



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**KEMİRİCİ MODELİNDE PARASETAMOL
KAYNAKLI DNA BAZ HASARI DÜZEYLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Eczacı Berin ALADAĞ

Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı

İzmir
2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**KEMİRİCİ MODELİNDE PARASETAMOL
KAYNAKLI DNA BAZ HASARI DÜZEYLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Eczacı Berin ALADAĞ

Danışman
Prof. Dr. Hilmi ORHAN

Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı
Tezli Yüksek Lisans Programı

İzmir
2022

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof. Dr. Hilmi ORHAN

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Hande GÜRER ORHAN

Üye : Prof. Dr. Halit Sinan SÜZEN

Üye : Prof. Dr. Zeki TOPÇU

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Lutfiye Sumru SÖZER KARADAĞLI

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: 9 Ağustos 2022

Önsöz

Lisans eğitimim sırasında yer aldığım laboratuvar pratikleri ve Torino Üniversitesi'nde uygulamalı bir şekilde yaptığım bitirme tezim sonucunda mesleki olarak akademik çalışmalarda yer almaktan daha çok keyif aldığımı farkına vardım. Yurtdışında doktora yapma hayalimi gerçekleştirmek için önce yeni teknikler ardından bilimsel bir çalışmanın nasıl gerçekleştirildiğini öğrenmem gerekiyordu. Bu yüzden lisans döneminde aldığım dersler arasında ilgimi daha çok çeken Farmasötik Toksikoloji alanında yüksek lisans eğitimime başlamaya karar verdim.

2019 yılında Prof. Dr. Hilmi ORHAN hocamın danışmanlığında başlayan lisansüstü eğitimim yoğun ders dönemi ve tez çalışmam için yazacağımız projenin literatür araştırması ile hızlı bir şekilde ilerlerken COVID-19 pandemisi meydana geldi. *“Hayat siz planlar yaparken başınıza gelenlerdir.”* sözünü hepimizin birebir yaşadığı bu dönemde ben de elimde olmayan sebeplerden dolayı planladığımdan farklı bir şekilde yüksek lisans eğitimime devam etmek durumunda kaldım.

Tez dönemine başlarken farkında olmadığım birçok zorlukla karşı karşıya kaldım. Çalışmamda kullandığım sarf ve kimyasalların döviz kurundaki ani değişimlere göre artışı ve bunun beraberinde getirdiği prosedürler, meydana gelen cihaz arızaları ve deneylerimi gerçekleştirmek için alternatif yollar üretmek benim için zorlayıcıydı, ancak bu süreçte yaşadıklarım bana çözüm odaklı bir yaklaşım kazandırmış oldu.

3 yıl süren bu çalışma sayesinde öğrendiğim pek çok teknik ve bilginin yanında çok güzel arkadaşlıklar kazanmamı da sağladığı için mutluyum. Hayatımın bundan sonraki kısmını heyecanla bekliyorum ve bu çalışmadan kazandıklarımın bana yol gösterici olmasını diliyorum.

İzmir, 9.08.2022

Berin ALADAĞ

Özet

Kemirici Modelinde Parasetamol Kaynaklı DNA Baz Hasarı Düzeylerinin Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında parasetamolün (PAR) tek aşırı dozda C57BL/6J farelerde böbrek ve karaciğerde hem nükleer hem de mitokondriyel DNA'da oksidatif baz hasarına neden olup olmadığı araştırılmıştır. Parasetamol kaynaklı karaciğer hasarı mekanizmasında mitokondriyel oksidatif stres temel rol oynadığı için mitokondriye özgü bir antioksidan olan MitoTempo'nun olası baz hasarı üzerindeki etkisi de incelenmiştir. İlaç uygulamasının ardından böbrek ve karaciğer dokuları çıkartılarak nükleer DNA (nDNA) ve mitokondriyel DNA (mtDNA) izolasyonu yapılmıştır. Her iki DNA'nın uygun primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmasıyla birbirleriyle çapraz kontaminasyon olup olmadığı belirlenmiştir. nDNA ve mtDNA enzimatik yoldan hidroliz edilmiş ve 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) miktarları belirlenmiştir. Sonuçlar PAR'a maruz bırakılan hayvanların hem karaciğer hem böbrek dokusunda gerek nDNA gerekse mtDNA'larında kontrol grubuna kıyasla 8-OHdG düzeylerinin artmadığını, tersine böbrek nDNA'sında önemli oranda azaldığını göstermiştir. Paradoksal bir şekilde PAR+MitoTempo grubunda 8-OHdG düzeyi, PAR grubuna kıyasla önemli derecede artmıştır. Buna karşın PAR+MitoTempo uygulanan hayvanların karaciğer nDNA'sı 8-OHdG düzeyleri gerek kontrol gerekse PAR grubuna göre önemli derecede düşük bulunmuştur. Karaciğer ve böbrekte DNA oksidatif baz hasarı ve MitoTempo uygulaması açısından farklı bir örüntü gözlenmiştir. MitoTempo'nun literatürde PAR'ın indüklediği karaciğer toksisitesini azaltmasına karşın böbrekte oksidatif DNA hasarını azaltmaması, tam tersine aksine şiddetlendirmesi, daha önceki böbrek toksisite mekanizmasının hepatotoksisite mekanizmasından farklı olduğu gözlemlerimizi desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler; Parasetamol; DNA baz hasarı; hepatotoksisite; nefrotoksisite; *in vivo* hayvan modeli

Abstract

Determination of Paracetamol-Induced DNA Base Damage Levels in a Rodent Model

In this thesis, it was investigated whether application to a single overdose of paracetamol (PAR) caused an oxidative base damage in both nuclear and mitochondrial DNA isolated from kidney and the liver of C57BL/6J mice. Since mitochondrial oxidative stress plays a fundamental role in the paracetamol-induced liver damage, the effect of MitoTempo, which is an antioxidant specific for mitochondria, on the potential base damage has also been studied. After the administration of the drug, kidney and liver tissue samples have been taken, and nuclear DNA (nDNA) and mitochondrial DNA (mtDNA) isolations were carried out. Both types of DNA samples were amplified by PCR using with appropriate primers to test for cross contamination with each other. nDNA and mtDNA were hydrolyzed enzymatically, and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) levels were determined. The results have shown that the 8-OHdG levels were not significantly increased in the nDNA and mtDNA of both the liver and the kidneys in PAR-treated group relative to the control, while they were significantly reduced in the renal nDNA of PAR group. Paradoxically, 8-OHdG levels in the PAR+MitoTempo group were significantly increased compared to the PAR group. However, 8-OHdG levels in the liver nDNA were found to be significantly lower in the PAR+MitoTempo group as compared to both the Control and PAR group. A different pattern of MitoTempo has been observed regarding its effect on oxidative DNA base damage in liver and kidney. The fact that MitoTempo can effectively reverse PAR-induced liver toxicity in literature, while it does not decrease, even increase the oxidative base damage in nDNA of kidney, supports our previous observation that mechanisms of kidney injury differ from the one for the liver.

Keywords; Paracetamol; DNA base damage; hepatotoxicity; nephrotoxicity; *in vivo* animal model

İçindekiler

Önsöz.....	II
Özet.....	III
Abstract.....	IV
İçindekiler	V
Tablolar Dizini.....	VIII
Şekiller Dizini	IX
Kısaltma Listesi	XII
Giriş	1
Genel Bilgiler	4
2.1. Parasetamol	4
2.1.1. Parasetamolün Farmakokinetiği ve Metabolizması	4
2.1.2. Parasetamolün Toksisitesi	5
2.1.2.1. Bilinen Toksik Etkiler	5
2.1.2.1.1. Karaciğer Toksisitesi	5
2.1.2.1.2. Böbrek Toksisitesi	6
2.1.2.2. Parasetamol'e Atfedilen Diğer Toksik Etkiler	7
2.2. Oksidatif Stres	8
2.2.1. Oksidatif Strese Bağlı Oluşan Hasar.....	8
2.2.1.1. Nükleer DNA ve Mitokondriyel DNA Hasarı.....	10
2.2.1.2. DNA Baz Hasarı	12
2.3. Oksidatif Strese Bağlı Oluşan DNA Hasarını Belirleme Yöntemleri.....	13
Gereç ve Yöntem	15
3.1. Gereç.....	15
3.1.1. Kullanılan Sarf ve Kimyasal Maddeler	15
3.1.2. Kullanılan Gereçler.....	17
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler	18
3.1.3.1. Mitokondriyel DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler.....	18
3.1.3.2. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler.....	18
3.1.4. Kullanılan Deney Hayvanları.....	18
3.2. Yöntem	19
3.2.1. Deney Planı	19
3.2.2. Mitokondriyel DNA İzolasyonu	20

3.2.3. Nükleer DNA İzolasyonu.....	21
3.2.4. İzole Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Saflığının Belirlenmesi	22
3.2.5. İzole Edilen DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılmasıyla Nükleer-Mitokondriyel Çapraz Kontaminasyonunun Belirlenmesi	23
3.2.6. Agaroz Jel Elektforezi.....	25
3.2.7. Nükleozid Hidrolitik Enzim Karışımı İle DNA Hidrolizi.....	26
3.2.8. İzole Edilmiş DNA'da 8-OHdG Miktarının ELISA Tekniği ile Belirlenmesi	26
3.2.8.1. Yöntemin Esası.....	27
3.2.8.2. Deney Basamakları	27
3.2.9. Histopatolojik Analiz	29
3.2.10. İstatistiksel Değerlendirme.....	29
Bulgular.....	30
4.1. Ön Uyumlandırma Çalışması Bulguları	30
4.1.1. İzole Edilen DNA'nın Konsantrasyonu ve Saflığına Ait Bulgular	30
4.1.2. DNA'da 8-OHdG Miktarının ELISA Tekniği ile Belirlenmesine Ait Bulgular.....	31
4.1.2.1. Ön Uyumlandırma Çalışmasının Kalibrasyon Grafiği	32
4.1.2.2. Böbrek Dokusundan İzole Edilen DNA'da 8-OHdG Miktarı Tayini	33
4.2. Esas Çalışmaya Ait Bulgular	34
4.2.1. İzole Edilen DNA'nın Konsantrasyonu ve Saflığına Ait Bulgular	34
4.2.2. PCR ile Çoğaltılan DNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektforezine ait Bulgular.....	35
4.2.2.1. Böbrekten İzole Edilen DNA'nın PCR ile Çoğaltılmasıyla Oluşan Ürünlerin Agaroz Jel Görüntüleri.....	36
4.2.2.2. Karaciğerden İzole Edilen DNA'nın PCR ile Çoğaltılmasıyla Oluşan Ürünlerin Agaroz Jel Görüntüleri.....	39
4.2.3. DNA'da 8-OHdG Miktarının ELISA Tekniği ile Belirlenmesine Ait Bulgular.....	42
4.2.3.1. Kalibrasyon Grafiği	42
4.2.3.2. Böbrekten İzole Edilen DNA'da 8-OHdG Miktarı Tayini.....	43
4.2.3.3. Karaciğerden İzole Edilen DNA'da 8-OHdG Miktarı Tayini	45

4.2.4. Histopatolojik Analiz Bulguları.....	48
Tartışma	50
Sonuç ve Öneriler	59
Kaynaklar	60
Ekler	75
Teşekkür	76
Özgeçmiş	78



Tablolar Dizini

Tablo 1. Deneysel çalışma planı özeti.....	20
Tablo 2. Çalışmada kullanılan forward (F) ve reverse (R) primerler.....	24
Tablo 3. PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve 25 µL reaksiyon hacminde final konsantrasyonları.....	25
Tablo 4. Fare böbrek dokusundan izole edilen mtDNA ve nDNA'nın nanodrop ölçüm sonuçları.....	31
Tablo 5. Kalibrasyon eğrisinin denklemi, denkleme ait veriler ve regresyon katsayısı (R^2).....	32
Tablo 6. Fare BÖBREK dokusundan izole edilen mtDNA ve nDNA'nın nanodrop ölçüm sonuçları.....	34
Tablo 7. Fare KARACİĞER dokusundan izole edilen mtDNA ve nDNA'nın nanodrop ölçüm sonuçları.....	35
Tablo 8. Kalibrasyon eğrisinin denklemi, denkleme ait veriler ve regresyon katsayısı (R^2).....	43

Şekiller Dizini

Şekil 1. Parasetamolün kimyasal yapısı.....	4
Şekil 2. Oksidatif stresin neden olduğu hasarlar (Földesi, 2020)	9
Şekil 3. Guanin bazının C8-OH katım radikalinin reaksiyonları sonucu meydana gelen 8-OH-Gua ve FapyGua yapılarının oluşumu (Dizdaroglu, 2012).....	12
Şekil 4. ELISA test kiti 8-OHdG standartlarının seri dilüsyon ile hazırlanışı.....	28
Şekil 5. Ön uyumlandırma çalışmasında kullanılan 8-OHdG kalibrasyon eğrisi.....	32
Şekil 6. Fare böbrek dokusundan izole edilen mitokondriyel ve nükleer DNA’da ELISA tekniği ile ölçülen 8-OHdG miktarları. A: Fare böbrek dokusundan izole edilen mitokondriyel DNA; B: Fare böbrek dokusundan izole edilen nükleer DNA.	33
Şekil 7. Mitokondriyel 16S rRNA primeri (132 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Kontrol grubu mtDNA, 2: MitoTempo grubu mtDNA, 3: PAR grubu mtDNA, 4: Kontrol grubu nDNA, 5:MitoTempo grubu nDNA, 6:PAR grubu nDNA, 7:Negatif Kontrol (DNA içermeyen örnek)	36
Şekil 8. Mitokondriyel ND1 primeri (84 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Kontrol grubu mtDNA, 2: MitoTempo grubu mtDNA, 3: PAR grubu mtDNA, 4: Kontrol grubu nDNA, 5: MitoTempo grubu nDNA, 6: PAR grubu nDNA, 7: Negatif Kontrol (DNA içermeyen örnek)	37
Şekil 9. Mitokondriyel DNA-B6 primeri (359 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Kontrol grubu mtDNA, 2: MitoTempo grubu mtDNA, 3: PAR grubu mtDNA, 4: Kontrol grubu nDNA, 5: MitoTempo grubu nDNA, 6: PAR grubu nDNA, 7: Negatif Kontrol (DNA içermeyen örnek)	37
Şekil 10. Nükleer Hekzokinaz 2 primeri (122 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Kontrol grubu mtDNA, 2: MitoTempo grubu mtDNA, 3: PAR grubu mtDNA, 4: Kontrol grubu nDNA, 5: MitoTempo grubu nDNA, 6: PAR grubu nDNA, 7: Negatif Kontrol (DNA içermeyen örnek)	38
Şekil 11. Nükleer Prostaglandin E primeri (189 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Kontrol grubu mtDNA, 2: MitoTempo grubu mtDNA, 3: PAR grubu mtDNA.....	38
Şekil 12. Nükleer Prostaglandin E primeri (189 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Negatif Kontrol, 2: Kontrol grubu nDNA, 3: MitoTempo grubu nDNA, 4: PAR grubu nDNA.....	39

- Şekil 13.** Mitokondriyel 16S rRNA primeri (132 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Kontrol grubu mtDNA, 2: MitoTempo grubu mtDNA, 3: PAR grubu mtDNA, 4: Kontrol grubu nDNA, 5: MitoTempo grubu nDNA, 6: PAR grubu nDNA, 7: Negatif Kontrol (DNA içermeyen örnek)..... 40
- Şekil 14.** Mitokondriyel ND1 primeri (84 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Kontrol grubu mtDNA, 2: MitoTempo grubu mtDNA, 3: PAR grubu mtDNA, 4: Kontrol grubu nDNA, 5: MitoTempo grubu nDNA, 6: PAR grubu nDNA, 7: Negatif Kontrol (DNA içermeyen örnek) 40
- Şekil 15.** Mitokondriyel DNA-B6 primeri (359 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Kontrol grubu mtDNA, 2: MitoTempo grubu mtDNA, 3: PAR grubu mtDNA, 4: Kontrol grubu nDNA, 5: MitoTempo grubu nDNA, 6: PAR grubu nDNA, 7: Negatif Kontrol (DNA içermeyen örnek) 41
- Şekil 16.** Nükleer Hekzokinaz 2 primeri (122 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Kontrol grubu mtDNA, 2: MitoTempo grubu mtDNA, 3: Kontrol grubu nDNA, 4: PAR grubu nDNA, 5: MitoTempo grubu nDNA, 6: Negatif Kontrol 41
- Şekil 17.** Nükleer Prostaglandin E primeri (189 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Kontrol grubu mtDNA, 2: MitoTempo grubu mtDNA, 3: PAR grubu mtDNA, 4: Kontrol grubu nDNA, 5: MitoTempo grubu nDNA, 6: PAR grubu nDNA, 7: Negatif Kontrol (DNA içermeyen örnek) 42
- Şekil 18.** Esas Çalışmaya Ait Kalibrasyon Eğrisi..... 43
- Şekil 19.** Fare böbrek dokusundan izole edilen mitokondriyel DNA'da ELISA tekniği ile ölçülen 8-OHdG miktarları. İzole edilmiş DNA, 1 saat 37°C'de enzim karışımı ile inkübe edilip hidroliz işlemi tamamlandıktan sonra ELISA kit aracılığıyla 450 nm'de her bir örneğin yaptığı absorpsiyon ölçülmüş, devamında örneklerin 8-OHdG miktarları, kalibrasyon çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon doğrusu denklemi aracılığıyla hesaplanmıştır. Hesaplama sonucu bulunan DNA miktarları, her bir örneğin ng DNA miktarına bölünerek normalize edilmiş ve grafiğe geçirilmiştir. 44
- Şekil 20.** Fare böbrek dokusundan izole edilen nükleer DNA'da ELISA tekniği ile ölçülen 8-OHdG miktarları. İzole edilmiş DNA, 1 saat 37°C'de enzim karışımı ile inkübe edilip hidroliz işlemi tamamlandıktan sonra ELISA kit aracılığıyla 450 nm'de

her bir örneğin yaptığı aborbans ölçülmüş, devamında örneklerin 8-OHdG miktarları, kalibrasyon çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon doğrusu denklemi aracılığıyla hesaplanmıştır. Hesaplama sonucu bulunan 8-OHdG miktarları, her bir örneğin ng DNA miktarına bölünerek normalize edilmiş ve grafiğe geçirilmiştir (*, kontrol grubuna göre $*p \leq 0.05$; #, PAR grubuna göre $\#p \leq 0.05$). 45

Şekil 21. Fare karaciğer dokusundan izole edilen mitokondriyel DNA'da ELISA tekniği ile ölçülen 8-OHdG miktarları. İzole edilmiş DNA, 1 saat 37°C'de enzim karışımı ile inkübe edilip hidroliz işlemi tamamlandıktan sonra ELISA kit aracılığıyla 450 nm'de her bir örneğin yaptığı aborbans ölçülmüş, devamında örneklerin 8-OHdG miktarları, kalibrasyon çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon doğrusu denklemi aracılığıyla hesaplanmıştır. Hesaplama sonucu bulunan 8-OHdG miktarları, her bir örneğin ng DNA miktarına bölünerek normalize edilmiş ve grafiğe geçirilmiştir. 46

Şekil 22. Fare karaciğer dokusundan izole edilen nükleer DNA'da ELISA tekniği ile ölçülen 8-OHdG miktarları. İzole edilmiş DNA, 1 saat 37°C'de enzim karışımı ile inkübe edilip hidroliz işlemi tamamlandıktan sonra ELISA kit aracılığıyla 450 nm'de her bir örneğin yaptığı aborbans ölçülmüş, devamında örneklerin 8-OHdG miktarları, kalibrasyon çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon doğrusu denklemi aracılığıyla hesaplanmıştır. Hesaplama sonucu bulunan 8-OHdG miktarları, her bir örneğin ng DNA miktarına bölünerek normalize edilmiş ve grafiğe geçirilmiştir (*, kontrol grubuna göre $*p \leq 0.05$; #, PAR grubuna göre $\#p \leq 0.05$). 47

Şekil 23. Böbrek dokusuna ait histopatolojik analiz görüntüleri. A: Kontrol grubu, Bowman kapsülü ve glomerülüs (okun işaret ettiği alan) B: Parasetamol grubu, daralmış Bowman kapsülü ve mezengial hücre aktivasyonu (okun işaret ettiği alan) C: Parasetamol+MitoTempo grubu, daralmış Bowman kapsülü ve kapiller dilatasyon (okun işaret ettiği alan). Büyütme boyutu 60X. 49

Kısaltma Listesi

AIF	: Apoptozis indükleyici faktör
4-HNE	: 4-hidroksi-2-nonenal
8-OHdG	: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
8-OH-Gua	: 8-hidroksiguanin
APAP	: Asetaminofen
ATP	: Adenozin trifosfat
BSA	: <i>Bovin serum albumin</i> , Sığır serum albümini
CAT	: Katalaz
Cu	: Bakır
CYP450	: Sitokrom P450
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EGTA	: Etilenglikol-bi(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraasetik asit
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i> , Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi
EMA	: European Medicines Agency
ETC	: Elektron transport zinciri
FDA	: Food and Drug Administration
Fe	: Demir
GC-MS	: Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometri

GPx	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Redükte glutasyon
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
JNK	: c-Jun <i>N</i> -terminal kinase
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi- Tandem Kütle Spektrometri
MAPK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MDA	: Malondialdehit
MPTP	: Mitokondriyel geçirgenlik dönüşüm poru
mtDNA	: Mitokondriyel DNA
NAPQI	: <i>N</i> -asetil- <i>p</i> -benzokinonimin
nDNA	: Nükleer DNA
NO [•]	: Nitrik oksit radikali
NSAİİ	: Nonsteroidal antiinflamatuar ilaç
O ₂ ^{•-}	: Süperoksit anyon radikali
OH [•]	: Hidroksil radikali
ONOO ⁻	: Peroksinitrit anyonu
PAP	: <i>p</i> -aminofenol
PAR	: Parasetamol
PAR-Cys	: Parasetamol sistein konjugatı
PAR-GSH	: Parasetamol glutasyon konjugatı
PBS	: <i>Phosphate buffered saline</i> , Fosfat tamponlu tuz çözeltisi

PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i> , Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PGES	: Prostaglandin endoperoksit sentaz
RAT	: Reaktif azot türleri
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOD	: Süperoksit dismutaz
SULT	: Sülfotransferaz
TBE	: Tris Borat EDTA tamponu
UGT	: UDP-glukuronozil transferaz
WHO	: <i>World Health Organization</i> , Dünya Sağlık Örgütü

Giriş

Temel İlaçlar Listesi (EML), bir halkın öncelikli sağlık hizmeti ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla en çok etkili ve güvenli olduğu düşünülen ilaçları içeren ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından düzenlenen bir ilaç listesidir (World Health Organization, 2021). Bu liste içerisinde yer alan parasetamol (PAR), migren atağı tedavisi, genel ağrı ve palyatif bakım için kullanılan en önemli ilaçlardan birisidir. Aynı zamanda günlük hayatta reçetesiz bir şekilde kolayca ulaşılabilen ve ağrı kesici-ateş düşürücü olarak sıklıkla kullanılan bir ilaç olduğundan dolayı parasetamol doz aşımı olguları sıklıkla görülmektedir.

PAR doz aşımına bağlı en önemli toksik etki, akut karaciğer yetmezliğine ve ölüme kadar gidebilen ciddi karaciğer hasarıdır (Prescott ve ark., 1971; Hodgman ve Garrard, 2012). Aşırı doz kullanımda indüklenen karaciğer toksisitesinin yanı sıra PAR böbrekte de hasar oluşturabilmektedir. Nefrotoksisite daha az yaygın olmasına rağmen Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada yüksek doz PAR kullanımında akut karaciğer hasarı gözlenen hastalarda ciddi böbrek hasarı meydana geldiği ve hastaların %34'üne renal replasman/transplantasyon tedavisi uygulanması gerektiği bildirilmiştir (Tujios ve ark., 2015). Bunun yanı sıra karaciğer hasarı gelişmeden de PAR'ın doğrudan nefrotoksik etkiye sahip olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Jeffery ve Lafferty, 1981; Cobden ve ark., 1982; Campbell ve Baylis, 1992; Eguia ve Materson, 1997). Şimdiye kadar aşırı doz PAR kullanımını sonucu karaciğerde oluşan toksisitenin mekanizması iyi bir şekilde araştırılmıştır. Doz aşımında yüksek miktarda oluşan *N*-asetil-*p*-benzokinonimin metabolitinin (NAPQI) glutatyon depolarını tükettiği, ortamdaki çok sayıda hücrel proteine -özellikle mitokondriyel proteinlere- bağlandığı gösterilmiş ve oksidatif strese neden olduğu, bunun da toksisitede temel rol oynadığı ortaya konmuştur (Jaeschke ve Ramachandran, 2012). Böbrek toksisite mekanizması ise tam olarak aydınlatılmasa da karaciğerden farklı olduğunu gösteren çalışmalar vardır. PAR'ın indüklediği karaciğer toksisitesinde antidot olarak kullanılan *N*-asetilsisteinin nefrotoksisiteyi önlememesi, aksine daha da şiddetlendirmesi ve karaciğer toksisite mekanizmasında temel basamaklar olan JNK fosforilasyonu ve mitokondriye translokasyonunun gerçekleşmemesi bu çalışmalara örnek verilebilir (Blakely ve McDonald, 1995; Akakpo ve ark., 2020).

Literatürde yapılan birçok in vivo ve in vitro çalışmada PAR kaynaklı oksidatif stres, kanıtlarıyla gösterilmiştir (Wang ve ark., 2017). Söz konusu yüksek oksidatif stres protein, lipid ve DNA gibi hücre için hayati öneme sahip moleküllere zarar verebilmektedir. Hücrelerde çekirdekte ve enerji üretim merkezi organelimiz olan mitokondrilerde DNA bulunmaktadır. Oksidatif stres sonucu aşırı miktarda oluşan reaktif oksijen ve azot türleri, nükleer ve mitokondriyel DNA'da oksidatif hasara neden olabilmektedir (Fromenty, 2020). DNA'da meydana gelen hasar önemlidir çünkü yaşlanma, kanser, immün sistem hastalıkları ve dejeneratif hastalıklar gibi pek çok hastalığın nedeni olabilmektedir (Berstain ve Gensler, 1993; Jena, 2012).

PAR'ın hamilelerde ve bebeklerde dahi en güvenli ateş düşürücü olarak reçetelenmesi ve 60 yıla yakın bir süredir tüm dünyada kullanımda olması, bir taraftan doz aşımı durumunda yol açtığı başta karaciğer toksisitesinin ayrıntılı çalışılmasını, diğer taraftan ise insan sağlığı üzerinde henüz fark edilememiş potansiyel etkileri olup olmadığı konusunda epidemiyolojik çalışmalar yapılabilmesini sağlamıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, PAR kullanımının çeşitli hastalık ve toksik etkilerle ilişkili olabileceğine dair bir takım şüpheler uyandırmıştır (Weiss, 2016; Kristensen ve ark., 2016; McCrae ve ark., 2018), bunlardan birisi PAR'ın genotoksik etki potansiyeline ilişkindir. Bu konuda yapılan az sayıda temel araştırma çelişkili sonuçlar vermiştir (Dybing ve ark., 1984; Hongso ve ark., 1994; Rannug ve ark., 1995; Bergman, Müller ve Teigen, 1996). Bu nedenle bu tez çalışmasında söz konusu genotoksik etki olasılığı, akut yüksek doz PAR'a maruz bırakılan hayvan modelinde araştırılmıştır. Bu amaçla hepatotoksik düzeylerde tek doz PAR uygulanan sıçanlar 24 saat sonra ötenazi edilerek kalp içinden kan toplanmış, karaciğer ve böbrek dokuları çıkarılmıştır. Her iki dokudan hem genomik hem mitokondriyel DNA izole edilmiş ve hidroliz edildikten sonra her ikisinde 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeyleri belirlenmiştir.

PAR uygulanan hayvanlardan elde edilen bu sonuçlar, sadece PAR çözücüsü enjekte edilen kontrol grubundaki hayvanların sonuçları ile kıyaslanmıştır. Yanı sıra 3. bir grup hayvana PAR ve mitokondriye özgü bir antioksidan olan MitoTempo uygulanmıştır. Karaciğer mitokondrilerinde PAR'ın indüklediği oksidatif stresi engelleyerek karaciğer hasarını azalttığı gösterilen MitoTemponun (Du ve ark., 2017) aynı şekilde akut böbrek hasarında da etkisinin olup olmadığı ve dolayısıyla

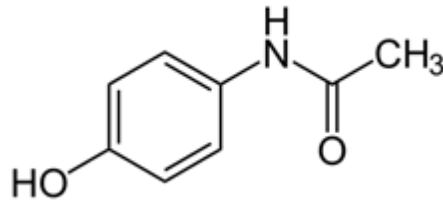
böbrek mitokondriyel DNA'sında oksidatif guanin hasarını etkileyip etkilemediği incelenmiştir.



Genel Bilgiler

2.1. Parasetamol

Güçlü bir analjezik ve antipiretik olan parasetamol, asetaminofen ve *N*-asetil-*p*-aminofenol (APAP) olarak da adlandırılmaktadır. Parasetamolün kimyasal yapısı Şekil 1’de verilmiştir (U.S. Environmental Protection Agency, 2022).



Şekil 1. Parasetamolün kimyasal yapısı

Parasetamolün keşfedilmesinin üzerinden 100 yılı aşkın süre geçmesine ve pratikte sık kullanılmasına rağmen hala farmakolojik etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan ilk araştırmalarda etki mekanizması, analjezik ve antipiretik özellikleri benzer olan aspirin gibi klasik nonsteroidal antiinflatuar ilaçlarla (NSAİİ) karşılaştırılmıştır. NSAİİ’lerin siklooksijenaz (COX) bağımlı prostaglandin sentezini inhibe ettiği iyi bilinirken parasetamolün daha zayıf bir şekilde bu sentezi inhibe ettiği ve bu yüzden periferdeki inflamasyonlara etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Vane, 1971; Swierkosz ve ark., 2002).

2.1.1. Parasetamolün Farmakokinetiği ve Metabolizması

PAR oral yoldan kullanıldığında hızlı bir şekilde gastrointestinal kanaldan emilir. Kullanan kişinin açlık ve tokluk durumuna göre absorpsiyon süresi değişebilir. Terapötik dozlarda alındıktan sonra kandaki yarı ömrü 1.5 - 3 saattir, bu süre toksik dozlarda ve/veya karaciğer hasarı olduğunda uzamaktadır (McGill ve Jaeschke, 2013).

PAR metabolizmasının 3 farklı yolu vardır; ana molekülün doğrudan glukronidasyonu, sülfasyon/sülfasyonu ve sitokrom P450 (CYP450) aracılığı

mikrozomal oksidasyonun ardından glutatyon konjugasyonudur. Terapötik dozlarda alınan PAR'ın %90'dan fazlası karaciğerde *UDP-glukronozil transferaz* (UGT) enzimi ile glukuronid ve *sülfotransferaz* (SULT) enzimi ile sülfat konjugatlarına dönüştürülmektedir. Bu inaktif konjugatlar, idrar ve safra yoluyla vücuttan uzaklaştırılır. %4 kadarı ise başta CYP2E1 olmak üzere CYP3A4 ve CYP1A2 enzimleri aracılığıyla *N*-asetil-*p*-benzokinonimin (NAPQI) elektrofilik metabolitine oksitlenir. Reaktif yapıda olmasına karşın bu miktarda oluşan NAPQI, hepatositlerde glutatyon (GSH) ile konjuge edilerek merkaptürik asit veya sistein konjugatı olarak vücuttan uzaklaştırılır ve herhangi bir toksisite gözlenmez. Terapötik dozda alındığında %1 oranında PAR ise değişmeden olduğu gibi idrarla atılır (Larson, 2007; McGill ve Jaeschke, 2013).

Paradoksal bir şekilde PAR'ın ağrı kesici/analjezik etkisinin toksisitesinden sorumlu olan NAPQI elektrofilik metabolitinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Andersson ve ark., 2011).

2.1.2. Parasetamolün Toksisitesi

2.1.2.1. Bilinen Toksik Etkiler

2.1.2.1.1. Karaciğer Toksisitesi

PAR bir yetişkin için günde $\leq 4g$ terapötik dozlarda kullanıldığında güvenli bir ilaç olarak kabul edilir (Dart ve Bailey, 2007). Ancak terapötik dozların üzerinde alınması durumunda çoğunlukla ölümcül olan hepatoselüler nekroz ve akut karaciğer hasarına yol açmaktadır. PAR'ın aşırı doz kullanımında hepatotoksik bir etki gösterdiğini fark eden Davidson ve Eastham, PAR doz aşımı sonrası hepatotoksisite gelişen ve devamında ölen iki kişiyi bildirmişlerdir. Bu bireylerden alınan karaciğer kesitlerinin mikroskopik incelemesi sonucu fulminan hepatik nekroz tespit edilmiştir (Davidson ve Eastham, 1966). Bu ilk rapordan sonra, birçok PAR doz aşımı vakası rapor edilmiştir (Hinson ve ark., 2010).

Oluşan hasarın mekanizması ilacın biyotransformasyonu ile ilişkilidir. Doz aşımı durumunda PAR'ı doğrudan konjuge eden sülfat depoları tükenince diğer iki biyotransformasyon yolağı olan glukronik asit konjugasyonu ve reaktif NAPQI

oluşumu yolaklarına giden ilaç miktarı artmaya başlar. Bu koşullarda oluşum hızı artan NAPQI, hepatositlerdeki glutatyon depolarını tüketir, çünkü GSH biyosentez hızı, NAPQI oluşum hızına yetişemez. Hücre içinde kolayca bağlandığı GSH'ı bulamayıp serbest kalan NAPQI, bir miktar sitozolik proteinin yanında çok fazla miktarda mitokondriyel proteine bağlanarak onları alkiler ve mitokondri içerisinde oksidatif stresin artmasına neden olur. Oksidatif stres sonucu ortamda miktarı aşırı artan süperoksit anyon radikalleri ($O_2^{\cdot-}$), hücrede fizyolojik olarak bulunan nitrik oksit (NO^{\cdot}) ile birleşerek peroksinitrit anyonunu ($ONOO^-$) oluşturur. Mitokondriyel glutatyonun tükenmesi ve bu reaksiyonlarla artan hücre içi oksidatif ve nitrozatif stres sonucunda *Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK)* aracılıklı olaylar dizisi aktifleşir ve sitozolik c-Jun N-terminal kinase (JNK) fosforile olur. Fosforillenen JNK (p-JNK) mitokondri dışı membranındaki proteinlere bağlanarak mitokondri içine girer ve mitokondriyel oksidatif stresin daha da artmasına neden olur. Bunun sonucunda *mitokondriyel geçirgenlik dönüşüm porları (MPTP)* oluşumu patolojik bir biçimde indüklenir. MPTP'nin indüklenmesiyle sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz G gibi mitokondriyel proteinler sitozole salınır. Nükleusa giren AIF ve endonükleaz G, DNA fragmentasyonuna neden olur ve hepatositlerin onkotik nekrozuna yol açar (Bajt ve ark., 2006; 2008; McGill ve Jaeschke, 2013; Ramachandran ve Jaeschke, 2018).

2.1.2.1.2. Böbrek Toksisitesi

Yüksek doz PAR'a maruz kalma sonucu oluşan bir diğer toksisite de böbrek hasarıdır. Literatürde kemirici modellerinde yapılan çalışmalarda ve doz aşımı sonrasında rapor edilen klinik olgularda böbrek toksisitesinin hepatotoksisite ile birlikte ya da tek başına meydana geldiği gösterilmiştir (Davidson ve Eastham, 1966; Trumper ve ark., 1992; Lucas ve ark., 2000; Stern ve ark., 2005a; 2005b; Pakravan ve ark., 2009; Chen ve ark., 2015).

PAR kaynaklı nefrotoksisitenin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır ancak hepatotoksisite mekanizmasından farklı olduğu düşünülmektedir. Karaciğer hasarı olmadan böbrek hasarı gelişebilmesi (Eguia ve Materson, 1997), in vitro böbrek modellerinde ve karaciğeri çıkarılmış farelerde nefrotoksisite gözlenmesi (Breen ve ark., 1982; Hoivik ve ark., 1996), karaciğer hasarında kullanılan antidot N-

asetilsisteinin böbrek toksisitesini önlememesi (Blakely ve McDonald, 1995) tersine şiddetlendirmesi (Jones ve Vale, 1993) bu düşüncenin nedenlerindedir. Ayrıca Kansas Üniversitesi ile araştırma grubumuzun iş birliği yaptığı bir çalışmada PAR ile indüklenen böbrek toksisitesinde, farelerin karaciğer ve böbrek dokularında GSH tükenmesi görülürken böbrekte JNK aktivasyonu ve aktive olan JNK'nin mitokondriye translokasyonunun olmaması, toksisite mekanizmasındaki farklılığın başka bir kanıtıdır (Akakpo ve ark., 2020).

PAR'ın indüklediği böbrek toksisitesinde metaboliti olan PAR-Cys'in β -liyaz aracılıklı biyoaktivasyonunun rol alıp almadığı araştırma grubumuzda bir doktora tezi kapsamında çalışılmıştır. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar sonucunda PAR-Cys'in mitokondriyel enzimler (matriks ve mitokondriyel membran) başta olmak üzere fare ve insan β -liyaz enzimi tarafından substrat olarak kullanıldığı, reaksiyon sonucunda reaktif özellikte bir takım ara ürün/ürünler oluştuğu ve bunların MPTP'yi indüklediği gösterilmiştir (Karakuş, 2021).

2.1.2.2. Parasetamol'e Atfedilen Diğer Toksik Etkiler

Yakın yıllarda yoğunlaşan bazı çalışmalar, PAR'ın karaciğer ve böbrek toksisitesi dışındaki diğer olası advers etkilerine odaklanmaktadır. Hem deneysel modellerde hem de klinik ve epidemiyolojik çalışmalarda nörolojik, pulmoner, endokrin ve nörogelişimsel toksisite olasılığı bildirilmiştir (Kristensen ve ark., 2016; Kennon-McGill ve McGill, 2017; Bauer ve ark., 2018; Konkel, 2018).

Özellikle hamilelik sırasında PAR kullanan kadınların çocuklarında ilacın toksik etkilerini değerlendirmek önemlidir. Şu an PAR, hamile kadınlar arasında en yaygın kullanılan ağrı kesici ve ateş düşürücü ilaçtır. FDA ve EMA'nın da dahil olduğu devlet sağlık otoriteleri belirtildiği şekilde kullanıldığında PAR'ın hamilelik döneminde uygun olduğunu düşünmekte ve kullanımını önermektedir (Food and Drug Administration, 2015; European Medicines Agency, 2019).

2021 yılında alanında uzman bilim insanları, PAR'a doğum öncesinde maruz kaldığında fetüste bazı nörogelişimsel, üreme ve ürogenital bozuklukların riskinin arttığını gösteren deneysel ve epidemiyolojik çalışmaları özetlemişler ve ilacın hamilelik döneminde kullanımını konusunun yeniden değerlendirilmesi çağrısında

bulunmuşlardır (Bauer ve ark., 2021). Bir başka PAR ilişkili toksik etki, pulmoner sistemdedir; konjenital ya da çocukluk çağında PAR'a maruz kalmanın ileri yaşlarda astım gelişmesiyle ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Shaheen ve ark., 2005).

Aşırı doz PAR'a bağlı toksisite mekanizması bilinen akut karaciğer hasarı ve buraya kadar özetlenen diğer potansiyel advers etkilerde hücrel oksidatif stresin önemli rol oynadığı bilinmektedir.

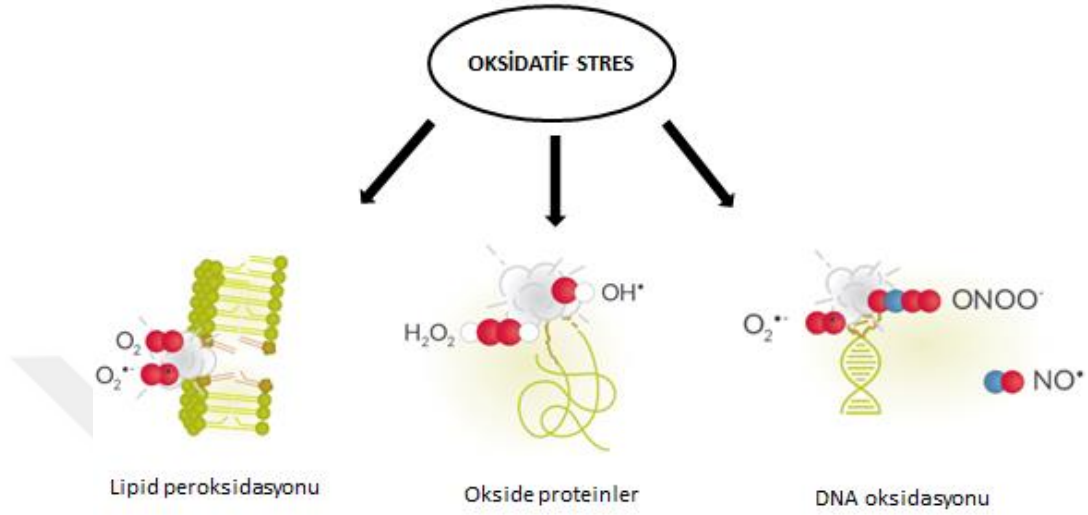
2.2. Oksidatif Stres

Temel hücrel işlevlerde önemli rolü olan moleküler oksijen (O_2), aerobik metabolizma sonucu tamamen suya indirgenemediğinde ciddi tehdit oluşturan süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) vb. birçok reaktif yapı oluşmaktadır. Bunların hücrel ortamda çevresindeki molekülleri oksitleme potansiyelleri çok yüksektir. Oluşan bu reaktif yapıların zararlı etkilerine karşı hücreyi savunan glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) gibi enzimler varken; diyet ile alınan vitamin C (askorbik asit), vitamin E (α -tokoferol) gibi takviyeler ve vücutta sentezlenen GSH gibi enzimatik olmayan antioksidanlar da mevcuttur ve normal koşullarda belirli bir düzeye kadar oluşan bu tür reaktif yapılara karşı koruma sağlayabilmektedirler. Ancak bu çoklu bileşenlerden oluşan antioksidan sistemin yetersiz kaldığı ve/veya reaktif oksijen türlerinin (ROT) aşırı miktarda oluştuğu durumlarda oksidatif/antioksidatif denge bozulur ve oksidatif stres meydana gelir (Dalton ve ark., 1999; Scandalios, 2005). Oksidatif stresin belirli bir süre geriye döndürülemediği durumlarda ise hücrel moleküller ve hücre ya da organel membranı, DNA, enzimler vb. yapılar üzerinde oksidatif hasar oluşur. Bu aşamada devreye giren diğer bazı savunma sistemlerinin de yetersiz kalması bu hasarın kalıcı olmasına yol açabilir (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

2.2.1. Oksidatif Strese Bağlı Oluşan Hasar

Hücrede serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasındaki hassas denge bozulduğunda oksidatif strese bağlı olarak hasar meydana gelmektedir. Bu hasar

elektron yönünden zengin olan DNA, lipid, protein gibi makromolekülleri hedef almaktadır (Valavanidis ve ark., 2006).



Şekil 2. Oksidatif stresin neden olduğu hasarlar (Földesi, 2020)

Hücre ve organel membranlarında çok miktarda bulunan doymamış yağ asitleri, oksidatif stres durumunda serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Bu peroksidasyon sonucu membranlarda oluşan yapısal ve işlevsel bozukluğun yanı sıra membran lipitlerinden malondialdehit (MDA), 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) gibi reaktif son ürünler de oluşmaktadır. Oksidatif hasarın göstergesi olan MDA, DNA ile etkileşime girerek katım ürünleri oluşturur (Marnett, 1999). 4-HNE proteinleri modifiye ederek işlevlerinin bozulmasına ve GSH konsantrasyonunu azaltarak antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalmasına neden olmaktadır (Uchida ve ark., 1999, Ito ve ark., 2019).

Hücre proteinleri serbest radikaller için kritik hedeflerden biridir ve yapılarında bulunan aminoasit çeşidine göre hasardan etkilenme dereceleri değişmektedir. Özellikle proteinlerin sistein ve metiyonin aminoasitleri, oksidasyona en duyarlı bileşenleridir. Proteinlerde oksidasyonu sonucu aktivite kayıpları, katlanma

problemleri, konformasyonel değişiklikler meydana gelmektedir. Vücutta temel rol oynayan proteinler gen regülasyonunda görevli olduklarından ve hücrelerin yapısında yer aldıklarından dolayı önemlidirler. Hücrede pek çok yaşamsal işlevin sürdürülmesinde görevli olan enzimler de protein yapısında oldukları için serbest radikallerle etkileştikten sonra enzim aktivitelerinde değişiklikler meydana gelmektedir (Stadtman ve Levine, 2003).

2.2.1.1. Nükleer DNA ve Mitokondriyel DNA Hasarı

Genetik materyalin yapısında endojen veya eksojen faktörlerin meydana getirdiği tüm değişikliklere “DNA hasarı” adı verilir (Kulaksız ve Sancar, 2007). Kararlı bir yapıda olmasına rağmen nükleer DNA, kendiliğinden gelişen oksidatif hasara uğrayabilmekte veya proteinler ve lipidlerde olduğu gibi oksidatif stres sonucu hasar görebilmektedir.

Oksidatif stres sonucu ortamda artan serbest radikaller DNA’da yapısal değişikliklere yol açarak esas olarak pürin-primidin baz modifikasyonlarına neden olmaktadır. Bunun dışında riboz şeker hasarı, abazik bölgeler, zincir kırıkları ve DNA-protein çapraz bağlanmaları gibi hasarlar da oluşturabilmekte ve DNA’nın yapısını önemli derecede etkileyebilmektedir. Bu hasarlar “oksidatif DNA hasarı” olarak adlandırılır ve replikasyondan önce tamir edilemediği durumlarda hücrenin genomik materyalinde kalıcı değişikliklere ve mutasyonlara sebep olmaktadır. Bu durum da genomik instabiliteye, gen ekspresyonunda değişikliklere, hücresel davranışlarda değişime, nörodejeneratif hastalıklara, kronik inflamasyona, kansere veya yaşlanmaya neden olmaktadır (Klaunig ve ark., 2011; Jena, 2012).

Mitokondri hücrenin enerji üretim merkezidir ve hücresel metabolizmada rol alan hayati öneme sahip bir organeldir. Hücrede oksidatif fosforilasyonla ürettiği ATP formunda enerjinin dışında, kalsiyum (Ca^{+2}) düzeylerinin homeostazı, ROT’ların üretilmesi ve regülasyonu, hücre canlılığı için önemli olan sinyal yollarının ve apoptozun yönetilmesi gibi birçok görevi vardır (Vakifahmetoglu-Norberg ve ark., 2017; Ramachandran ve ark., 2018).

Çift membrana sahip olan mitokondrilerin iç membranına *krista* ve bu membran tarafından çevrelenmiş sıvı kısma *matriks* adı verilir. Matriks içinde yağ asidi

oksidasyonu ve krebs döngüsü gibi farklı yollarda görev alan birçok enzim içerir. Mitokondrinin kendine ait genomu olan mitokondriyel DNA da (mtDNA) birden fazla kopya halinde matrikste yer alır.

İnsanlardaki mtDNA, nükleer DNA gibi çift zincirli ancak halkasal yapıda olup 16,569 baz çiftinden oluşmaktadır ve nDNA'dan bağımsız olarak çoğalabilmektedir. Nükleer DNA'dan bir diğer farkı onun gibi histon proteinleriyle çevrili olmamasıdır. mtDNA, oksidatif fosforilasyonun gerçekleştiği ETC'de yer alan 4 protein kompleksinin (Kompleks I, III, IV ve V) 13 protein alt birimini ve mitokondriyel protein sentezi için gerekli olan 2 ribozomal RNA (rRNA) (12S ve 16S) ile 22 transfer RNA (tRNA) olmak üzere toplamda 37 geni kodlamaktadır. Bu nedenle oksidatif fosforilasyonun ve ATP sentezinin doğru bir şekilde gerçekleşebilmesi için mtDNA gereklidir (Area-Gomez ve Schon, 2014; Fromenty, 2020).

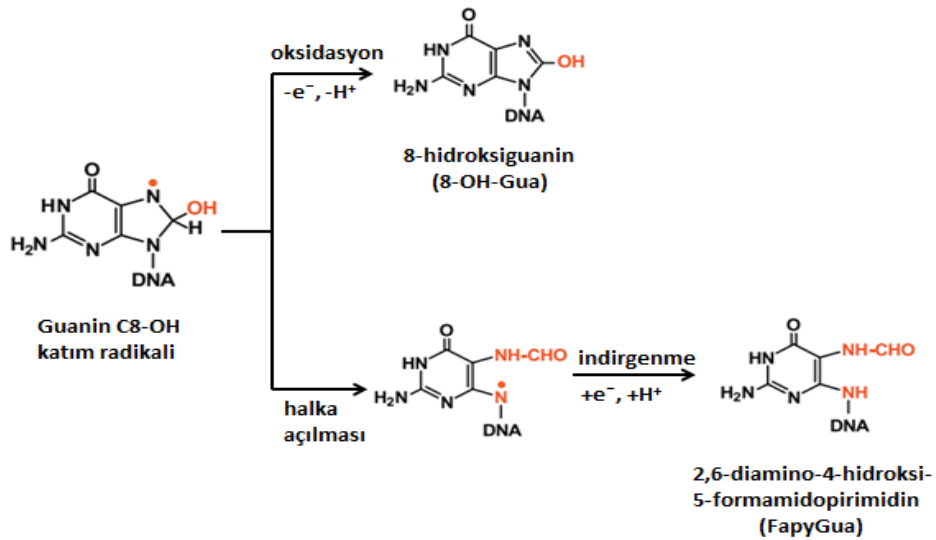
Mitokondriler oksidatif fosforilasyon sebebiyle hücrede ROT'ların temel üretim yeridir. Bunun ana nedeni elektronların kısmen ETC'den kaçıp doğrudan oksijenle reaksiyona girmesi ve süperoksit anyon radikalini oluşturmasıdır. Bu radikal SOD enzimi ile daha kararlı yapıda olan hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüştürülür. Ancak iç mitokondriyel membranda bulunan demir ve bakır gibi geçiş metalleri ile Fenton reaksiyonu sonucu DNA oksidasyonuna neden olabilecek aşırı reaktif olan hidroksil radikaline (OH^{\bullet}) dönüşür. Normal şartlar altında belirli bir miktara kadar olan radikaller, antioksidan savunma sistemi tarafından nötralize edilirler. Bununla birlikte, mitokondride ROT üretim miktarı, toksik kimyasallara maruz kalma durumunda olduğu gibi önemli derecede artabilmektedir. mtDNA, nDNA'da bulunan koruyucu histon proteinlerine sahip olmadığından ve ROT'ların ana kaynağı olan iç mitokondriyel zara yakınlığından ve ayrıca onarım mekanizmalarının yetersizliğinden dolayı oksidatif hasar için kritik bir hedeftir ve bu tür ataklara nDNA'dan daha duyarlıdır (Cadenas ve Davies, 2000; Mihajlovic ve Vinken, 2022).

mtDNA'da oluşan oksidatif hasarın onarılamaması mtDNA mutasyonlarına yol açmakta ve bu mutasyonlara bağlı çeşitli hastalıklar meydana gelmektedir (Van Houten ve ark., 2006).

2.2.1.2. DNA Baz Hasarı

Başta OH[•] radikali olmak üzere serbest radikallerin DNA'daki pürin ve pirimidin bazlarıyla reaksiyona girmesi sonucu bazlarda bazı yapısal değişiklikler meydana gelmektedir. Bu modifikasyonlara örnek olarak pürin bazlarından guanin'in 4., 5. veya 8. pozisyonlarındaki C atomlarının OH[•] radikali ile reaksiyona girmesi ve sonucunda çeşitli DNA oksidatif hasar ürünlerinin oluşması verilebilir (Dizdaroglu, 2012).

Guanin, DNA bazları arasında en düşük indirgenme potansiyeline sahiptir ve bu bazlar arasındaki en iyi elektron donörüdür. Bu nedenle oksidasyona oldukça yatkındır ve serbest radikallerin ana hedefidir. Aşırı elektrofilik yapısından dolayı OH[•] radikali en yüksek elektron yoğunluğu içeren bölgeye bağlanır (Sonntag, 2006). OH[•] radikali guanin bazının 8. pozisyonundaki C atomuna atak yaparak C8-OH katım ürünü radikali oluşturur. Oluşan bu ürün kimyasal açıdan kararsız yapısından dolayı bir elektron ve proton kaybederek 8-hidroksiguanin (8-OH-Gua) yapısına dönüşür. Bunun yanı sıra C8-OH katım ürünü radikalinin imidazol halkasının açılması ve ardından bir elektron ve proton kazanarak indirgenmesi sonucu 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (FapyGua) yapısı da meydana gelmektedir (Şekil 3; Dizdaroglu, 2012).



Şekil 3. Guanin bazının C8-OH katım radikalinin reaksiyonları sonucu meydana gelen 8-OH-Gua ve FapyGua yapılarının oluşumu (Dizdaroglu, 2012).

Reaktif oksijen türleri DNA'da 20'den fazla oksidatif baz hasar ürünü oluşturmaktadır. DNA hasarı alanındaki çalışmaların çoğu, mutajenik potansiyeli yüksek ve en sık görülen lezyon olduğu için guanin bazının oksidatif hasar ürünü olan 8-hidroksiguaninin nükleozid formundaki 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) yapısına odaklanmaktadır (Wu ve ark., 2004).

2.3. Oksidatif Strese Bağlı Oluşan DNA Hasarını Belirleme Yöntemleri

Oksidatif olarak indüklenen DNA hasarı düzeyinin doğru bir şekilde ölçülmesi, hasarın oluşum mekanizmasının, hücresel onarım sisteminin ve hasarın biyolojik sonuçlarının tam olarak anlaşılması için önemlidir. Bu nedenle oksidatif DNA lezyonlarını ölçmeyi hedefleyen hassas ve doğru yöntemler geliştirmek üzere yoğun çalışılmıştır (Ravanat, 2005).

DNA'da gerçekleşen oksidatif hasarları tespit etmek ve incelemek amacıyla çeşitli yöntemler kullanılmıştır, bu yöntemler 2 gruba ayrılmaktadır. Bu gruplardan ilki olan enzimatik yöntemler ya da diğer ismiyle dolaylı yöntemlerden birisi, spesifik bir DNA glikozilaz enzimi aracılığı ile DNA zincir kırığının belirlenmesidir. Alkali elüsyon testi ve tek hücre jel elektroforezi (Comet testi) DNA zincir kırıklarını ölçmek için geliştirilmiş yöntemlerdir (Pflaum ve Epe, 2000; Collins ve Dusinská, 2002). Aşağıda özetlenen spesifik antikorların kullanıldığı immünokimyasal teknikler de bu grupta düşünülebilir.

İmmünokimyasal tekniklerden en çok kullanılan 2 yöntem, immünohistokimya ve mikropilaka tabanlı yaklaşımlardır. İmmünohistokimyada formaldehit veya benzeri bir fiksatif aracılığıyla dokunun sabitlenmesi gerekmektedir. DNA'daki oksitlenmiş nükleobazların tanınması, uygun ve spesifik primer antikor kullanılarak gerçekleştirilir. Devamında enzim ile konjüge edilmiş sekonder antikor eklenir ve renk oluşumu gerçekleşir, mikroskopla örnekler analiz edilir. Bu yöntem oksitlenmiş DNA'nın lokalizasyonuna izin vermesine rağmen, hedefin hassas bir şekilde miktarının ölçülmesi için uygun değildir ve kalitatif/yarı kantitatif yöntem olarak kabul edilir. Mikropilaka tabanlı yaklaşım olan enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA), 8-OHdG tipinde DNA baz hasarının kantitatif ölçülmesi için çok tercih edilen bir yöntemdir. Ticari olarak temin edilebilen ELISA kitlerinde primer antikor

tarafından tanınan bileşik (8-OHdG), ELISA plakasına önceden kaplanmıştır. Bu testin prensibi antijen-antikor arasında bir kompleks oluşumu, antikora bir işaretleyici enzimin bağlanması ve bu enzime uygun bir substrat eklenmesiyle renkli ürünler meydana gelmesine dayanır. Analiz edilmek istenen biyolojik örnek içindeki 8-OHdG, antikorla bağlanabilmek için daha önceden plakaya kaplanmış olan 8-OHdG ile yarışır. ELISA testi diğer yöntemlere kıyasla kısa analiz süresi, uygulama kolaylığı ve düşük maliyet gibi üstünlükleri nedeniyle tercih edilen bir yöntemdir. Bununla birlikte sınırlı miktarda temin edilebilen spesifik antikorlar ve bunların maliyetinin yüksek olması, enzimlerle işaretlenmiş antikorların özgüllüğünün düşük olması ve DNA hasarının belirlenmesinde uygulanan antikorların DNA bazları ile girebileceği çapraz reaksiyon, bu yöntemin dezavantajlarıdır (Boguszewska ve ark., 2019). Diğer alternatif ölçüm yöntemleri sıvı kromatografi-elektrokimyasal deteksiyon (HPLC-ECD), gaz kromatografi-kütle spektrometri (GC-MS) ve LC tandem MS 'dir (Gan ve ark., 2012; Dizdaroglu ve ark., 2015; Cadet ve ark., 2017; Gonzalez-Hunt ve ark., 2018).

Oksidatif baz hasarını belirlemek için yukarıda anlatılan farklı tekniklere dayalı birçok yöntem geliştirilmiştir. Yöntemin seçimi ölçülmek istenen hasar, örnek sayısı ve analiz maliyetiyle yakından ilişkilidir.

Gereç ve Yöntem

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Sarf ve Kimyasal Maddeler

<u>Kimyasal/Sarf Adı</u>	<u>Marka/Kod</u>
50 bp DNA ladder	Thermo Fisher SM0371
8-OHdG ELISA Kit	Elabscience - E-EL-0028-96T
Agaroz	Sigma A9539-100G
Borik Asit	Sigma B0394-500G
DNaz I	Sigma D5025-15KU
dNTP Mix (10 mM each) 1mL	Thermo Fisher R0192
Etanol	Merck 100986
Etidyum bromür çözeltisi	Sigma E1510-10ML
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Sigma E5134
Etilenglikol-bi(2-aminoetileter)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraasetik asit (EGTA)	Sigma E3889
Falkon tüp (15 mL, nonsteril)	İsolab 078.02.001
Falkon tüp (50 mL, nonsteril)	İsolab 078.02.003
GeneJET Genomik DNA Saflaştırma Kiti	Thermo Fisher K0721
Hidroklorik asit (HCl)	Merck Lot:K31301214242
Magnezyum Klorür (MgCl ₂)	Sigma M8266
Mikrosantrifüj tüp-1,5 mL	İsolab 078.03.002

Mikrosantrifüj tüp-2,0 mL	İsolab 078.03.003
Mitotempo	Sigma SML0737-25MG
Nükleozit Hidroliz Enzimi	NEB M0649S
Parasetamol (Asetaminofen; PAR)	Sigma A7085
PBS tablet	Sigma P4417-100TAB
PCR tüp (0,2mL, steril)	İsolab 123.01.002
Potasyum asetat	Sigma P1190-500G
Primer 200 nmol	Eurofins
Proteinaz K, recombinant, PCR Grade	Sigma 3115836001
RNAz A	Sigma R6513-10MG
Sığır serum albümini (BSA)	Chem Cruz/B2415
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck 428015
Sodyum hidroksit (NaOH) pelleti	Sigma S8045-500G
Sodyum klorür (NaCl)	Merck M.106404.1000
Sükroz	Merck M107651.1000
Taq DNA Polymerase, recombinant	Thermo Fisher 10342020
Tris baz (Tris(hidroksimetil)aminometan)	Sigma T1378

3.1.2. Kullanılan Gereçler

<u>Cihaz Adı</u>	<u>Marka/Model</u>
+4°C ve -20°C Buzdolabı	Arçelik
Çalkalayıcı/İnkübatör	Boeco/TS-100
Derin dondurucu (-86°C)	New Brunswick Scientific U 410 Premium
Dounce homojenizatörü	Sartorius-Teflon-Kolben für Potter S
Hassas Terazı	Denver Instruments TB 215D
Jel elektroforez cihazı	Accuris-E1101
Kemigörüntüleme cihazı	Vilber Lourmat
Kırık Buz Makinesi	Hoshizaki-FM80
Mikrodalga fırını	Ariston- MW211W
Multiplaka okuyucu	Thermo Scientific Varioskan Flash
NanoDrop	Thermo Fisher Scientific-ND1000
Otoklav	Hirayama-HG-80
Otomatik Pipetler	Gilson, Brand
PCR Cihazı	Techne-Plus
pH metre	Hanna Instruments HI 221
Santrifüj	Thermo Scientific CL31R
Su arıtma cihazı	Millipore Direct Q

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

3.1.3.1. Mitokondriyel DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

Mitokondri izolasyon tamponu, 2X (640 mM sükröz, 40 mM Tris, 2 mM EGTA, pH 7.2)

Mitokondri izolasyon tamponu-1 (320 mM sükröz, 20 mM Tris, 1 mM EGTA, % 1 BSA, pH 7.2)

Mitokondri izolasyon tamponu-2 (320 mM sükröz, 20 mM Tris, 1 mM EGTA, % 0.2 BSA, pH 7.2)

Mito-DNaz tamponu (300 mM sükröz, 10 mM MgCl₂, 20 mM Tris, % 0,15 (a/h) BSA, 0.03 mg/mL Dnaz I, 0.02 mg/mL Rnaz A, pH 7.5)

Hidroliz tamponu (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 20 mM EDTA, % 1 SDS, pH 8.75)

6 M Potasyum asetat tamponu; pH 7.50

3.1.3.2. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

5X Tris-Borat-EDTA (TBE) tamponu (54 g Tris baz, 27.5 g Borik Asit ve 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0))

Etidyum Bromür Çözeltisi (0.5 µg/mL)

3.1.4. Kullanılan Deney Hayvanları

Çalışmada kullanılan fareler ticari olarak *İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi'nden (İBG)* temin edilmiştir ve yapılan işlemler yine aynı merkezde birim sorumlusu veteriner hekim eşliğinde gerçekleştirilmiştir. Tüm işlemler *İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu* onayı ile gerçekleştirilmiştir (Ek-1, belge no ve tarih: 2022-018, 11.05.2022). Bu çalışmada 20-25 gram ağırlığında 45 adet 8-10 haftalık C57BL/6J erkek fare kullanılmıştır. Fareler standart yem ve su ile beslenmiş ve oda sıcaklığında 12 saat aydınlık/12 saat karanlık olacak şekilde bakımları yapılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Planı

Farelerde PAR kaynaklı nükleer ve mitokondriyel DNA hasarı olasılığını test etmek üzere PAR'a bağlı akut karaciğer hasarı yaptığı bilinen hayvan modeli kullanılmıştır (McGill ve ark., 2012; Jaeschke ve ark., 2014; Akakpo ve ark., 2020). Bu modele göre her bir grupta 15 adet 8-10 haftalık C57BL/6J erkek fare olmak üzere rastgele seçilen farelerle *Kontrol (K)*, *PAR (P)* ve *PAR + MitoTempo (P+M)* olmak üzere 3 grup oluşturulmuştur. İlaç uygulamasından 12 saat önce hayvanlara yem verilmeyerek açlık uygulanmış ancak su kısıtlaması yapılmamıştır. Deney başlamadan önce her bir fare tartılarak ağırlıkları kaydedilmiş ve ilaç uygulaması sırasında işlem kolaylığı sağlamak için fareler kulaklarından etiketlenerek kodlanmıştır. Parasetamol ve MitoTempo serum fizyolojik (SF) içerisinde çözülmüş, *K* grubuna i.p. yoldan 10 mL/kg tek doz SF, diğer iki gruptan *P* grubuna yine i.p. yoldan 500 mg/kg tek doz PAR ve son *P+M* grubuna ise i.p. yoldan 500 mg/kg tek doz PAR ve 1.5 saat sonra i.p. yoldan 20 mg/kg tek doz MitoTempo uygulanmıştır. İlaç uygulamasından 6 saat sonra farelerin yeme erişimi sağlanmıştır. Fareler ilaç uygulamasından 24 saat sonra izofluran anestezisi altındayken batın açılarak klinik biyokimyasal testler için kalplerinden kan örnekleri toplanmış ve ardından ötenazi edilerek böbrek ve karaciğer dokuları çıkartılmıştır. Histopatolojik inceleme yapılacak olan dokular %10'luk tamponlanmış formalin içerisine alınmış ve diğer dokular deneysel çalışmalar gerçekleşene kadar sıvı azotta dondurulduktan sonra -80 °C'de saklanmıştır. Çalışma planı özeti Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Deneysel çalışma planı özeti

Deney Grubu	Uygulanan İlaç	Uygulanan Doz	Hayvan Sayısı
Kontrol (K)	Serum Fizyolojik (SF) (Sadece çözücü)	10 mL/kg intraperitoneal (i.p.)	15
PAR (P)	Parasetamol	500 mg/kg (i.p.) tek enjeksiyon	15
PAR + MitoTempo (P+M)	Parasetamol ve MitoTempo	500 mg/kg (i.p.) tek enjeksiyon + 20 mg/ kg (i.p.) tek enjeksiyon	15

3.2.2. Mitokondriyel DNA İzolasyonu

500 mg ile 1 g arasında tartılan karaciğer ya da böbrek dokusu, soğuk PBS çözeltisi ile yıkanarak dokunun içinde kalan kan uzaklaştırılmış, ardından makas ve bistüri ile küçük parçalara ayrılmıştır. 30 mL'lik Cam Potter homojenizasyon tüpüne alınan parçalanmış doku üzerine 15 mL soğuk *mitokondri izolasyon tamponu-1* (320 mM sukroz, 20 mM Tris, 1 mM EGTA, 1 % BSA, pH 7.2) eklenmiş ve teflon havaneli yardımıyla 200 rpm'de (matkap yardımıyla) 5-10 vuruş yapılarak doku homojenize edilmiştir. Homojenat hacmi aynı tamponla 30 mL'ye tamamlanarak +4°C'de 10 dk boyunca 800 *xg*'de santrifüj edilmiştir. Üst faz temiz bir santrifüj tüpüne aktarılıp aynı işlem tekrarlanmıştır. Daha sonra üst faz +4°C'de 10 dk boyunca 8,500 *xg*'de santrifüj edilerek mitokondriyel fraksiyon çöktürülmüştür. Mitokondriyel pellet 3 adet Eppendorf tüpe ayrılmış ve her bir tüpe 600 µL DNaz I ve RNaz A içeren Mito-DNaz tamponu eklenerek mitokondriler süspande edilmiştir. 37°C'de 1 saat inkübasyon yapıldıktan sonra mitokondriler +4°C'de 30 dk boyunca 13,000 *xg* hızda santrifüj ile çöktürülmüştür. Mito-DNaz tamponunun artıklarını gidermek için 500 µL *mitokondri izolasyon tamponu-2* ile mitokondriler yeniden süspande edilerek +4°C'de 15 dk boyunca 13,000 *xg* hızda santrifüj edilmiş ve bu yıkama işlemi bir kez daha tekrarlanmıştır. Önceden 56 °C'ye ısıtılmış 400 µL hidroliz tamponuna 0,02 mg/ml Proteinaz K ve 0,02 mg/mL RNaz A eklenmiş ve mitokondriler bunun içerisinde süspande edilerek 56°C'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda mitokondri içeren tüpler oda sıcaklığına getirildikten sonra 100 µL potasyum asetat

çözeltisi, ardından 500 µL kloroform: izoamilalkol (24:1) (h/h) eklenerek tüpler 20 sn. boyunca alt üst edilerek karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 10 dk boyunca 13,000 xg hızda santrifüj ile fazlar ayrılmıştır. Üst fazlar dikkatli bir şekilde 1,5 mL'lik yeni mikrosantrifüj tüplere aktarılmıştır. Üstlerine 100 µL RNaz A (1mg/mL) eklenip 37°C'de 45 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon bittikten sonra tüplere 1 mL (2 hacim) soğuk absolü EtOH eklenmiş ve tüpler 5 kere alt üst edilmiştir. -80°C'de 3 saat inkübasyondan sonra oda sıcaklığında 15 dk boyunca 13,000 xg hızda santrifüj sonucu pellet "mitokondriyel DNA" elde edilmiştir. Elde edilen mtDNA, 500 µL soğuk %70'lik EtOH ile oda sıcaklığında 5 dk 13,000 xg hızda santrifüj edilerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Aynı adım tekrarlandıktan sonra üst faz tamamen uzaklaştırılıp tüpte EtOH kalmaması için 2 dk boyunca tüplerin ağzı açık tutulmuştur. mtDNA pelleti üzerine otoklavlanmış bidistile su eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. İzole edilen DNA analize kadar -20°C'de saklanmıştır (Isokallio ve Stewart, 2018).

3.2.3. Nükleer DNA İzolasyonu

Karaciğer ve böbrek dokusundan nükleer DNA izolasyonu için ticari kit *Thermo Scientific™ GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit* kullanılmış ve işlem basamakları kit prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir.

20 mg tartılan karaciğer/böbrek dokusu, soğuk PBS çözeltisi ile yıkanarak kanından arındırılmış ve bistüri ile küçük parçalara ayrılmıştır. 2 mL'lik cam Potter homojenizasyon tüpüne alınan parçalanmış doku üzerine 200 µL homojenizasyon tamponu eklenmiş ve karaciğer dokusu için 10 vuruş, böbrek dokusu için 20 vuruş yapılarak dokunun iyice parçalanması sağlanmıştır. Homojenat mikrosantrifüj tüpe aktarıldıktan sonra üzerine 180 µL *hidroliz çözeltisi* eklenmiş ve pipetle süspande edilmiştir. Ardından 20 µL *Proteinaz K çözeltisi* eklenip pipetle alt-üst yapılarak iyice karıştırılmıştır. Doku tamamen parçalanana ve hiçbir partikül kalmayana kadar hazırlanan örnek 56°C'de 3 saat boyunca sallanan inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon bittikten sonra örneğe 20 µL RNaz A eklenmiş ve vorteksle karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. Ardından 200 µL *liziz çözeltisi* eklendikten sonra 15 sn boyunca vorteksle homojen bir karışım elde edilinceye kadar karıştırılmıştır. Örnek üzerine 400 µL %50 etanol eklenip pipetle

kariştırıldıktan sonra hazırlanan lizat, altına toplama tüpü yerleştirilmiş GeneJET Genomik DNA saflaştırma kolonuna aktarılmış ve 6000 *xg*'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Altta toplanan sıvı ve toplama tüpü atılmış ve üstteki saflaştırma kolonu yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Sonra 500 μL *yıkama tamponu I* eklenip 8000 *xg*'de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Altta toplanan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra saflaştırma kolonu toplama tüpüne geri yerleştirilmiş ve devamında 500 μL *yıkama tamponu II* eklenip 12000 *xg* hızda 3 dk santrifüj edilmiştir. Altta sıvı içeren toplama tüpü atılmış ve GeneJET Genomik DNA saflaştırma kolonu steril 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Saflaştırma kolonu merkezine 200 μL elüsyon tamponu eklendikten sonra oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilmiş ve 8000 *xg*'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Maksimum DNA verimi için elüsyon adımı, 200 μL elüsyon tamponu ile tekrarlanmıştır. Üstteki saflaştırma kolonu atılmış, altta mikrosantrifüj tüpündeki izole edilmiş DNA, analize kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.2.4. İzole Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Saflığının Belirlenmesi

İzole edilen DNA'nın konsantrasyonunun belirlenmesi ve saflığının kontrolü için DNA rneğinden 2 μL alınarak Nanodrop ND1000 cihazında spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. Ölçümlerden önce kr okuma işlemi, DNA'nın çözülmesinde kullanılan distile su veya TE tamponu ile yapılmıştır. DNA konsantrasyonu ng/ μL cinsinden ifade edilmiştir.

260 nm dalga boyunda DNA, 280 nm dalga boyunda ise proteinler maksimum absorbansa sahiptir. Dolayısıyla 260/280 absorbans oranı, protein kontaminasyonunun göstergesidir ve bu oran ≥ 1.8 olduğu zaman DNA örneğinin kabul edilebilir saflıkta olduğu kabul edilir. Nükleik asit saflığının ikincil bir ölçüsü olan 260/230 absorbans oranı 1.8-2.2 aralığında beklenmektedir. Bu oranın 1.8'den küçük olması DNA'da organik bileşenler veya kaotropik maddelerden kaynaklı kontaminasyon olduğunu gösterir (Desjardins ve Conklin, 2010).

3.2.5. İzole Edilen DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılmasıyla Nükleer-Mitokondriyel Çapraz Kontaminasyonunun Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan primerlerin sentezi, Karyon Biyoteknoloji firması (İzmir, Türkiye) tarafından gerçekleştirilmiştir. Mitokondriyel DNA'nın kodladığı 16S rRNA, ND1 genleri ve nükleer DNA'nın kodladığı heksokinaz 2 ile prostaglandin E reseptör 2 (PTGER₂) genlerinin çoğaltılması için Tablo 2'deki primerler kullanılmıştır. Ayrıca C57BL/6 mtDNA sekansı dikkate alınarak tasarlanan mitokondriyel DNA-B6 primerleri de çalışmada kullanılmıştır. Liyofilize halde olan primerler son konsantrasyonları 1000 µM olacak şekilde steril bidistile suda çözülmüştür. Hazırlanan stok çözeltilerden 1:40 oranında dilüsyon yapılarak 25 µM konsantrasyonda çalışma primerleri elde edilmiştir. Stok primerler -20°C'de, çalışma primerleri +4°C'de saklanmıştır. PCR reaksiyonu 25 µL hacimde *Techne TC-Plus* thermal cycler cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR için hazırlanan karışıma otoklavlanmış bidistile su, 10x PCR tamponu, 50 mM MgCl₂, 10 mM dNTP karışımı, 25 µM forward primer, 25 µM reverse primer, 100-300 ng kalıp DNA ve en son Taq DNA Polimeraz (5U/µL) eklenmiştir. Örnekler cihaza konulana kadar bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. PCR karışımına eklenen miktarlar ve 25 µL hacimdeki final konsantrasyonları, Tablo 3'te gösterilmiştir. Negatif kontrol (DNA eklenmemiş örnek), her amplifikasyon setine dahil edilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan forward (F) ve reverse (R) primerler

Primer Adı	Primer Dizisi	Fragment uzunluğu (bp)	Referans
Mitokondriyel 16S rRNA (F)	5'-CCGCAAGGGAAAGATGAAAGAC-3'	132	(Quiros ve ark., 2017)
Mitokondriyel 16S rRNA (R)	5'-TCGTTTGGTTTCGGGGTTTC-3'		
Mitokondriyel DNA-B6 (F)	5'-ACTATTTGCCAGAGAACTACTAGCCA-3'	359	(Shitara ve ark., 2017)
Mitokondriyel DNA-B6 (R)	5'-TGTGTGCGTACTTCATTGCTC-3'		
Mitokondriyel ND1 (F)	5'-CTAGCAGAAACAAACCGGGC-3'	84	(Quiros ve ark., 2017)
Mitokondriyel ND1 (R)	5'-CCGGCTGCGTATTCTACGTT-3'		
Nükleer Hezokinaz 2 (F)	5'-GCCAGCCTCTCCTGATTTTAGTGT-3'	122	(Quiros ve ark., 2017)
Nükleer Hezokinaz 2 (R)	5'-GGGAACACAAAAGACCTCTTCTGG-3'		
Nükleer Prostaglandin E (F)	5'-CCTGCTGCTTATCGTGGCTG-3'	189	(Alcoser ve ark., 2011)
Nükleer Prostaglandin E (R)	5'-GCCAGGAGAATGAGGTGGTC-3'		

Tablo 3. PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve 25 µL reaksiyon hacminde final konsantrasyonları

PCR Bileşeni	25 µL Reaksiyon	Final Konsantrasyon
10 X PCR Tamponu	2.5 µL	1 X
50 mM MgCl ₂	1.5 µL	3 mM
10 mM dNTP Karışımı	0.5 µL	0.2 mM
25 µM Forward Primer	0.5 µL	0.5 µM
25 µM Reverse Primer	0.5 µL	0.5 µM
Taq DNA Polimeraz 5U/µl	0.2 µL	1 U
Kalıp DNA	2-5 µL	100-300 ng
Distile su	25 µL'ye tamamlanır.	

DNA'ların çoğaltılması için aşağıda belirtilen koşullarda yapılmıştır.

<u>Basamak Adı</u>	<u>Derece (°C)</u>	<u>Süre</u>	
İlk denatürasyon	94 °C	1 dk 30 sn	
Denatürasyon	94 °C	30 sn	} 30 döngü
Primerlerin bağlanması	56 °C	30 sn	
Polimerizasyon uzaması	72 °C	90 sn	
Son uzama	72 °C	3 dk	

3.2.6. Agaroz Jel Elektrofrezisi

%1.8'lik (a/h) agaroz jel hazırlamak için 0,72 g agaroz tartılarak erlenmayer içine aktarılmış ve üzerine 40 mL 1X TBE tamponu eklenmiştir. Erlenmayerin ağzı parafilm ile kapatılıp üzerinde iğne ile delikler açıldıktan sonra çözelti mikrodalga fırında ısıtılmış ve agarozun tamamen tampon içinde çözünmesi sağlanmıştır.

Jel kasete dökülmeden önce örnek sayısına uygun tarak seçilip kasete yerleştirilmiştir. Jelin soğuması için kısa bir süre beklendikten sonra jel kasete dökülmüş ve katılaşması için 30 dk beklenmiştir. Jel tamamen katılaştıktan sonra

taraklar yavaşça çıkartılmış ve içinde 1X TBE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir. PCR ürünleri 6X yükleme boyası ile iyice karıştırılıp kuyulara yüklenmiştir. Jelin ilk kuyusuna uygun DNA moleküler ağırlık standartı da (50 bp DNA ladder) yüklendikten sonra güç kaynağı 100 V'a ayarlanıp 30 dk boyunca elektroforez gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi bitince jel tanktan dikkatlice çıkartılıp plaka çalkalayıcıya aktarılmış, 0.5 µg/mL Et-Br içeren boyama çözeltisi ile 20 dk boyunca boyanmış, ardından distile su ile 10 dk boyunca yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonra UV ışığı altında görüntüleme sistemi yardımıyla jeldeki bantların görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. Nükleozid Hidrolitik Enzim Karışımı İle DNA Hidrolizi

İzole edilmiş DNA'da 8-OHdG ölçümü yapabilmek için bu yapının DNA'dan serbestleşmesi gerektiği için DNA molekülü enzimatik olarak hidroliz edilmiştir. Bu amaçla *Nucleoside Digestion Mix (NEB #M0649)* protokolüne göre 1 µg DNA içeren örneği hidroliz edebilmek için 1 µL enzim karışımı ve enzime ait 10X konsantrasyonda tampondan 5 µL eklenmiştir. Ardından hacim, otoklavlanmış distile su ile 50 µL'ye tamamlanmış ve 37°C'de 1 saat süreyle inkübe edilerek hidroliz işlemi tamamlanmıştır.

3.2.8. İzole Edilmiş DNA'da 8-OHdG Miktarının ELISA Tekniği ile Belirlenmesi

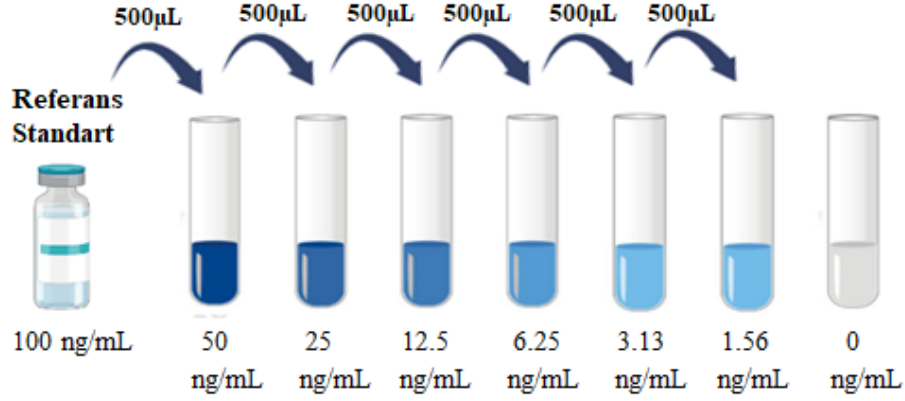
Bu çalışmada karaciğer ve böbrek dokularından izole edilen nDNA ve mtDNA'daki 8-OHdG miktarının ölçümü için *Elabscience 8-OHdG (8-Hydroxydeoxyguanosine) ELISA Kit* kullanılmıştır.

3.2.8.1. Yöntemin Esası

Bu kit yarışmalı ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kitin içeriğinde bulunan mikropłaka, 8-OHdG ile önceden kaplanmıştır. Kuyulara eklenen örnek veya standarttaki 8-OHdG, örnekten sonra kuyulara eklenen 8-OHdG'ye özgü *Biotinylated Detection Ab* primer antikoruna bağlanmak için plakadaki 8-OHdG ile yarışmaya girer. Fazla konjugat ve plakaya bağlanmamış örnek veya standart, plakadan yıkanarak uzaklaştırılır. Ardından enzimle işaretli sekonder antikor olan *Horseshoe peroksidaz (HRP) ile konjuge Avidin* kuyulara eklenir ve inkübasyon gerçekleşir. Bağlanmayan sekonder antikorlar yıkama işlemi ile ortamdaki uzaklaştırılır ve *TMB substrat çözeltisi* eklenir. Enzim ile substrat arasındaki reaksiyon, *durdurma çözeltisi* eklenerek sonlandırılır ve oluşan renk değişimi spektrofotometrik olarak 450 nm dalga boyunda ölçülür. Oluşan rengin yoğunluğu, örnekte bulunan 8-OHdG konsantrasyonu ile ters orantılıdır.

3.2.8.2. Deney Basamakları

Deneye başlamadan önce bütün reaktifler oda sıcaklığına getirilir. Konsantre halde olan yıkama tamponu distile su ile, *Biotinylated Detection* antikor ve HRP konjugatı ise kitin içinde bulunan kendilerine ait çözeltilerle kit protokolüne uygun seyreltilerek çalışma çözeltileri elde edilir. Sonra standart çözelti hazırlamak için kitin içinden çıkan liyofilize halde olan referans standart 8-OHdG, yine kitin içinde bulunan çözücüsünden 1 mL eklenerek çözülür ve 100 ng/mL konsantrasyonda stok çözelti elde edilmiştir. Ardından seri dilüsyonlarla 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 ve 0 ng/mL konsantrasyonlarda Şekil 4'te gösterilen standart çözeltiler elde edilir. Son tüp blank olarak düşünüldüğü için standart eklenmemiştir.



Şekil 4. ELISA test kiti 8-OHdG standartlarının seri dilüsyon ile hazırlanışı.

Deney basamakları kit protokolüne uygun olarak aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir:

- 1) Önce hazırlanan standart çözeltiler, 50 µL hacimde ilk 2 sırada yer alan kuyulara eklenmiştir. Ardından diğer kuyulara analiz edilecek örnekler yine 50 µL hacimde eklenmiştir.
- 2) Kuyulara hemen 50 µL *biotinylated detection Ab çalışma çözeltisi* eklenmiştir. Plaka kitin içinde bulunan yapışkanlı bantla kapatılmış ve 37°C 'de 45 dk inkübe edilmiştir.
- 3) İnkübasyon bittikten sonra her bir kuyudan çözelti uzaklaştırılmıştır ve 350 µL *yıkama çözeltisi* eklenmiştir. 2 dakika bekledikten sonra yıkama çözeltisi de her bir kuyudan uzaklaştırılmış ve plaka temiz kağıt peçete üzerine ters çevrilerek yıkama çözeltisinin tamamen akması sağlanmıştır, bu yıkama adımı 3 kez tekrarlanmıştır.
- 4) Her bir kuyuya 100 µL *HRP konjuge çalışma çözeltisi* eklenmiştir. Plaka yapışkanlı bant ile kapatılıp 37°C'de 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
- 5) İnkübasyon bitince 3. adımda anlatıldığı gibi yıkama işlemi 5 kez tekrarlanmıştır.
- 6) Kuyulara 90 µL *substrat çözeltisi* eklenmiştir. Plaka yeni bir yapışkanlı bant ile kaplandıktan sonra 37°C'de 15 dk süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında plaka ışıktan korunmuştur.

7) Reaksiyonun sonlandırılması için her kuyuya 50 µL *durdurma çözeltisi* eklenmiştir.

8) Absorbans değerleri 450 nm’de plaka okuyucuda okunmuştur. Standart çözeltiden oluşturulan kalibrasyon grafiği ile absorbans değeri grafikte yerine konularak örneklerin 8-OHdG konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.2.9. Histopatolojik Analiz

Fareler ötenazi edildikten sonra çıkartılan böbrek dokuları %10’luk formalin çözeltisi içinde 24 saat boyunca tespit edilmiştir. Süre sonunda sabit doku örnekleri parafin içine gömülmüştür. Parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandıktan sonra histopatolojik inceleme yapılmıştır.

3.2.10. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 8.4 programı kullanılarak yapılmıştır. Verilerin normallik dağılımını kontrol etmek için Shapiro-Wilk testi kullanılmıştır. Veriler ortalama değer ±standart hata olarak ifade edilmiştir. Ortalamalar arasındaki farkın önem testi olarak Student t- testi uygulanmıştır. Hesaplamalarda istatistiksel olarak anlamlılık derecesi, p değerinin 0.05’ten daha küçük olduğu durumlarda kabul edilmiştir.

Bulgular

4.1. Ön Uyumlandırma Çalışması Bulguları

DNA hasarını belirlemek için gerekli olan ilk adım biyolojik örnekten DNA izolasyonunu gerçekleştirmektir. Biyolojik örnek olarak doku, kan, idrar ve diğer vücut sıvıları kullanılarak çeşitli izolasyon protokolleri ya da ticari kitler aracılığıyla DNA izole edilebilmektedir. Bu çalışmaya başlamadan önce literatürdeki DNA izolasyon protokolleri araştırılarak en uygun yöntemin belirlenmesi için bazı ön çalışmalar yapılmıştır. Dokudan DNA izolasyonu gerçekleştirileceği için homojenizasyon aşamasına özellikle dikkat edilmiş ve farklı rpm, vuruş sayıları, doku miktarları ile optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda mtDNA izolasyonu için *Yöntem* kısmında anlatıldığı gibi diferansiyel santrifüjle önce mitokondrinin elde edilmesi ardından DNaz kullanılarak ortamdan nDNA'nın uzaklaştırılması ve sonunda saf mtDNA eldesi sağlanmıştır. nDNA izolasyonu gerçekleştirilirken ticari kit tercih edilmiştir. Kit ile izolasyon, fenol-kloroform ekstraksiyonlarını ve zaman alıcı alkol ile DNA'nın çöktürülmesi basamaklarını ortadan kaldırmaktadır. Ancak kit protokolünde belirtilen doku miktarı ile (20 mg) izolasyona başlandığı ve kitin içeriğinde bulunan saflaştırma kolonunun kapasitesi belirtilen miktarı aşmaya uygun olmadığı için verim oldukça düşüktür. Bu nedenle elde edilen DNA'yı daha konsantre hale getirmek için SpeedVac vakum cihazında çözücü ortamdan uzaklaştırılmış ve daha az miktarda çözücüyle nDNA çözündürülmüştür.

4.1.1. İzole Edilen DNA'nın Konsantrasyonu ve Saflığına Ait Bulgular

Yöntem kısmında belirtilen DNA izolasyon protokollerinin optimizasyonu (uyumlandırılması) ve yeterli saflıkta DNA eldesi için uygun olduğunu test etmek amacıyla in vivo deneyler, 2 aşamada gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada yer alan *kontrol* grubu ve *parasetamol* grubuna ait böbrek dokularından izole edilen mtDNA ve nDNA'nın nanodrop ile ölçüm sonuçları Tablo 4'te gösterilmiştir. 260/280 oranı DNA'daki genellikle protein kontaminasyonu göstergesi olarak kullanılırken, 260/230 oranı ise DNA'da deneysel çözelti kaynaklı bulunabilecek fenol, tuz ve benzeri maddelerin seviyesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Sonuçlar

incelendiğinde 260/280 ve 260/230 oranlarının PAR mtDNA-2 örneği dışında kabul edilebilir düzeylerde olduğu görülmektedir.

Tablo 4. Fare böbrek dokusundan izole edilen mtDNA ve nDNA'nın nanodrop ölçüm sonuçları

Deney Grubu	DNA Konsantrasyonu (ng/μL)	DNA Miktarı (μg)	260/280 (nm)	260/230 (nm)
Kontrol mtDNA	347,8	17,3	1,9	2,1
PAR mtDNA-1	46,2	2,3	1,8	1,81
PAR mtDNA-2	64,8	3,2	1,69	1,2
Kontrol nDNA	9,95	2	2,01	2,07
PAR nDNA-1	26,08	5,2	2,03	2,3
PAR nDNA-2	28,84	5,8	1,94	2,29

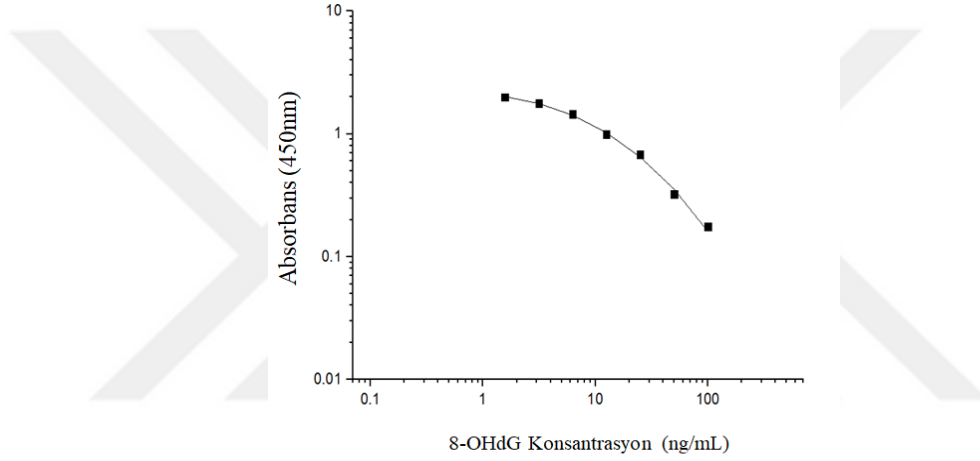
4.1.2. DNA'da 8-OHdG Miktarının ELISA Tekniği ile Belirlenmesine Ait

Bulgular

DNA izole edildikten sonra bazlarda veya nükleozitlerde oluşan oksidatif hasarın belirlenebilmesi için bunların serbestleşmesi sağlanmalıdır. Bu yüzden enzimatik yolla veya bir asit/baz kullanılarak DNA hidroliz edilmektedir. Bu çalışmada hidroliz, literatürde birçok çalışmada da kullanılan enzim karışımı (*NEB M0649*) aracılığıyla 1 μg DNA'da gerçekleştirilmiştir (Czernecki ve ark., 2021; Krueger ve ark., 2022; Mposhi ve ark., 2022). Hidroliz işleminden sonra serbestleşen 8-OHdG miktarı ELISA tekniği ile ölçülmüştür.

4.1.2.1. Ön Uyumlandırma Çalışmasının Kalibrasyon Grafiği

8-OHdG ölçümü için kullanılan ticari kitin önerdiği şekilde standartlar ikili şekilde çalışılmıştır. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için kullanılan standartlar 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 ve 0 ng/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır, bunun için önce en konsantre çözelti olan 100 ng/mL hazırlanmış, diğer çözeltiler bu çözeltilerden bir seri dilüsyonla elde edilmiştir. Şekil 5'te dört parametrelili lojistik modele göre çizilen kalibrasyon eğrisi gösterilmektedir. Tablo 5'te çizilen eğrinin denklemi, denkleme ait veriler ve denklemdaki regresyon katsayısı (R^2) verilmiştir.



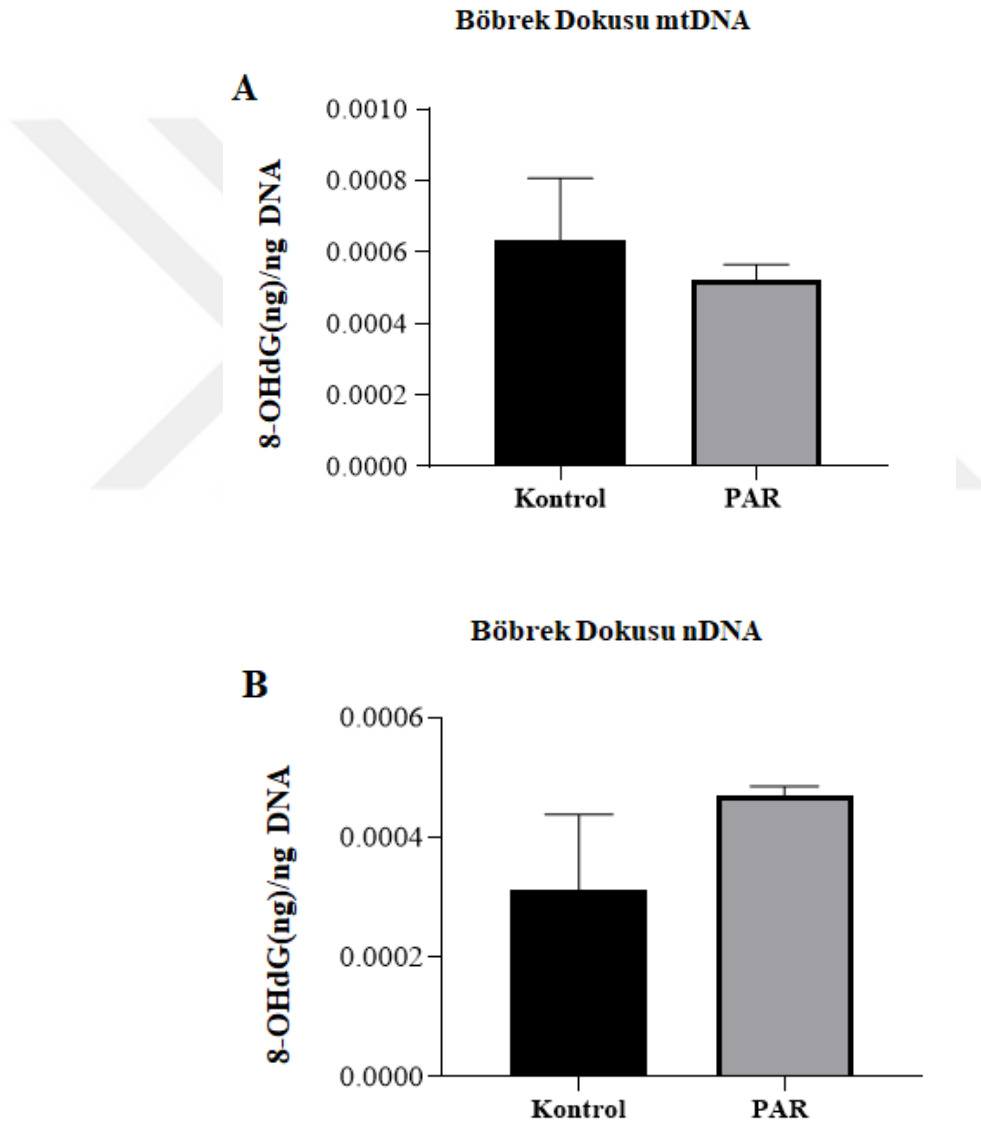
Şekil 5. Ön uyumlandırma çalışmasında kullanılan 8-OHdG kalibrasyon eğrisi

Tablo 5. Kalibrasyon eğrisinin denklemi, denkleme ait veriler ve regresyon katsayısı (R^2)

Denklem	$y = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + (x/x_0)^p)$
A_1	$2,362653 \pm 0,03317$
A_2	$-0,0941 \pm 0,07734$
x_0	$10,35216 \pm 0,92355$
p	$0,95146 \pm 0,06122$
R^2	0,99898

4.1.2.2. Böbrek Dokusundan İzole Edilen DNA'da 8-OHdG Miktarı Tayini

Kontrol ve parasetamol grubuna ait böbrek dokularından izole edilen DNA örnekleri enzimatik olarak hidroliz edilmiş, ardından ELISA tekniği ile içeriklerindeki 8-OHdG miktarı belirlenmiştir. *PAR* grubu 8-OHdG miktarı *Kontrol* grubu ile karşılaştırıldığında hem mtDNA hem de nDNA'da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 6).



Şekil 6. Fare böbrek dokusundan izole edilen mitokondriyel ve nükleer DNA'da ELISA tekniği ile ölçülen 8-OHdG miktarları. A: Fare böbrek dokusundan izole edilen mitokondriyel DNA; B: Fare böbrek dokusundan izole edilen nükleer DNA.

4.2. Esas Çalışmaya Ait Bulgular

4.2.1. İzole Edilen DNA'nın Konsantrasyonu ve Saflığına Ait Bulgular

Ön deneme çalışmasında gerçekleştirildiği gibi DNA konsantrasyonu, 260/280 ve 260/230 oranları belirlenmiştir. Bu çalışmaya *Kontrol* ve *PAR* grubunun yanında *MitoTempo* grubu da dahil edilmiştir. Farelerin hem böbrek hem de karaciğer dokularından DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Tablo 6 ve 7'de verilen nanodrop ölçüm sonuçları incelendiğinde 260/280 oranları DNA saflığı için istenen 1.8-2 aralığında olduğu görülmüştür. 260/230 oranları da DNA örnekleri için istenen 1.8-2.2 aralığına uygun veya bu aralığa çok yakın bir sonuç vermiştir.

Tablo 6. Fare BÖBREK dokusundan izole edilen mtDNA ve nDNA'nın nanodrop ölçüm sonuçları

Deney Grubu	DNA Konsantrasyonu (ng/μL)	DNA Miktarı (μg)	260/280 (nm)	260/230 (nm)
Kontrol mtDNA	442,79	22,1	1,88	2,06
PAR mtDNA	336,34	23,5	1,84	1,66
MitoTempo mtDNA	344,88	20,6	1,81	1,92
Kontrol nDNA	120,67	12,06	2,1	1,78
PAR nDNA	147,27	14,7	2,04	1,9
MitoTempo nDNA	158,78	15,8	2,02	1,85

Tablo 7. Fare KARACIĞER dokusundan izole edilen mtDNA ve nDNA'nın nanodrop ölçüm sonuçları

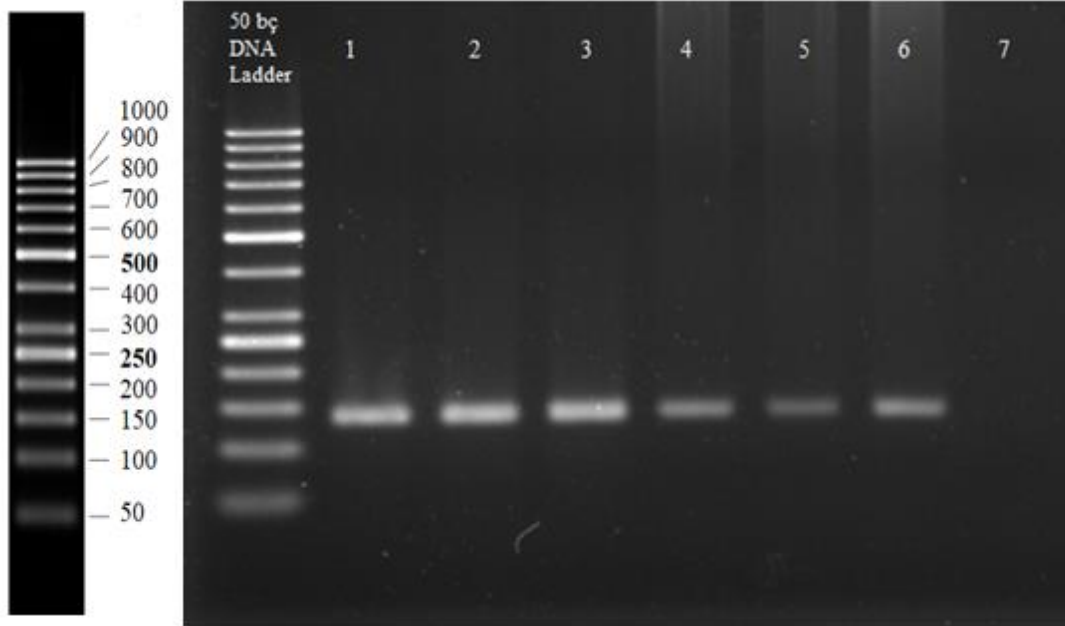
Deneş Grubu	DNA Konsantrasyonu (ng/µL)	DNA Miktarı (µg)	260/280 (nm)	260/230 (nm)
Kontrol mtDNA	2780,41	83,4	1,91	1,73
PAR mtDNA	1972,64	59,1	1,91	2,31
MitoTempo mtDNA	2086,27	62,5	1,91	2,27
Kontrol nDNA	74,9	7,4	1,92	1,83
PAR nDNA	58,36	5,8	2	1,8
MitoTempo nDNA	69,72	6,9	2	1,84

4.2.2. PCR ile Çoğaltılan DNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektrofrezine ait Bulgular

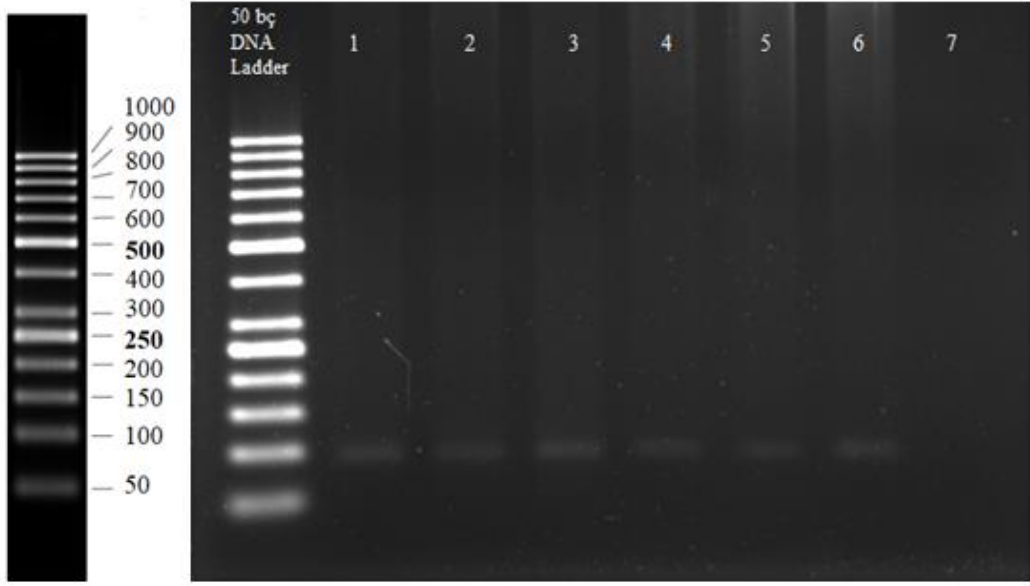
İzolatların hedeflendiği gibi nükleer ya da mitokondriyel DNA olup olmadıklarını kanıtlamak ve izole edilen DNA'ların birbirini kontamine edip etmediğini belirlemek için literatürden seçilen primerler ile *Yöntem* kısmında anlatılan koşullarda PCR işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem spesifik bir DNA parçasının primerler aracılığıyla istenen gen bölgesinin enzimatik olarak çoğaltılması şeklinde ifade edilmektedir. PCR reaksiyonu temelde 3 aşamadan meydana gelmektedir. İlk basamakta kalıp DNA yüksek sıcaklıklarda (94-96°C) denatürasyona uğrayıp tek iplikli hale dönüşmektedir. Ardından sıcaklık 37-65°C'ye düşürülerek tek iplikli DNA molekülleri üzerinde spesifik olarak hedef dizilere primerlerin bağlanması (annealing) adımı gerçekleşir. PCR'ın son basamağında DNA zincirlerine tutunan primerlerin DNA polimeraz aracılığıyla uzaması ve sonucunda da DNA sentezi gerçekleşmiş olur.

4.2.2.1. Böbrekten İzole Edilen DNA'nın PCR ile Çoğaltılmasıyla Oluşan Ürünlerin Agaroz Jel Görüntüleri

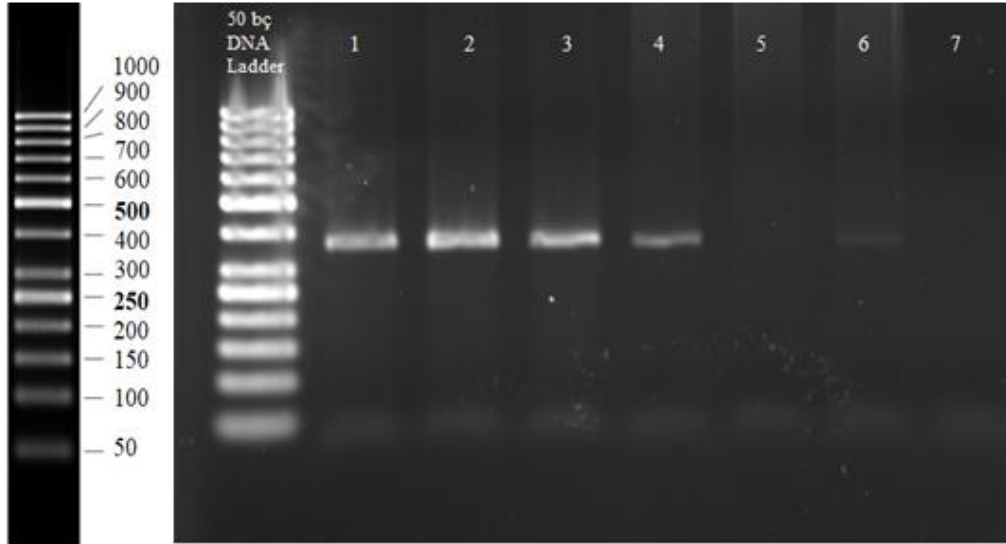
Böbrek dokusundan izole edildikten sonra PCR ile çoğaltılan DNA örnekleri, agaroz jelde görüntülenmiştir. Agaroz jel görüntülerinin sol tarafındaki 50 baz çifti DNA ladder görüntüsü (Thermo Fisher, SM0371) kendi deneysel çalışmamızda elde ettiğimiz görüntüleri karşılaştırmak için verilmiştir. Mitokondriyel DNA için seçilen primerlerle çoğaltılan örneklerin jel görüntüleri incelendiğinde beklenen bölgelerde bantlar oluştuğu görülmüştür (Şekil 7-15, 1-3 numaralı hatlar). Ancak nükleer DNA örneklerinin bu primerlerle çoğalmasını beklemediğimiz halde mtDNA örneklerine göre daha az yoğunlukta olsa da bantlar gözlenmiştir (Şekil 7-9, 4-6 numaralı hatlar). Nükleer DNA primerleri ile gerçekleşen PCR sonucu nükleer DNA örneklerinde çoğalma gözlenirken mitokondriyel DNA örneklerinde bir bant görülmemiştir.



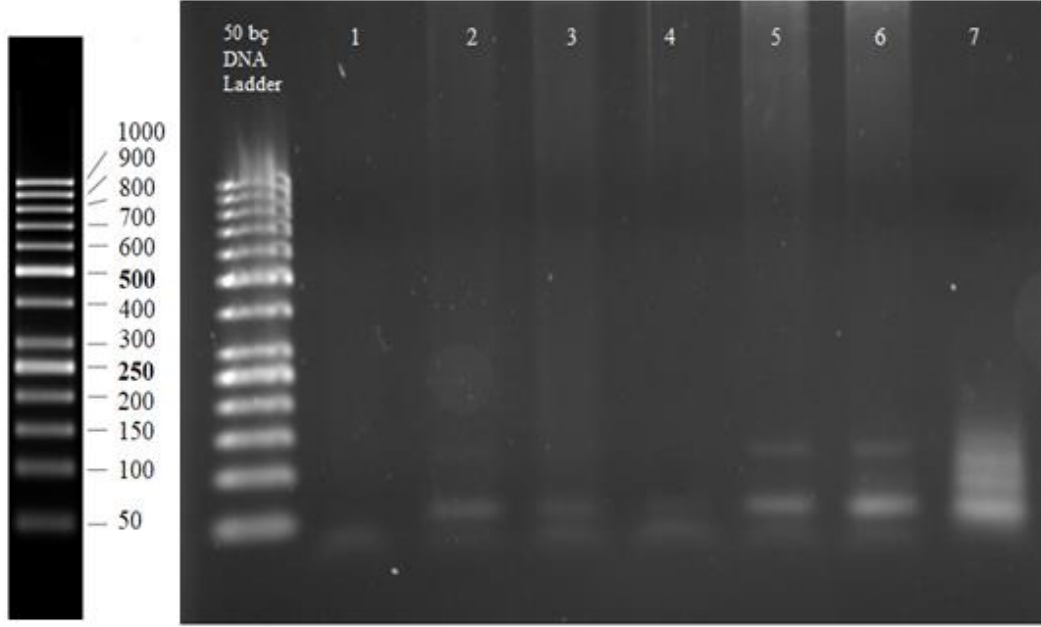
Şekil 7. Mitokondriyel 16S rRNA primeri (132 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Kontrol grubu mtDNA, 2: MitoTempo grubu mtDNA, 3: PAR grubu mtDNA, 4: Kontrol grubu nDNA, 5: MitoTempo grubu nDNA, 6: PAR grubu nDNA, 7: Negatif Kontrol (DNA içermeyen örnek)



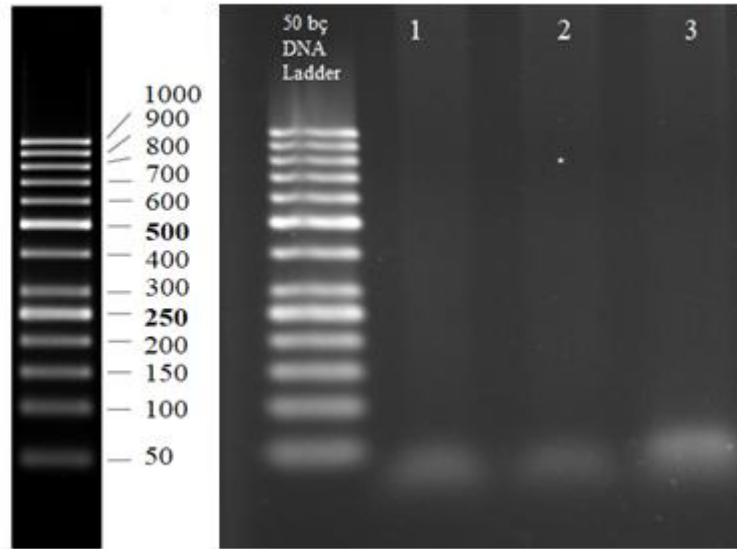
Şekil 8. Mitokondriyel ND1 primeri (84 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Kontrol grubu mtDNA, 2: MitoTempo grubu mtDNA, 3: PAR grubu mtDNA, 4: Kontrol grubu nDNA, 5: MitoTempo grubu nDNA, 6: PAR grubu nDNA, 7: Negatif Kontrol (DNA içermeyen örnek)



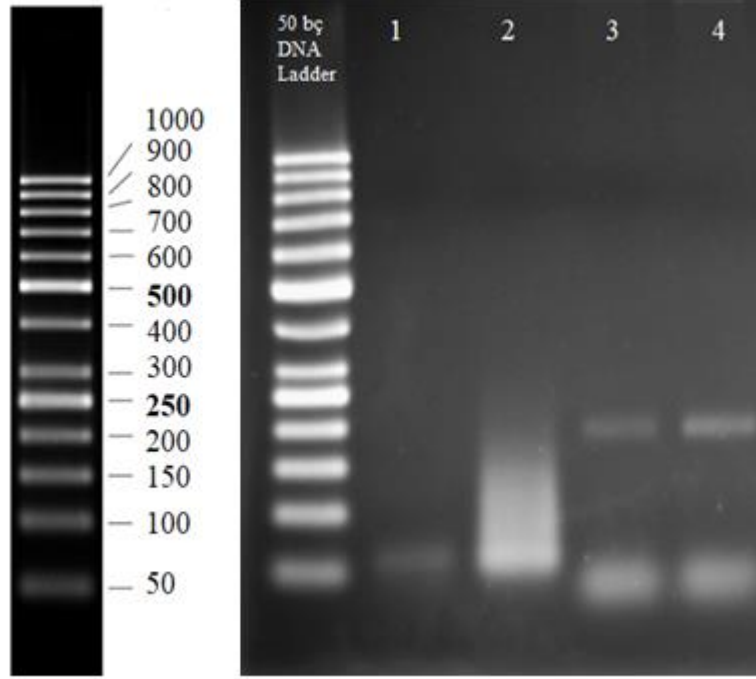
Şekil 9. Mitokondriyel DNA-B6 primeri (359 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Kontrol grubu mtDNA, 2: MitoTempo grubu mtDNA, 3: PAR grubu mtDNA, 4: Kontrol grubu nDNA, 5: MitoTempo grubu nDNA, 6: PAR grubu nDNA, 7: Negatif Kontrol (DNA içermeyen örnek)



Şekil 10. Nükleer Hekzokinaz 2 primeri (122 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Kontrol grubu mtDNA, 2: MitoTempo grubu mtDNA, 3: PAR grubu mtDNA, 4: Kontrol grubu nDNA, 5: MitoTempo grubu nDNA, 6: PAR grubu nDNA, 7: Negatif Kontrol (DNA içermeyen örnek)



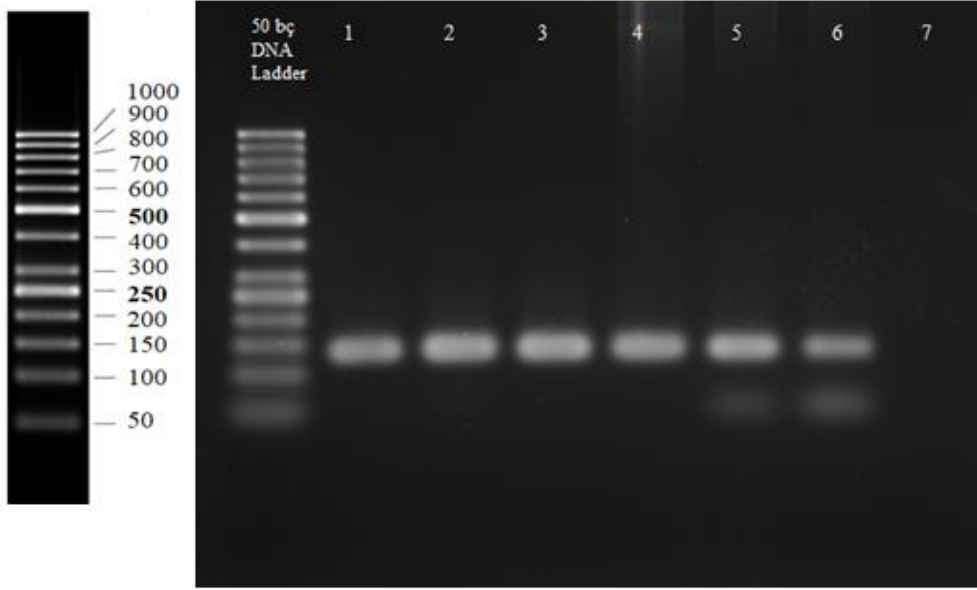
Şekil 11. Nükleer Prostaglandin E primeri (189 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Kontrol grubu mtDNA, 2: MitoTempo grubu mtDNA, 3: PAR grubu mtDNA



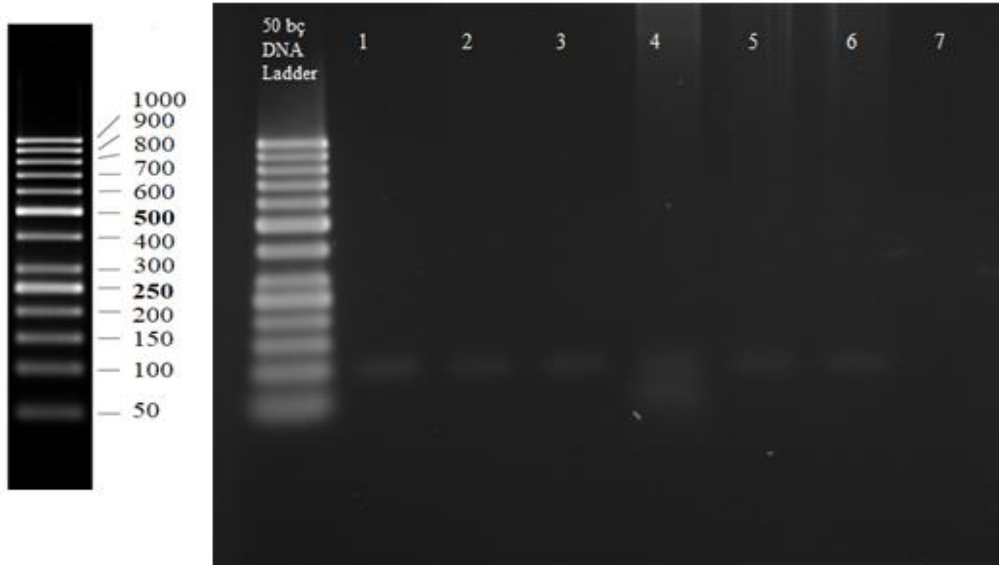
Şekil 12. Nükleer Prostaglandin E primeri (189 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Negatif Kontrol, 2: Kontrol grubu nDNA, 3: MitoTempo grubu nDNA, 4: PAR grubu nDNA

4.2.2.2. Karaciğerden İzole Edilen DNA'nın PCR ile Çoğaltılmasıyla Oluşan Ürünlerin Agaroz Jel Görüntüleri

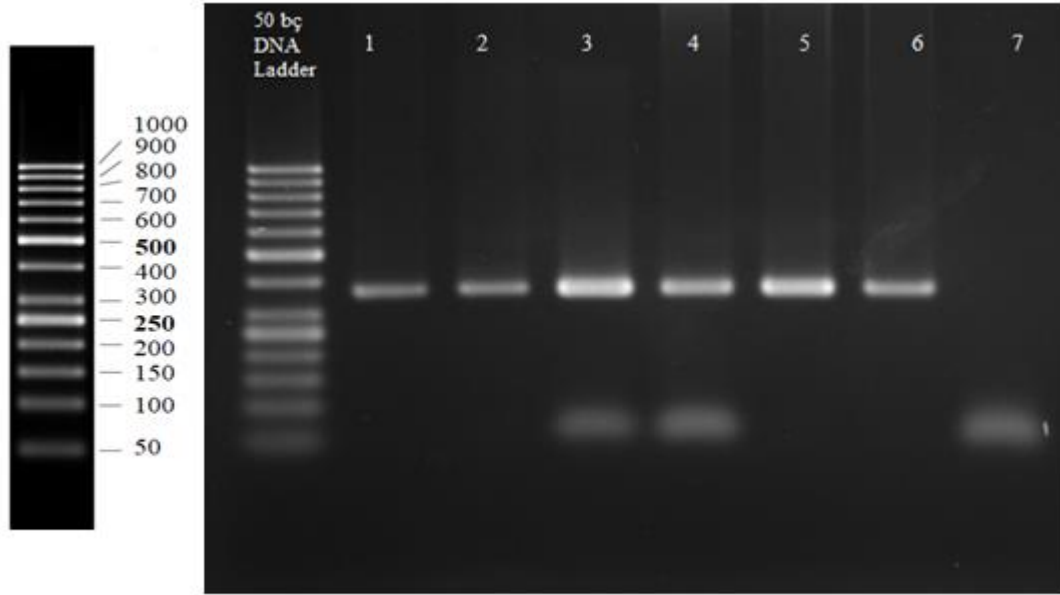
Karaciğer dokusundan izole edildikten sonra PCR ile çoğaltılan DNA örnekleri agaroz jelde kontrol edilmiştir. Agaroz jel görüntülerinin sol tarafındaki 50 baz çifti DNA ladder görüntüsü (Thermo Fisher, SM0371) kendi deneysel çalışmamızda elde ettiğimiz görüntüleri karşılaştırmak için verilmiştir. Böbrek dokusunda olduğu gibi mitokondriyel DNA için seçilen primerlerle çoğaltılan örneklerin jel görüntüleri incelendiğinde beklenen bölgelerde bantlar oluştuğu görülmüştür. Ancak nükleer DNA örneklerinin bu primerlerle çoğalması beklenmediği halde mtDNA örneklerine göre daha az yoğunlukta olsa da bir bant verdiği görülmüştür. Nükleer DNA primerleri ile gerçekleşen PCR sonucu nükleer DNA örneklerinde çoğalma gözlenirken mitokondriyel DNA örneklerinde herhangi bir çoğalma gerçekleşmemiş ve dolayısıyla bir bant görülmemiştir.



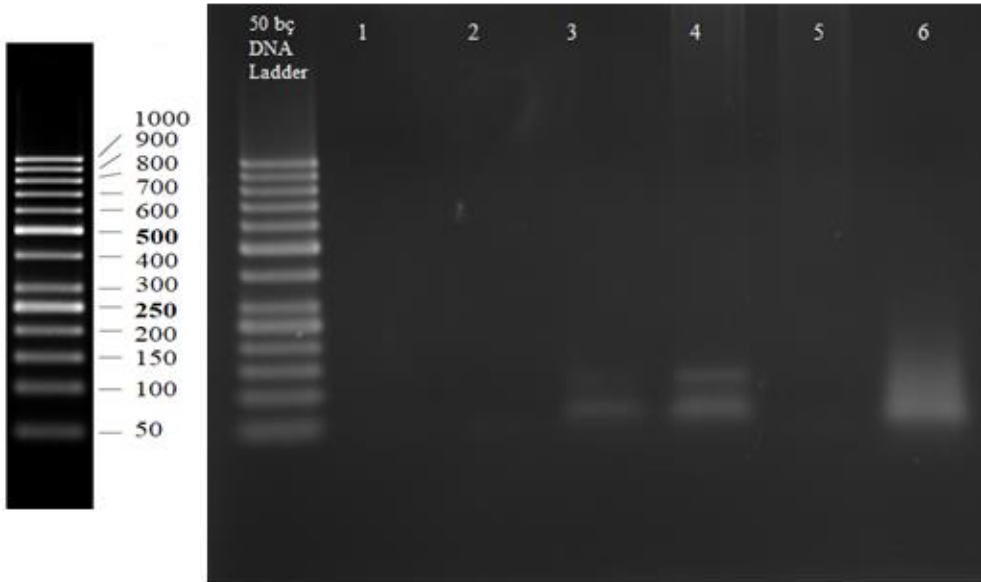
Şekil 13. Mitokondriyel 16S rRNA primeri (132 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Kontrol grubu mtDNA, 2: MitoTempo grubu mtDNA, 3: PAR grubu mtDNA, 4: Kontrol grubu nDNA, 5: MitoTempo grubu nDNA, 6: PAR grubu nDNA, 7: Negatif Kontrol (DNA içermeyen örnek)



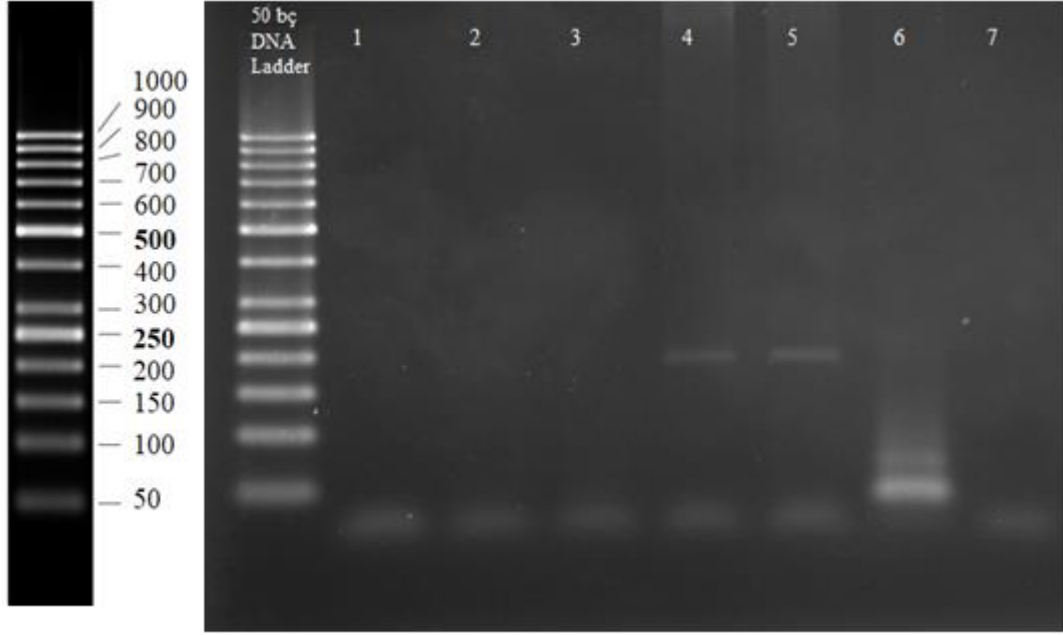
Şekil 14. Mitokondriyel ND1 primeri (84 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Kontrol grubu mtDNA, 2: MitoTempo grubu mtDNA, 3: PAR grubu mtDNA, 4: Kontrol grubu nDNA, 5: MitoTempo grubu nDNA, 6: PAR grubu nDNA, 7: Negatif Kontrol (DNA içermeyen örnek)



Şekil 15. Mitokondriyel DNA-B6 primeri (359 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Kontrol grubu mtDNA, 2: MitoTempo grubu mtDNA, 3: PAR grubu mtDNA, 4: Kontrol grubu nDNA, 5: MitoTempo grubu nDNA, 6: PAR grubu nDNA, 7: Negatif Kontrol (DNA içermeyen örnek)



Şekil 16. Nükleer Hekzokinaz 2 primeri (122 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Kontrol grubu mtDNA, 2: MitoTempo grubu mtDNA, 3: Kontrol grubu nDNA, 4: PAR grubu nDNA, 5: MitoTempo grubu nDNA, 6: Negatif Kontrol



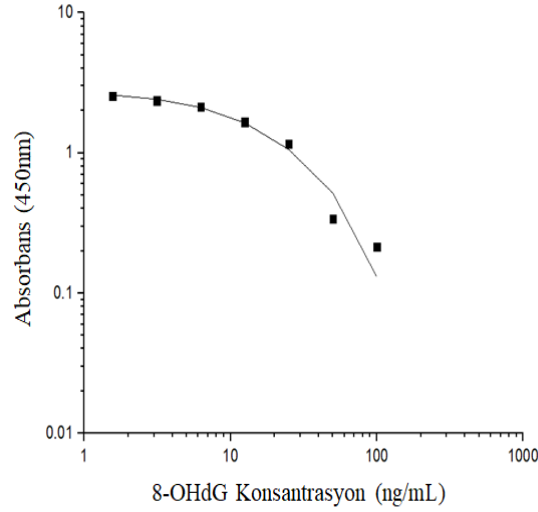
Şekil 17. Nükleer Prostaglandin E primeri (189 baz çifti) kullanılarak gerçekleştirilen PCR deneyinin agaroz jel görüntüsü. 1: Kontrol grubu mtDNA, 2: MitoTempo grubu mtDNA, 3: PAR grubu mtDNA, 4: Kontrol grubu nDNA, 5: MitoTempo grubu nDNA, 6: PAR grubu nDNA, 7: Negatif Kontrol (DNA içermeyen örnek)

4.2.3. DNA'da 8-OHdG Miktarının ELISA Tekniği ile Belirlenmesine Ait

Bulgular

4.2.3.1. Kalibrasyon Grafiği

Ön uyumlandırma çalışmasında yapıldığı gibi 8-OHdG miktarının belirlenmesi için ticari kitin önerdiği şekilde kalibrasyon standart çözeltileri ikili hazırlanmış ve çalışılmıştır. Kalibrasyon eğrisi için kullanılan standartlar 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 ve 0 ng/mL konsantrasyon aralığındadır. Şekil 18'de dört parametrelili lojistik modele göre çizilen kalibrasyon eğrisi ve Tablo 8'de çizilen eğrinin denklemi, denkleme ait veriler ve denklemdeki regresyon katsayısı (R^2) verilmiştir.



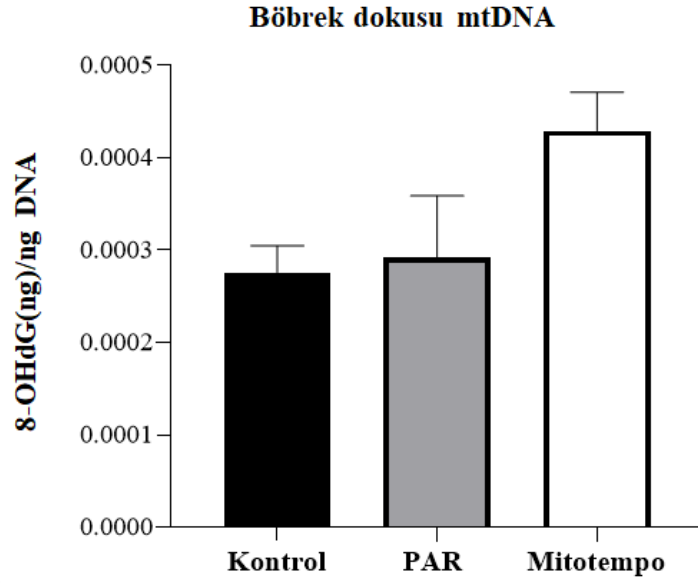
Şekil 18. Esas Çalışmaya Ait Kalibrasyon Eğrisi

Tablo 8. Kalibrasyon eğrisinin denklemi, denkleme ait veriler ve regresyon katsayısı (R^2)

Denklem	$y = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + (x/x_0)^p)$
A_1	$2,74331 \pm 0,10735$
A_2	$-0,32656 \pm 0,38235$
x_0	$20,93079 \pm 5,76432$
p	$1,11557 \pm 0,23585$
R^2	0,99162

4.2.3.2. Böbrekten İzole Edilen DNA'da 8-OHdG Miktarı Tayini

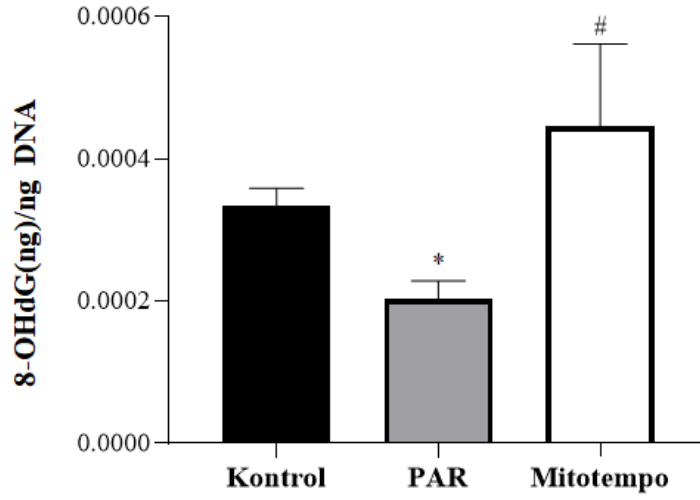
İlaç uygulamasından 24 saat sonra ötenazi edilen farelerin *Kontrol*, *PAR* ve *MitoTempo* grubuna ait böbrek dokularından izole edilen DNA enzimatik olarak hidroliz edilmiş ve ardından 8-OHdG miktarları ELISA tekniği ile belirlenmiştir. Şekil 19'da gösterilen *PAR* ve *MitoTempo* grubunun böbrek dokusundan izole edilen mtDNA'nın 8-OHdG içeriği kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.



Şekil 19. Fare böbrek dokusundan izole edilen mitokondriyel DNA’da ELISA tekniği ile ölçülen 8-OHdG miktarları. İzole edilmiş DNA, 1 saat 37°C’de enzim karışımı ile inkübe edilip hidroliz işlemi tamamlandıktan sonra ELISA kit aracılığıyla 450 nm’de her bir örneğin yaptığı aborbans ölçülmüş, devamında örneklerin 8-OHdG miktarları, kalibrasyon çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon doğrusu denklemi aracılığıyla hesaplanmıştır. Hesaplama sonucu bulunan DNA miktarları, her bir örneğin ng DNA miktarına bölünerek normalize edilmiş ve grafiğe geçirilmiştir.

Şekil 20’de gösterilen *PAR* ve *MitoTempo* grubundaki hayvanların böbrek dokularından izole edilen nDNA’nın 8-OHdG içeriği, ilaç uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *PAR* grubu DNA’sında kontrol grubuna kıyasla %39 oranında daha düşük 8-OHdG olduğu gözlenmiştir. *MitoTempo* grubunda ise *Kontrol* grubuna kıyasla önemli bir fark gözlenmezken *PAR* grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yüksek düzeyler belirlenmiştir. *MitoTempo* grubu *PAR* grubu ile kıyaslandığında 8-OHdG miktarı *PAR*’dan sonra *MitoTempo* uygulanan farelerde %120 oranında bir artış meydana gelmiştir (Şekil 20).

Böbrek dokusu nDNA

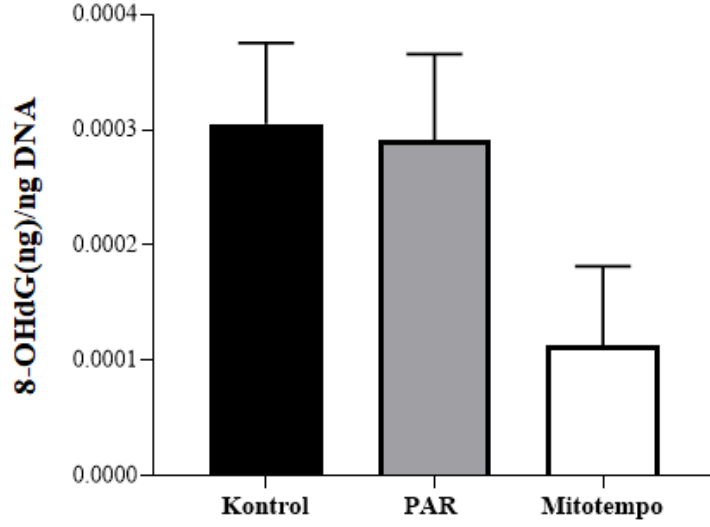


Şekil 20. Fare böbrek dokusundan izole edilen nükleer DNA'da ELISA tekniği ile ölçülen 8-OHdG miktarları. İzole edilmiş DNA, 1 saat 37°C'de enzim karışımı ile inkübe edilip hidroliz işlemi tamamlandıktan sonra ELISA kit aracılığıyla 450 nm'de her bir örneğin yaptığı aborbans ölçülmüş, devamında örneklerin 8-OHdG miktarları, kalibrasyon çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon doğrusu denklemi aracılığıyla hesaplanmıştır. Hesaplama sonucu bulunan 8-OHdG miktarları, her bir örneğin ng DNA miktarına bölünerek normalize edilmiş ve grafiğe geçirilmiştir (*, kontrol grubuna göre $*p \leq 0.05$; #, PAR grubuna göre $#p \leq 0.05$).

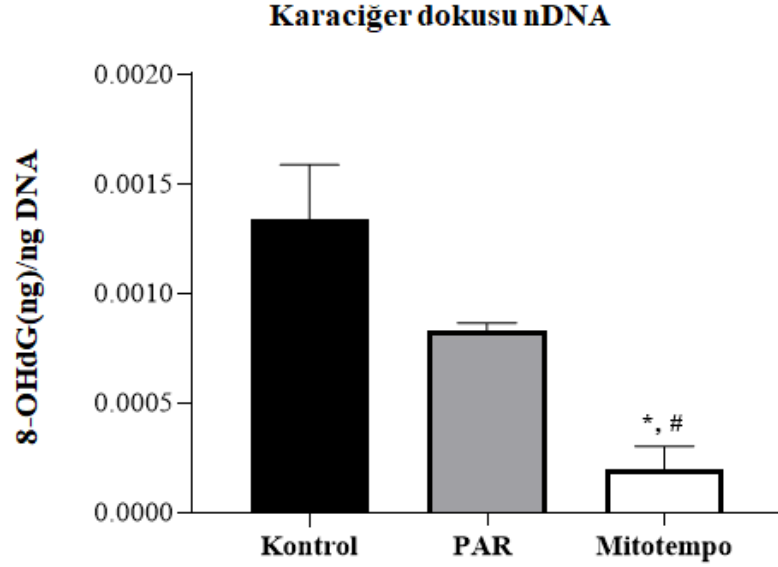
4.2.3.3. Karaciğerden İzole Edilen DNA'da 8-OHdG Miktarı Tayini

İlaç uygulamasından 24 saat sonra ötenazi edilen farelerin *Kontrol*, *PAR* ve *MitoTempo* grubuna ait karaciğer dokularından izole edilen DNA örnekleri enzimatik olarak hidroliz edilmiş, ardından ELISA tekniği ile 8-OHdG miktarı belirlenmiştir. *Kontrol* ve *PAR* grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Her ne kadar *MitoTempo* grubunda ölçülen 8-OHdG miktarı *Kontrol* ve *PAR* grubuna nazaran oldukça düşük görünmekte ise de her bir grupta üçlü çalışılan örneklerin standart sapma değerlerinin yüksek olması nedeniyle bu fark, istatistiksel olarak önemli değildir (Şekil 21).

Karaciğer dokusu mtDNA



Şekil 21. Fare karaciğer dokusundan izole edilen mitokondriyel DNA'da ELISA tekniği ile ölçülen 8-OHdG miktarları. İzole edilmiş DNA, 1 saat 37°C'de enzim karışımı ile inkübe edilip hidroliz işlemi tamamlandıktan sonra ELISA kit aracılığıyla 450 nm'de her bir örneğin yaptığı aborbans ölçülmüş, devamında örneklerin 8-OHdG miktarları, kalibrasyon çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon doğrusu denklemi aracılığıyla hesaplanmıştır. Hesaplama sonucu bulunan 8-OHdG miktarları, her bir örneğin ng DNA miktarına bölünerek normalize edilmiş ve grafiğe geçirilmiştir.



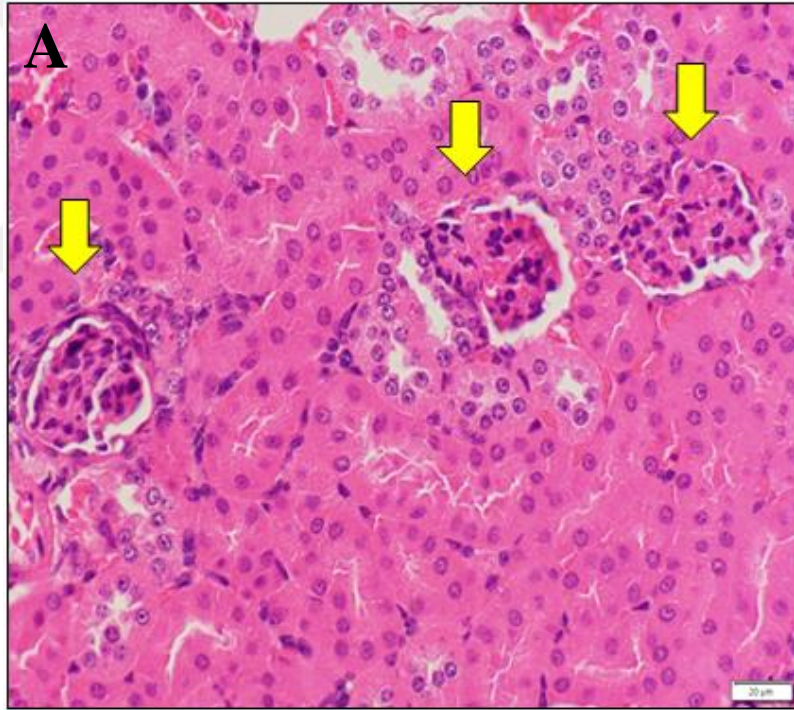
Şekil 22. Fare karaciğer dokusundan izole edilen nükleer DNA'da ELISA tekniği ile ölçülen 8-OHdG miktarları. İzole edilmiş DNA, 1 saat 37°C'de enzim karışımı ile inkübe edilip hidroliz işlemi tamamlandıktan sonra ELISA kit aracılığıyla 450 nm'de her bir örneğin yaptığı absorbans ölçülmüş, devamında örneklerin 8-OHdG miktarları, kalibrasyon çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon doğrusu denklemi aracılığıyla hesaplanmıştır. Hesaplama sonucu bulunan 8-OHdG miktarları, her bir örneğin ng DNA miktarına bölünerek normalize edilmiş ve grafiğe geçirilmiştir (*, kontrol grubuna göre $p \leq 0.05$; #, PAR grubuna göre $p \leq 0.05$).

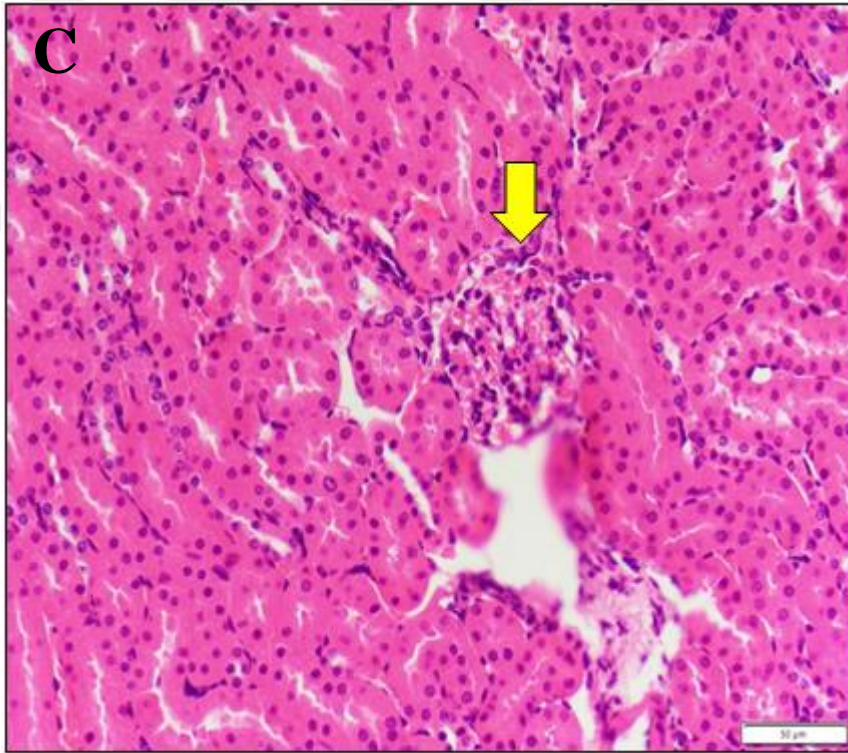
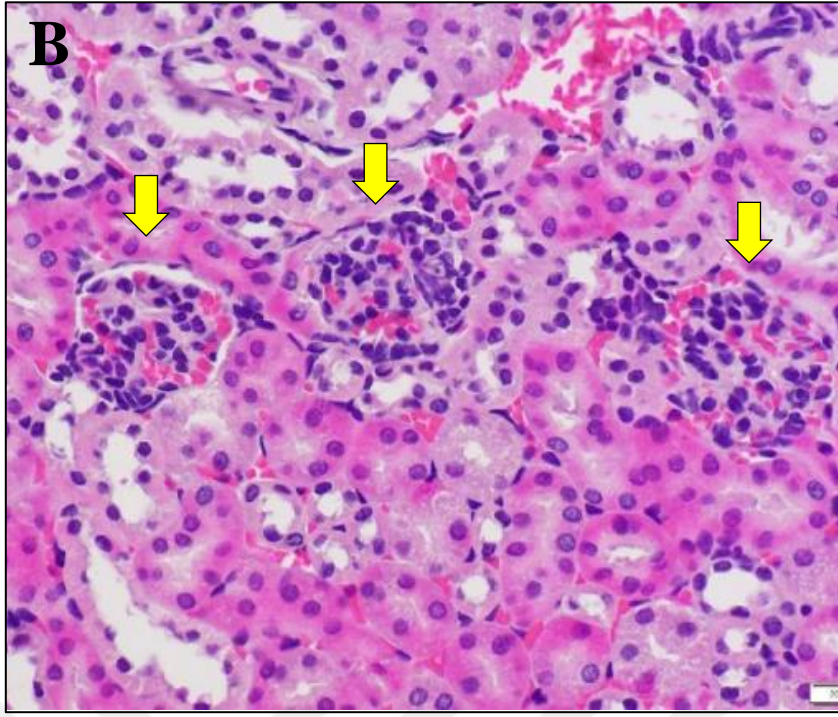
PAR ve *MitoTempo* gruplarının karaciğer dokusundan izole edilen nDNA örneklerinde ölçülen 8-OHdG miktarları, ilaç uygulanmayan kontrol grubu ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında *PAR* grubunda anlamlı bir fark gözlenmezken *MitoTempo* grubunda %85 oranında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma gözlenmiştir. *MitoTempo* ve *PAR* grubu kıyaslandığında ise *PAR*'dan sonra *MitoTempo* uygulanan farelerde %76.5 oranında meydana gelen 8-OHdG miktarının anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir (Şekil 22).

4.2.4. Histopatolojik Analiz Bulguları

Kontrol, *PAR* ve *MitoTempo* gruplarına ait böbrek dokusu örneklerinin histopatolojik analiz görüntüleri, Şekil 23'te gösterilmiştir.

Histopatolojik analiz bulguları incelendiğinde *Kontrol* grubundaki böbrek dokusunda glomerülüs ve Bowman kapsülü olağan izlenirken, *PAR* grubunda glomerülüslerde sellülaritede artış ve mezengial hücrelerde aktivasyon gözlenmiştir, ayrıca Bowman kapsülünde daralma da mevcuttur. *MitoTempo* grubunda ise Bowman kapsülünde daralma devam ederken mezengial hücrelerdeki aktivasyonun azaldığı ancak kapillerde dilatasyon meydana geldiği görülmüştür.





Şekil 23. Böbrek dokusuna ait histopatolojik analiz görüntüleri. A: Kontrol grubu, Bowman kapsülü ve glomerülüs (okun işaret ettiği alan) B: Parasetamol grubu, daralmış Bowman kapsülü ve mezengial hücre aktivasyonu (okun işaret ettiği alan) C: Parasetamol+MitoTempo grubu, daralmış Bowman kapsülü ve kapiller dilatasyon (okun işaret ettiği alan). Büyütme boyutu 60X.

Tartışma

Bu tez çalışması tüm dünyada 60 yıla yakın bir zamandır kullanımda olan parasetamolün hepatotoksik ve nefrotoksik tek doz maruz-kalımda nükleer ve mitokondriyel DNA'da oksidatif baz hasarına neden olup olmadığını ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla parasetamole bağlı akut karaciğer ve böbrek hasarının olduğu C57BL/6J fare modeli kullanılmıştır. Parasetamol kaynaklı karaciğer hasarı mekanizmasında mitokondriyel oksidatif stres önemli rol oynadığı için organizmada mitokondrilere hedeflenen bir antioksidan olan MitoTempo'nun gerek karaciğer gerekse böbrek dokusunda nükleer ve mitokondriyel baz hasarı üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Parasetamol terapötik dozlarda kullanıldığında başta Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) olmak üzere diğer birçok ulusal sağlık otoritesi ve sağlık uzmanları tarafından da insan sağlığı açısından güvenli ve etkili bir analjezik-antipiretik ilaç olarak kabul edilmektedir. Tezgâh üstü ilaç (OTC, over the counter) olarak ve başta baş ağrısına karşı olmak üzere reçete gerektirmeden alınabilmekte ve çok fazla sayıda insan tarafından kullanılmaktadır. Bu reçetesiz kullanımının yanı sıra reçeteye bağlı olarak kanser ya da romatoid artrit ağrısı yönetimi gibi farklı durumlarda da kullanımı vardır. 1950 yılından beri hamilelik döneminde ve bebeklerde dahi güvenli bir şekilde kullanılan bu ilacın en iyi bilenen toksik etkisi, doz aşımı durumunda neden olduğu ve ölümlü sonuçlanabilen akut karaciğer hasarıdır. İlk fark edildiği 1966 yılından sonraki yıllarda parasetamolün aslında böbreklerde de toksik etkisi olduğu fark edilmiş, ancak ölümcül olabilen karaciğer toksisitesi yanında böbrek toksisitesi fazla önemsenmemiştir. Bunun nedenleri arasında İngiltere kaynaklı 1983 tarihli bir makalede aşırı doz parasetamol vakalarında böbrek toksisitesi görülme sıklığının %1-2 gibi çok düşük bir oranda bildirilmiş olması da vardır (Prescott, 1983). Uzunca yıllar bu makaleye atfen böbrek toksisitesi çok önemsenmemiş, ancak zaman içerisinde parasetamol doz aşımı vakalarına ilişkin biriken klinik verilerin dikkat çekmesiyle konu tekrar incelenmeye başlamıştır. Sonuçta doz aşımı durumlarında aslında böbrek toksisitesi görülme sıklığının %10 ile %79 gibi oldukça yüksek bir aralıkta olduğu anlaşılmıştır (Mour ve ark., 2005; Pakravan ve ark., 2009; Curry ve ark., 2015). İlk makaledeki çelişkili sonucun nedeninin o araştırmanın İngiltere'de oldukça küçük bir hastanede yapılmış olması, değerlendirmeye alınan vakaların çalışmaya dahil olma ölçütlerinin bilimsel çıkarımlar yapmaya yetecek kaliteyi

sağlayamaması olduğu anlaşılmıştır. Bunun üzerine parasetamol doz aşımı kaynaklı böbrek toksisitesi konusuna ilgi tekrar yoğunlaşmıştır. Böbrek toksisitesi riskinin yıllarca zannedildiğinden çok daha yüksek olduğunun fark edilmesi yanında konuyu ilginç kılan bir başka neden, parasetamol doz aşımında gözlenen böbrek toksisitesi mekanizmasının karaciğer toksisitesi mekanizmasından farklı ve ondan bağımsız olduğunun da anlaşılmasıdır (Jones ve Vale, 1993; Blakely ve McDonald, 1995; Akakpo ve ark., 2020). Bugüne kadar yapılan çalışmalar her iki organ hasarının her zaman birbirine eşlik etmediği ve tek başına karaciğer ya da böbrek hasarı gelişebildiğini göstermektedir (Gabriel, 1982; Eguia ve Materson, 1997). Böbrekte gözlenen toksisitenin parasetamolün oransal olarak asıl karaciğerde gerçekleşen biyotransformasyonu sonucu oluşan elektrofilik metaboliti NAPQI'a bağlı olabileceği hipotezleri, karaciğerleri çıkarıldıktan sonra yüksek doz parasetamole maruz bırakılan hayvanlarda böbrek hasarı gelişmesi sonucu yanlışlanmıştır (Breen ve ark., 1982). Her iki organdaki toksisitenin moleküler düzeydeki farklılığı ise çalışma grubumuzun daha önce yurtdışı ile ortaklaşa gerçekleştirdiği bir araştırmada gösterilmiş, karaciğer dokusunda toksisitenin başlangıcı ve devamındaki biyokimyasal olayların böbrek dokusunda gerçekleşmediği gözlenmiştir (Akakpo ve ark., 2020). Farklılığın kanıtlanmasına karşın böbrek toksisitesinin nasıl başladığı ve ilerlediği henüz anlaşılamamıştır.

Parasetamolün uzunca yıllar yaygın kullanımı sonucunda yıllar içerisinde biriken birçok temel, klinik ve epidemiyolojik veri, ilacın başka bir takım sağlık risklerinin olabileceğini düşündürmektedir. Bu riskler astım, cinsel gelişim ve endokrin bozukluklar, nörogelişimsel ve nörodavranışsal bozukluklardır (Dimova ve ark., 2005; Tiegs ve ark., 2014; Kristensen ve ark., 2016; Kennon-McGill ve McGill, 2017; Konkel, 2018; Liew ve ark., 2021).

Şüphelenilen bu risklerden birisi ilacın kansere yol açıp açmadığıdır. Amerika Birleşik Devletleri Kaliforniya Eyaleti yasalarına göre toplumsal yaşamda insanların maruz kaldığı kimyasal maddelerin bilinen karsinojenler ile ortak özellikler taşımaları durumunda karsinojenisite potansiyellerinin uzmanlarca incelenmesi ve bir risk değerlendirilmesi yapılması gerekmektedir (Proposition 65, 1986). Parasetamol, diğer karsinojenik maddeler gibi elektrofilik metabolit oluşturduğu için Kaliforniya Çevre Sağlığı Tehlike Değerlendirme Ofisi (OEHHA) tarafından 2019 yılında

incelenmeye alınmıştır. Konuda uzman bilim insanlarından oluşturulan bir komisyon parasetamolün karsinojenik potansiyeline ilişkin hakemli dergilerde yayınlanan 100'den fazla çalışmayı gözden geçirmiştir. İncelenen çalışmalarda ilacı kullananlarda karaciğer, mesane ve kan kanseri riskinin yüksek olduğu bildirilmektedir (Sun ve ark., 2018). Bilimsel komisyon literatürdeki prelinik ve klinik karsinojenisite verileri, mekanistik çalışmalar, genotoksisite ve epidemiyolojik çalışmaları değerlendirdikten sonra parasetamol kullanımı ile kanser arasında bir ilişki olmadığı sonucuna varmış ve bir seri değerlendirme makalesi yayınlamıştır (Murray ve ark., 2020; Jaeschke ve ark., 2021; Kirkland ve ark., 2021 Weinstein ve ark., 2021).

Parasetamol ile kanser arasındaki muğlak bağlantı nedeniyle *Dünya Sağlık Örgütü*'nün (WHO) bir organı olan *Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı* (IARC) parasetamolu Grup 3'te sınıflandırmaktadır; IARC'ın sınıflandırmasında net olarak başka gruplara girmeyen ajanlar bu kategoriye yerleştirilmektedir. Bir maddenin bu grupta yer alması genellikle onun karsinojenik potansiyeli olup olmadığının bilinmediği, bu konuda yapılarak yayınlanmış araştırma sayısının yeterli olmadığı ve/veya yayınlanan çalışmalarda eksikler olduğunu göstermektedir.

IARC, 1990 ve 1999 yıllarında parasetamolün uzun vadeli *in vivo* çalışmalarının kapsamlı bir değerlendirmesini yapmıştır. 1990'da deney hayvanları çalışmalarında karsinojenisite ile ilgili "sınırlı kanıt" olduğunu bildirirken (IARC, 1990), 1999 yılında yeni çalışmaları da içeren değerlendirmesinde verilerin parasetamolün karsinojenik olduğu sonucuna varmak için hala "yetersiz" olduğunu bildirmekte ve dolayısıyla parasetamol, Grup 3'te yer almaktadır (IARC, 1999).

Tüm dünyada çok uzun süredir ve yaygın kullanılmakta olan parasetamol ile ilgili en önemli endişe, kansere yol açıp açmadığı olsa da parasetamolün DNA'da yapması olası herhangi bir değişikliğin sonucunun mutlaka kanser olması gerekmez. Dolayısı ile uzmanların değerlendirme sonucu olan ilacın kullanımının kansere yol açmadığı görüşünü doğru kabul etmemiz durumunda bile yine de parasetamol kullanımı DNA molekülünde değişikliklere neden oluyor olabilir.

Ayrıca hücrede nükleer DNA yanında ikinci ve tek DNA olan mitokondriyel DNA'nın moleküler yapısında indüklenmesi olası değişiklikler de son yıllarda önem

kazanmıştır. Nükleer DNA'ya kıyasla her ne kadar çok daha az sayıda işlevsel protein ve diğer endojen faktörlerin kodlanmasını sağlasa da mtDNA'nın kodladığı bu biyomoleküller, hücrenin yaşamını sürdürmesi için oldukça kritik rol oynamaktadırlar. Dolayısı ile nDNA yanında mtDNA'da indüklenmesi olası yapısal hasarların analiz edilmesi önemli bir çalışma alanı olarak karşımıza çıkmaktadır. Birçok kanser çalışmasında mitokondriyel DNA'da meydana gelen oksidatif hasar ve bu hasarın DNA'da meydana getirdiği mutasyonlar belirlenmiştir. Ayrıca mtDNA'da meydana gelen hasar sonucu kodladığı proteinlerin anormal ekspresyona uğraması ve bu yüzden mitokondriyel işlev bozukluğuna neden olması da gözlenmiştir (Chatterjee ve ark., 2006).

Nükleer DNA ile karşılaştırıldığında, mtDNA reaktif oksijen türlerinin önemli bir kaynağı olan *Elektron Transport Zinciri*'ne yakınlığından dolayı oksidatif baz hasarına daha duyarlıdır (Barber ve Harris, 1994). Hasara daha yatkın olmasının diğer nedenleri histon proteinleri tarafından korunmaması ve mitokondride DNA onarımının sınırlı olmasıdır (Bohr ve Dianov, 1999; Sawyer ve Van Houten, 1999). Literatürde aşırı doz parasetamolün oluşturduğu oksidatif stresin mitokondriyel DNA'da herhangi bir baz hasarına yol açıp açmadığı henüz araştırılmamış, birkaç çalışmada mitokondriyel DNA'da olabilecek diğer bazı değişiklikler incelenmiştir. Bunun yanı sıra parasetamolün nükleer DNA üzerinde oksidatif baz hasarını indüklemesi de dahil yine az sayıda çalışma vardır. Bu çalışmaları hücre kültürü, in vivo hayvan çalışması ve insan çalışmaları olarak özetleyecek olursak, sıçan C6 glioma hücreleri kullanılan bir çalışmada hücreler 2.5-5 mM arasında değişen konsantrasyonlarda PAR'a maruz bırakılmış ve nükleer DNA'da bir değişim olup olmadığı araştırılmıştır. Bu hücrelerin tercih edilme nedeni PAR metabolizmasından sorumlu sitokrom P450 enzimlerini aktif bir biçimde içermesi, dolayısıyla elektrofilik metabolit NAPQI'nın olası etkisinin gözlenebilecek olmasıdır. Hücreler 48 saat PAR'a maruz bırakıldıklarında nükleer DNA'da 8-OHdG düzeyleri konsantrasyon- ve zaman-bağımlı olarak önemli derecede artmıştır, bu artışa ROT ve RAT da eşlik etmektedir (Wan ve ark., 2004).

Bugüne değin PAR toksisitesine yönelik yapılan hayvan çalışmaları incelendiğinde en çok tercih edilen hayvan türünün C57BL/6J fareler olduğu görülmektedir. Bu fareler parasetamol toksisitesine en duyarlı ırk ve tür olduğu için tercih

edilmektedirler (McGill ve ark., 2012). Söz konusu ilacın toksisitesi, erkek farelerde daha şiddetli ortaya çıkmaktadır, çünkü parasetamol toksisitesinden sorumlu metabolit NAPQI oluşumunu katalize eden CYP2E1 enzimi, testosteron tarafından indüklenmektedir (Hu ve ark., 1993). Bu indüksiyonun insanlarda da geçerli olduğu çalışma grubumuz tarafından gösterilmiştir (Arzuk ve ark., 2018; 2022). Bu nedenle bu tez çalışmasında da söz konusu fare ırkı ve türü tercih edilmiştir. Çalışmamızda hücre kültürü modelinin tercih edilmemesinin sebebi ise DNA üzerinde meydana gelebilecek oksidatif hasarın mekanizmasının anlaşılabilmesi için yetersiz kalmasıdır.

Literatürde mtDNA ile yapılan çalışmalara bakıldığında yüksek doz PAR kullanımı sonucu, ortamda artan oksidatif stres ile birlikte oluşan peroksinitrit yapısının mtDNA'da bir hasar meydana getirme olasılığı araştırılmıştır. Bu çalışmada C3Heb/FeJ farelere 300 mg/kg tek doz PAR verildikten 12 saat sonra karaciğer dokusundan izole edilen toplam DNA, slot blot hibridizasyon tekniği ile analiz edilmiştir. Densitometrik analizle PAR uygulamasından 3 saat sonra mtDNA düzeylerinde önemli bir azalma olduğu gösterilmiştir (Cover ve ark., 2005).

Yapılan *in vivo* bir çalışmada tekrarlayan doz etkisini ortaya koymak için erkek fareler 70 gün boyunca 400 mg/kg dozda parasetamole maruz bırakıldıklarında serum 8-OHdG düzeylerinin önemli derecede arttığı gösterilmiştir. Bunun sonucunda PAR'a uzun süre maruz kalmanın oksidatif strese neden olduğu ve DNA hasarını indüklediği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2015). Ancak bu çalışmada serumda önemli oranda artan 8-OHdG'in kaynağının ne oranda nükleer ne oranda mitokondriyel DNA olduğu araştırılmamıştır.

Yine erkek C57BL/6J farelerin kullanıldığı bir çalışmada i.p. yoldan 300 mg/kg PAR uygulanmış ve farelerin plazmasında mtDNA düzeylerinin önemli derecede arttığı gösterilmiştir (McGill ve ark., 2012). Aynı çalışmanın insanlarda yapılmış olan bölümünde akut ve tekrarlayan yüksek dozda PAR'a maruz kalan hastalar prospektif olarak izlenmiş ve mitokondriyel hasar ve nükleer DNA hasar biyogöstergeleri araştırılmıştır. Hepatotoksisite gelişen bu hastalarda mtDNA hasarı olup olmadığını test etmek üzere sadece mtDNA'da kodlanan primerlerle kantitatif PCR tekniği kullanılarak plazmadaki mtDNA konsantrasyonları ölçülmüş ve sağlıklı gönüllüler ile karşılaştırıldığında önemli derecede arttığı gözlenmiştir. Hem hastalarda hem de

PAR dozlanan farelerde kanda mtDNA'nın yanında nDNA fragmentlerinin de olduğu gösterilmiştir (McGill ve ark., 2012).

Bu tez çalışmasının amacı tek aşırı doz parasetamolün nükleer ve/veya mitokondriyel DNA'da oksidatif guanin hasarına neden olup olmadığının ortaya konması, neden oluyorsa her iki DNA molekülünde ne oranda hasar yaptığının belirlenmesidir. Dolayısıyla çalışmanın en kritik noktalarından birisi öncelikle izole edilen fraksiyonların ayrı ayrı nükleer ve mitokondriyel DNA olduğunun gösterilmesi, ardından da birbirinden yeterince ayrıldığına gösterilmesidir. Bu amaçla parasetamole maruz bırakılan hayvanların karaciğer ve böbrek dokularından ayrı fraksiyonlar halinde izole edilen her iki DNA molekülünün varlığını kanıtlamak ve izolasyon sırasında birbirini ne oranda kontamine ettiğini belirlemek üzere Mitokondriyel DNA'ya özgü *16S rRNA primeri* (132 baz çifti), *ND1 primeri* (84 baz çifti) ve *mtDNA-B6 primeri* (359 baz çifti) kullanılmıştır. Nükleer DNA'ya özgü olarak ise *Hekzokinaz 2 primeri* (122 baz çifti) ve *Prostaglandin E primeri* (189 baz çifti) kullanılmıştır. İzole mitokondriyel DNA jel görüntülerini içeren Şekil 7-17 değerlendirildiğinde *Kontrol*, *PAR* ve *MitoTempo* grubunun hem karaciğer hem de böbrek dokusundan mtDNA'nın başarılı şekilde izole edildiği görülmektedir. Ancak mtDNA primerlerinin daha az yoğunlukta da olsa nDNA örnekleri içinde de çoğaldığı gözlenmiştir. İzole nükleer DNA jel görüntüleri Şekil 7-17'de 4-6 numaralı hatlarda verilmiştir. Bu sonuçlara göre *Kontrol* grubu böbrek dokusunda hegzokinaz 2 primeri ile çoğalma gözlenmezken diğer *PAR* ve *PAR+MitoTempo* grubunda nükleer DNA varlığı kanıtlanmıştır. Böbrek dokusunda mtDNA örnekleri bu primerle çoğalmamıştır ki bu durum mtDNA'da herhangi bir kontaminasyon olmadığının göstergesidir. Karaciğer dokusundan izole edilen nDNA'dan *Kontrol* ve *PAR* grubunda hegzokinaz 2 primeri ile çoğalma gözlenirken *MitoTempo* grubunda bir bant oluşmamıştır. mtDNA örneklerinin bu primerle çoğalmamış olması, içinde nDNA kontaminasyonu olmadığını göstermektedir (Şekil 16).

Nükleer DNA'nın belirlenmesi için seçilen diğer primer prostaglandin E, *Kontrol* ve *MitoTempo* grubunun nDNA örneklerinde çoğalırken *PAR* grubunda beklenen yoğunlukta bir bant görülmemiştir. mtDNA örnekleri bu primerle de bir çoğalma göstermemiştir (Şekil 17). Bütün jel görüntüleri incelendiğinde her örnekte olmasa da DNA örnekleriyle eşleşmeyen bazı bantlar olduğu görülmektedir. PCR'da

sıklıkla karşılaşılan bu yapılar primer dimerleri olarak adlandırılmakta ve moleküler ağırlıkları yaklaşık 50 bp olduğu için jelde en alt kısımlarda yer almaktadır. Jel görüntüleri genel olarak değerlendirildiğinde mtDNA örnekleri saf bir halde izole edilmişken nDNA örneklerinde mtDNA kontaminasyonu gözlenmektedir. İzolasyon basamaklarının çok adımlı olması ve mtDNA'nın nDNA'ya göre çok küçük boyutta (16.3 kb) olmasının mtDNA'nın nDNA'yı kontamine etmesini kolaylaştırdığı düşünülebilir. Ancak nDNA'nın saflaştırma kolonu içeren kit ile izole edilmesine ve mtDNA'nın daha kolay kontamine olabilmesine rağmen mtDNA örneklerinin saf elde edilmiş olup nDNA örneklerinin kontamine olması düşündürücüdür. nDNA'da mtDNA primerlerinin çoğalmasının PCR koşulları ve primerlerle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu yüzden mtDNA için seçilen primerlerin sekansları 4-5 baz uzatılarak gen bölgesinin çoğalması daha spesifik hale getirilirse veya PCR koşullarından annealing sıcaklığı, döngü süresi vb. optimizasyonu gerçekleştirilirse bu sorunun aşılabileceği düşüncesindeyiz.

DNA izole edildikten sonra bazlarda oluşan oksidatif hasarın belirlenebilmesi için bunların serbestleşmesi sağlanmalıdır. Bu yüzden enzimatik yolla veya güçlü asidik ya da bazik koşullarda DNA hidroliz edilmektedir. Güvenilir sonuçlar elde edilebilmesi için DNA'nın hidroliz basamağına özellikle dikkat edilmelidir, çünkü bu basamakta kullanılan hidroliz ya da analitik ölçüm yöntemine bağlı olarak yapay oksidatif DNA hasarı (artifakt) meydana gelebilmektedir (Cadet ve ark., 2017).

Genel Bilgiler kısmında açıklandığı gibi DNA'da 20'den fazla oksidatif baz hasarı oluşmaktadır. Ancak bunlar arasında araştırmalarda en çok tercih edilen, mutajenik potansiyelinin yüksek olması ve oksidasyona yatkınlığı nedeniyle guanin bazında meydana gelen oksidatif hasardır. Bu bazda meydana gelen hasar sonucu oluşan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) yapısı literatürde oksidatif hasar, yaşlanma ve kanser gibi durumlarda biyogösterge olarak kullanılmaktadır (Valavanidis ve ark., 2009).

Ön uyumlandırma çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlarla DNA izolasyonunun, hidroliz işleminin ve ELISA yöntemi ile 8-OHdG ölçümünün başarılı bir şekilde gerçekleştiği gösterilmiştir (Tablo 4 ve Şekil 6). Bunun üzerine gruplarda daha fazla sayıda hayvan ile asıl çalışmaya geçilmiş, bu aşamada *Kontrol* ve *PAR* gruplarına *PAR+MitoTempo* grubu da dahil edilmiştir.

Trnka ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada mitokondriye hedefli bir antioksidan olarak gösterilen MitoTempo, antioksidan piperidin nitroksit (Tempo) ile lipofilik katyon trifenilfosfonyum (TPP⁺)'un kombinasyonudur. Bu maddede Tempo, süperoksit dismutaz enzimi (SOD) mimetiği iken TPP⁺ mitokondri içinde biriken membran geçirgenlik katyonudur. Bu iki bileşiğin kombinasyonu sonucu mitokondri hedefli bir antioksidan meydana gelmektedir. Literatürde MitoTemponun çeşitli patolojilerde oksidatif hasara karşı koruma gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Choumar ve ark., 2011; Patil ve ark., 2014; Wang ve ark., 2014). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada C57BL/6J erkek farelere i.p. yolla 300 mg/kg parasetamol uygulamasından 1,5 saat sonra 10 ve 20 mg/kg dozlarda i.p. yolla MitoTempo uygulaması gerçekleştirilmiş ve doza bağlı olarak parasetamolün oluşturduğu karaciğer hasarını azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada MitoTemponun mitokondriyel oksidatif stresi azalttığı ve mitokondriyel işlev bozukluğuna neden olan Bax'ın translokasyonunu ve devamında gerçekleşen mitokondri dış zarında oluşan porlardan (MPTP) apoptoz indükleyici faktör (AIF) vb. endonükleazların salınmasını ve DNA fragmentasyonunu engellediği gösterilmiştir (Du, Farhood ve Jaeschke, 2017). MitoTemponun karaciğer toksisitesini azalttığı gibi böbrek toksisitesinde de bir etkisinin olup olmayacağını belirlemek için 3. grup olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

PAR ve *PAR+MitoTempo* gruplarının böbrek mtDNA'larında 8-OHdG düzeyleri, Kontrol grubu 8-OHdG düzeyi ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 21). Ancak ilginç bir şekilde *PAR* grubu nDNA'sının 8-OHdG düzeyi *Kontrol* grubuna kıyasla %39 oranında ve anlamlı derecede düşük bulunmuştur. *MitoTempo* grubu nDNA'sının 8-OHdG düzeyi ise *Kontrol* grubuna kıyasla farklı değilken *PAR* grubuyla kıyaslandığında %120 oranında ve anlamlı bir artış gözlenmiştir (Şekil 20).

Aynı grupların karaciğer dokularından izole edilen mtDNA'da *Kontrol* ve *PAR* gruplarının 8-OHdG düzeyleri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 21). *MitoTempo* grubunda ölçülen 8-OHdG düzeyi, *Kontrol* ve *PAR* gruplarına göre düşük görünmekte ise de grup ortalamalarının standart sapma değerlerinin yüksek olması nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu grupların karaciğer dokularından izole edilen nDNA 8-OHdG düzeylerine bakıldığında

Kontrol ve *PAR* grupları arasında fark gözlenmezken ilginç bir şekilde *MitoTempo* grubunun 8-OHdG düzeyi, her iki grup düzeyinden de anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Şekil 22).

Bu sonuçlar somut olarak *PAR*'ın karaciğer ve böbrekte gerek mitokondriyel gerekse nükleer DNA'da guanin bazında oksidatif hasarı indüklediğini göstermektedir. Buna karşın *MitoTempo*, böbrek ve karaciğerde tamamen zıt etki göstermiş, böbrek nDNA'sında *PAR* grubuna göre 8-OHdG düzeylerini anlamlı derecede artırırken karaciğer nDNA'sında ise hem *Kontrol* hem *PAR* gruplarına göre anlamlı ve güçlü bir biçimde azaltmıştır. *PAR* tarafından indüklenen karaciğer ve böbrek toksisite mekanizmalarının birbirinden bağımsız ve farklı olduğu, araştırma grubumuzun da dahil olduğu çalışmalarda daha önce gösterilmiştir (Akakpo ve ark, 2020).

Histopatolojik analiz bulguları incelendiğinde *PAR* grubunda meydana gelen değişiklikler, böbrekte toksik değişikliklerin başladığını göstermektedir. *MitoTempo* uygulanan grupta ise bu değişikliklerin kısmen geriye döndüğü gözlenmektedir. C57BL/6J farelerde böbrek hasarını indükleyen maksimum *PAR* dozu 600 mg/kg'dır, ancak bu dozda mortalite yüksek olduğu için tez çalışmasında 500 mg/kg uygulanmıştır. İleri çalışmalarda dozun 600 mg/kg'a çıkarılmasıyla böbrek toksisitesinin şiddetleneceği ve DNA hasarının da gözlenebileceği düşünülmektedir. Araştırma grubunda farklı yönleriyle bu konu çalışılmaya devam etmektedir.

Sonuç ve Öneriler

MitoTempo, karaciğer ve böbrekte tamamen farklı etki göstermiştir. Ancak bu etki, PAR'ın indüklediği oksidatif baz hasarını değiştirmek şeklinde değildir, çünkü PAR ne karaciğer ne de böbrekte baz hasarını indüklememiştir. Bunun yerine MitoTempo, Kontrol ve PAR gruplarında ölçülen bazal 8-OHdG düzeylerini karaciğer nDNA'sında azaltmış, böbrek DNA'sında ise artırmıştır.

Bu ilginç bir sonuçtur ve bu iki organda PAR toksisitesi ile ilgili süreçlerdeki farklılığı destekleyen bir gözlemdir. Tez sonrası ileri çalışmalarda bu konu farklı yaklaşımlarla incelenmeye devam edilecektir.



Kaynaklar

- Akakpo, J. Y., Ramachandran, A., Orhan, H., Curry, S. C., Rumack, B. H., & Jaeschke, H. (2020). 4-methylpyrazole protects against acetaminophen-induced acute kidney injury. *Toxicology and applied pharmacology*, 409, 115317. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115317>
- Alcoser, S. Y., Kimmel, D. J., Borgel, S. D., Carter, J. P., Dougherty, K. M., & Hollingshead, M. G. (2011). Real-time PCR-based assay to quantify the relative amount of human and mouse tissue present in tumor xenografts. *BMC biotechnology*, 11, 124. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-124>
- Andersson, D. A., Gentry, C., Alenmyr, L., Killander, D., Lewis, S. E., Andersson, A., ... Zygmunt, P. M. (2011). TRPA1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Nature Communications*, 2(1). doi:10.1038/ncomms1559
- Area-Gomez, E., & Schon, E. A. (2014). Mitochondrial genetics and disease. *Journal of child neurology*, 29(9), 1208–1215. <https://doi.org/10.1177/0883073814539561>
- Arzuk, E., Tokdemir, M., & Orhan, H. (2022). Mitochondrial versus microsomal bioactivation of paracetamol by human liver and kidney tissues. *Toxicology Letters*.
- Arzuk, E., Turna, B., Sözbilen, M., & Orhan, H. (2018). Inter-individual and inter-organ variability in the bioactivation of paracetamol by human liver and kidney tissues. *Environmental toxicology and pharmacology*, 61, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.05.015>
- Bajt, M. L., Cover, C., Lemasters, J. J., & Jaeschke, H. (2006). Nuclear translocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor during acetaminophen-induced liver cell injury. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 94(1), 217–225. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl077>
- Bajt, M. L., Farhood, A., Lemasters, J. J., & Jaeschke, H. (2008). Mitochondrial bax translocation accelerates DNA fragmentation and cell necrosis in a murine model of acetaminophen hepatotoxicity. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 324(1), 8–14. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.129445>

- Barregard, L., Møller, P., Henriksen, T., Mistry, V., Koppen, G., Rossner, P., ...
Cooke, M. S. (2013). Human and methodological sources of variability in the measurement of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Antioxidants & redox signaling*, 18(18), 2377–2391. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4714>
- Bauer, A. Z., Kriebel, D., Herbert, M. R., Bornehag, C. G., & Swan, S. H. (2018). Prenatal paracetamol exposure and child neurodevelopment: A review. *Hormones and behavior*, 101, 125-147.
- Bauer, A. Z., Swan, S. H., Kriebel, D., Liew, Z., Taylor, H. S., Bornehag, C. G., Andrade, A. M., Olsen, J., Jensen, R. H., Mitchell, R. T., Skakkebaek, N. E., Jégou, B., & Kristensen, D. M. (2021). Paracetamol use during pregnancy - a call for precautionary action. *Nature reviews. Endocrinology*, 17(12), 757–766. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00553-7>
- Bergman, K., Müller, L., & Teigen, S. W. (1996). The genotoxicity and carcinogenicity of paracetamol: a regulatory (re) view. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 349(2), 263-288.
- Berstein, H. & Gensler, H. L. (1993). DNA damage and aging. In: Yu, B. P., ed. *Free radicals in aging*. London: CRC Press; 89–122.
- Blakely, P., & McDonald, B. R. (1995). Acute renal failure due to acetaminophen ingestion: a case report and review of the literature. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 6(1), 48–53. <https://doi.org/10.1681/ASN.V6148>
- Boguszewska, K., Szewczuk, M., Urbaniak, S., & Karwowski, B. T. (2019). Review: immunoassays in DNA damage and instability detection. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 76(23), 4689–4704. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03239-6>
- Breen, K., Wandscheer, J. C., Peignoux, M., & Pessayre, D. (1982). In situ formation of the acetaminophen metabolite covalently bound in kidney and lung. Supportive evidence provided by total hepatectomy. *Biochemical pharmacology*, 31(1), 115–116. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(82\)90247-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(82)90247-7)

- Cadenas, E., & Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free radical biology & medicine*, 29(3-4), 222–230. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00317-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00317-8)
- Cadet, J., Davies, K., Medeiros, M. H., Di Mascio, P., & Wagner, J. R. (2017). Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA. *Free radical biology & medicine*, 107, 13–34. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.049>
- Cadet, J., Douki, T., & Ravanat, J. L. (1997). Artifacts associated with the measurement of oxidized DNA bases. *Environmental Health Perspectives*, 105(10), 1034-1039
- Campbell, N. R., & Baylis, B. (1992). Renal impairment associated with an acute paracetamol overdose in the absence of hepatotoxicity. *Postgraduate medical journal*, 68(796), 116–118. <https://doi.org/10.1136/pgmj.68.796.116>
- Chatterjee, A., Mambo, E., & Sidransky, D. (2006). Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene*, 25(34), 4663–4674. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209604>
- Chen, Y. G., Lin, C. L., Dai, M. S., Chang, P. Y., Chen, J. H., Huang, T. C., Wu, Y. Y., & Kao, C. H. (2015). Risk of Acute Kidney Injury and Long-Term Outcome in Patients With Acetaminophen Intoxication: A Nationwide Population-Based Retrospective Cohort Study. *Medicine*, 94(46), e2040. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002040>
- Choumar, A., Tarhuni, A., Lettéron, P., Reyl-Desmars, F., Dauhoo, N., Damasse, J., ... & Mansouri, A. (2011). Lipopolysaccharide-induced mitochondrial DNA depletion. *Antioxidants & redox signaling*, 15(11), 2837-2854.
- Cobden, I., Record, C. O., Ward, M. K., & Kerr, D. N. (1982). Paracetamol-induced acute renal failure in the absence of fulminant liver damage. *British medical journal (Clinical research ed.)*, 284(6308), 21.
- Collins, A. R., & Dusinská, M. (2002). Oxidation of cellular DNA measured with the comet assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 186, 147–159. <https://doi.org/10.1385/1-59259-173-6:147>
- Comparison of different methods of measuring 8-oxoguanine as a marker of oxidative DNA damage. ESCODD (European Standards Committee on

- Oxidative DNA Damage). (2000). *Free radical research*, 32(4), 333–341.
<https://doi.org/10.1080/10715760000300331>
- Cover, C., Mansouri, A., Knight, T. R., Bajt, M. L., Lemasters, J. J., Pessayre, D., & Jaeschke, H. (2005). Peroxynitrite-induced mitochondrial and endonuclease-mediated nuclear DNA damage in acetaminophen hepatotoxicity. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 315(2), 879–887.
<https://doi.org/10.1124/jpet.105.088898>
- Curry, S. C., Padilla-Jones, A., O'Connor, A. D., Ruha, A. M., Bikin, D. S., Wilkins, D. G., Rollins...Acetaminophen Adduct Study Group (2015). Prolonged Acetaminophen-Protein Adduct Elimination During Renal Failure, Lack of Adduct Removal by Hemodiafiltration, and Urinary Adduct Concentrations After Acetaminophen Overdose. *Journal of medical toxicology : official journal of the American College of Medical Toxicology*, 11(2), 169–178.
<https://doi.org/10.1007/s13181-014-0431-2>
- Czernecki, D., Bonhomme, F., Kaminski, P.-A., & Delarue, M. (2021). Characterization of a triad of genes in cyanophage S-2L sufficient to replace adenine by 2-aminoadenine in bacterial DNA. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25064-x>
- Dalton, T. P., Shertzer, H. G., & Puga, A. (1999). Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39, 67–101. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.67>
- Dart, R. C., & Bailey, E. (2007). Does Therapeutic Use of Acetaminophen Cause Acute Liver Failure? *Pharmacotherapy*, 27(9), 1219–1230. doi:10.1592/phco.27.9.1219
- Davidson, D. G., & Eastham, W. N. (1966). Acute liver necrosis following overdose of paracetamol. *British medical journal*, 2(5512), 497–499.
<https://doi.org/10.1136/bmj.2.5512.497>
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (45), 2565.
<https://doi.org/10.3791/2565>
- Di Lisa, F., Kaludercic, N., & Paolocci, N. (2011). β_2 -Adrenoceptors, NADPH oxidase, ROS and p38 MAPK: another 'radical' road to heart

- failure?. *British journal of pharmacology*, 162(5), 1009–1011.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01130.x>
- Dimova, S., Hoet, P. H., Dinsdale, D., & Nemery, B. (2005). Acetaminophen decreases intracellular glutathione levels and modulates cytokine production in human alveolar macrophages and type II pneumocytes in vitro. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(8), 1727–1737.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.03.005>
- Dizdaroglu M. (2012). Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. *Cancer letters*, 327(1-2), 26–47.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.016>
- Dizdaroglu, M., Coskun, E., & Jaruga, P. (2015). Measurement of oxidatively induced DNA damage and its repair, by mass spectrometric techniques. *Free radical research*, 49(5), 525–548.
<https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1014814>
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., & Rodriguez, H. (2001). Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry: comparison with measurement by gas chromatography-mass spectrometry. *Nucleic acids research*, 29(3), E12.
<https://doi.org/10.1093/nar/29.3.e12>
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free radical biology & medicine*, 32(11), 1102–1115. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00826-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00826-2)
- Du, K., Farhood, A., & Jaeschke, H. (2017). Mitochondria-targeted antioxidant Mito-Tempo protects against acetaminophen hepatotoxicity. *Archives of toxicology*, 91(2), 761–773. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1692-0>
- Dybing, E., Holme, J. A., Gordon, W. P., Søderlund, E. J., Dahlin, D. C., & Nelson, S. D. (1984). Genotoxicity studies with paracetamol. *Mutation research*, 138(1), 21–32. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(84\)90081-8](https://doi.org/10.1016/0165-1218(84)90081-8)
- dysfunction in acetaminophen poisoning. *Renal failure*, 27(4), 381–383.
- Eguia, L., & Materson, B. J. (1997). Acetaminophen-related acute renal failure without fulminant liver failure. *Pharmacotherapy*, 17(2), 363–370.

- Emeigh Hart, S. G., Wyand, D. S., Khairallah, E. A., & Cohen, S. D. (1996). Acetaminophen nephrotoxicity in the CD-1 mouse. II. Protection by probenecid and AT-125 without diminution of renal covalent binding. *Toxicology and applied pharmacology*, 136(1), 161–169. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.002>
- European Medicines Agency (2019). PRAC recommendations on signals: adopted at the 12–15 March 2019 PRAC meeting. https://www.ema.europa.eu/en/documents/prac-recommendation/prac-recommendations-signals-adopted-12-15-march-2019-prac-meeting_en.pdf
- European Standards Committee on Urinary (DNA) Lesion Analysis, Evans, M. D., Olinski, R., Loft, S., & Cooke, M. S. (2010). Toward consensus in the analysis of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a noninvasive biomarker of oxidative stress. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(4), 1249–1260. <https://doi.org/10.1096/fj.09-147124>
- Flower, R. J., & Vane, J. R. (1972). Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). *Nature*, 240(5381), 410–411. <https://doi.org/10.1038/240410a0>
- Food and Drug Administration (2015). FDA Drug Safety Communications: FDA has reviewed possible risks of pain medicine use during pregnancy. <https://www.fda.gov/media/90209/download>
- Földesi, B. (2020) How to pick an oxidative damage assay? *Biomol.* <https://www.biomol.com/resources/biomol-blog/how-to-pick-an-oxidative-damage-assay>
- Fromenty B. (2020). Alteration of mitochondrial DNA homeostasis in drug-induced liver injury. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 135, 110916. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110916>
- Gabriel R. (1982). Paracetamol-induced acute renal failure in the absence of fulminant liver damage. *British medical journal (Clinical research ed.)*, 284(6314), 505–506. <https://doi.org/10.1136/bmj.284.6314.505-d>

- Gan, W., Nie, B., Shi, F., Xu, X. M., Qian, J. C., Takagi, Y., Hayakawa, H., Sekiguchi, M., & Cai, J. P. (2012). Age-dependent increases in the oxidative damage of DNA, RNA, and their metabolites in normal and senescence-accelerated mice analyzed by LC-MS/MS: urinary 8-oxoguanosine as a novel biomarker of aging. *Free radical biology & medicine*, 52(9), 1700–1707. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.016>
- Gonzalez-Hunt, C. P., Wadhwa, M., & Sanders, L. H. (2018). DNA damage by oxidative stress: Measurement strategies for two genomes. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 87-94.
- Halliwell B., Gutteridge, J.M.C.(1999). (Eds.) *Free radicals in biology and medicine*. (3rd edition). Oxford, England: Oxford University Press.
- Hinson, J. A., Roberts, D. W., & James, L. P. (2010). Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handbook of experimental pharmacology*, (196), 369–405. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00663-0_12
- Hodgman, M. J., & Garrard, A. R. (2012). A review of acetaminophen poisoning. *Critical care clinics*, 28(4), 499–516. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2012.07.006>
- Hoivik, D. J., Fisher, R. L., Brendel, K., Gandolfi, A. J., Khairallah, E. A., & Cohen, S. D. (1996). Protein arylation precedes acetaminophen toxicity in a dynamic organ slice culture of mouse kidney. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology*, 34(1), 99–104. <https://doi.org/10.1006/faat.1996.0180>
- Hongslo, J. K., Smith, C. V., Brunborg, G., Söderlund, E. J., & Holme, J. A. (1994). Genotoxicity of paracetamol in mice and rats. *Mutagenesis*, 9(2), 93–100. <https://doi.org/10.1093/mutage/9.2.93>
- Isokallio, Marita A., & Stewart, James B. (2018). Isolation of high-quality, highly enriched mitochondrial DNA from mouse tissues. *protocols.io* <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.mycc7sw>
- Ito, F., Sono, Y., & Ito, T. (2019). Measurement and Clinical Significance of Lipid Peroxidation as a Biomarker of Oxidative Stress: Oxidative Stress in Diabetes, Atherosclerosis, and Chronic Inflammation. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(3), 72. <https://doi.org/10.3390/antiox8030072>

- Jaeschke, H., Duan, L., Nguyen, N., & Ramachandran, A. (2019). Mitochondrial Damage and Biogenesis in Acetaminophen-induced Liver Injury. *Liver research*, 3(3-4), 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2019.10.002>
- Jaeschke, H., McGill, M. R., & Ramachandran, A. (2012). Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug metabolism reviews*, 44(1), 88–106. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.602688>
- Jeffery, W. H., & Lafferty, W. E. (1981). Acute renal failure after acetaminophen overdose: report of two cases. *American Journal of Hospital Pharmacy*, 38(9), 1355-1358.
- Jena N. R. (2012). DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *Journal of biosciences*, 37(3), 503–517. <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9218-2>
- Jones, A. F., & Vale, J. A. (1993). Paracetamol poisoning and the kidney. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 18(1), 5–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.1993.tb00560.x>
- Karakuş F. (2021). *Advers reaksiyonlarda hücre ve organel düzeyinde toksisite yollarının belirlenmesi*. (Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir)
- Kennon-McGill, S., & McGill, M. R. (2017). Extrahepatic toxicity of acetaminophen: critical evaluation of the evidence and proposed mechanisms. *Journal of clinical and translational research*, 3(3), 297–310. <https://doi.org/10.18053/jctres.03.201703.005>
- Kirkland, D., Kovoichich, M., More, S. L., Murray, F. J., Monnot, A. D., Miller, J. V., Jaeschke, H., Jacobson-Kram, D., Deore, M., Pitchaiyan, S. K., Unice, K., & Eichenbaum, G. (2021). A comprehensive weight of evidence assessment of published acetaminophen genotoxicity data: Implications for its carcinogenic hazard potential. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 122, 104892. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.104892>
- Klaunig, J. E., Wang, Z., Pu, X., & Zhou, S. (2011). Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicology and applied pharmacology*, 254(2), 86–99. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.11.028>

- Konkel L. (2018). Reproductive Headache? Investigating Acetaminophen as a Potential Endocrine Disruptor. *Environmental health perspectives*, 126(3), 032001. <https://doi.org/10.1289/EHP2478>
- Kristensen, D. M., Mazaud-Guittot, S., Gaudriault, P., Lesné, L., Serrano, T., Main, K. M., & Jégou, B. (2016). Analgesic use - prevalence, biomonitoring and endocrine and reproductive effects. *Nature reviews. Endocrinology*, 12(7), 381–393. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.55>
- Krueger, A., Mohamed, A., Kolka, C. M., Stoll, T., Zaugg, J., Linedale, R., Morrison, Hill, M. M. (2022). Skin Cancer-Associated *S. aureus* Strains Can Induce DNA Damage in Human Keratinocytes by Downregulating DNA Repair and Promoting Oxidative Stress. *Cancers*, 14(9), 2143. <https://doi.org/10.3390/cancers14092143>
- Kulaksız G & Sancar A (2007). Nükleotid eksizyon onarımı ve kanser. *Turk J Biochem*, 32 (3): 104-111
- Larson A. M. (2007). Acetaminophen hepatotoxicity. *Clinics in liver disease*, 11(3), 525–vi. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2007.06.006>
- Liew, Z., Yuan, Y., Meng, Q., von Ehrenstein, O. S., Cui, X., Flores, M., & Ritz, B. (2021). Prenatal Exposure to Acetaminophen and Childhood Asthmatic Symptoms in a Population-Based Cohort in Los Angeles, California. *International journal of environmental research and public health*, 18(19), 10107. <https://doi.org/10.3390/ijerph181910107>
- Lucas, A. M., Hennig, G., Dominick, P. K., Whiteley, H. E., Roberts, J. C., & Cohen, S. D. (2000). Ribose cysteine protects against acetaminophen-induced hepatic and renal toxicity. *Toxicologic pathology*, 28(5), 697–704. <https://doi.org/10.1177/01926233000280051>
- Lunec J. (1998). ESCODD: European Standards Committee on Oxidative DNA Damage. *Free radical research*, 29(6), 601–608. <https://doi.org/10.1080/10715769800300651>
- Marnett, L. J. (1999). Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. *IARC scientific publications*, (150), 17-27.
- McCrae, J. C., Morrison, E. E., MacIntyre, I. M., Dear, J. W., & Webb, D. J. (2018). Long-term adverse effects of paracetamol - a review. *British journal of*

- clinical pharmacology, 84(10), 2218–2230.
<https://doi.org/10.1111/bcp.13656>
- McGill, M. R., & Jaeschke, H. (2013). Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharmaceutical research*, 30(9), 2174–2187.
<https://doi.org/10.1007/s11095-013-1007-6>
- McGill, M. R., Sharpe, M. R., Williams, C. D., Taha, M., Curry, S. C., & Jaeschke, H. (2012). The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. *The Journal of clinical investigation*, 122(4), 1574–1583. <https://doi.org/10.1172/JCI59755>
- McGill, M. R., Williams, C. D., Xie, Y., Ramachandran, A., & Jaeschke, H. (2012). Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 264(3), 387–394.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.08.015>
- Mihajlovic, M., & Vinken, M. (2022). Mitochondria as the Target of Hepatotoxicity and Drug-Induced Liver Injury: Molecular Mechanisms and Detection Methods. *International journal of molecular sciences*, 23(6), 3315.
<https://doi.org/10.3390/ijms23063315>
- Mour, G., Feinfeld, D. A., Caraccio, T., & McGuigan, M. (2005). Acute renal
- Mposhi, A., Liang, L., Mennega, K. P., Yildiz, D., Kampert, C., Hof, I. H., Jellema, P. G., de Koning, T. J., Faber, K. N., Ruiters, M., Niezen-Koning, K. E., & Rots, M. G. (2022). The Mitochondrial Epigenome: An Unexplored Avenue to Explain Unexplained Myopathies?. *International journal of molecular sciences*, 23(4), 2197. <https://doi.org/10.3390/ijms23042197>
- Ogilvie, J. D., Rieder, M. J., & Lim, R. (2012). Acetaminophen overdose in children. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 184(13), 1492–1496.
<https://doi.org/10.1503/cmaj.111338>
- Pakravan, N., Simpson, K. J., Waring, W. S., Bates, C. M., & Bateman, D. N. (2009). Renal injury at first presentation as a predictor for poor outcome in 119 severe paracetamol poisoning referred to a liver transplant unit.

- European journal of clinical pharmacology, 65(2), 163–168.
<https://doi.org/10.1007/s00228-008-0580-9>
- Patil, N. K., Parajuli, N., MacMillan-Crow, L. A., & Mayeux, P. R. (2014). Inactivation of renal mitochondrial respiratory complexes and manganese superoxide dismutase during sepsis: mitochondria-targeted antioxidant mitigates injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 306(7), F734-F743.
- Pflaum, M., & Epe, B. (2000). Measuring oxidative DNA damage by alkaline elution, Lunec J, Griffiths HR (eds.), *Measuring In Vivo Oxidative Damage: A Practical Course*.
- Podmore, I. D., Griffiths, H. R., Herbert, K. E., Mistry, N., Mistry, P., & Lunec, J. (1998). Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature*, 392(6676), 559.
<https://doi.org/10.1038/33308>
- Prescott L. F. (1983). Paracetamol overdose. Pharmacological considerations and clinical management. *Drugs*, 25(3), 290–314.
<https://doi.org/10.2165/00003495-198325030-00002>
- Prescott, L. F., Roscoe, P., Wright, N., & Brown, S. S. (1971). Plasma-paracetamol half-life and hepatic necrosis in patients with paracetamol overdose. *Lancet (London, England)*, 1(7698), 519–522.
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(71\)91125-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(71)91125-1)
- Proposition 65 (1986). Law and Regulations The Safe Drinking Water and Toxic Enforcement Act of 1986. <https://oehha.ca.gov/proposition-65/law/proposition-65-law-and-regulations>
- Quiros, P. M., Goyal, A., Jha, P., & Auwerx, J. (2017). Analysis of mtDNA/nDNA Ratio in Mice. *Current protocols in mouse biology*, 7(1), 47–54.
<https://doi.org/10.1002/cpmo.21>
- Ramachandran, A., & Jaeschke, H. (2018). Acetaminophen Toxicity: Novel Insights Into Mechanisms and Future Perspectives. *Gene expression*, 18(1), 19–30.
<https://doi.org/10.3727/105221617X15084371374138>
- Ramachandran, A., Visschers, R., Duan, L., Akakpo, J. Y., & Jaeschke, H. (2018). Mitochondrial dysfunction as a mechanism of drug-induced hepatotoxicity: current understanding and future perspectives. *Journal of clinical and*

translational research, 4(1), 75–100.
<https://doi.org/10.18053/jctres.04.201801.005>

- Rannug, U., Holme, J. A., Hongso, J. K., & Srám, R. (1995). International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens. An evaluation of the genetic toxicity of paracetamol. *Mutation research*, 327(1-2), 179–200. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)00184-7](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)00184-7)
- Ravanat, J. (2005). Measuring Oxidized DNA Lesions as Biomarkers of Oxidative Stress: An Analytical Challenge . *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences* , 2 (30) , 100-113
- Rehman, A., Collis, C. S., Yang, M., Kelly, M., Diplock, A. T., Halliwell, B., & Rice-Evans, C. (1998). The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers. *Biochemical and biophysical research communications*, 246(1), 293–298. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8592>
- Rossner, P., Jr, Orhan, H., Koppen, G., Sakai, K., Santella, R. M., Ambroz, A., ...Cooke, M. S. (2016). Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine analysis by an improved ELISA: An inter-laboratory comparison study. *Free radical biology & medicine*, 95, 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.016>
- Scandalios J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 38(7), 995–1014. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2005000700003>
- Shaheen, S. O., Newson, R. B., Henderson, A. J., Headley, J. E., Stratton, F. D., Jones, R. W., Strachan, D. P., & ALSPAC Study Team (2005). Prenatal paracetamol exposure and risk of asthma and elevated immunoglobulin E in childhood. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 35(1), 18–25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2005.02151.x>
- Shitara, H., Cao, L., Yamaguchi, M., Yonekawa, H., & Taya, C. (2017). Establishment of a heteroplasmic mouse strain with interspecific mitochondrial DNA haplotypes and improvement of a PCR-RFLP-based

- measurement system for estimation of mitochondrial DNA heteroplasmy. *Transgenic research*, 26(4), 559–565. <https://doi.org/10.1007/s11248-017-0009-2>
- Smart, R. C., & Hodgson, E. (2008). *Molecular and Biochemical Toxicology* Fourth Edition.
- Sonntag, C.V. (2006). Free radical induced DNA damage and its repair a chemical perspective.
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids*, 25(3-4), 207–218. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0011-2>
- Stern, S. T., Bruno, M. K., Hennig, G. E., Horton, R. A., Roberts, J. C., & Cohen, S. D. (2005a). Contribution of acetaminophen-cysteine to acetaminophen nephrotoxicity in CD-1 mice: I. Enhancement of acetaminophen nephrotoxicity by acetaminophen-cysteine. *Toxicology and applied pharmacology*, 202(2), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.06.030>
- Swierkosz, T. A., Jordan, L., McBride, M., McGough, K., Devlin, J., & Botting, R. M. (2002). Actions of paracetamol on cyclooxygenases in tissue and cell homogenates of mouse and rabbit. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 8(12), BR496–BR503.
- Tiegs, G., Karimi, K., Brune, K., & Arck, P. (2014). New problems arising from old drugs: second-generation effects of acetaminophen. *Expert review of clinical pharmacology*, 7(5), 655–662. <https://doi.org/10.1586/17512433.2014.944502>
- Tujios, S. R., Hynan, L. S., Vazquez, M. A., Larson, A. M., Seremba, E., Sanders, C. M., ... & Acute Liver Failure Study Group. (2015). Risk factors and outcomes of acute kidney injury in patients with acute liver failure. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 13(2), 352-359.
- U.S. Environmental Protection Agency. Comptox Chemicals Dashboard. <https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/details/DTXSID2020006> (accessed June 19, 2022) Acetaminophen
- Uchida, K., Shiraishi, M., Naito, Y., Torii, Y., Nakamura, Y., & Osawa, T. (1999). Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid

- peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *The Journal of biological chemistry*, 274(4), 2234–2242. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.4.2234>
- Vakifahmetoglu-Norberg, H., Ouchida, A. T., & Norberg, E. (2017). The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 426–431. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.088>
- Valavanidis, A., VLACHOGIANNI, T., & FIOTAKIS, C. (2009). 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 27(2), 120–139. <https://doi.org/10.1080/10590500902885684>
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 64(2), 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>
- Van Houten, B., Woshner, V., & Santos, J. H. (2006). Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA repair*, 5(2), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.03.002>
- Vane, J. R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature new biology*, 231(25), 232-235.
- Wang, A., Keita, A. V., Phan, V., McKay, C. M., Schoultz, I., Lee, J., ... & McKay, D. M. (2014). Targeting mitochondria-derived reactive oxygen species to reduce epithelial barrier dysfunction and colitis. *The American journal of pathology*, 184(9), 2516-2527.
- Wang, X., Wu, Q., Liu, A., Anadón, A., Rodríguez, J. L., Martínez-Larrañaga, M. R., Yuan, Z., & Martínez, M. A. (2017). Paracetamol: overdose-induced oxidative stress toxicity, metabolism, and protective effects of various compounds in vivo and in vitro. *Drug metabolism reviews*, 49(4), 395–437. <https://doi.org/10.1080/03602532.2017.1354014>
- Wang, Y., Li, D., Cheng, N., Gao, H., Xue, X., Cao, W., & Sun, L. (2015). Antioxidant and hepatoprotective activity of vitex honey against paracetamol induced liver damage in mice. *Food & function*, 6(7), 2339–2349. <https://doi.org/10.1039/c5fo00345h>

Weiss N. S. (2016). Use of acetaminophen in relation to the occurrence of cancer: a review of epidemiologic studies. *Cancer causes & control : CCC*, 27(12), 1411–1418. <https://doi.org/10.1007/s10552-016-0818-2>

World Health Organization Model List of Essential Medicines – 22nd List, 2021

Wu, L. L., Chiou, C. C., Chang, P. Y., & Wu, J. T. (2004). Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 339(1-2), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2003.09.010>



Ekler

Ek-1. Etik kurul onay belgesi



**İZMİR BİYOTİP VE GENOM MERKEZİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İBG-HADYEK)
KARARI**

Toplantı Tarihi : 11/05/2022 **Toplantı Günü** : Çarşamba
Toplantı Sayısı : 8 **Toplantı Saati** : 15:30

Sayın Prof. Dr. Hilmi ORHAN,

2022-018 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Parasetamol kaynaklı böbrek toksisite mekanizmasının hücre, organ ve organizma düzeyinde araştırılması" başlıklı projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Dr. Gülçin ÇAKAN AKDOĞAN Başkan (Katılmadı)	Vet. Hek. Kerem ESMEN Başkan Yardımcısı
Prof. Dr. Enşari GÜNELİ Üye	Doç. Dr. Güneş ÖZHAN Üye (Katılmadı)
Doç. Dr. Kasım DİRİL Üye	Dr. Yavuz DOĞAN Üye
Vet. Hek. Umur KELEŞ Üye	Vet. Hek. Ceren ÜLKER Üye
Vet. Hek. Gizem ARALAN Üye	İrem KARADAŞ Üye (Katılmadı)

Teşekkür

3 yıllık yüksek lisans eğitimim boyunca hem ders dönemi hem de tez çalışmamın oluşturulması ve yürütülmesi dahil olmak üzere bilgi ve tecrübesiyle bana her konuda bilimsel destek sağlayan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Hilmi ORHAN'a,

Ders döneminde verdikleri katkılarından dolayı Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Ferzan LERMİOĞLU ERCİYAS'a, Prof. Dr. Hande GÜRER ORHAN'a ve Dr. Öğr. Üyesi Lütfiye Sumru SÖZER KARADAĞLI'ya,

Lisansüstü eğitim sürecinde laboratuvar tekniklerimin gelişmesinde çok büyük payı olan ve doktora tez döneminin son aşamasında olmasına rağmen her türlü soruma cevap verip yardımcı olan çok değerli Arş. Gör. Dr. Fuat KARAKUŞ'a,

Tezimin önemli bir kısmını oluşturan PCR ve agaroz jel elektroforezi tekniklerinin deney planlarını tasarlayan ve gerekli primerlerin belirlenmesini sağlayan Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Zeki TOPÇU'ya,

Bu tekniklerin pratikte uygulamasını bana öğreten, deney yaparken dikkat etmem gereken noktaları her zaman vurgulayan ve sabırla sorduğum her soruya yanıt veren çok değerli Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Mustafa KOTMAKÇI'ya,

Lisansüstü eğitimimin tez döneminden itibaren 2 yıl boyunca beraber çalıştığım ve bu süreç boyunca yanımda olup bana destek olan değerli arkadaşım doktora öğrencisi Ecz. Kemal ATMACA'ya,

Bu süreçte desteklerini her zaman hissettiğim değerli çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Ege ARZUK, Dr. Şadiye MIDİK ve Arş. Gör. Dr. Ali ERGÜÇ'e,

Kısa süre çalışma imkanı bulmuş olmamıza rağmen çok sevdiğim, enerjisiyle günümü güzelleştiren değerli iki arkadaşım Ecz. Aysel Nazlı ÇOMU ve Halin BAREKE'ye,

Tez sürecimde online olarak tanışmama rağmen yıllardır birbirimizi tanıyor gibi hissettiğim ve bu süreçte moralim bozulduğunda beni yalnız bırakmayan çok değerli Dr. Ecz. İrem KILIÇARSLAN'a,

Birçok etkinlik ve kongreye beraber katıldığım, bu süreçte de desteklerini hep hissettiğim değerli eczacı arkadaşlarım Zeren ARDA ve Gizem EROL'a

Cihazların kullanımında bir sıkıntı yaşadığımda yardımcı olan Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı (FABAL) çalışanları Öğr. Gör. Dr. Çiğdem YENGİN'e, Kimyager Nihan ATABAY'a ve Tekniker Esra ERGİN'e,

NanoDrop ND-1000 cihazının kullanımında her zaman içten bir şekilde yardımcı olan Uzman Moleküler Biyolog Ezgi MEHMETOĞLU'na,

Deneyletimde kullandığım sarf malzemelerin satın alma işlemlerinde kolaylık sağlayan ve teminini hızlı bir şekilde gerçekleştiren Seda SAKİN ve Koray SAKİN'e,

Yıllardır yanımda olan ve bu süreçte de beni manevi olarak destekleyen başta Bahar TEK, Ayça Selen ŞAHİN ve Cansu YAĞCI olmak üzere bütün lise arkadaşlarıma, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi ile birlikte hayatıma giren ve lisans ardından yüksek lisans dönemimi güzelleştiren sevgili arkadaşlarım Berna KAHRAMAN, Merve DEMİR, Güzide Ece EMİR, Hande YÖRÜK, Enis ALİU ve Sözdar YILDIZ'a,

Ailem oldukları için kendimi çok şanslı hissettiğim, hayatımın her anında yanımda olan, sevgi ve destekleriyle beni bugünlere kadar getiren sevgili annem Nurdan ALADAĞ, babam Numan ALADAĞ'a ve ailemizin ikinci eczacısı olmasına çok az kalan sevgili kardeşim Begüm ALADAĞ'a,

Tez çalışmamı destekleyen Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje kodu: TOA-2021-22922) teşekkür ederim.

Özgeçmiş

EĞİTİM

2019- Şimdi	Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
2015-2021	Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi İşletme Bölümü (AçıkÖğretim)
2018-2019	Erasmus Programı Torino Üniversitesi
2014-2019	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
2010-2014	İzmir Bornova Anadolu Lisesi

STAJLAR

2019	Mustafa Fidan Eczanesi
2018	İzmir Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi (Depo Eczanesi, Merkez Servis Eczanesi, Doğumevi Servis Eczanesi, TPN hazırlama servisi)
2017	Gaziemir Akın Eczanesi
2016	Gaziemir Akın Eczanesi

PROJELER VE TOPLUM HİZMETLERİ

2021-	Ege Üniversitesi, Çok Disiplinli Öncelikli Alan Araştırma Projesi (ÖNAP), Araştırmacı, <i>Parasetamol kaynaklı böbrek toksisite mekanizmasının hücre, organ ve organizma düzeyinde araştırılması</i>
2019	Zumba Sosyal Sorumluluk Etkinliği, <i>Otizm Farkındalığı</i>
2019	Zumba Sosyal Sorumluluk Etkinliği, <i>Bir Elin Nesi Var?</i>
2016	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Sosyal Sorumluluk Projesi, <i>Dostlara Dost Eli Olalım</i>

POSTER ve SÖZLÜ BİLDİRİLER

Karakuş F. , Atmaca K., Aladağ B., Orhan H., Cysteine conjugate of paracetamol serves as substrate for kidney cysteine S-conjugates β -lyase: implications for drug-induced acute kidney injury, 56th Congress of the European Societies of Toxicology , September 2021, ss.164 DOI: 10.1016/S0378-4274(21)00629-9

Orhan H., Karakuş F., Atmaca K., Aladağ B, Paracetamol-associated adverse reactions in kidney: Different mechanistic pathways compared to liver, 56th Congress of the European Societies of Toxicology, September 2021, Toxicology Letters 350: S55-S56 DOI: 10.1016/S0378-4274(21)00381-7

Karakuş F. , Atmaca K., Aladağ B., Orhan H., Comparative Cysteine S-Conjugate β -Lyase Activities of Different Organs Towards Paracetamol in Mice, 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, Türkiye, 22 - 25 Haziran 2021

