

**SIÇANLARDA PARASETAMOLLE İNDÜKLENEN
KARACİĞER TOKSİSİTESİNDE VALSARTAN/
SAKUBİTRİL KOMBİNASYONU LCZ696 İLE
VALSARTANIN ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Gökçe KAYA BOZKURT
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Beyzagül ERKAYMAN

Doktora Tezi – 2023



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

**SIÇANLARDA PARASETAMOLLE İNDÜKLENEN
KARACİĞER TOKSİSİTESİNDE VALSARTAN/
SAKUBİTRİL KOMBİNASYONU LCZ696 İLE
VALSARTANIN ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Gökçe KAYA BOZKURT

**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Beyzagül ERKAYMAN**

**ERZURUM
2023**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Parasetamol	5
2.2. Parasetamolün Farmakolojik Özellikleri	5
2.3. Parasetamolün Farmakokinetiği	7
2.4. Parasetamolün Yan Etkileri	8
2.5. Parasetamol Toksisitesi.....	8
2.5.1. Parasetamol Toksisitesinin Klinik Bulguları	9
2.6. Parasetamol Zehirlenmesinin Tedavisi	10
2.6.1. N-Asetil Sistein (NAC).....	11
2.6.2. Diğer Tedavi Yöntemleri	12
2.6.2.1. Simetidin.....	12
2.6.2.2. Diyaliz.....	12
2.6.2.3. Karaciğer Transplantasyonu	12
2.6.3. Prognoz	13
2.7. Serbest Radikaller	14
2.7.1. Serbest Radikal Çeşitleri.....	14

2.7.2. Serbest Radikallerin Etkileri	15
2.8. Antioksidan Savunma Sistemleri	17
2.8.1. Endojen Doğal Antioksidanlar	17
2.8.1.1. Süperoksit Dismutaz	18
2.8.1.2. Glutasyon	19
2.8.2. Eksojen (Sekonder) Antioksidanlar	19
2.9. Biyokimyasal Parametreler	20
2.9.1. Alanin Aminotransferaz	20
2.9.2. Aspartat Aminotransferaz	21
2.10. Sitokinler	22
2.10.1. Sitokinlerin Sınıflandırılması	24
2.10.2. TNF-alfa	25
2.10.3. IL-1 β	26
2.11. Renin Anjiyotensin Aldosteron Sistemi (RAAS)	27
2.12. Valsartan	28
2.13. Neprilisin Enzimi ve Fizyolojik Önemi	30
2.14. LCZ696 (Sakubitril/Valsartan)	31
2.15. Neprilisin İnhibitörleri ve Anjiyotensin Reseptör Blokörleri İle Parasetamol Zehirlenmesi Arasındaki İlişki	35
3. MATERYAL METOD	37
3.1. Materyal	37
3.1.1. Deney Hayvanları	37
3.1.2. Kullanılan İlaçlar	37
3.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar	38
3.2. Metod	39

3.2.1. Deney Planı.....	39
3.2.2. Biyokimyasal Çalışmalar	42
3.2.2.1. Serumda ALT ve AST Ölçümleri.....	42
3.2.2.2. Karaciğer Dokusunda Yapılan Ölçümler.....	44
3.2.3. Moleküler Çalışmalar	50
3.2.3.1 Karaciğer Dokusunda TNF- α , IL-1 β ve iNOS Ölçümleri	50
3.2.3.2. Revers Transkriptaz Reaksiyonu ve cDNA Sentezi:	50
3.2.3.3. Real Time PCR ile mRNA Ekspresyonlarının Kantitatif Olarak Belirlenmesi.	51
2.3.4. İstatistiksel Analiz.....	51
4. BULGULAR.....	53
4.1. Biyokimyasal Bulgular	53
4.1.1. Serumda ALT ve AST Bulguları	53
4.1.2. Karaciğer Dokusunda SOD, GSH ve MDA Bulguları	56
4.1.3. Karaciğer Dokusunda ADE-NEP Bulguları	60
4.2. Moleküler Bulgular.....	62
4.2.1. TNF- α , IL-1 β ve iNOS Bulguları	62
5.TARTIŞMA.....	66
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	77
KAYNAKÇA.....	78
EKLER	108
EK-1. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	108
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	109

TEŞEKKÜR

Doktora tezimin hazırlanması sürecinde yardımını, anlayışını, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Beyzagül ERKAYMAN'a çok teşekkür ederim.

Doktora öğrenimim boyunca tecrübesiyle bana daima yol gösteren hocam sayın Prof. Dr. Zekai HALICI'ya, kendisine her ulaştığımda bana vakit ayıran, bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım hocam sayın Prof. Dr. Elif ÇADIRCI'ya, tez çalışmalarım süresince bilgilerinden ve deneyimlerinden yararlandığım hocam sayın Prof. Dr. Yasin BAYIR'a sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamda ve doktora öğrenimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım hocam sayın Prof. Dr. Abdülmecit ALBAYRAK'a, tez çalışmamda desteklerini esirgemeyen hocam sayın Doç. Dr. Rüstem Anıl UĞAN'a, tez süresince desteklerini esirgemeyen ve tecrübelerinden yararlandığım sayın hocam Doç. Dr. Onur ŞENOL'a, tezimi oluşturma süresince desteklerini esirgemeyen Dr. Taha TAVACI ve Doç. Dr. Pelin AYDIN'a, tezimin moleküler ve biyokimyasal ölçümlerinde desteklerini esirgemeyen hocam sayın Doç. Dr. Zerrin KUTLU'ya ve Araş. Gör. Berna ÖZTÜRK KARAGÖZ'e, TÜBİTAK 2211/A Yurtiçi Lisansüstü Doktora Burs Programı desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a çok teşekkürlerimi sunarım.

Doktora öğrenimim boyunca beni sürekli destekleyen annem, babam, ablam ve eşime tüm içtenliğimle çok teşekkür ederim.

Gökçe KAYA BOZKURT

ÖZET

Sıçanlarda Parasetamolle İndüklenen Karaciğer Toksisitesinde Valsartan/ Sakubitril Kombinasyonu LCZ696 ile Valsartanın Etkilerinin Karşılaştırılması

Amaç: Sıçanlarda parasetamol ile oluşturulmuş karaciğer hasarına karşı Anjiyotensin-1 reseptör blokörü Valsartan ile Anjiyotensin-1 reseptör blokörü ve neprilisin inhibitörü LCZ696'nın hepatoprotektif etkisini araştırmak amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: 66 adet Albino *wistar* sıçan rastgele 11 gruba ayrılmış, 24 saat aç bırakılmıştır. Parasetamol, Valsartan, LCZ696, NAC oral yoldan verilmiştir. Parasetamol uygulaması Valsartan, LCZ696, NAC verildikten 1 saat sonra yapılmıştır. PARA+VAL, PARA+LCZ696, PARA+NAC gruplarına 12 saat sonra tekrar aynı dozlarda ilaçlar uygulanmıştır. Parasetamol uygulamasından 24 saat sonra sıçanlar sakrifiye edilmiştir kan ve doku örnekleri alınmıştır. Alınan örnekler üzerinde ALT, AST, SOD, GSH, MDA, ADE, Neprilisin, TNF- α , IL-1 β , iNOS parametreleri incelenmiştir.

Bulgular: Elde edilen sonuçlara baktığımızda parasetamol uygulamasına bağlı olarak artan ALT ve AST seviyeleri Valsartan ve LCZ696 uygulamasıyla düşüş göstermiş olup bu etkinin doza bağlı olduğu görülmüştür. ALT ve AST seviyelerinde PARA+LCZ696 gruplarında PARA+VAL gruplarına göre daha etkili bir düşüş gözlemlenmiştir. SOD ve GSH parametreleri PARA+VAL ve PARA+LCZ696 gruplarında doza bağlı olarak artmıştır. MDA seviyeleri incelendiğinde en yüksek değer PARA grubunda ölçülmüştür. PARA+LCZ696-200 grubu MDA seviyesi Sağlıklı ve PARA+NAC grubuyla benzer seviyededir. PARA+VAL ve PARA+LCZ696 gruplarında ADE ve NEP seviyeleri artan doza bağlı olarak düşmüştür. iNOS, TNF- α , IL1- β düzeyleri incelendiğinde en yüksek PARA grubunda ölçülmüş olup, PARA+LCZ696 ve PARA+VAL gruplarında artan doza bağlı olarak azalma görülmüştür.

Sonuç: LCZ696 ve Valsartan parasetamole bağlı hepatotksisiteyi artan dozlarda azaltmıştır. En yüksek hepatoprotektif etki PARA+LCZ696-200 grubunda ölçülmüştür.

Anahtar kelimeler: Hepatotoksisite, Parasetamol, LCZ696, Valsartan

ABSTRACT

Comparison of the Effects of Valsartan/Sacubitril Combination LCZ696 and Valsartan on Paracetamol-Induced Liver Toxicity in Rats

Aim: It was aimed to investigate the hepatoprotective effects of angiotensin-1 receptor blocker Valsartan and angiotensin-1 receptor blocker and neprilysin inhibitor LCZ696 against paracetamol-induced liver injury in rats.

Materials and Methods: 66 Albino wistar rats were randomly divided into 11 groups and fasted for 24 hours. Paracetamol, Valsartan, LCZ696, NAC was given orally. Paracetamol administration was done 1 hour after Valsartan, LCZ696, NAC was given. After 12 hours, the same doses of drugs were applied to the PARA+VAL, PARA+LCZ696, PARA+NAC groups. Rats were sacrificed 24 hours after paracetamol administration and blood and tissue samples were taken. ALT, AST, SOD, GSH, MDA ADE, Neprilysin, TNF- α , IL-1 β and iNOS parameters were examined on the samples taken.

Results: When we look at the results obtained, ALT and AST levels increased due to paracetamol administration and decreased with Valsartan and LCZ696 administration, and it was seen that this effect was dose dependent. A more effective decrease was observed in ALT and AST levels in the PARA+LCZ696 groups compared to the PARA+VAL groups. SOD and GSH parameters increased in the PARA+VAL and PARA+LCZ696 groups in a dose-dependent manner. When MDA levels were examined, the highest value was measured in the PARA group. MDA level of PARA+LCZ696-200 group is at the same level as HEALTHY and PARA+NAC group. ADE and NEP levels decreased with increasing dose in the PARA+VAL and PARA+LCZ696 groups. iNOS, TNF- α , IL1- β levels were highest in the PARA group, and decreased in the PARA+LCZ696 and PARA+VAL groups depending on the increasing dose.

Conclusion: LCZ696 and Valsartan reduced paracetamol-induced hepatotoxicity at increasing doses. The highest hepatoprotective effect was measured in the PARA+LCZ696-200 group.

Keywords: Hepatotoxicity, Paracetamol, LCZ696, Valsartan

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADE	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ALT	: Alanin aminotransferaz
ANP	: Atriyal Natriüretik Peptit
ANP	: Atriyal natriüretik peptit
ARB	: Anjiyotensin II tip 1 reseptör blokörü
ARNi	: Anjiyotensin reseptör neprilisin inhibitörü
AST	: Aspartat aminotransferaz
AT1R	: Anjiyotensin II tip 1 reseptörü
AT2R	: Anjiyotensin II tip 2 reseptörü
AT-II	: Anjiyotensin II
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit
GSH	: Glutasyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
IL	: interlökin
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit
KCH	: King's College Kriterleri
MDA	: Malondialdehit
NAC	: N-asetilsistein
NAPQI	: N-asetil-p-benzokinonimin:
NEP	: Neprilisin
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NSAİ	: Nonsteroidal Antiinflamatuvar İlaç
PT	: Protrombin zamanı

RAAS	: Renin Anjiyotensin Aldosteron Sistemi
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TNF	: Tümör nekroz faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 4.1. ALT ölçümüne ait grafik	55
Şekil 4.2. AST ölçümüne ait grafik	56
Şekil 4.3. SOD ölçümüne ait grafik	58
Şekil 4.4. GSH ölçümüne ait grafik	59
Şekil 4.5. MDA ölçümüne ait grafik	60
Şekil 4.6. ADE ölçümüne ait grafik	61
Şekil 4.7. NEP ölçümüne ait grafik	62
Şekil 4.8. TNF- α ölçümlerine ait grafik	63
Şekil 4.9. IL-1 β ölçümlerine ait grafik	64
Şekil 4.10. iNOS ölçümlerine ait grafik	65

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan cihazların marka ve modelleri	38
Tablo 3.2. Deneylerde kullanılan hayvanların sayıları ve tedavi grupları	41
Tablo 4.1. ALT ve AST ölçüm sonuçları.....	54
Tablo 4.2. SOD, GSH ve MDA ölçüm sonuçları.....	57
Tablo 4.3. ADE ve NEP ölçüm sonuçları	61

1. GİRİŞ

Parasetamol diğerk bir adıyla asetaminofen (N-asetil-p-aminofenol) dünya çapında yaygın olarak kullanılan analjezik ve antipiretik bir ajandır (O'Grady, 1997). Asetaminofen, kolay erişilebilirliği ve düşük maliyeti nedeniyle birçok farmasötik preparatta kullanılmaktadır. Parasetamol yüzlerce reçetesiz ve reçeteli ilacın bir bileşeni olup sıklıkla kazara ve aşırı doz suistimali ile ilişkilendirilmektedir (Agrawal & Khazaeni, 2022). Önerilen terapötik dozlarda kullanıldığında, asetaminofen güvenli olarak değerlendirilmektedir; ancak yanlış kronik ve aşırı dozda kullanımı hepatotoksisite meydana getirebilmektedir (Saccomano, 2019). Tedavi dozlarının üzerinde kullanılması (çocuklarda tek seferde 150 mg/kg, erişkinlerde ise 7.5 g'ın üzerinde alınması (Lewis & Paloucek, 1991) veya 24 saat içinde çocuklarda 250 mg/kg, yetişkinlerde ise 12 g'ın üzerinde alınması) (Makin ve ark., 1995; Prescott, 1983) hepatotoksisiteye neden olmaktadır.

Parasetamolün büyük bir kısmı karaciğerde glukuronidasyon ve sülfonasyon reaksiyonları ile metabolize edilir, küçük bir kısmı ise oksidasyona uğrayarak oldukça reaktif metabolit olan N-asetil-p-benzokinonimin (NAPQI) oluşturur (Dahlin ve ark., 1984; Hodgman & Garrard, 2012). Parasetamolün metabolik aktivasyonunda karaciğer sitokrom P450 (CYP) enzimlerinin, özellikle CYP2E1 ve CYP3A4'ün, anahtar rol oynadığına inanılmaktadır (Patten ve ark., 1993; Thummel ve ark., 1993). Terapötik dozda parasetamol alındığında oluşan NAPQI, glutatyon (GSH) ile metabolize edilerek devre dışı bırakılır (Mitchell ve ark., 1973). Parasetamole bağlı gelişen hepatotoksisitede, GSH miktarının tükenmesinin sorumlu olduğu çok iyi bilinmektedir. Yüksek doz parasetamol alındığında GSH'ın hücre içi depoları tükenir. GSH depoları normal değerlerin %30'undan daha azına tükendiğinde hepatosit hasarı tetiklenir. Bu tip

hepatotoksisite, akut karaciğer yetmezliğine ve sonuçta ciddi mortalite ve morbiditeye yol açabilir (Ghanem ve ark., 2016).

Parasetamol toksisitesinin tedavisinde kullanılan yöntemler arasında; nazogastrik tüp ya da oral yolla uygulanan aktif kömür, gastrointestinal dekontaminasyon, uygun zamanda N-asetilsistein (NAC) kullanımı ve destekleyici tedavi bulunmaktadır (Chiew ve ark., 2018). Klinikte parasetamol zehirlenmelerinde ortaya çıkan ciddi karaciğer hasarında çoğunlukla NAC tercih edilmektedir. Ancak genellikle ilk birkaç saat içinde uygulandığı zaman etkili olabilmekte ve her hastada da aynı yanıt alınamamaktadır (Ghanem ve ark., 2016). Bu nedenle parasetamolün neden olduğu karaciğer hasarının tedavisinde veya önlenmesi ile ilgili literatürde çok sayıda ve güncel insan ve deney hayvanı çalışması bulunmaktadır.

Parasetamolün metabolizması iyi bilinmesine rağmen parasetamole bağlı gelişen hepatotoksisitenin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Son yapılan çalışmalar oksidatif stresin ve inflamasyonun bu süreçte kritik bir rol oynadığını göstermektedir (Shan ve ark., 2018). Tüm biyolojik sistemler, yaşam için uygun koşulları elde etmek için oksidatif ve indirgeyici reaksiyonları dengeleyen bir düzende tutulurlar. Bu denge oksitleyici moleküllerin kaybı ya da aşırı birikmesi nedeniyle bozulur. Reaktif oksijen türleri (ROT) hücrelerdeki yaygın oksidanlardan bazılarıdır (Ricciotti & FitzGerald, 2011). Renin Anjiyotensin Aldosteron Sistemi (RAAS) homeostazın düzenlenmesinde büyük bir göreve sahiptir. Anjiyotensin II bu sistemin önemli bir bileşeni olup vücuttaki kan basıncını, elektrolit ve su dengesini düzenler (Hitomi ve ark., 2007). Ayrıca Anjiyotensin II, vasküler NADPH oksidazın güçlü bir aktivatörüdür ve reaktif oksijen üretimini artırır. Bununla birlikte nitrik oksit seviyesi azalır, vasküler inflamasyon ve sonucunda ateroskleroz oluşur (Doran ve ark., 2007). Anjiyotensin II inflamasyonun

gelişmesinde önemli bir faktör olan sitokinlerin salınımında düzenleyici olarak görev alır (Kolakovic ve ark., 2017).

Çalışmamızda kullanacağımız bir sakubitril/valsartan kombinasyonu olan LCZ 696 kodlu ilaç, hem Anjiyotensin II (AT-II) inhibisyonu hem nötral endopeptidaz inhibisyonu yapıp, vazokonstriksiyonu engelleyerek etki gösterir. LCZ 696 içeriğindeki sakubitril, neprilisin inhibitörüdür (Solomon ve ark., 2012). Neprilisin, böbrek korteksinde bulunan ve atriyal natriüretik peptidi (ANP) parçalayan bir endopeptidazdır. Natriüretik peptitler; atriyal, beyin tipi ve C tipi natriüretik peptitleri (ANP, BNP ve CNP) içeren benzer fakat genetik olarak farklı peptitlerin bir ailesini oluşturur. Neprilisin aktivasyonu hücre içi siklik GMP'yi artırır, bu da sırasıyla vazodilatasyon, natriürez ve diürez, RAAS, endotelin ve vazopressin inhibisyonu ve lipid mobilizasyonunu içeren biyolojik etkilere aracılık eder (Gu ve ark., 2010). Neprilisin inhibisyonunda amaç yararlı vazodilatör etkilerinin daha uzun sürmesine izin vermek için natriüretik peptitlerin parçalanmasını en aza indirmektir. Neprilisin aynı zamanda Anjiyotensin I, II ve Endotelin-1 gibi vazokonstriktörlerin parçalanmasına neden olur. Bu yüzden kalp yetmezliği ve hipertansiyon tedavisinde anjiyotensin reseptör blokörleriyle kombine olarak kullanılmaktadır (Kang & Banerjee, 2017). Sakubitril hem vazokonstriktör hem vazodilatör etkili olduğundan tek başına tedavide kullanılmaz. Neprilisin inhibitörleri ile anjiyotensin reseptör blokörleri kombine olarak kullanılır ve ARNi olarak bilinir (Sagnella, 2002). Neprilisin inhibitörü-anjiyotensin reseptör blokörü, sakubitril/valsartan, neprilisin enzimini (NEP) inhibe ederek eş zamanlı natriüretik peptit seviyesini artırır ve anjiyotensin II reseptörünü yani RAAS'ı inhibe eder (Singh ve ark., 2017). Valsartan, Anjiyotensin II'nin tip 1 reseptörünü (AT1-R) seçici olarak bloke ederek, anjiyotensin II bağımlı aldosteron salınımını inhibe eder. AT1-R 'nin blokajı; vazokonstrüksiyonu, sodyum ve su tutulmasını ve miyokardiyal hipertrofiyi azaltır (Dargad ve ark., 2018).

Bu çalışmanın amacı sıçanlarda parasetamol ile oluşturulmuş karaciğer hasarına karşı Valsartan ve LCZ696'nın muhtemel hepatoprotektif etkisini karşılaştırmalı olarak araştırmaktır ve ADE-NEP inhibisyonunun karaciğer üzerindeki muhtemel koruyucu etki mekanizmasını biyokimyasal ve moleküler bir bakış açısıyla göstermektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parasetamol

Parasetamol, asetaminofen ya da diğer bir deyişle N-Asetil-p-Aminofenol (APAP) analjezik ve antipiretik olarak sıklıkla kullanılan bir ilaçtır. Parasetamol tek bileşenli ya da kombine şeklinde reçeteli veya reçetesiz olarak satılan yüzlerce ürünün bileşiminde bulunmaktadır (Farrell).

Parasetamol, 1878 yılında Harmon Northrop Morse tarafından sentezlenmiştir. Klinikteki kullanımına ise Joseph von Mering tarafından 1887 yılında başlanılmıştır (Bertolini ve ark., 2006). Bernard Brodie ve Julius Axelrod 1948 yılında yaptıkları çalışmalarda parasetamolün asetanilid gibi toksik olmadığını göstermişlerdir (Brodie & Axelrod, 1948).

Parasetamol hafif ve orta şiddetteki ağrının ve ateşin semptomatik tedavisinde endikedir. Ayrıca, mide ülseri, aspirine aşırı duyarlılık gibi nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçların (NSAİİ'ler) kullanımının kontrendike olduğu hastalarda, kan pıhtılaşması bozuklukları, hamile kadınlar, emziren annelerde de sıklıkla tercih edilmektedir (Leung, 2012). Parasetamolün piyasada i.v., eliksir, süspansiyon, çözülebilir tablet, çiğnenebilir tablet, kapsül, rektal supozituar formları mevcuttur.

Yetişkinlerde günlük maksimum parasetamol dozu 4 g'dır (Saccomano, 2019). On iki yaşın üzerindeki çocuklar ve yetişkinler için önerilen 4-6 saat arayla 500 mg-1000 mg tablettir. 6-12 yaş arasındaki çocuklar için 250 mg-500 mg tablet önerilir. Günlük en yüksek doz 10-15 mg/kg bölünmüş dozlarda 60 mg/kg'dır.

2.2. Parasetamolün Farmakolojik Özellikleri

Parasetamol yüzyılı aşkın bir süredir kullanılmasına rağmen etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (Smith, 2009). NSAİİ'ler gibi analjezik ve antipiretik özellik göstermesine rağmen, NSAİİ'lerin aksine antiinflamatuvar aktivite göstermez.

Parasetamol NSAİİ'ler gibi prostaglandin sentezini baskılamasına rağmen gastrointestinal yan etkileri yoktur (Hinz & Brune, 2002). Son yıllarda yapılan çalışmalar parasetamolün analjezik ve antipiretik özelliğini, COX-1 ve COX-2 aktivitesini inhibe ederek ve merkezi etki göstererek oluşturduğu düşünülmektedir (Fu ve ark., 1990).

Chandrasekharan ve arkadaşları tarafından köpeğin beyin dokusu üzerinde yapılan deneylerde parasetamole karşı özel bir duyarlılık sergileyen üçüncü COX izoformu olan COX-3'ün varlığı gösterilmiştir. Ancak COX-3'ün insan organizmasında işlev görmediği ortaya çıkarılmıştır. Köpek COX-3'ün merkezi sinir sisteminin bazı dokularında meydana gelen insan analogu, COX'ten farklı amino asit dizilimi proteinlerini kodlayan ve COX sergilemeyen, parasetamole tercihli bir duyarlılığı olmayan COX-1'in alternatif bir ek varyantı olduğu gösterilmiştir (Dinchuk ve ark., 2003; Simmons ve ark., 2005). Buna rağmen üç COX izoenziminin parasetamol etki mekanizmasındaki rolü tartışılmaya devam etmektedir (Ayoub ve ark., 2006; Botting, 2006; Schwab ve ark., 2003).

Parasetamolün santral etki mekanizması ağrı inhibisyonunda yer alan azalan serotoninerjik yollar üzerindeki uyarıcı etkisi olabileceği tartışılmıştır. Alloui ve arkadaşları tarafından yapılan bir deneyde karragenin verilmiş sıçanlarda parasetamolün analjezik ve antiinflamatuvar etkisi araştırılmıştır. Parasetamolün antiinflamatuvar etkisi gözlenmezken, bu ilacın santral antinosiseptif etkisi serotonin reseptörlerinin 5-HT₃ alt tipinin tutulumu ile saptanmıştır (Alloui ve ark., 2002). Median sinirin elektrikle uyarılmasıyla ağrının indüklendiği sağlıklı gönüllüler üzerinde yapılan çalışmada, parasetamolün 5-HT₃ reseptör blokörü tropisetron veya granisetron ile kombine parasetamol ile tedavi edilen denek grubunda parasetamolün analjezik etkisinin tamamen bloke edildiği gösterilmiştir (Pickering ve ark., 2008; Pickering ve ark., 2006).

Başka bir yaklaşıma göre L-arginin-nitrik oksit (NO) yolunun inhibisyonu da parasetamolün analjezik etkisinin mekanizması olabilir (Bjorkman, 1995). NO'nun ağrı

oluşumundaki mekanizması karışıktır. NO donörleri pronosisepsiyonu veya antinosisepsiyonu indükleyebilirler. Bu karşıt eylemler, devam eden ağrıyı yoğunlaştıran yüksek dozlarda NO donörü konsantrasyonuna bağlı olabilir (Sousa & Prado, 2001).

2.3. Parasetamolün Farmakokinetiği

Oral uygulamadan sonra asetaminofenin emilimi ince bağırsaktadır ve emilim hızı mide boşalma hızına bağlıdır. Yiyecekler, opioidler ve antikolinerjik ajanlar gibi diğer bazı ilaçların eşzamanlı kullanımı gastrik boşalmayı geciktirebilir (McGilveray & Mattok, 1972; Nimmo ve ark., 1975; Prescott, 1980). Parasetamolün kafeinle alımı emilimini hızlandırır ve analjezik etkiyi artırır. Analjezik etki 30 dakika içinde başlar ve doruk plazma konsantrasyonuna 30-60 dakika içinde ulaşır (Renner ve ark., 2007).

Parasetamolün plazma proteinlerine bağlanma oranı düşüktür (Prescott, 1980). Vücutta kolayca dağılır. Asetaminofen hem kan beyin bariyerini hem de plesantal bariyeri geçer (Jensen ve ark., 2010; Mallet ve ark., 2010). Plazma yarı ömrü 1.5-2 saattir (Prescott, 1980).

Teapötik dozlarda kullanıldığında parasetamol glukuronil transferaz (%20-46) ve sülfö transferaz (%20-46) enzimleri tarafından hepatik konjugasyona uğrayarak metabolize edilir ve böbreklerden atılır. Bu yolakla parasetamolün %85-90 ı metabolize edilir. Yüksek doz parasetamol varlığında bu yollar yetersiz hale gelir (Forrest ve ark., 1982; Prescott, 1980). Asetaminofenin yaklaşık %10'u normalde CYP450 izoenzimleri CYP2E1 ve daha az ölçüde CYP1A2, CYP3A4 ve CYP2A6 tarafından metabolize edilir. Metabolizasyon ürünü olarak oldukça reaktif bir metabolit olan NAPQI oluşur. Yüksek dozda asetaminofenden sonra veya ilgili CYP450 izoenzimleri diğer ilaçlar veya kronik alkol tüketimi ile indüklendiğinde, NAPQI yüksek konsantrasyonlarda birikebilir (Benson ve ark., 2005; Jollow ve ark., 1974; Potter ve ark., 1973; Potter ve ark., 1974). Normalde NAPQI, glutatyonun sülfidril gruplarının, glutatyon S transferaz tarafından

idrarla atılan merkaptürük aside konjugasyonu ile zararsız metabolitlere detoksifiye edilir. Bununla birlikte, glutatyon, yüksek dozlarda asetaminofenden sonra veya yetersiz beslenme durumlarında tükenerek NAPQI'nin birikmesine neden olabilir. Bunun sonucunda NAPQI karaciğer hücre bileşenleri ile kovalent olarak etkileşime girerek hepatik hasara neden olur (Benson ve ark., 2005; Potter ve ark., 1973).

2.4. Parasetamolün Yan Etkileri

Parasetamol önerilen terapötik dozlarda alındığında çok nadir olarak yan etki bildirilmiştir. Parasetamol seyrek olarak ciltte ürtiker ve diğer alerjik döküntülere neden olabilir, nadiren larenks ödemi ve bronkospazm yapabilir. Methemoglobinemi ve hemolitik anemi nadiren oluşturur. Uzun süre kullanıldığında analjezik nefropatisi riskini artırır; yapılan çalışmalarda yılda 366 tablet veya daha fazla kullanan kişilerde riski 2 kat artırmıştır.

En önemli yan etkisi yüksek doz parasetamol alındığında karaciğer hepatotoksitesine neden olmasıdır. Hepatotoksik etken, parasetamolden karaciğerde oluşan bir oksidasyon ürünü olan NAPQI'dır. Akut intoksikasyon sırasında ilk 24 saatte bulantı, kusma ve karın ağrısı gibi belirtiler oluşur. Sarılık ve diğer karaciğer yetmezliği belirtileri 2-3 gün sonra ortaya çıkar. Ayrıca hepatik ensefalopati ve akut böbrek yetmezliği oluşabilir. Tek seferde 10 g veya daha fazla miktar dozda alındığında belirgin akut karaciğer nekrozu oluşabilir (Melli & Kayaalp, 2012).

2.5. Parasetamol Toksisitesi

Yetişkinlerde 10 g, çocuklarda 150 mg/kg üzerinde parasetamol alımında en ciddi yan etki olan hepatotoksisite tetiklenir (Rumack & Matthew, 1975). Hepatotoksisite derecesi GSH düzeyi ve metabolize eden enzim seviyesi ile ilişkilidir. Terapötik dozlarda parasetamol alındığında az miktarda NAPQI oluşur ve GSH ile kolaylıkla detoksifiye edilir. Aşırı dozda parasetamol alımı sonucunda glukuronik asit ve sülfat yolları

doygunluğa ulaşır, parasetamol metabolizasyon için CYP yolağına yönlendirilir. CYP 2E1 tarafından artan metabolizasyon sonucu üretilen NAPQI miktarı da artar (Lee ve ark., 1996). Karaciğerdeki glutatyon depoları sınırlıdır ve artan NAPQI seviyesine yetişemeyip tükenirler. GSH depoları %70 ila %80 oranında azaldığında, karaciğerin detoksifikasyon kapasitesi aşarak NAPQI birikir. Böylece hepatositler ve diğer hücrelerle etkileşime girer ve onları yok eder (Gemborys ve ark., 1980; Linden & Rumack, 1984; Prescott, 1983). Glutatyon tükenmesi ayrıca oksidatif strese neden olur (Graham ve ark., 2005). NAPQI'nin mitokondriyal proteinler gibi kritik hücresel hedeflere bağlanmasıyla, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve hücre ATP kaybı meydana gelir (Harman ve ark., 1991; Jaeschke ve ark., 2003). Hepatositlerde meydana gelen enerji kaybı, mitokondriyal işlev bozukluğu, DNA hasarı ve sonucunda hücre ölümüne neden olur (Burcham & Harman, 1991; Jaeschke & Bajt, 2006; Mitchell ve ark., 1974).

2.5.1. Parasetamol Toksisitesinin Klinik Bulguları

Yüksek doz parasetamol alımının etkileri klinikte birbirini takip eden evrelerle gözlemlenmiştir. Oral parasetamol alınmasından sonraki ilk 24 saatte (evre 1) mide bulantısı, kusma, karın ağrısı, anoreksi, uyuşukluk, halsizlik ve terleme ile spesifik olmayan gastrointestinal tahriş ile karakterize edilir (Rumack ve ark., 1981). Laboratuvar ölçümleri genellikle normaldir fakat karaciğer enzimleri ölçüldüğünde alımdan sonraki 8-12 saat içinde hafif yükselmeler meydana gelebilmektedir. Bu evredeki hastalar için tıbbi müdahale gerekmez ve belirtiler zamanla azalır.

Latent faz (evre 2) parasetamol alımından sonraki 24-72 saat arasında gerçekleşir. Hastalar genelde iyi görünmesine rağmen hepatotoksisitenin biyokimyasal ve subklinik kanıtları ortaya çıkmaya başlar. Serum aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) enzimleri artmaya başlar (Singer ve ark., 1995). Hastalarda sağ

üst kadran ağrısı ve sarılık meydana gelebilir. Total bilirubin ve protrombin zamanında yükselmeler meydana gelebilir. Nefrotoksisite ve oligoüri meydana gelebilir.

Parasetamol alımından 72-96 saat sonra hepatik faz (evre 3) meydana gelir. Bu faz hepatoselüler nekroz fazıdır, en çok ölüm bu fazda meydana gelir (Bessems & Vermeulen, 2001). Semptomlar bu fazda belirgindir ve hasarın ciddiyetine göre değişir. İştahsızlık, bulantı, kusma, karın ağrısı, halsizlik ve konfüzyon gelişebilir. Sarılık kötüleşebilir, ALT ve AST seviyeleri ciddi şekilde yükselmiştir. AST 10.000 IU/L veya daha yüksek seviyelere çıkabilir. Aminotransferaz yükselmesinin derecesi kabaca hepatoselüler hasarın derecesine karşılık gelmektedir. Parasetamol toksisitesine maruz kalan hastaların bir kısmı iyileşme fazına (evre 4) girerek hayatta kalırlar bir kısmında ise ölüm meydana gelir (Larson, 2007).

2.6. Parasetamol Zehirlenmesinin Tedavisi

Asetaminofenin doz aşımına yönelik olarak yapılacaklar arasında absorpsiyonun önlenmesi, asetaminofenin kandan uzaklaştırılması, asetaminofenin toksik metabolit olan NAPQI'ya dönüşümünün engellenmesi, NAPQI'nın detoksifikasyonu ve karaciğer transplantasyonu yer almalıdır.

Gastrik lavaj, aktif kömür uygulanması ve ipeka ile kusturulmanın sağlanması parasetamol alımından sonraki ilk birkaç saatte Emilimi azaltmak için kullanılmaktadır (Brok ve ark., 2006; Underhill ve ark., 1990). Simetidin CYP 450 enzimini inhibe ederek toksik metabolit olan NAPQI'nın oluşumunu azaltır. NAPQI'yı detoksifiye etmek için metionin, sisteamin ve NAC kullanılır. Yapılan çalışmalarda üçünün de karaciğer hasarını azalttığı gösterilmiş olmasına rağmen metionin ve sisteaminin NAC'a kıyasla daha fazla yan etkiye (merkezi sinir sistemi ve gastrointestinal sistemde) sahip olduğu gösterilmiştir. Geri dönüşümsüz karaciğer hasarlarında sağ kalımı iyileştiren tek

müdahale karaciğer transplantasyonudur. Günümüzde parasetamol hepatotoksitesitesi tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaç NAC'dır (Brok ve ark., 2006).

2.6.1. N-Asetil Sistein (NAC)

NAC, yeterince erken uygulanırsa, asetaminofen doz aşımı olan hastalarda karaciğer yetmezliğini önleyebilir (Kozer & Koren, 2001). Yüksek doz parasetamol alımı sonrasında 8-10 saat içinde oral NAC tedavisi ciddi karaciğer hasarını ve ölümleri önemli ölçüde azaltmıştır (Prescott, 1981; Smilkstein ve ark., 1988). NAC bir glutatyon öncüsü olup ilk olarak 1977 yılında parasetamole bağlı hepatotoksitesite tedavisinde kullanılmıştır (Peterson & Rumack, 1977; Prescott ve ark., 1977). NAC, glutatyon depolarını doldurarak, NAPQI'ya bağlanıp sülfat konjugasyonunu artırır. NAC ayrıca antiinflamatuvar, vazodilatör, antioksidan etkilere de sahiptir (Lin & Levy, 1981; Mitchell ve ark., 1974; Slattey ve ark., 1987).

Parasetamol toksisitesinde 72 saat boyunca oral NAC uygulanmalıdır. NAC 140 mg/kg yükleme dozu olarak başlanılır ardından 4 saatte bir 70 mg/kg idame dozu olarak toplam 17 doz olarak verilir. Verilecek doz kusma sonucunda kaybedilirse bu doz tekrarlanır. 4 saatlik ölçülen parasetamol konsantrasyonu toksik seviyenin altındaysa idame NAC dozları kesilebilir (Smilkstein ve ark., 1988). İntra venöz NAC uygulamasında; yükleme dozu 15 dakikada 150 mg/kg, sonraki 4 saatte 50 mg/kg ve ardından 16 saatte 100 mg/kg şeklindedir (Smilkstein ve ark., 1991). Asetaminofen doz aşımından sonraki ilk 10 saatte oral veya intra venöz NAC uygulanması benzer etkinlik göstermiştir. Alınan toplam NAC dozu 20 saatte 300 mg/kg'dır. Eğer parasetamol toksikasyonundan 10 saatden fazla zaman geçmişse daha yüksek toplam NAC dozu nedeniyle oral tedavi tercih edilir (Smilkstein ve ark., 1991; Smilkstein ve ark., 1988).

Oral NAC kötü bir tada ve kokuya sahiptir. Yaygın yan etkileri mide bulantısı, kusma, ishal ve döküntüdür. İntravenöz NAC uygulaması sonucu mide bulantısı,

döküntü, kaşıntı, bronkospazm, rinore, hemoliz, ateş, titreme, anjiyoödem gibi yan etkiler görülebilir (Tsai ve ark., 2005; Woo ve ark., 2000).

2.6.2. Diğer Tedavi Yöntemleri

2.6.2.1. Simetidin

Simetidin, H-2 reseptör antagonisti olup, gastrik sekresyonu inhibe ederek duodenal ülser tedavisinde kullanılır (Ruffalo & Thompson, 1982). Simetidin metabolizasyonu CYP 2E1 enzimi tarafından gerçekleştirilir. Parasetamolle birlikte simetidin kullanımı sonucunda CYP 2E1 enzimini yarışmalı olarak bloke edip, toksik metabolit olan NAPQI üretimini azaltır. Ancak literatürde yapılan bir çalışmaya göre parasetamol alımından 8 saat sonra simetidin uygulanması NAPQI üretimini azaltmamış olup, bu da bize simetidin'in erken saatlerde uygulanmasının etkili olabileceğini göstermektedir (Burkhart ve ark., 1995; Slattery ve ark., 1989).

2.6.2.2. Diyaliz

Parasetamol'un ekstrakorporel eliminasyonu parasetamol toksisitesi tedavisinde tartışmalıdır ve varolan datalar karışıktır (McBride & Rumack, 1992). Hemodializ; şiddetli parasetamol toksisitesinde kullanılmış olup hemodializin hepatotoksisiteyi önlediğini veya azalttığını gösteren güvenilir bir data elde edilememiştir. Hemodializin parasetamol toksisitesinde yararlı olamamasının en önemli nedeni ise yüksek doz alınan parasetamolün karaciğere hemen uğrayıp hasara başlaması olabilir (Matthew, 1973).

2.6.2.3. Karaciğer Transplantasyonu

Karaciğer nakli, NAC uygulanmasına rağmen akut karaciğer yetmezliğine ilerleyen aşırı doz parasetamol almış hastada uygulanacak nihai tedavi yöntemidir. Karaciğer nakli olmadan parasetamol zehirlenmesine bağlı akut karaciğer yetmezliğinde sağ kalım %36 kadar düşük bir orandır (Craig, Lee, ve ark., 2010).

Hangi hastaların transplantasyona ihtiyacı olduğu ve bundan fayda sağlayacağını belirlemek çok önemlidir. Bunun için belirli kriterler vardır. 1989'da O'Grady ve meslektaşları tarafından geliştirilen King's College Kriterleri (KCH), nakil gerektirecek hastaları belirlemede yüksek bir özgüllüğe sahiptir. Bu kriterler; arteriyal pH'ın 7,3 den düşük olması veya Derece III veya IV hepatik ensefalopati ile birlikte protrombin zamanının (PT) 100 saniyeden büyük olması ve kreatinin değeri 300 µmol/L (3,4 mg/dL)'den yüksek olmasıdır (Craig, Ford, ve ark., 2010). Ayrıca transplantasyon sonrası geriye dönüşümü olmayan ömür boyu süren bir immünosüpresif tedavi gerekmektedir (Dargan & Jones, 2002).

2.6.3. Prognoz

Yüksek doz parasetamol almış hastaların % 90 ı hepatotoksisite gelişsin ya da gelişmesin tam bir iyileşme göstermişlerdir (Larson, 2007). NAC, parasetamol alımından sonraki 12 saat içinde verilirse, Parasetamol hepatotoksitesisi gelişmiş hastalarda sağ kalım %80'den daha iyidir. Ancak NAC uygulanmazsa bu oran yalnızca %48'dir (Makin ve ark., 1995). KCH kriterlerini karşılamayan hastaların sağ kalım oranı %90 ila %93 arasındadır. Parasetamol toksisitesine bağlı akut karaciğer yetmezliğinde karaciğer transplantasyonsuz sağ kalım oranı %65-73'tür (Larson ve ark., 2005). Parasetamol alımından sonraki ilk 24 saatte hastane yoğun bakımlarında tedaviye alınanların sağ kalım oranı, sonraki zaman periyodunda gelenlerden oldukça yüksektir. Hepatik ensefalopatinin derecesi arttıkça, sağ kalım oranı azalmaktadır (Makin ve ark., 1995). Serum kreatinin ve protrombin zamanı ile sağ kalım arasında çok güçlü bir bağlantı bulunmaktadır. PT'si 90 sn olan hastalarda sağ kalım oranı % 80 iken, PT'si 180 sn olan hastalardaki sağ kalım oranı % 8'lere kadar gerilemektedir (Harrison ve ark., 1990). Serum kreatinin değeri 100 mmol/L'nin altında olan hastalarda genel sağ kalım %65 iken, 300 mmol/L'nin üzerindeki hastalarda %23'e düşmektedir (O'Grady, 1997). Parasetamol

ile indüklenen karaciğer hasarında karaciğer transplantasyon ihtiyacı diğer nedenlerle oluşan karaciğer hasarındaki karaciğer transplantasyon ihtiyacından oldukça düşüktür (Bernal ve ark., 1998).

2.7. Serbest Radikaller

Serbest radikaller kararsız olup, başka bileşiklerle reaksiyona girmek için oldukça reaktif özellik gösteren, bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron içeren moleküllerdir (Sisein, 2014). Aerobik hücrelerde en önemli serbest radikal kaynağı; oksijen ve radikal türevleri (süperoksit, hidroksil radikali), geçiş metalleri ve hidrojen peroksittir. Oksijen atomu eşleşmemiş elektron çiftine sahiptir. Oksijen bu özelliğinden ötürü birçok serbest radikal ile kolayca tepkimeye girerken, genel olarak radikal olmayan türlerle nispeten yavaş reaksiyona girer (Cheeseman & Slater, 1993). Aerobik (oksijenli) solunum yapan canlılar dışarıdan aldıkları besin maddelerini, oksijeni kullanarak enerjiye çevirirler. Dolayısıyla aerobik solunum yapan canlılar, serbest radikallerin en fazla olduğu canlı grubudur. Bu yüzden aerobik solunum yapan canlılar serbest oksijen radikallerinin etkilerine daha fazla maruz kalırlar (Halliwell & Gutteridge, 1984).

2.7.1. Serbest Radikal Çeşitleri

Süper oksit radikali ($O_2^{\cdot -}$); oksijen molekülünün içerdiği iki serbest elektrondan bir tanesini dışarıdan bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. Süper oksit radikali hemen hemen bütün aerobik hücrelerde bulunmaktadır. Bu radikal eozinofil, monosit, makrofaj ve nötrofil gibi fagositik hücreler tarafından üretilmektedir (Halliwell & Gutteridge, 1984). Süper oksit radikali direkt olarak çok fazla toksik etki göstermez diğer reaktif oksijen türlerine dönüşerek toksisiteye neden olur (McCord & Day, 1978).

Hidrojen Peroksit radikali (H_2O_2); asidik ortamda moleküler oksijenin iki elektron alması sonucu meydana gelir. Bu tepkime kendiliğinden gerçekleşebilir veya süper oksit dismutaz enzimi tarafından katalizlenebilir (Gutteridge, 1995).

Hidroksil Radikali ($\cdot\text{OH}$); aktif geçiş metalleri ile hidrojen peroksidin reaksiyonu ile oluşur (Lloyd ve ark., 1997). Hidroksil radikali oldukça reaktif olup biyolojik sistemler üzerinde zararlı etkilere sahiptir. Hidroksil radikalının en önemli zararı lipid peroksidasyonu yapmasıdır (Ames ve ark., 1993).

Singlet Oksijeni ($^1\text{O}_2$); eşleşmemiş elektron ya da elektronlara sahip olmadığından dolayı bir serbest radikal değildir. Oksijenin eşleşmemiş elektronlarından birinden verilen enerji sonucu, bulunduğu orbitalden başka bir orbitale veya kendi spininin ters yönünde yer değiştirmesiyle oluşur. Ancak orbitalinde içerdiği elektronların aynı yönlü olması singlet oksijenin diğer SOR ile okside olmasını artırmaktadır. Singlet oksijen özellikle fotokimyasal reaksiyonlar için oldukça önemlidir (Ames ve ark., 1993).

Nitrik Oksit (NO) ve Azot Dioksit (NO_2); NO, nitrik oksit sentazlar (NOS) adı verilen hem içeren bir enzim ailesi tarafından katalize edilen bir reaksiyon olan, moleküler oksijen varlığında L-arginin'in L-sitrüline dönüştürülmesiyle üretilir (Radi, 2018). Nitrik oksit ve azot dioksit eşleşmemiş elektronları ile birer radikaldirler. NO_2 , NO'nun oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelir. NO_2 oldukça zehirli ve çok güçlü bir oksidandır (Gutteridge, 1995). Nitrik oksit eşleşmemiş elektronları sayesinde süperoksit, tiyol grupları ve azot dioksit ile hızlı reaksiyonlar oluşurmaktadır. Diğer radikallerle birlikte diabetes mellitus, septik çok, kalp bozuklukları, Alzheimer hastalığı ve gastrik hasar oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir (Lohinai & Szabo, 1999).

Diğer Serbest Radikaller: Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller ($\text{R}\cdot$), peroksil radikalleri ($\text{ROO}\cdot$), alkoksil radikalleri ($\text{RO}\cdot$), tiyol radikalleri ($\text{RS}\cdot$) gibi önemli serbest radikaller de oluşabilir.

2.7.2. Serbest Radikallerin Etkileri

ROT ve reaktif nitrojen türlerinin (RNT) konsantrasyonlarının kontrolsüz artışları, proteinleri (Stadtman & Levine, 2000), lipidleri (Rubbo ve ark., 1994), polisakkaritleri

(Kaur & Halliwell, 1994) ve DNA'yı (LeDoux ve ark., 1999; Richter ve ark., 1988) etkiler. Ayrıca bu artış apoptozun içsel yolunu tetikler. Hücrelerde oluşan stres aşırı ROT üretimine yol açar (Boveris & Chance, 1973).

Artan ROT üretimi lipitlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin spesifik olmayan modifikasyonuna yol açarak, biyoenerjetik işlev bozukluğuna neden olur. Mitokondriyal membran bileşenleri, ROT tarafından oluşturulan oksidatif hasara karşı özellikle hassastır. Mitokondriyal zarların ana fosfolipid bileşenleri, doymamış yağ asitleri açısından zengindir. Bu doymamış yağ asitleri, oksidatif reaksiyonlar zinciri yoluyla peroksidasyona uğrayan çift bağların varlığı nedeniyle oksijen radikal saldırısına potansiyel olarak oldukça duyarlıdır. Malondialdehit (MDA), çoklu doymamış yağ asidi peroksidasyonunun ana ürünüdür. Bu nedenle oksidatif strese maruz kalma sonucu plazma ve mitokondriyal MDA seviyesinde artış görülür (Mujahid ve ark., 2007).

Lipit peroksidasyonu, ROT tarafından bir hidrojen atomunun hidroksil radikalleri tarafından ayrılmasıyla başlatılır (Rhoads ve ark., 2006). Çoklu doymamış yağ asitlerinin radikal tarafından saldırıya uğraması sonucu membranlarda yıkıcı etki meydana gelir (Valko ve ark., 2006). Reaksiyon sonucunda, yağ asidi bir hidroperoksit oluşturabilir veya MDA ve 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) dahil olmak üzere aldehitler üretilebilir (Pinchuk ve ark., 1998). MDA, DNA bazları ile reaksiyona girerek gen mutasyonlarına neden olabilirken, HNE çoğunlukla proteinlerle reaksiyona girerek fonksiyonel değişikliklere yol açar (Trachootham ve ark., 2008). Lipit peroksidasyonu ile oluşturulmuş hasar sonucunda daha fazla miktarda ROT oluşur. Reaksiyon iki reaktifin birbiriyle tepkimeye girmesiyle sona erer (Agarwal & Prabakaran, 2005).

Tüm amino asitler ROT/RNS ile oksidasyona karşı duyarlı olsalar da, lizin, arginin, histidin, prolin ve treonin gibi bazı aminoasitler oksidasyona karşı özellikle hassastırlar (Valko ve ark., 2006). Proteinlerin radikallerle reaksiyona girmesi sonucu

karbon merkezli radikaller oluşur. Protein karbonillerinin seviyesi, protein oksidasyonu ve oksidatif stresin kantitatif bir belirteci olarak kullanılmıştır (Dean ve ark., 1997).

Oksijen radikalleri, fosfolipidlerdeki çoklu doymamış yağ asidi kalıntılarıyla reaksiyona girerek, çoğu protein ve DNA ile reaksiyona girebilecek çok sayıda ara ürün oluşturur. Lipit peroksidasyonunun ana ürünü olan MDA, deoksiguanozin, deoksiadenozin ve deoksisitidin gibi çok sayıda ürün oluşturmak üzere DNA ile reaksiyona girer. Oluşturulan DNA hasarı kanser ve diğer genetik hastalıklara yol açar (Marnett, 2002). ROT hemen hemen her hücresel yapıya veya moleküle saldırabilir ve DNA-protein çapraz bağlarına, deoksiriboz fosfat omurgasında hasara ve ayrıca pirimidin ve pürin bazlarının spesifik kimyasal modifikasyonlarına neden olabilir. Oksidatif baz modifikasyonları, mutasyonlara neden olabilirken, deoksiriboz kısımlarının oksidasyonu, baz salınımını veya DNA sarmal kırılmalarını indükleyebilir. Hidroksil radikalleri dört bazın hepsinden (örneğin, 5-hidroksimetil urasil, 8-dihidroksiadenin, timidin glikol, vb.) çoklu ürünler üretirken, singlet oksijen tercihen 8-hidroksilasyon ile guanini değiştirir (Haines ve ark., 2013; Kalogeris ve ark., 2012).

2.8. Antioksidan Savunma Sistemleri

Antioksidanlar, serbest radikallerle güvenli bir şekilde etkileşime girerek, hayati moleküller zarar görmeden zincirleme reaksiyonu sonlandırabilen ve zararlı serbest radikallere karşı bu molekülleri koruyan maddelerdir. Hem doğal hem de sentetik çok çeşitli antioksidanlar, serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olarak ikiye ayrılırlar.

2.8.1. Endojen Doğal Antioksidanlar

Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, tiyoller, ürik asit, bilirubin, melatonin, metal bağlı proteinler, alfa lipoik asit endojen antioksidanlardandır (Pisoschi

& Pop, 2015). Katalaz enzimi H_2O_2 'yi suya dönüştürerek antioksidan özellik gösterir. Daha çok karaciğer ve eritrositlerden sentezlenir (Sung ve ark., 2013). Glutasyon peroksidaz dört farklı selenoprotein içerir. Glutasyon peroksidaz enziminin biri selenyumdan bağımsız (glutasyon-S-transferaz, GST), diğeri selenyuma bağımlı (GPx) olmak üzere iki formu vardır. En önemli formu mitokondri ve hücre dışı matriste de bulunan sitozolik GPx'tir. Diğerleri, selenyum bağımlı olmayan bir GPx, gastrointestinal GPx ve bir fosfolipid hidroperoksit GPx'tir. GPx; böbrek, karaciğer ve eritrositlerde eksprese edilir. Tüm GPx enzimleri, selenoller oluşturarak peroksitleri azaltmak için iki elektron ekler. GPx, indirgenmiş glutasyonu (GSH) oksitlenmiş glutatona (GSSG) dönüştürerek hidrojen peroksidi parçalar. GSH'nin rejenerasyonu, bir redoks döngüsü oluşturan NADPH'ye bağımlı bir glutasyon redüktaz (GR) aracılığıyla gerçekleşir (Chen ve ark., 2013; Kumaran & Prince, 2010). Tiyoller oksidanlarla reaksiyona giren esansiyel antioksidanlardandır.

2.8.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD) biyolojik sistemlerin her hücresinde bulunan endojen olarak üretilen önemli bir hücre içi enzimdir. Hücrel SOD çeşitli metal kompleksleri şeklinde bulunur. Biyolojik sistemde üç ana SOD formu bulunur: bakır-çinko içeren SOD (CuZnSOD), manganez içeren SOD (SOD2 olarak da bilinen MnSOD) ve demir içeren SOD (FeSOD)'dur. Ekstraselüler SOD ekstraselüler matriks içinde bulunur. Karaciğer, dalak, böbrek ve adrenal bezde yüksek oranda SOD enzimi bulunur. SOD, ROT'u elimine etmede temel enzim olarak kabul edilir. SOD, hidrojen peroksit ve oksijen oluşturmak için protonlarla reaksiyona girerek süperoksit radikalini uzaklaştırır. SOD, süperoksiti hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürerek antioksidan aktivite gösterir (Salles ve ark., 2012).

2.8.1.2. Glutasyon (GSH)

Tripeptit indirgenmiş glutasyon (GSH), enzimatik olmayan çok işlevli hücre içi bir antioksidandır. Hücre içinde sistein, glisin ve glutamattan sentezlenir. Esas olarak karaciğerde sentezlenir ve yaklaşık %40'ı safraya salgılanır. GSH'nin rolü, bağırsak lümeninde diyet ksenobiyotiklerine ve lipid peroksidasyonuna karşı savunma yapmak ve bağırsak epitelyumunu oksijen radikal saldırısından korumaktır. Ayrıca glutasyon, oksidatif strese karşı detoksifiye edici birkaç enzime kofaktörlük yaparak antioksidan aktivite gösterir. Hidroksil radikalini ve singlet oksijeni doğrudan temizler, glutasyon peroksidazın katalitik etkisiyle hidrojen peroksit ve lipid peroksitleri detoksifiye eder (Tovmasyan ve ark., 2015).

2.8.2. Eksojen (Sekonder) Antioksidanlar

Vitaminlerin bir bölümü biyokimyasal olayların düzenlenmesinde görev alırken; A, C ve E vitaminleri serbest radikallerin hücrelerde meydana getirebileceği oksidatif hasarları önleyerek hücrelerin normal işlevlerini sürdürmelerini sağlarlar. E vitamini sekiz farklı formda bulunur. α -Tokoferol en aktif biyolojik antioksidandır; çekirdek zarında diğer tokoferol izomerlerinden daha derinde lokalize edilir. α -Tokoferol esas olarak mitokondri, endoplazmik retikulum ve plazma zarlarının fosfolipitlerinde yoğunlaşmıştır. En önemli antioksidan özelliği lipid peroksidasyonuna karşı korumasıdır. İskemik kalp hastalığı, osteoartrit, katarakt, romatoid artrit görülme sıklığını azaltır. Singlet oksijen ve hidroksil radikaliyle direkt reaksiyona girerek antioksidan aktivite gösterir (Ahmed ve ark., 2017; Moukette ve ark., 2015). Karotenoidler, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunan yaklaşık 600 üye içerirler. En yaygın formları α -karoten, β -karoten, likopen, kantaksantin, fukoksantin ve krositindir. Bunlar arasında, β -karoten, antioksidan aktivite için en çok çalışılmıştır. β -karoten hem antioksidan hem de prooksidan özellik gösterir. β -karoten, singlet oksijeni yok ederek plazma membran

lipitlerini oksidatif bozunmaya karşı korur. Aktivitesi doza ve oksijen konsantrasyonuna bağlıdır. Düşük doz oksijen varlığında β -karoten, direk olarak peroksil radikalleriyle tepkimeye girer. Yüksek doz oksijen varlığında β -karoten, prooksidan etki gösterir (Sharma ve ark., 2018). C vitamini (askorbik asit) suda çözünür, vücudun aköz ortamlarında çalışır ve akciğerlerde ve göz merceğinde bulunur. Turunçgiller, patates, domates ve yeşil yapraklı sebzelerde bulunur. L-gula kolakton oksidaz enziminin olmaması nedeniyle insanlar d-glikozdan l-askorbik asit sentezleyemezler. Bu nedenle c vitamininin diyetle alınması gerekir. Antioksidan ve prooksidan aktivite gösterir. Bir indirgeyici ajan olarak moleküler oksijen, süperoksit, nitrat, hidroksil serbest radikal, lipid hidroperoksitler ve sitokrom a ve c ile reaksiyona girebilir. Vitamin C diğer suda çözünür vitaminlerle karşılaştırıldığında plazma lipid peroksidasyonuna karşı en etkili antioksidandır. Canlılarda C vitamini takviyesi E vitamininin plazma ve doku düzeylerinde artışa neden olur. C ve E vitamini, serbest radikal ve singlet oksijene karşı sinerjistik olarak çalışır (Starkov, 2008; Zhao ve ark., 2016). Ayrıca ürik asit, seruloplazmin, flavonoid, ve albümin de antioksidan özellik gösterir (Sharma ve ark., 2018).

2.9. Biyokimyasal Parametreler

2.9.1. Alanin Aminotransferaz (ALT, SGPT)

Karaciğer hastalıkları teşhis ve tedavisinde ALT enzim aktivitesinin ölçümü kritiktir. ALT daha önce SGPT (serum glütamik pirüvik asit transaminaz) olarak adlandırılıyordu. ALT, hepatik metabolit oksaloasetat oluşturmak için amino gruplarının transferini katalize eden bir enzimdir. ALT hepatosit sitozolünde bolca bulunur. Karaciğerdeki ALT aktivitesi, serum aktivitesinin yaklaşık 3000 katıdır. Böylece, hepatoselüler yaralanma veya ölüm durumunda, hasarlı karaciğer hücrelerinden ALT salınımı, serumda ölçülen ALT aktivitesini artırır. ALT daha çok karaciğerde

bulunmasına rağmen; böbrek, kalp ve iskelet kası hücrelerinde de bulunur. Kana salınan ALT, karaciğerde katabolize edilir ve sonuçta 47 saatlik bir plazma yarılanma ömrü oluşur, bu da AST' den (17 saat) önemli ölçüde daha uzundur (Price & Alberti, 1979). Akut hepatoselüler hasarda serum AST seviyeleri genellikle hemen yükselir ve başlangıçta ALT'den daha yüksek bir seviyeye ulaşır. 24 ila 48 saat içinde, özellikle devam eden hasar meydana gelirse, ALT seviyesi daha uzun plazma yarı ömrü nedeniyle AST'den daha yüksek olacaktır. Kronik hepatoselüler hasarda ALT, AST'den daha yaygın olarak yükselir; bununla birlikte, fibröz doku oluşumu ilerledikçe, ALT aktiviteleri tipik olarak azalır ve AST'nin ALT'ye oranı kademeli olarak artar, böylece siroz mevcut olduğunda, AST genellikle ALT'den daha yüksektir (Sheth ve ark., 1998; Williams & Hoofnagle, 1988). Yüksek alkol alımı ve hepatitis virüsü enfeksiyonu olmadan rastlanan alkolik olmayan karaciğer yağlanması gibi hastalıkların tanısında da ALT ve AST değerleri önem arz etmektedir (Kim ve ark., 2008). Yüksek doz parasetamol alımına bağlı olarak 24-36 saat aralığında ALT seviyesi artar. 72 saat sonunda ALT en yüksek seviyeye ulaşır (Singer ve ark., 1995).

2.9.2. Aspartat Aminotransferaz (AST, SGOT)

Karaciğer hastalıklarının teşhisi ve tedavisinde kullanılan bir diğer enzim Aspartat aminotransferaz (AST) olup eskiden SGOT (serum glutamik oksalasetik transaminaz) olarak adlandırılıyordu. AST organa spesifik olmayan bir enzimdir. Hepatositlerde, kalp kasında, iskelet kaslarında, böbrek dokusunda ve plasentada bulunur. Bu dokularda nekroz geliştiğinde serum AST konsantrasyonunda artış görülür. Hepatositlerin içinde bulunan aspartat aminotransferazın % 60-80'i mitokondri içinde bulunurken diğer bölümü çözünür formda sitoplazma içinde bulunur. AST'nin mitokondriyel formunun salınımı için membran permeabilitesinde değişime neden olan harabiyetten daha şiddetli bir bozukluğun olması gereklidir. Bunun sonucu olarak AST aktivitesindeki artış, alanin

aminotransferazın artışından daha geç gerçekleşir. AST'nin konsantrasyonundaki artış en yaygın olarak hepatoselüler hastalıklarda görülür (Gupta ve ark., 2005; Malhi ve ark., 2006). AST, L-aspartat ve alfa-ketoglutarat'ın oksaloasetat ve glutamata transaminasyonunu katalize eder. B6 vitaminin aktif metaboliti olan Piridoksal 5'-fosfat, AST'ye sıkıca bağlanan bir kofaktördür ve enzimin aktivitesi için gereklidir. Bu vitaminin alımındaki yetersizlik enzim aktivitesinde azalmaya sebep olur (Sun ve ark., 2008). AST'nin sitozolik (AST1) ve mitokondrial (AST2) iki izoenziminin çok sayıda formları vardır (Laskin ve ark., 1995). AST pek çok yumuşak dokuda bulunduğundan (iskelet kasları, kalp kası ve karaciğerde yüksek konsantrasyonda; eritrositler ve böbreklerde daha az) serum aktivitesinde yükselme yumuşak doku hasarının bir göstergesidir (Gupta ve ark., 2005). Ancak organa spesifik bir enzim değildir (Satoh & Yamazaki, 1992). Yüksek doz parasetamol alımı sonucunda da, 24-72 saat içinde karaciğer hasarının göstergesi olarak AST seviyesi yükselir. AST 10.000 IU/L veya daha yüksek seviyelere çıkabilir. Aminotransferaz yükselmesinin derecesi kabaca hepatoselüler hasarın derecesine karşılık gelmektedir (Larson, 2007).

2.10. Sitokinler

Sitokinler makrofajlar, doğal öldürücü hücreler, mast hücreleri ve lenfositler gibi çeşitli hücrelerden salgılanan düşük molekül ağırlıklı çözünebilir proteinlerdir. Sitokinler salgılayan hücre tipine veya özelliğine bağlı olarak kategorize edilmiştir. Kemotaktik özellik gösteren sitokinler kemokin, lökositler tarafından salgılanan sitokinler interlökin, lenfositler tarafından salgılanan sitokinler lenfokin, monositler tarafından salgılanan sitokinler ise monokin olarak adlandırılır (Tisoncik ve ark., 2012). Sitokinler bağışıklık, inflamasyon ve hematopoeze aracılık eden ve bunları düzenleyen proteinlerdir. İnflamasyonda rol alan hücreleri aktive ederek reaksiyon bölgesine çekerler (Akdoğan & Yöntem, 2018). Karaciğer, normal koşullar altında yalnızca minimum düzeyde sitokin

üreten birkaç hücreden oluşur. Karaciğer hücrelerinden özellikle Kupffer hücreleri aktive olduğunda, sitokin üretimi önemli ölçüde artar; bu nedenle karaciğer hasar görmüşse, sitokinler karaciğer dokusunun yenilenmesine aracılık eder. Kupffer hücreleri tarafından üretilen ve salınan sitokinler, iyileşme sürecini başlatmak için gerekli olan karaciğerde bir inflamatuvar yanıtı indükler. Eğer inflamasyon kısa bir sürede azalmazsa aynı sitokinlerin sürekli üretimi fibröz ve siroz oluşumuna neden olabilir. Böylece sitokin üretimi, sitokin salınım miktarına ve süresine bağlı olarak hem yararlı hem de zararlı etkilere sahip olabilir. Sitokinler bağışıklık sisteminin iletişim ağıyla ilişkili önemli mediatörler olup, immün cevaba katılırlar (Kulbe ve ark., 2012; O'Shea & Murray, 2008). Sitokinler, immün hücrelerinin olgunlaşma, büyüme ve immün yanıtın düzenlenmesinden sorumludur. Ayrıca sağlığın önemli belirteçleridir (Burska ve ark., 2014; Kabel, 2014; Neurath, 2014). Tek bir sitokin farklı hücrelerden sentezlenip, birçok hücreyi etkileyerek çok çeşitli biyolojik aktiviteye neden olabilir (Sprague & Khalil, 2009). Serum, kan, dışkı, tükürük ve ter gibi çeşitli biyolojik sıvılardaki sitokin düzeylerinin değişimi, çeşitli hastalıkların teşhisi, evresi ve prognozu hakkında değerli bilgiler sağlar. Sitokin fırtınasında olduğu gibi anormal veya artan sitokin üretimi, organ yetmezliğine ve ölüme yol açabilir. Kritik Corona Virüs Hastalığı 2019 (COVID19) vakalarının kötü prognozundan "sitokin fırtınası sendromu"nın sorumlu olduğu konusunda fikir birliği vardır. Sonuç olarak, sitokin seviyeleri, klinik bozuklukları değerlendirmek için temel bir gösterge olarak kabul edilmektedir (Mehta ve ark., 2020; Moore & June, 2020). Pratikte sitokin düzeyi ölçümü, vücutta eser miktarlarda bulunmalarından, dinamik sekresyon süreçlerinden (Liu ve ark., 2016) ve kısa yarılanma ömrüne sahip olmalarından ötürü zordur (Whiteside, 1994). Sitokinler, bağışıklık süreçlerini modüle etmeye hizmet eden karmaşık ağlar oluşturur; farklı sitokinler, aynı biyolojik süreç üzerinde antagonistik, aditif veya sinerjistik etkiye sahip olabilir

(Nedoszytko ve ark., 2014). Sitokin ölçümü için en yaygın kullanılan yöntemler, ELISA (Shankar & Cohen, 1997) ve polimeraz zincir reaksiyonudur (PCR) (Saito ve ark., 1999).

2.10.1. Sitokinlerin Sınıflandırılması

Sitokinler, tümör nekroz faktörleri (TNF'ler), interlökinler (IL'ler), lenfokinler, monokinler, interferonlar (IFN'ler), koloni uyarıcı faktörler (CSF'ler) ve dönüştürücü büyüme faktörleri (TGF'ler) dahil olmak üzere bir dizi kategoride sınıflandırılabilir. Sitokinler, hücrel kaynaklarına göre, IL-2, IL-12, IFN- γ ve TNF- β dahil olmak üzere CD4⁺ T-yardımcı 1 (Th1) hücreleri tarafından üretilen tip 1 sitokinler olarak sınıflandırılır. IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 dahil olmak üzere CD4⁺ Th2 hücreleri tarafından üretilen tip 2 sitokinlerdir (Sprague & Khalil, 2009). Ayrıca rollerine bağlı olarak sitokinler, proinflamatuvar veya antiinflamatuvar olarak da sınıflandırılabilir. IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α ve interferonlar dahil proinflamatuvar sitokinlerdir, inflamatuvar reaksiyonları kolaylaştırır ve immünokompetan hücreleri uyarma eğilimindedirler. Buna karşılık, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13, IL-1 reseptör antagonisti (IL-1RA) ve TGF- β gibi antiinflamatuvar sitokinler, inhibe eder ve bağışıklığı baskılar (Boshtam ve ark., 2017). Bazı sitokinler (IL-6 gibi) hem pro hem de antiinflamatuvar özelliklere sahiptir. Sonuç olarak, pro ve anti-inflamatuvar sitokinler arasındaki dinamik ve sürekli değişen denge, enflamasyona aracılık ederek ve modüle ederek konakçı bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynar. Proinflamatuvar sitokinler, otoimmün inflamasyonun başlamasına ve ilerlemesine katkıda bulunurken; antiinflamatuvar sitokinler, inflamasyonun gerilemesine ve otoimmün hastalığın akut fazlarından iyileşmeye yardımcı olur (Moudgil & Choubey, 2011).

İnflamatuvar yanıt, konakçıyı yaralanmaya ve enfeksiyona karşı korumak için bir akut faz tepkisini indükleyen sitokinler tarafından birincil olarak kontrol edilir. Bu reaksiyon, aynı hücreden veya farklı hücrelerden IL-1 β , IL-6, IL-8, IL 12, IFN- γ ve TNF-

α gibi proinflatuar sitokinlerin salınmasıyla başlar. Bu sitokinlerin başlıca rolü, çevre dokulara enfeksiyon veya yaralanma mesajını iletmektir. Ek olarak, bu sitokinler sistemik dolaşıma girerek bağışıklık hücresi aktivasyonu ile ateş ve akut faz reaksiyonu gibi konak fizyolojisinde önemli değişikliklere neden olabilir (Boshtam ve ark., 2017).

IL-1 reseptörü antagonisti, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13 ve TGF- β gibi anti-inflatuar sitokinler, proinflatuar sitokinlerin neden olduğu aşırı inflamatuvar yanıtı engelleyen bir dizi immün düzenleyici moleküldür (Opal & DePalo, 2000).

2.10.2. TNF-alfa

Tümör nekroz faktörü (TNF) bir adipokin ve bir sitokindir. TNF, mononükleer fagositlerden salınan TNF- α (kaşektin) ve lenfositlerden salınan TNF- β olmak üzere ikiye ayrılır (Beutler & Cerami, 1989). TNF- α öncelikle makrofaj ve monositlerden sentezlenir. TNF- α 'nın molekül ağırlığı 17 kDa'dır. TNF, reseptör 1 (TNFR1) ve reseptör 2 (TNFR2) olmak üzere 2 farklı reseptöre bağlanarak etki gösterir (Varfolomeev & Ashkenazi, 2004). TNF- α inflamatuvar reaksiyon ve ilgili hastalıkların oluşumunda ve gelişmesinde önemli bir proinflatuar sitokindir (Opal & DePalo, 2000; Paul ve ark., 2006). TNF- α 'nın çeşitli işlevleri arasında, proinflatuar sitokin zincir kaskadını başlatma görevi vardır. Bu nedenle TNF- α proinflatuvar sitokin üretiminin master sitokindir (Maini ve ark., 1995). İnflamasyonun amacı, irrite edici ajanı yok etmek ve doku yenilenmesini hızlandırmaktır. Vazodilatasyon, akut inflamasyonun iyi tanımlanmış bir özelliğidir ve klinik olarak ateş ve inflamasyonlu bölgede daha yüksek sıcaklık olarak kendini gösterir. Vazodilatasyona esas olarak NO ve vazodilatasyon etkili prostanoidler aracılık eder (Rees ve ark., 1998; Tabernero ve ark., 2003; Vallance & Chan, 2001). NO, üç çeşit NO-sentazı (NOS) tarafından üretilir: endotelial (eNOS), nöronal (nNOS) ve indüklenbilir (iNOS)dir (Vallance & Chan, 2001). TNF-a ve diğer bazı proinflatuar sitokinlerin makrofajlarda ve diğer bazı lökositlerde iNOS

ekspresyonunu uyardığı bulunmuştur (Sanders ve ark., 2001). İnflamasyonun karakteristik özelliklerinden biri ödemdir. TNF-a'nın ödem oluşumuna katkıda bulunabileceği olası bir mekanizma, damarın endotel yapısını bozmasıdır. Sağlıklı endotel, inflamasyonu ve damar geçirgenliğini düzenlemede kilit rol oynayan bir glikokaliks tabakası ile güçlendirilmiştir. TNF-a, bu katmanın bozulmasını indükleyebilir ve dolayısıyla geçirgenliği artırır (Chappell ve ark., 2009). Vazodilatasyon ve ödeme, lökositlerin inflamasyonlu bölgeye göçü eşlik eder. TNF- α , damar endotelinde bazı adhezyon moleküllerinin ortaya çıkmasına yol açar. Adhezyon molekülleri; nötrofillerin, monositlerin ve hafıza T-lökositlerinin, uyarılmış trombositler ve endotelial hücreler üzerine yapışmasına katılır (Mommensen ve ark., 2011). İnflamasyon ve kan pıhtılaşması sıkı bir şekilde ilişkilidir. TNF- α ve bazı sitokinler doku faktörü ekspresyonunu indükleyerek, pıhtılaşma kaskatını aktive ederler (Pawlinski ve ark., 2003). TNF- α hipotalamusa geçerek pirojenik sitokin olması özelliğiyle ateşe neden olur (Steinman, 2010). Adından da anlaşılacağı üzere TNF- α 'nın yüksek doz lokal uygulaması, güçlü bir tümör nekroz aktivitesine sahipken, düşük dozda hücrel transformasyon, proliferasyon, büyüme, invazyon, metastaz dahil tümör oluşumunun tüm aşamalarına katılan endojen tümör başlatıcı olarak hareket eder (Balkwill, 2002; Szlosarek ve ark., 2006).

2.10.3. IL-1 β

İnterlökin-1 β (IL-1 β) inflamasyon ve yaralanmaya karşı konakçı savunma tepkileri için çok önemli olan güçlü bir proinflamatuvar sitokindir (Dinarello, 1996). Aynı zamanda tüm interlökinler arasında IL-1, en iyi karakterize edilen ve en çok çalışılanıdır. IL-1 β daha çok monositler ve makrofajlar gibi doğuştan gelen bağışıklık sisteminin hücrelerinde üretilmesine rağmen, çeşitli hücre tipleri tarafından da salgılanır. IL-1 β , pro-IL-1 β olarak adlandırılan 31 kDa'lık aktif olmayan bir öncü olarak üretilir (Takeuchi & Akira, 2010). Pro-IL-1 β , proinflamatuvar proteaz kaspaz1 tarafından yıkılır (Thornberry

ve ark., 1992). Pro-IL-1 β 'nın kaspaz-1'e bağlı işlenmesini takiben, olgun IL-1 β hızla hücreden salgılanır (Brough & Rothwell, 2007).

IL-1 β , endotelial hücreler üzerinde adezyon moleküllerinin ekspresyonunu indükleyerek ve stromal hücreler tarafından kemokinlerin salınması yoluyla inflamasyon bölgesinde inflamasyon hücrelerinin toplanmasını teşvik eder. Sitokin, fosfolipaz A2, siklooksijenaz 2 ve iNOS gibi çeşitli enzimlerin üretimini indükleyerek lokal ve sistemik tepkilere katkıda bulunan inflamatuvar araçlar, prostaglandin E2 ve NO'nun salınmasına yol açar (Jacques ve ark., 2006). IL-1 β 'nın sistemik etkileri arasında hipotansiyon, ateş, nötrofili, trombositoz ve akut faz proteinlerinin üretimi yer alır. Bu etkilerin bazıları indirekt olup, sitokinlerin ve diğer inflamatuvar mediatörlerin indüklenmesi yoluyla aracılık eder (Dinarello, 1996). IL-1, farelerde ve insanlarda tip 17 T-yardımcı hücrelerin farklılaşmasını ve IL-17 üretimini indükleyerek adaptif bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde de yer alır (Chung ve ark., 2009).

2.11. Renin Anjiyotensin Aldosteron Sistemi (RAAS)

İnsan vücudu çok sayıda sistemin bir arada çalıştığı kompleks bir yapıdır. Bu sistemlerin içinde Renin Anjiyotensin Aldosteron Sistemi (RAAS) hayati önem taşımaktadır (Atlas, 2007). Bu sistem ekstraselüler sıvı hacmini ve arteriyel basıncı düzenleyerek vasküler tonusu korur (Navar, 2014). Adından da anlaşılacağı üzere renin ve anjiyotensin sistemi oluşturan iki önemli bileşendir. Renin veya diğer adıyla anjiyotensinojenaz, böbrekte jukstaglomerular hücreler tarafından salgılanır (Kopp, 2011). Düşük arteriyel kan basıncı, düşük sodyum klorür seviyesi ve sempatik sinir sistemi aktivasyonu renin sentezine yol açar (Drenjancevic-Peric ve ark., 2011). Renin karaciğer tarafından salgılanan α -2 globulin proteini olan anjiyotensinojeni anjiyotensin I'e hidrolize eder (Verdecchia ve ark., 2008). Anjiyotensin I ayrıca endotele bağlı anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) tarafından akciğer kılcal damarlarında, endotel

hücrelerinde ve böbrek epitel hücrelerinde bölünmeye uğrar. Bir karboksipeptidaz olan ADE diğer adıyla kininaz II, anjiyotensin I'i anjiyotensin II'ye dönüştürür (Crisan & Carr, 2000). Anjiyotensin II, düz kası daralttığı için tüm kan damarlarında (arterler ve damarlar) vazoaaktif role sahiptir. Anjiyotensin II kan basıncını ve nabızı artırır, protrombotik etkiye sahiptir (Feener ve ark., 1995). Ayrıca adrenal bezi aldosteron salgılaması için uyarır (Yatabe ve ark., 2011). Aldosteron, sodyumun geri emilimini artırmak için böbrek proksimal tübüllerini uyararak sodyum-potasyum homeostazını korur, dolayısıyla sodyum tutulur ve potasyum kaybedilir (Chiolero ve ark., 2000). Anjiyotensin II, anjiyotensin tip-1 ve tip-2 reseptörleri (AT-1R ve AT-2R) olmak üzere 2 reseptör üzerinden etki gösterir. Anjiyotensin II; AT-1R üzerinden, artan sodyum tutulmasına, vazokonstriksiyona, susuzluğun ve tuz arzusunun uyarılmasına, artmış sempatik sinir sistemi aktivitesine ve adrenal bezden aldosteron salınımına yol açar. AT-2R AT-1R'ye göre tam ters çalışır. AT-2R stimülasyonu sonucu antiinflamatuvar, antifibrotik ve vazodilatör etki görülür. AT-2R, fetusteki baskın reseptör tipidir ve gelişimde kilit bir rol oynar, yetişkinde AT-1R baskındır (De Mello, 2015; De Mello & Frohlich, 2014). RAAS sistemi, kardiyovasküler sistemin sağlıklı bir şekilde işleyişinden, elektrolit-sıvı dengesinden sorumludur. Ayrıca RAAS sistemi ROT varlığı ve inflamasyonla da ilişkilidir (Welch, 2008). Anjiyotensin II; ROT üretimini, hücre büyümesini, apoptozu, hücre göçünü ve farklılaşmasını, gen ekspresyonunu düzenler ve doku hasarına yol açan çoklu hücre içi sinyal yollarını aktive edebilir (Ruster & Wolf, 2006).

2.12. Valsartan

Valsartan bir anjiyotensin reseptör blokörüdür ve Anjiyotensin II'nin tip 1 reseptörünü (AT-1 reseptörünü-AT-1R) seçici olarak bloke ederek Anjiyotensin II bağımlı aldosteron salınımını inhibe eder. AT-1R'nin blokajı vazokonstriksiyonu, sodyum ve su tutulmasını ve miyokardiyal hipertrofiyi azaltır (Dargad ve ark., 2018).

Valsartan hızlıca absorbe edilir, oral uygulanmasından 2 saat sonra maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşır (Flesch ve ark., 1997). Valsartan %85-99 plazma proteinlerine bağlanır. Tek doz (10-300 mg), çoklu oral doz 200 mg Valsartanın iyi tolere edilmiş ve biyoyararlanımı doza bağımlı olduğu gösterilmiştir. Oral olarak uygulanan bir Valsartan dozunun %10'u değişmeden idrarla ve %71'i değişmeden dışkıyla atılır. Valsartanın baskın inaktif metaboliti, dozlamadan yaklaşık 8 saat sonra plazmada görülen valeril-4-hidroksi-valsartan, atılan dozun yaklaşık %9'unu oluşturur. Renal atılım 2 gün sonra büyük ölçüde tamamlanır ancak fekal eliminasyon 4. güne kadar devam eder (Colussi ve ark., 1997).

Valsartan hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği ve diyabetik nefropatide ADE inhibitörleri kadar etkilidir. Böbrek kan akımını artırır ve ADE inhibitörleri gibi diyabetik nefropati ve kronik böbrek yetmezliğindeki proteinüriyi azaltır. ADE inhibitörlerinden farklı olarak anjiyoödem ve kuru öksürük oluşturmaz. Kandaki renin düzeyini ve ADE inhibitörlerinden farklı olarak anjiyotensin düzeyini yükseltir. Bu yükselmenin nedeni böbrekte renin salgılayan hücreler üzerinde anjiyotensinin AT-1R aracılığı ile yaptığı feedback inhibisyonunu kaldırmasıdır. RAAS sistemi bloke edildiğinden kan basıncı sodyuma bağımlı hale gelmiştir. Bu nedenle kanda sodyum düzeyinin düşük olması veya düşük sodyum diyeti, antihipertansif etkinliği artırır. Bundan dolayı diüretiklerle kombine preparatları mevcuttur. Aynı zamanda direkt ve natriüretik etkisi de vardır. Valsartan sol ventrikül sistolik disfonksiyonu veya yetmezliği gelişen miyokard infarktusunun (MI) tedavisinde kullanılır (Kayaalp, 2012).

Valsartan alımına bağlı olarak görülen en sık yan etkiler; baş ağrısı, baş dönmesi, mide bulantısı, karın ağrısı, yorgunluk, diyaredir. Bazı hastalarda ürik asit, üre, kreatinin artışı gözlemlenmiştir (Baruch ve ark., 1999).

2.13. Neprilisin Enzimi ve Fizyolojik Önemi

Neprilisin enzimi 1970 yılında bulunmuştur. Neprilisin, nötral endopeptidaz (NEP), enkefalinaz gibi diğer isimlerle adlandırılmıştır. NEP enzimi çinko bağımlı metallopeptidaz ailesindendir (Erdos & Skidgel, 1989; Schiering ve ark., 2016). NEP esas olarak böbreklerde (en çok proksimal tüpde), akciğerlerde, endotel hücrelerinde, vasküler düz kas hücrelerinde, kardiyak miyositlerde, fibroblastlarda, nötrofillerde, adipositlerde, testislerde ve beyinde bulunur (Dussaule ve ark., 1993; Graf ve ark., 1995). NEP aynı zamanda böbrek korteksinde bulunan ve ANP parçalayan bir endopeptidazdır (Sonnenberg ve ark., 1988). Natriüretik peptitler; atriyal, beyin tipi ve C tipi natriüretik peptitleri (ANP, BNP ve CNP) içeren benzer fakat genetik olarak farklı peptitlerin bir ailesini oluşturur (Baxter, 2004). ANP ve BNP fizyolojik etkilerini guanilil siklaza bağlanan tip A (NPR-A) ve tip B (NPR-B) natriüretik peptid reseptörleri aracılığıyla gösterirler. NPR aktivasyonu hücre içi siklik GMP'yi (cGMP) artırır, bu da sırasıyla vazodilatasyon, natriürez ve diürez, renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin (RAAS), endotelin ve vazopressin inhibisyonu ve lipid mobilizasyonunu içeren biyolojik etkilere aracılık eder (Potter ve ark., 2006; Rubattu ve ark., 2008). ANP'nin dolaşımında kısa bir yarı ömrü vardır, NEP tarafından hızlıca parçalanır (Sonnenberg ve ark., 1988). NEP inhibitörlerinin ANP seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (O'Connell ve ark., 1992; Richards ve ark., 1990) ve bu nedenle hipertansiyon ve kalp yetmezliği dahil olmak üzere bir dizi kardiyovasküler hastalığın tedavisi için faydalı etkilere sahiptir (Gu ve ark., 2010). ANP'nin, vazodilatasyon, natriürez ve diürez dahil olmak üzere kalp yetmezliğinde potansiyel olarak faydalı fizyolojik etkiler sağladığı tanımlanmıştır, ancak NEP tarafından hızla parçalanır. NEP inhibisyonunda amaç yararlı vazodilatör etkilerinin daha uzun sürmesine izin vermek için natriüretik peptidlerin parçalanmasını en aza indirmektir. NEP aynı zamanda vazokonstriktörlerinde (anjiyotensin I, II ve endotelin-1)

parçalanmasına neden olur. Bu yüzden kalp yetmezliği (Cleland & Swedberg, 1998) ve hipertansiyon tedavisinde (Ando ve ark., 1995) anjiyotensin reseptör blokörleriyle kombine olarak kullanılmaktadır (Kang & Banerjee, 2017) Neprilisin, amiloid- β peptidi (A β) bozarak, inhibisyonunun yaşa bağlı maküler dejenerasyon, serebral amiloid anjiyopati ve alzheimer hastalığı gibi A β birikimi hastalıklarının gelişimine katkıda bulunabileceği endişelerine yol açar (Campbell, 2017).

1990 yılında piyasaya ilk NEP inhibitörü olarak kandoksatril çıkmış olup antihipertansif olarak kullanılmıştır (O'Connell ve ark., 1992). Natriürez ve diürez etki göstermesine rağmen eş zamanlı olarak vazokonstriktör Endotelin 1 ve Anjiyotensin 1 konsantrasyonunu artırdığı ve devamlı antihipertansif etki göstermediğinden piyasadan çekilmiştir (McDowell & Nicholls, 1999). Tek olarak NEP inhibitörlerinin kullanımının başarısız olması ADE/NEP inhibitörleri geliştirilmesine sebep olmuş olup omapatrilat kullanılmaya başlanmıştır. Kalp yetmezliği olan hastalarda ADE inhibitörlerinden lizinopril ve omapatrilat karşılaştırılarak yapılan bir araştırmada, omapatrilat kalp yetmezliği tedavisinde tek başına ADE inhibitörlerinden kıyasla ölüm oranını daha çok azaltmıştır (Rouleau ve ark., 2000). Yapılan başka bir araştırmaya göre, kalp yetmezliği olan hastalarda enalapril ve omapatrilat karşılaştırıldığında omapatrilat enalapriile göre kıyasla daha fazla anjiyoödem gelişmiştir (Kostis ve ark., 2004). Omapatrilat kullanımında bulunan anjiyoödem olumsuz etkinin bir sonucu olarak ve ikili tedavinin potansiyel rolü ile anjiyotensin reseptör blokörlerin NEP inhibitörleri ile kombinasyon halinde kullanılması düşünülmüştür (Feng ve ark., 2012).

2.14. LCZ696 (Sakubitril/Valsartan)

LCZ696, oral olarak aktif bir anjiyotensin reseptörü neprilisin inhibitörünü temsil eden Valsartan (ARB) ve sakubitrili (NEP inhibitör) içerir. LCZ696 bileşimindeki sakubitril ve Valsartan 1:1 molar oranında bulunur. Günlük dozu 100-400 mg'lık oral

tabletler şeklindedir. NEP inhibitörü olan sakubitril (AHU377) bir ön ilaç olup, esterazlar tarafından aktif formu olan LBQ657 ye dönüştürülür (Segura ve ark., 2013; Vardeny ve ark., 2013). Böylece sakubitril, natriüretik peptitlerin seviyelerini yükselterek natriürezi, vazodilatasyonu ve sodyum atılımı yoluyla ekstraselüler sıvı hacminin azalmasını teşvik eder; sonunda ön yükü ve ventriküler yeniden yapılanmayı azaltır (Mangiafico ve ark., 2013). NEP inhibisyonunda amaç yararlı vazodilatör etkilerinin daha uzun sürmesine izin vermek için natriüretik peptidlerin parçalanmasını en aza indirmektir. NEP aynı zamanda vazokonstriktörlerinde (Anjiyotensin I, II ve Endotelin-1) parçalanmasına neden olur. Bir NEP inhibitörü olan sakubitril hem vazokonstriktör hem vazodilatör etkili olduğundan tek başına tedavide kullanılmaz. NEP inhibitörleri ile ARB kombine olarak kullanılır ve ARNi olarak bilinir (Kang & Banerjee, 2017). Valsartan, AT1'i seçici olarak bloke ederek ve aynı zamanda anjiyotensin-II'ye bağlı aldosteron salınımını inhibe ederek anjiyotensin-II'nin etkilerini inhibe eder. AT1'in blokajı böylece vazokonstriksiyonu, sodyum ve su tutulmasını ve miyokardiyal hipertrofiyi azaltır. Deneysel çalışmalarda, LCZ696'nın deneysel MI'dan sonra anjiyotensin-II aracılı kardiyo-renal fibrozu ve kardiyak yeniden şekillenme ve işlev bozukluğunu azalttığı gösterilmiştir. LCZ696 tarafından kardiyak fibrozis ve kardiyak hipertrofiyi tek başına NEP inhibitörü veya ARB'den daha üstün inhibe etmiştir (von Lueder ve ark., 2015; Wang ve ark., 2015).

PARADIGM-HF (Kalp Yetmezliğinde Küresel Mortalite ve Morbidite Üzerindeki Etkiyi Belirlemek İçin Anjiyotensin Reseptör Blokörü-Neprilisin İnhibitörü ile ADE'nin Prospektif Karşılaştırması) çalışmasında düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği olan hastalarda LCZ696 tedavisi enalapril göre hastaneye yatış ve ölüm oranlarını %20 azaltmıştır (McMurray ve ark., 2014). Yine literatürde yapılan başka bir araştırma olan PARAMOUNT (Korunmuş Ejeksiyon Fraksiyonlu Kalp Yetmezliğinin Tedavisinde ARNI ile ARB'nin Prospektif Karşılaştırması) da korunmuş ejeksiyon

fraksiyonlu kalp yetmezliği olan hastalarda LCZ696 tedavisi enaprile kıyasla kan basıncını 9.3/4.9 mm Hg daha fazla düşürmüştür (Solomon ve ark., 2012).

LCZ696 oral uygulaması sonrasında sırasıyla; 0.5 saat, 2 saat, 1.5 saat sonunda sakubitril, sakubitrilat ve valsartan plazma konsantrasyonları doruk düzeyine ulaşır. Gıda ile alımının LCZ696 üzerinde önemli bir anlamı bulunmamıştır. LCZ696 plazma proteinlerine büyük oranda (%94-97) bağlanır. AHU377, esterazlar tarafından kolayca sakubitrilata dönüştürölür. Valsartan minimal düzeyde metabolize edilir; dozun sadece yaklaşık %20'si metabolitler olarak geri kazanılır. Plazmada düşük konsantrasyonlarda bir hidroksil metaboliti tanımlanabilir. Oral uygulamayı takiben AHU377 ve sakubitrilatın %52 ila %68'i, valsartan ve metabolitlerinin %13'ü idrarla atılır. AHU377 ve sakubitrilatın %37 ila %48'i, valsartan ve metabolitlerinin %86'sı feçesle atılır. AHU377, sakubitrilat ve valsartan sırasıyla yaklaşık 1.4 saat, 11.5 saat ve 9.9 saat ortalama eliminasyon yarı ömrü ile plazmadan elimine edilir. LCZ696'nın plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanması nedeniyle hemodiyaliz yoluyla sistemik dolaşımdan uzaklaştırılması mümkün değildir (Fala, 2015).

Yapılan klinik çalışmalara göre LCZ696 düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği olan hastalarda ARB'lere göre daha iyi tolere edilmiştir. PARADIGM-HF çalışmasında düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği olan hastalarda LCZ696 tedavisi enalapril ile göre hastaneye yatış ve ölüm oranlarını %20 azaltmıştır (McMurray ve ark., 2014). FDA tarafından düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği tanısında kullanımı onaylanmıştır. Ayrıca, korunmuş ejeksiyon fraksiyonu (HFpEF), kronik böbrek hastalığı, miyokard enfarktüsü sonrası ve inme ile kalp yetmezliğinde potansiyel kullanımını öneren çalışmalar vardır. LCZ696, kronik böbrek yetmezliği olan veya olmayan hipertansif hastalarda anjiyoödem gibi önemli yan etkiler olmaksızın hem sistolik hem de diyastolik kan basıncını etkili bir şekilde düşürdüğü gösterilmiştir ve kan

basıncını düşürme etkisi 24 saat devam eder (Ruilope ve ark., 2010; Wang ve ark., 2017; Williams ve ark., 2017). Sistolik hipertansiyon prevalansı ilerleyen yaşla birlikte önemli ölçüde artar ve yaşlılarda HFpEF için güçlü bir risk oluşturur. LCZ696, yaşa bağlı hipertansiyondan kalp yetmezliğine kadar olan kardiyovasküler süreci baskılar. LCZ696'nın yakın tarihli bir çalışma olan PARAMETRE (Anjiyotensin Reseptörü Neprilisin İnhibitörünün Anjiyotensin Reseptör Blokörü ile Yaşlılarda Arter Sertliğini Ölçen Prospektif Karşılaştırması) de, geniş nabız basınçlı sistolik hipertansif yaşlılarda santral aortik sistolik kan basıncını azaltmada ARB'den üstün olduğunu göstermiştir (Williams ve ark., 2017). PARADIGM-HF çalışmasında LCZ696'nın pozitif anti-diabetik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada diabetes mellitus ve düşük ejeksiyon fraksiyonlu hastalar, enalapril ile karşılaştırıldığında LCZ696 ile tedavi edildiğinde daha uzun süreli HbA1c düşüşü gerçekleşmiştir (Seferovic ve ark., 2017).

Kronik ARNI kullanımı, NEP düzeylerinin düşmesine neden olur ve belirli bireylerde veya popülasyonlarda NEP polimorfizmi ile birleştirildiğinde, Alzheimer patogenezinin katkıda bulunabilen A β bozulmasının azalmasına neden olabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda A β bozulmasını sağlayan NEP ve IDE (insülin yıkan enzim) arasında anlamlı bir etkileşim olmadığını göstermiştir, ancak Alzheimer hastalığı için ilave bir risk etkisi ile ilişkilendirildiler (Vepsäläinen ve ark., 2009). LCZ696 kullanımına bağlı olarak hiperkalemi, hipotansiyon, böbrek yetmezliği, öksürük, anjiyoödem gibi yan etkiler bildirilmiştir. Günde iki kez 10 mg enalapril ile LCZ696'yı karşılaştıran PARADIGM-HF çalışmasında, sakubitril/valsartan daha yüksek hipotansiyon ve semptomatik hipotansiyon insidansı ile ilişkilendirilmiştir. LCZ696, enalaprilden daha düşük serum potasyum veya serum kreatinin yükselme riski ve daha düşük öksürük riski ile ilişkilendirilmiştir (Bhagat ve ark., 2019).

2.15. Neprilisin İnhibitörleri ve Anjiyotensin Reseptör Blokörleri İle Parasetamol Zehirlenmesi Arasındaki İlişki

RAAS, parasetamol toksisitesine bağlı akut karaciğer hasarının patofizyolojisinde rol oynayan yollardan biridir (El-Demerdash ve ark., 2008). RAAS'ın en önemli mediyatörü olan Anjiyotensin II'nin artması karaciğer hasarında hepatik inflamasyon ve fibrozisi artırır (Bataller ve ark., 2005; Bataller ve ark., 2003; Friedman, 2008). Anjiyotensin II'nin karaciğer fibrozisi patogenezinde önemli bir molekül olduğu bilinmektedir (Aydin & Akcali, 2018; Lubel ve ark., 2008). Ayrıca Anjiyotensin II vasküler yapılarda NADPH oksidaz ve ksantin oksidaz (XO) gibi serbest radikal öncülü enzimleri salar ve serbest radikallerin dokudaki miktarının artmasına sebep olur (Landmesser ve ark., 2007; Mollnau ve ark., 2002). Anjiyotensin II, hepatik oksidatif stresi de artırır (Bataller ve ark., 2005; Bataller ve ark., 2003). Anjiyotensinojen, anjiyotensin dönüştürücü enzim ve anjiyotensin I, hem normal hem de fibrotik karaciğerde hepatositlerde yaygın olarak dağılır. AT-1R, hem normal hem de patojenik karaciğer parankiminde bulunur ve patojenik karaciğerdeki fibrotik alanlarda artan AT-1R bağlanması görülür. Bir ARB olan Valsartanın da AT-1R blokajı sonucunda karbontetraklorür ile oluşturulan hepatotoksisitede etkili olduğu belirtilmiştir (Xu ve ark., 2006). Neprilisin inhibitörleri de vazoaktif peptitlerin parçalanmasını inhibe ederek, RAAS inhibisyonuna neden olur (Potter ve ark., 2006; Rubattu ve ark., 2008). Son yıllarda yapılan bir araştırmaya göre STZ ile indüklenen hiperglisemik sıçanlarda, LCZ696'nın uygulanması karaciğer fonksiyonlarını iyileştirmiş ve antioksidan enzimleri yükseltmiştir. Ayrıca Valsartan grubuyla karşılaştırıldığında antioksidan parametreleri belirgin ölçüde artırmıştır (Alqahtani ve ark., 2020). Yapılan bir araştırmaya göre 5/6 oranında nefrektomi yapılmış ratlarda LCZ 696 uygulaması oksidatif stresi ve böbrek fonksiyonlarını iyileştirmiştir. Tek başına Valsartanla uygulanan tedaviye göre LCZ 696

daha etkili bulunmuştur (Jing ve ark., 2017). Ratlarda yapılan başka bir araştırmaya göre streptozosinle indüklenen diyabette LCZ 696 uygulaması inflamatuvar sitokin düzeyinde belirgin düşüş sağlamıştır (Mohany ve ark., 2020). Yeni bir araştırmaya göre de izoproterenolle indüklenmiş akut kalp yetmezliği modelinde LCZ 696 uygulanması miyokardiyal hasarı önemli ölçüde iyileştirerek kalp yetmezliğine bağlı oksidatif stresi azaltmıştır (Hou ve ark., 2022). Yapılan güncel bir araştırmaya göre renin inhibitörü aliskrenin parasetamol toksisitesinde etkili olduğu gösterilmiştir (Karcioglu ve ark., 2016).

Valsartanın hepatoprotektif özelliği diyabet ve karbon tetra klorür ile oluşturulmuş karaciğer hasarında çalışılmış olmasına rağmen, Valsartanın parasetamol ile oluşturulan karaciğer toksisite modelinde etkisini gösteren herhangi bir literatür bilgisi yoktur (Alqahtani ve ark., 2020; Xu ve ark., 2006). Ayrıca kullanacağımız sakubitril/valsartan kombinasyonu olan ve yeni ruhsat almış LCZ 696'nın da herhangi bir karaciğer toksisite modeli üzerine etkilerini araştıran bir literatür bilgisine rastlanmamıştır. Dolayısıyla ne Valsartanın, ne de LCZ 696'nın parasetamol ile oluşturulan karaciğer harabiyetine etkisi bilinmemektedir. Aynı zamanda LCZ696'nın Valsartana üstün olup olmadığı da araştırılmamıştır. Yapılmış araştırmalar, LCZ 696 'nın iflamasyonu azaltıp, oksidatif stresi baskıladığını gösterdiği için, inflamatuvar ve oksidatif strese bağımlı olarak gelişen bir süreç olan hepatotoksistide bu ilaçların etkili olabileceği akla gelmektedir.

3. MATERİYAL METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinden alınan erkek 200-210 g ağırlığında Albino *wistar* sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele 11 gruba ayrıldı. Bu çalışmada grup başına 6 sıçan olacak şekilde toplam 66 adet sıçan kullanıldı. Deney öncesinde adaptasyon sürecinde, sıçanlara ihtiyaç kadarıyla (*ad libitum*) su ve yem (standart sıçan yemi) verildi. Tüm hayvanların bakımı ve beslenmesi oda sıcaklığında (22 °C) gerçekleştirildi. Yürütülen çalışmalar, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'na (HADYEK) 19.02.2021 tarihli ve 93722986-000-E.2100051127 sayılı yazı ile başvurusu gerçekleştirilmiş, bu başvurunun HADYEK tarafından 09.03.2021 tarihli 75296309-050.01.04-E.2100073455 sayılı yazıda 50 nolu karar ile etik ilkelere uygun olduğu kabul görmüştür.

3.1.2. Kullanılan İlaçlar

Parasetamol: Deneyde, 2 ml 1X'lik PBS (phosphate buffer saline) içinde % 1'lik CMC (Karboksi Metil Selüloz) ile 2 g parasetamol süspande edilerek, düşük sıcaklıkta karıştırılarak hazır hale getirildi (Parasetamol, Doğa İlaç Hammadde Ltd. şirketi, İstanbul). Gavaj kullanılarak oral yoldan verildi.

N-Asetil Sistein (NAC): Çalışmada, 600 mg tablet NAC (NAC, Basel kimyevi Maddeler ve İlaç San. Tic. Anonim Şirketi, İstanbul), 2 ml % 0.9'luk NaCl çözeltisinde hazırlanarak gavaj yardımıyla oral yoldan kullanıldı.

LCZ 696: %0.9'luk NaCl çözeltisinde LCZ 696 200 mg tablet (ONEPTUS, Farmanova, İstanbul) süspande edildi. Bu süspansiyon sıçanlara yeterli dozlarda (50, 100 ve 200 mg/kg) oral olarak gavaj yöntemiyle tatbik edildi.

Valsartan: %0.9'luk NaCl çözeltisinde Valsartan 320 mg tablet (CARDOPAN, Sanovel, İstanbul) süspansiyon edildi. Hazırlanan süspansiyon sıçanlara uygun dozlarda (25, 50, 100 mg/kg) oral olarak gavaj yöntemiyle uygulandı.

Tiyopental Sodyum: (İE ULAGAY) Çalışmada i.p. olarak 50 mg/kg ötenazi işlemi için verildi.

3.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan cihazların marka ve modelleri

Cihaz	Modeli ve Markası
Derin Dondurucu	Vestel BZP-XL3402W, Türkiye
Hassas Terazı	Shimadzu ATX224, USA
Santrifüj (Soğutmalı)	Hettich Zentrifugen 320R, Germany
Doku Homojenizatörü	Tissue Lyser II Qiagen, Germany
Etüv	Memmert WNB 7-45, Germany
Pipet Seti	Eppendorf Research Plus
Mikroplate Yıkayıcı	Stat Fax 2600 Microplate Washer, USA
Manyetik Karıştırıcı	Wisd WiseStir MSH-20A, Germany
Buzdolabı (-86 °C)	Nuaire NU-9483E, USA
Karıştırıcı	IKA- MS 3 basic, USA
Eliza Okuyucu	Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, USA
pH Metre	SCHOTT Instruments Lab 850, Germany
Otomatik Multikanal Pipet	Eppendorf Research Pro (20-300µ)
QIAcube	QIAGEN, Hilden, Germany
Thermal Cycler Veriti	Applied Biosystems, CA, ABD
Spektrofotometre	Epoch spectrophotometer, Biotek, Highland Park
Real-Time PCR	Applied Biosystems, CA, ABD
Cerrahi Set	F.S.T., Germany
Otoklav Wac47	DAIHAN, Güney Kore
Dewar Transport Vessels	LLG, Germany
Kafes	Tecniplast, İtalya
Tartı	SKS 4511, Sinbo, Türkiye

3.2. Metod

3.2.1. Deney Planı

Çalışmada sıçanlar 11 gruba ayrıldı. Grup başına 6'şar sıçan kullanıldı. Deney prosedürüne geçilmeden önce bütün sıçanlar 24 saat süresince aç bırakıldı. Bu süreçte sıçanların suya erişimi sağlandı. Aşağıda verilen plan takip edilerek belirlenen gruplara göre ayrılan sıçanlara ilaçlar tatbik edildi:

Grup 1. Sağlıklı Grup: Bu gruba deney süresince herhangi bir ilaç verilmedi. 2 ml PBS (% 1'lik CMC içeren), gastrik gavaj yardımı ile oral yoldan uygulandı.

Grup 2. Parasetamol (PARA) Grubu: Parasetamol (2 g/kg) dozu hazırlanarak gastrik gavaj ile oral olarak verildi.

Grup 3. 2g/kg Parasetamol + Valsartan (VAL) (25mg/kg) Grubu: Valsartan (25 mg/kg) dozunda gastrik gavaj ile oral yoldan verildikten 1 saat sonra 2 g/kg dozunda parasetamol de gastrik gavaj ile oral olarak uygulandı. Parasetamol verilmesinin 12 saat sonrası tekrar aynı dozda olmak üzere Valsartan (25mg/kg) verildi.

Grup 4. 2g/kg Parasetamol + Valsartan (50mg/kg) Grubu: Gastrik gavaj ile oral olarak verilen Valsartan (50mg/kg) dozundan 1 saat sonra aynı şekilde 2 g/kg dozunda parasetamol verildi. Parasetamol uygulandıktan 12 saat sonra tekrar aynı dozda Valsartan (50mg/kg) uygulanmıştır.

Grup 5. 2g/kg Parasetamol + Valsartan (100mg/kg) Grubu: Valsartan (100mg/kg) miktarında gastrik gavaj ile oral olarak uygulandıktan 1 saat sonra 2 g/kg dozunda parasetamol aynı şekilde verildi. Parasetamolün ardından 12 saat sonra Valsartan (100mg/kg) tekrar aynı dozda verildi.

Grup 6. 2g/kg Parasetamol + LCZ696 (50mg/kg) Grubu: Gastrik gavaj ile LCZ696 (50mg/kg) dozunda oral olarak verildi ve 1 saat sonrası parasetamol 2 g/kg

dozunda aynı teknikle uygulandı. Parasetamol uygulandıktan 12 saat sonra LCZ 696 (50mg/kg) tekrar aynı dozda verildi.

Grup 7. 2g/kg Parasetamol + LCZ696 (100mg/kg) Grubu: Gastrik gavaj ile LCZ696 (100mg/kg) dozunda oral yoldan verildikten 1 saat sonra parasetamol 2 g/kg dozunda aynı yöntemle uygulandı. Parasetamolün ardından 12 saat sonra LCZ696 (100mg/kg) tekrar aynı dozda verildi.

Grup 8. 2g/kg Parasetamol + LCZ696 (200mg/kg) Grubu: Gastrik gavaj ile LCZ696 (200mg/kg) dozunda oral yoldan verildikten 1 saat sonra parasetamol 2 g/kg dozunda aynı yöntemle uygulandı. Parasetamolün ardından 12 saat sonra LCZ696 (200mg/kg) tekrar aynı dozda verildi.

Grup 9. 2g/kg Parasetamol + N-Asetil Sistein (NAC) (140mg/kg) Grubu: Gastrik gavaj ile NAC (140mg/kg) dozunda oral yoldan verildikten 1 saat sonra parasetamol 2 g/kg dozunda aynı yöntemle uygulandı. Parasetamolün ardından 12 saat sonra NAC tekrar aynı dozda verildi.

Grup 10. Valsartan (100mg/kg) Grubu: Gastrik gavaj ile Valsartan (100mg/kg) dozunda oral yoldan uygulandı.

Grup 11. LCZ 696 (200mg/kg) Grubu: LCZ696 (200mg/kg) dozunda gastrik gavaj yardımıyla oral olarak verildi.

Aşağıdaki deney planı tablosunda bu hayvan grupları sıralanmıştır:

Tablo 3.2. Deneylerde kullanılan hayvanların sayıları ve tedavi grupları

Gruplar	Hayvan Sayısı	Tedavi
1	6	Sağlıklı
2	6	Parasetamol
3	6	2g/kg Parasetamol + Valsartan (25mg/kg)
4	6	2g/kg Parasetamol + Valsartan (50mg/kg)
5	6	2g/kg Parasetamol + Valsartan (100mg/kg)
6	6	2g/kg Parasetamol + LCZ696 (50mg/kg)
7	6	2g/kg Parasetamol + LCZ696 (100mg/kg)
8	6	2g/kg Parasetamol + LCZ696 (200mg/kg)
9	6	2g/kg Parasetamol + NAC (140mg/kg)
10	6	Valsartan (100mg/kg)
11	6	LCZ 696 (200mg/kg)

Çalışma için, 2 ml 1X'lik PBS (fosfat tampon solüsyonu) içinde 2 g parasetamol ile % 1'lik CMC (Karboksi Metil Selüloz) düşük sıcaklıkta karıştırılıp hazırlandı ve hayvanlara oral yol kullanılarak gastrik sonda ile uygulandı (Chattopadhyay, 2003; Kuralay vd., 1998). Valsartan, LCZ 696 ve NAC uygun şartlarda, su ile süspande edilerek hayvanlara ilgili dozlarda 2 ml içinde gastrik sonda ile oral yol kullanılarak uygulandı. Tüm deney grupları için hayvanlar işlemlerden bir gün önce 24 saat aç bekletildikten sonra deney prosedürü tatbik edildi. Belirtilen dozlarda ilaçlar verildikten 1 saat sonra 2g/kg dozunda parasetamol gavaj ile oral yoldan uygulandı. PARA+NAC, PARA+VAL ve PARA+LCZ696 gruplarına parasetamol uygulanmasından 12 saat sonra tekrar aynı dozda ilaçlar uygulandı. Parasetamol uygulandıktan 24 saat sonra ötenazi işlemi için yüksek doz tiopental (50 mg/kg) ile deney sonlandırılıp, tüm gruplardan karaciğer ve kan örnekleri alındı. Alınan karaciğer dokusu biyokimyasal ve moleküler analizler için ayrılıp -80 °C'de saklandı.

3.2.2. Biyokimyasal Çalışmalar

3.2.2.1. Serumda ALT ve AST Ölçümleri

AST, ALT ölçümü için serumun elde edilmesi: Kanlar EDTA'lı biyokimya tüpüne konularak 4000 rpm de 10 dakika süresince 4 °C de santifüj edildi. Analiz dönemine kadar -80 °C de muhafaza edildi. AST ve ALT seviyelerinin belirlenmesi amacıyla her örneğin ikişer kere yüksek hassasiyetteki ELISA kitiyle (USCN Life Science-E90207Ra, E91214Ra-China) ölçümü gerçekleştirildi.

AST Ölçümü

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

Deneyin yapılışı:

1. Standart, kör ve numuneler 100 µl miktarında kuyulara yüklendi. Plate kapatılarak 2 saat 37 °C de inkübasyon gerçekleştirildi.
2. 3 kere yapılan yıkama işleminin ardından, Detection Reagent A solüsyonu 100 µl olacak şekilde her kuyuya eklendi. İnkübasyon 1 saat süre 37 °C sıcaklıkta gerçekleştirildi.
3. Bu sahfada yıkama işlemi 3 kere yapıldıktan sonra Detection Reagent B solüsyonu 100 µl olacak şekilde her kuyuya eklendi. İnkübasyon 1 saat süre 37 °C sıcaklıkta gerçekleştirildi.
4. Solusyonlar kuyulardan boşaltıldı ve yıkama işlemi gerçekleştirildi.
5. 90 µl kadar Substrat tüm kuyulara eklendi. Ardından inkübasyon 15-20 dk 37 °C de gerçekleştirildi.
6. 50 µl kadar stop solüsyonu tüm kuyulara eklendi ve ardından sıvılarda sarı renk gözlemlendi.

7. 450 nm mertebede ölçümler gerçekleştirildi.

AST Miktarının Hesaplanması: Epoch ELISA reader cihazında tüm ölçümler gerçekleştirildi. Hesaplamalar için Cihazın Gen 5 programı kullanıldı. Standartlara en yakın haliyle bir doğru çizilerek numunelerin konsantrasyonları tespit edildi. Konsantrasyon değerleri ng/ml mertebesinde hesaplandı.

ALT Ölçümü

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

Deneyin yapılışı:

1. Standart, blank ve numuneler 100 µl miktarında kuyulara yüklendi. 2 saat süresince 37 °C de inkübasyon gerçekleştirildi.
2. Yıkama yapılmaksızın tüm sıvılar alındı.
3. Detection Reagent A solüsyonu tüm kuyulara 100 µl miktarında eklendi. 1 saat süresince 37 °C de inkübasyon gerçekleştirildi.
4. Solusyonlar kuyulardan çekildi ve yıkama gerçekleştirildi.
5. Detection Reagent B solüsyonu tüm kuyulara 100 µl miktarında eklendi. 30 dk süresince 37 °C de inkübasyon gerçekleştirildi.
6. Solusyonlar kuyulardan çekildi ve yıkama gerçekleştirildi.
7. 90 µl Substrat solüsyonu tüm kuyulara yüklendi. 37 °C de karanlıkta 15-20 dk süre boyunca inkübasyon gerçekleştirildi.
8. 50 µl stop solüsyonu tüm kuyulara yüklendi ve sarı renk gözlenmeye başlandı.
9. 450 nm mertebede ölçümler gerçekleştirildi.

ALT Miktarının Hesaplanması: Epoch ELISA reader cihazında tüm ölçümler gerçekleştirildi. Hesaplamalar için cihaza ait Gen 5 programı kullanıldı. Standartlara en

yakın haliyle bir doğru çizilerek numunelerin konsantrasyonları tespit edildi. Konsantrasyon değerleri ng/ml mertebesinde hesaplandı.

3.2.2.2. Karaciğer Dokusunda Yapılan Ölçümler

Her sıçanın 100 mg karaciğer dokusu homojenizasyonu, buz üzerinde spesifik homojenat tampon solüsyonunda (uygun bufferda) 3 dk süresince 30 Hz titreşimde Tissue Lyser ile gerçekleştirildi. Ardından kitteki talimatlara uygun olarak doku santrifüjü uygulandı. MDA, SOD, GSH değerleri ile ilgili literatüre uygun yöntemlerle manuel olarak, ADE ve neprilisin seviyelerine ELISA kitiyle bakıldı.

Malondialdehit (MDA) miktar tayini

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

Deneyin yapılışı:

Doku homojenizasyonu;

1. Homojenizasyon işleminden önce sıvı azot kullanılarak PBS ile yıkama gerçekleştirildi,
2. Sıvı azot ile parçalanmış örnekler her bir tüpte 100 mg olarak şekilde tartıldı,
3. 0.1 g doku üzerine 1 ml homojenat tamponu eklendi ve homojenizasyon tissue lyser ile yapıldı.
4. Homojenizasyon işleminin ardından numuneler 4000 rpm de 15 dakika santrifüj edildi.

Çalışma prosedürü:

1. Deneylerde 96 kuyucuklu plate ile işlem yapıldı,
2. 75 µl asetik asit, 10 µl SDS, 20 µl saf su ve 75 µl TBA tüm kuyucuklara eklendi,

3. Uygun numunelerden 20'şer µl numune kuyularına eklendi,
4. 20 µl homojenat tampon solüsyonu kör kuyusuna koyuldu,
5. Uygun standarttan 20'şer µl standartlar kuyularına eklendi,
6. Pipetleme işleminin ardından plate, 90 dakika süre boyunca 105 °C de inkübe edildi,
7. Absorbans 532 nm dalga boyunda okundu.

MDA miktarının hesaplanması: Oluşan pembe renk miktarları 96'lık well platede 532 nm'de okundu. Örneklerin MDA miktarlarının hesabı, seyreltme katsayıları dikkate alınarak öncesinde hazırlanmış olan MDA stok solüsyonu ile oluşturulan standart grafiği kullanılarak yapıldı. Örneklerin MDA miktarları için nmol/mg protein birimi kullanıldı. Her bir doku için faktör etkisi 2 kez tekrar yapılarak saptandı.

Total Glutatyon (GSSG/GSH) tayini

Reaktif Maddeler: Glutathione disulfide, Chromogen, Assay buffer, Glutathione reductase, Metaphosphoric asid, NADPH.

Deneyin yapılışı:

Doku homojenizasyonu;

1. Dokularda yıkama işlemi PBS ile gerçekleştirildi,
2. Homojenizasyon işlemi 0.1 g doku üzerine 4.5 ml homojenat tamponu eklenerek elde edildi,
3. Homojenatlar, 4 °C' de 10 dakika boyunca 12000 rpm de, santrifüj edildi ve GSH seviyesinin belirlenmesi için supernatant kısım kullanıldı.

Çalışma prosedürü:

1. Deneylerde 96 kuyucuklu plate ile işlem yapıldı,
2. Her bir kuyucuğa 150'şer µl olacak şekilde ölçüm tamponundan eklendi,
3. Her bir kuyucuğa DTNB'den 10'ar µl eklendi,

4. Uygun kuyulara örneklerden 25'şer µl eklendi,
5. Uygun kuyucuklara Standartlar 25'şer µl eklendi,
6. 25 µl homojenat tamponu Kör kuyucuğuna eklendi,
7. 30 dakika süre boyunca 37 °C'de inkübasyon gerçekleştirildi,
8. Absorbans 412 nm dalga boyunda okundu.

GSH miktarının hesaplanması: Oluşan sarı renk miktarları 96'lık well platede 412 nm'de okunup, önceden hazırlanmış GSH stok solüsyonu ile oluşturulan standart grafikten faydalanılarak seyreltme katsayıları göz önünde bulundurularak ölçüm hesabı gerçekleştirildi. Serum GSH seviyesi için nmol/mg protein birimi kullanıldı. 2 kez tekrar yapılarak her bir dokuya ait faktör etkisi belirlendi.

Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivite tayini

Reaktif Maddeler: Ölçüm tamponu (0,3mM 400 ml Ksantin, 0,6mM 20 ml EDTA, 150µM NTB(Nitro blue tetrazolium), 0,4M Na₂CO₃, 1,2 g Bovin Serum Albumin), Homojenat tamponu (50 mM EDTA içeren fosfat tamponu), Tris-HCL, (NH₄)₂SO₄, XO (Ksantin Oksidaz), CuCl₂, etilen glikol-bis tetraasetik asit (EGTA)

Deneyin yapılışı:

Doku homojenizasyonu

1. PBS ile yıkanan dokuların homojenizasyon işlemi sıvı azot içinde gerçekleştirildi,
2. 1mM etilen glikol-bis tetraasetik asit (EGTA), 210 mM mannitol ve 70 mM sükröz ihtiva eden pH'ı 7.2 değerinde doku başına 1 ml soğuk HEPES buffer ile ultra turrax homojenizatörde 1 dakika süresince buz aküsü üzerinde homojenizasyon gerçekleştirildi,
3. Bütün numuneler işlem sonuna kadar 4 °C'de muhafaza edildi,
4. 5 dk süresince, 10000 RPM'de, 4 °C'de santrifüj gerçekleştirildi,

5. Süpernatanttan ölçüm alındı.

Çalışma prosedürü:

1. Deneylerde 96 kuyucuklu plate tercih edildi,
2. Ölçüm karışımından 200' er µl olmak üzere tüm kuyucuklar dolduruldu,
3. Hazırlanan standartlar 50 µl olmak üzere standart kuyularına eklendi,
4. Uygun kuyucuklara numuneler 50'şer µl koyuldu,
5. 50 µl homojenat tamponu Kör kuyucuğuna ilave edildi,
6. 5'şer µl xantin oksidaz oda sıcaklığında her bir kuyucuğa eklendi,
7. İlk kuyucuğa eklenen XO işleminin 20 dakika ardından absorbans ölçümü 560 nm dalga boyunda gerçekleştirildi.

SOD aktivitesi analizi: 560 nm'de 96'lık well plate ile oluşan mavi-mor renkteki formazon boyasındaki azalmaya ait absorbans seviyeleri okundu ve seyreltme katsayılarına göre önceden hazırlanmış SOD stok solüsyonu kullanılarak oluşturulan standart grafikten faydalanılarak ölçüm hesabı yapıldı. U/mg protein birimi numunelerin SOD aktivitesi için kullanıldı. Her bir doku için faktör etkisi 2 tekrar ile belirlendi. Standart ve numunelere ait konsantrasyonlar hesaplandı.

Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ADE) miktar tayini

Reaktif Maddeler: ELISA kiti içinde standart solüsyon, standart dilüsyon çözeltisi, yıkama çözeltisi, streptavidin-HRP konjugat reaktifi, stop solüsyon, kromojen solüsyon A, kromojen solüsyon B, biotin ile işaretlenmiş ADE antikorları.

Deneyin yapılışı:

Doku homojenizasyonu

1. 1 tablet PBS 100 ml distile su içinde çözüldü.
2. 100 mg doku üzerine 900 µl PBS çözeltisi eklenerek doku homojenizasyonu elde edildi.

3. Homojenatlar, 20 dakika boyunca, 4 °C'de ve 2500 rpm'de santrifüj edildi, süpernantant kısım ADE düzeyinin belirlenmesi için kullanıldı.

Çalışma prosedürü

1. Deneylerde 96 kuyucuklu plate tercih edildi,
2. Standart, standart seyreltme çözeltisiyle dilüe edildi, 5 farklı konsantrasyonda standart hazırlandı,
3. Kromojen A, kromojen B ve stop solüsyonu boş kuyucuğa eklendi,
4. 50 µl standart solüsyon ve 50 µl streptavidin-HRP standart solüsyon kuyucuklarına eklendi,
5. 40 µl örnek, 10 µl ADE antibodyleri ve 50 µl streptavidin-HRP ölçüm yapılacak dokuların konulduğu kuyucuklara yüklendi,
6. Kuyucukları barındıran platein üstü yapışkan membran ile kapatıldı ve hafifçe karıştırıldı. Daha sonra 60 dk süresince 37 °C'de etüvde inkübe edildi,
7. Yıkama çözeltisine 30 kez seyreltme uygulandı ve plate 5'er kez Mikroplate Yıkayıcı ile yıkandı,
8. 50'şer µl kromojen solüsyon A ve kromojen solüsyon B her kuyucuğa konuldu ve hafifçe karıştırıldı. Daha sonra 37 °C'deki etüvde 10 dakika boyunca inkübe edildi.
9. Her kuyucuktaki reaksiyon 50'şer µl stop solüsyon ile durduruldu. Kuyucuk renklerinin maviden sarıya dönmesi sağlandı,
10. Stop solüsyonunun eklenmesinin hemen ardından 15 dk içinde, boş kuyucuğa göre absorbansları tüm kuyucukların 450 nm ışığı ölçüldü.

ADE miktarının hesaplanması: 450 nm'de 96'lık well platede meydana gelen sarı renk değerleri okundu. Seyreltme katsayıları kullanılarak önceden hazırlanmış ADE

stok solüsyonu ile oluşturulan standart grafik yoluyla hesap yapıldı. ADE seviyesi için ng/ml protein birimi kullanıldı. 2 kez tekrar ile her bir doku için faktör etkisi belirlendi.

Neprilisin miktar tayini

Reaktif Maddeler: Streptavidin-HRP, yıkama çözeltisi kromojen solüsyon A, kromojen solüsyon B, biotin ile işaretlenmiş NEP antibodyleri, ELISA kiti içinde standart, standart dilüsyon çözeltisi, stop solüsyon.

Deneyin yapılışı:

Doku homojenizasyonu

1. 1 tablet PBS 100 ml distile su içinde çözüldü.
2. 100 mg doku üzerine 900µl PBS hazırlanan çözeltisi eklenerek doku homojenizasyonu elde edildi,
3. Homojenatlar, 20 dakika boyunca, 4 °C'de ve 2500 rpm de santrifüj edildi, Neprilisin seviyesinin tespitinde süpernatant kullanıldı.

Çalışma prosedürü

1. Deneylerde 96 kuyucuklu plate ile işlem yapıldı,
2. Standart seyreltme çözeltisiyle standart dilüe edildi, standart çözeltisi 5 farklı konsantrasyonda hazırlandı,
3. Boş kuyucuğa kromojen A, kromojen B ve stop solüsyonu eklendi,
4. Standart solüsyon kuyucuklarına 50 µl streptavidin-HRP ve 50 µl standart solüsyon eklendi,
5. Ölçümünün gerçekleştirileceği dokuların yer aldığı kuyucuklara 40 µl örnek, 50 µl streptavidin-HRP ve 10 µl Neprilisin antibodyleri eklendi,
6. Yapışkan membran ile örtülen kuyucukların olduğu platein üstü yavaşça karıştırıldı. Sonrasında 60 dk süre ile 37 °C'de etüvde inkübe edildi,

7. Yıkama çözeltisine 30 kez seyreltme işlemi uygulandı ve plate Mikroplate Yıkayıcı kullanılarak, 5'er kez yıkandı,
8. 50'şer µl kromojen solüsyon A ve kromojen solüsyon B her kuyucuğa konuldu ve yavaşça karıştırıldıktan sonra 37 °C'deki etüvde 10 dakika boyunca inkübe edildi,
9. Her kuyucuktaki reaksiyon 50'şer µl stop solüsyon ile sonlandırıldı ve ardından kuyucuk renklerindeki maviden sarıya dönüşüm gözlemlendi,
10. Stop solüsyonunun eklenmesinin ardından 15 dk süre içinde, boş kuyucuğa göre tüm kuyucukların absorbanların ölçümleri 450 nm değerinde ölçüldü.

Neprilisin miktarının hesaplanması: 450 nm'de 96'lık well platede oluşan sarı renk miktarları okundu. Seyreltme katsayıları kullanılarak Neprilisin standart grafiğinden hesap yapıldı. Neprilisin seviyesi için dokuda pg/ml protein birimi kullanıldı. Her bir doku faktörünün etkisi 2 kez tekrar ile tespit edildi.

3.2.3. Moleküler Çalışmalar

3.2.3.1 Karaciğer Dokusunda TNF- α , IL-1 β ve iNOS Ölçümleri

Tissue Lyser II (Qiagen) cihazında 20-30 mg karaciğer dokuları 350 µl RLT buffer eklenerek homojenize edildi. RNA ekstraksiyonu QIAcube RNA izolasyon cihazında gerçekleştirildi. Karaciğer dokuları ayrı ayrı tartıldı. Üretici firma protokollerine göre RNA izolasyon cihazında (Qiagen) total RNA izolasyonuna ait aşamalar, RNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanılarak yürütüldü. Total mRNA miktarı EPOCH Take3 Plate (Biotek) ile 260/280 nm'de ölçüldü. RNA'lar -80°C'de saklandı.

3.2.3.2. Revers Transkriptaz Reaksiyonu ve cDNA Sentezi:

Total RNA'dan cDNA elde edilmesi amacıyla yüksek kapasiteli cDNA ters çevirim kit enzimi uygulandı. 10 µl miktarınca RNA her bir reaksiyon için kullanıldı. Belirtilen sıcaklıklarda cDNA sentezi Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied

Biosystem) ile gerçekleştirildi. cDNA miktarları EPOCH Take3 Plate, (Biotek) yardımı ile belirlendi. -20°C’de olmak üzere tüm numuneler muhafaza altına alındı.

cDNA sentez reaksiyonu:

dNTPs mix 25 X 0.8 µl

MultiScribe Reverse Transcriptase 1 µl

RT Buffer 10 X 2 µl

RT Random Primers 10 X 2 µl

DEPC-H₂O 4.2 µl

Total RNA 10 µl

3.2.3.3. Real Time PCR ile mRNA Ekspresyonlarının Kantitatif Olarak Belirlenmesi

TNF- α , IL-1 β ve iNOS mRNA ekspresyonu için Taq Man Gene Expression Master Mix kiti tercih edildi. Amplifikasyon ve kantifikasyon işlemleri StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) cihazında yapıldı. 200 ng cDNA için TaqMan® Gene Expression Assays’ler aşağıda ifade edildiği gibi pipetlendi, 40 siklus yürütüldü. Ct değerleri cihazda otomatik olarak 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}’ye çevrildi ve deneylerin sonucunda elde edilen veriler IBM SPSS 20.0 paket programında istatistiksel olarak işlendi.

Pipetleme: Assay 1 µl, TaqMan Master Mix 10 µl, cDNA (200 ng) X µl, , RNase free water ile 20 µl’ye tamamlandı.

2.3.4. İstatistiksel Analiz

Deneylerin ardından elde edilen ortalama değerler $\pm$ standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel bakımdan $p < 0.05$ şartını sağlayan değerler anlamlı olarak kabul edildi. Tek yönlü varyans analizi için One-Way ANOVA testi üzerinde Post Hoc çoklu karşılaştırmalı testlerden Duncan tekniği kullanılarak deney grupları arasındaki nüansın önem seviyesi tespit edildi. Bir grubun diğerinden istatistiksel olarak farklı olduğu farklı

harfler kullanılarak gösterildi. Aynı harflerin kullanımı ise mevcut farkın istatistiksel bağlamda önemsiz olduğuna işaret etmektedir.

4. BULGULAR

Yapılan çalışmalarda elde edilen bulgular biyokimyasal ve moleküler olarak iki katagoriye ayrılmıştır.

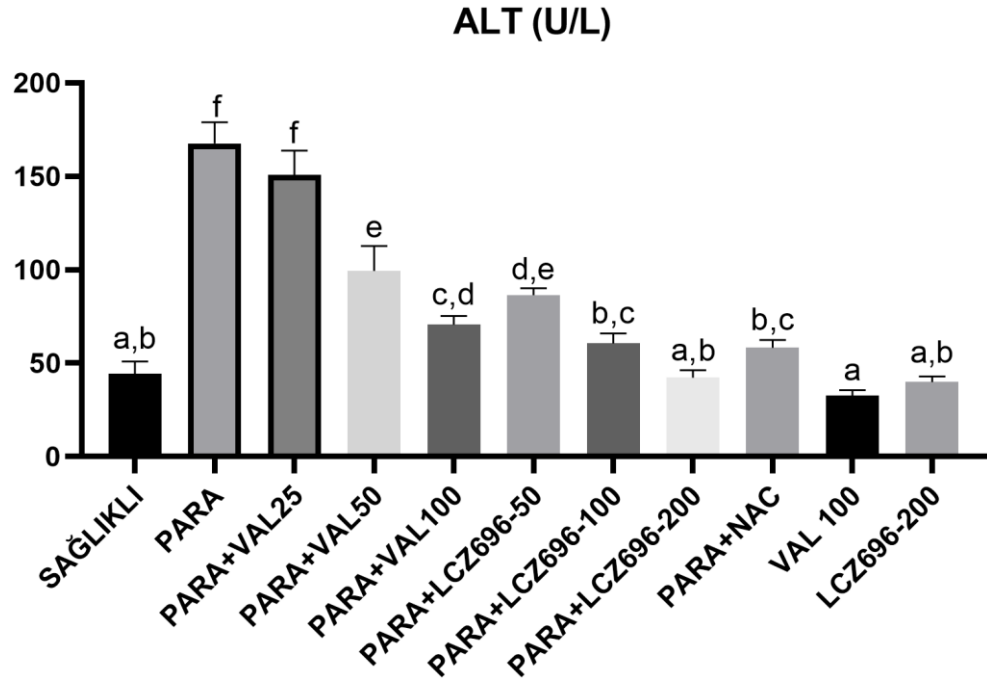
4.1. Biyokimyasal Bulgular

4.1.1. Serumda ALT ve AST Bulguları

ALT ve AST ölçüm sonuçları Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre karaciğer hasarına bağlı PARA grubunda ALT miktarı en yüksek olarak (167.57 ± 11.42 U/L) ölçülmüştür. PARA grubu ALT seviyesine en çok yaklaşan grup PARA+VAL25 grubu olarak ölçülmüştür. ALT seviyesi Hem Valsartan hem LCZ696 gruplarında PARA toksisite grubuna göre önemli düzeyde ALT miktarında düşüş gözlemlenmiştir. VAL-100 grubunda ALT miktarı en düşük (32.63 ± 3.00 U/L) olarak ölçülmüştür. PARA+VAL25, PARA+VAL50, PARA+VAL100 ve LCZ696 50 mg/kg, LCZ696 100 mg/kg, LCZ696 200 mg/kg gruplarında ise giderek artan ilaç dozuna bağlı olarak ALT seviyelerinin Sağlıklı gruba yaklaştığı gözlemlenmiştir. PARA+LCZ696 kullanılan tüm gruplarda PARA+VAL kullanılan gruplara göre daha fazla düzelme göstermiştir. LCZ696 200 mg/kg dozundaki ALT seviyesi, pozitif kontrol grubu olarak seçilen PARA+NAC grubundan daha düşük olarak ölçülmüştür. Sağlıklı grup ve PARA+LCZ696-200 grubu ALT seviyeleri benzer olarak ölçülmüştür (Şekil 4.1).

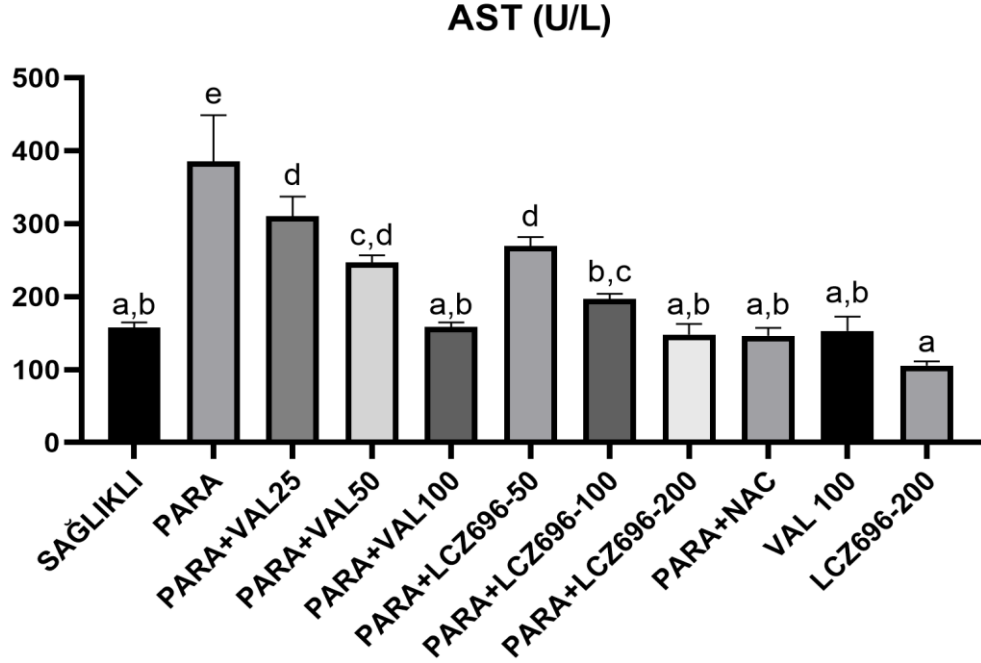
Tablo 4.1. ALT ve AST ölçüm sonuçları

Gruplar	ALT (U/L)	AST (U/L)
Sağlıklı	44.48 ± 6.47 ^{ab}	157.63 ± 6.96 ^{ab}
Parasetamol	167.57 ± 11.42 ^f	385.17 ± 63.61 ^e
2g/kg Parasetamol + Valsartan (25mg/kg)	150.8 ± 12.88 ^f	310.02 ± 27.10 ^d
2g/kg Parasetamol + Valsartan (50mg/kg)	99.43 ± 13.32 ^e	246.72 ± 10.17 ^{cd}
2g/kg Parasetamol + Valsartan (100mg/kg)	70.5 ± 4.68 ^{cd}	158.33 ± 6.50 ^{ab}
2g/kg Parasetamol + LCZ696 (50mg/kg)	86.4 ± 3.76 ^d	269.37 ± 12.62 ^d
2g/kg Parasetamol + LCZ696 (100mg/kg)	60.62 ± 5.31 ^{bc}	197.06 ± 6.88 ^{bc}
2g/kg Parasetamol + LCZ696 (200mg/kg)	42.3 ± 3.91 ^{ab}	147.95 ± 14.89 ^{ab}
2g/kg Parasetamol + NAC (140mg/kg)	58.17 ± 4.29 ^{bc}	146.66 ± 10.75 ^{ab}
Valsartan (100mg/kg)	32.63 ± 3.00 ^a	153.15 ± 19.42 ^{ab}
LCZ 696 (200mg/kg)	39.83 ± 3.13 ^{ab}	105.75 ± 5.83 ^a



Şekil 4.1. ALT ölçümüne ait grafik

Tablo 4.1’de gösterildiği üzere AST seviyelerine bakıldığında PARA grubunda AST miktarı en yüksek 385.17 ± 63.61 U/L olarak ölçülmüştür. PARA grubuna en yakın AST miktarı PARA+VAL25 grubunda ölçülmüştür. Sağlıklı grubu AST düzeyine (157.63 ± 6.96 U/L) en çok yaklaşan PARA+VAL100 grubu (158.33 ± 6.50 U/L) olmuştur. PARA+VAL100, PARA+LCZ696-200, PARA+NAC, VAL100, Sağlıklı grup AST seviyeleri benzer olarak ölçülmüştür. PARA+VAL gruplarında artan doza bağlı olarak AST seviyeleri Sağlıklı guba yaklaşmıştır. PARA+LCZ696 gruplarında artan doza bağlı olarak AST seviyeleri düşmüştür. AST seviyesi LCZ696-200 grubunda en düşük (105.75 ± 5.83 U/L) olarak ölçülmüştür. (Şekil 4.2).



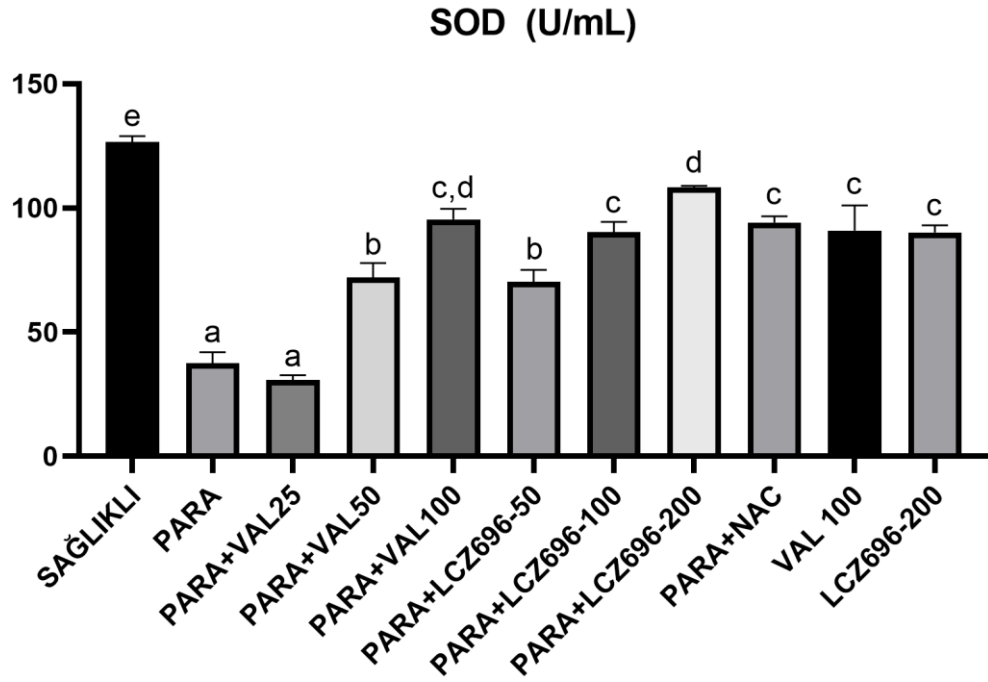
Şekil 4.2. AST ölçümüne ait grafik

4.1.2. Karaciğer Dokusunda SOD, GSH ve MDA Bulguları

SOD, GSH ve MDA parametrelerinin sonuçları Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre Sağlıklı grup SOD düzeyi en yüksek 126.59 ± 2.30 U/ml olarak ölçülmüştür. En düşük SOD düzeyi 30.69 ± 2.05 U/ml olarak ölçülmüştür. Ölçüm sonuçlarına göre SOD aktivitesi Sağlıklı grubuna en yakın olan PARA+VAL100 ve PARA+LCZ696 200 mg/kg gruplarıdır. PARA grubunda SOD aktivitesinde ciddi bir azalma gözlemlenmiştir. PARA+VAL25 grubu SOD aktivitesi PARA grubuyla benzerdir. PARA+VAL gruplarında doza bağlı olarak SOD düzeyinde artış görülmüştür. PARA+VAL50 ve PARA-LCZ696-50 SOD seviyeleri benzer ölçülmüştür. PARA+VAL100 dozundaki SOD düzeyi ise PARA+NAC dan daha yüksektir. PARA+LCZ696 gruplarında doza bağlı olarak SOD aktivitesinde artış gözlemlenmiştir. PARA+LCZ696-100, PARA+NAC, VAL100, LCZ696-200 grupları AST seviyeleri benzer ölçülmüştür. PARA+LCZ696-200 dozundaki SOD düzeyi PARA+NAC grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Şekil 4.3).

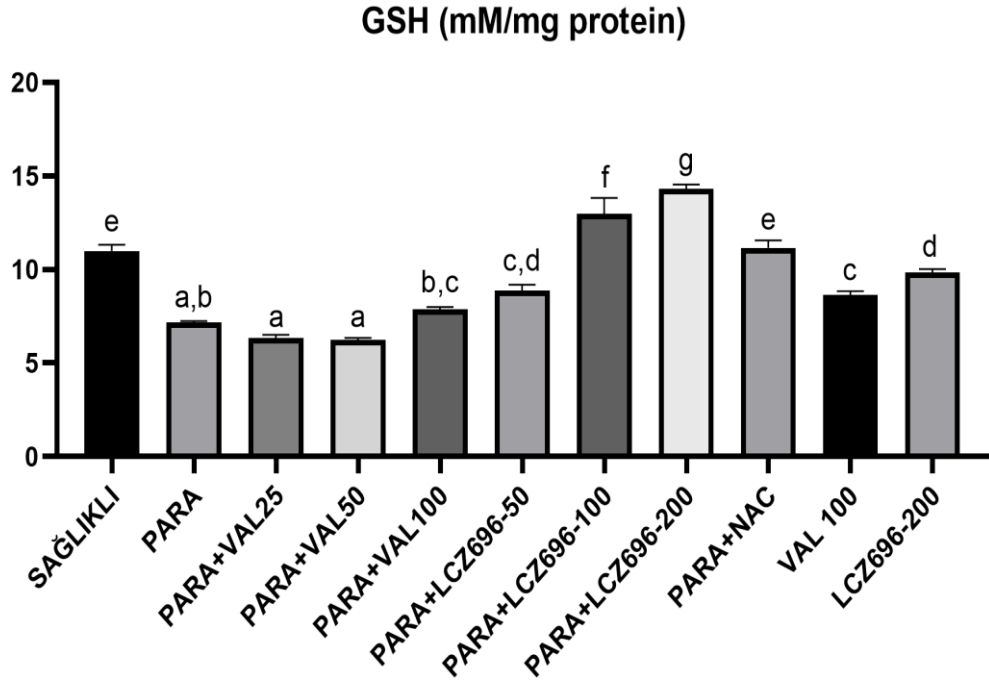
Tablo 4.2. SOD, GSH ve MDA ölçüm sonuçları

Gruplar	SOD (U/mL)	GSH (mmol/mg protein)	MDA (μ mol/mg protein)
Sağlıklı	126.59 $\pm$ 2.30 ^e	10.99 $\pm$ 0.34 ^e	3.11 $\pm$ 0.16 ^a
Parasetamol	37.61 $\pm$ 4.31 ^a	7.16 $\pm$ 0.08 ^{ab}	9.27 $\pm$ 0.56 ^e
2g/kg Parasetamol + Valsartan (25mg/kg)	30.69 $\pm$ 2.05 ^a	6.32 $\pm$ 0.20 ^a	10.80 $\pm$ 0.08 ^f
2g/kg Parasetamol + Valsartan (50mg/kg)	72.10 $\pm$ 5.67 ^b	6.24 $\pm$ 0.09 ^a	9.61 $\pm$ 0.23 ^e
2g/kg Parasetamol + Valsartan (100mg/kg)	95.43 $\pm$ 4.22 ^{cd}	7.86 $\pm$ 0.13 ^{bc}	7.86 $\pm$ 0.13 ^d
2g/kg Parasetamol + LCZ696 (50mg/kg)	70.31 $\pm$ 4.71 ^b	8.87 $\pm$ 0.32 ^{cd}	10.72 $\pm$ 0.08 ^f
2g/kg Parasetamol + LCZ696 (100mg/kg)	90.31 $\pm$ 4.17 ^c	12.98 $\pm$ 0.84 ^f	9.45 $\pm$ 0.18 ^e
2g/kg Parasetamol + LCZ696 (200mg/kg)	108.28 $\pm$ 0.64 ^d	14.31 $\pm$ 0.23 ^g	6.73 $\pm$ 0.69 ^c
2g/kg Parasetamol + NAC (140mg/kg)	94.15 $\pm$ 2.52 ^c	11.17 $\pm$ 0.39 ^e	5.36 $\pm$ 0.25 ^b
Valsartan (100mg/kg)	90.95 $\pm$ 10.10 ^c	8.64 $\pm$ 0.20 ^c	4.79 $\pm$ 0.10 ^b
LCZ 696 (200mg/kg)	90.18 $\pm$ 2.82 ^c	9.83 $\pm$ 0.19 ^d	4.47 $\pm$ 0.31 ^b



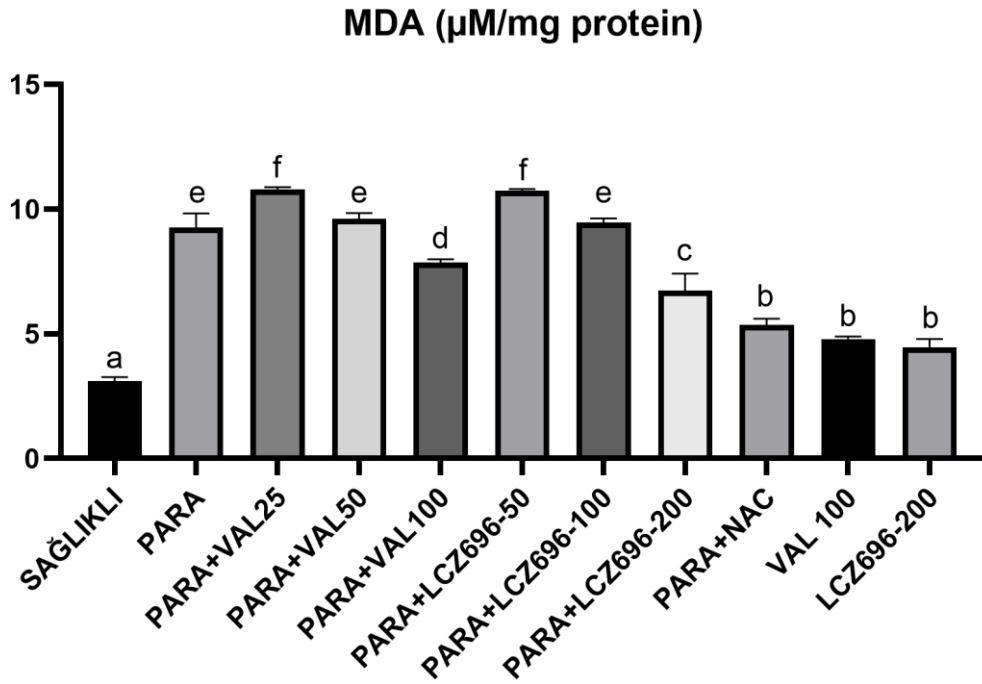
Şekil 4.3. SOD ölçümüne ait grafik

Tablo 4.2 de gösterildiği üzere GSH düzeylerine bakılırsa en düşük PARA+VAL50 grubunda (6.24 ± 0.09 mmol/mgprotein), en yüksek PARA+LCZ696-200 grubunda (14.31 ± 0.23 mmol/mgprotein) ölçülmüştür. Sağlıklı ve PARA+NAC grupları GSH düzeyleri benzerlik göstermiştir. PARA+VAL25 ve PARA+VAL50 grupları GSH düzeyleri benzer olarak ölçülmüştür. PARA+VAL grupları GSH seviyeleri PARA+LCZ696 grupları GSH seviyesinden daha düşük olarak ölçülmüştür. PARA+LCZ696 gruplarında artan doza bağlı olarak GSH seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. PARA+LCZ696-100 ve PARA+LCZ696-200 grupları GSH ölçümleri PARA+NAC grubundan daha yüksek olarak ölçülmüştür. PARA+LCZ696-50 grubuyla VAL100 grubu GSH seviyeleri benzer ölçülmüştür (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. GSH ölçümüne ait grafik

Tablo 4.2’de belirtildiği üzere PARA+VAL25 MDA değeri en yüksek 10.80 ± 0.08 $\mu\text{mol/mg}$ protein olarak ölçülmüştür. Sağlıklı grup MDA düzeyi en düşük 3.11 ± 0.16 $\mu\text{mol/mg}$ protein olarak ölçülmüştür. Sağlıklı gruba en yakın MDA miktarı LCZ696-200 grubunda ölçülmüştür. PARA, PARA+VAL50, PARA+LCZ696-100 MDA düzeyleri benzer olarak ölçülmüştür. PARA+VAL gruplarında doza bağlı olarak MDA aktiviteleri düşmüştür. PARA+LCZ696 gruplarında yine doza bağlı olarak MDA aktiviteleri düşmüş ve PARA+NAC’a yaklaşmıştır. PARA+NAC, VAL100, LCZ696-200 grupları MDA seviyeleri benzer olarak ölçülmüştür (Şekil 4.5).



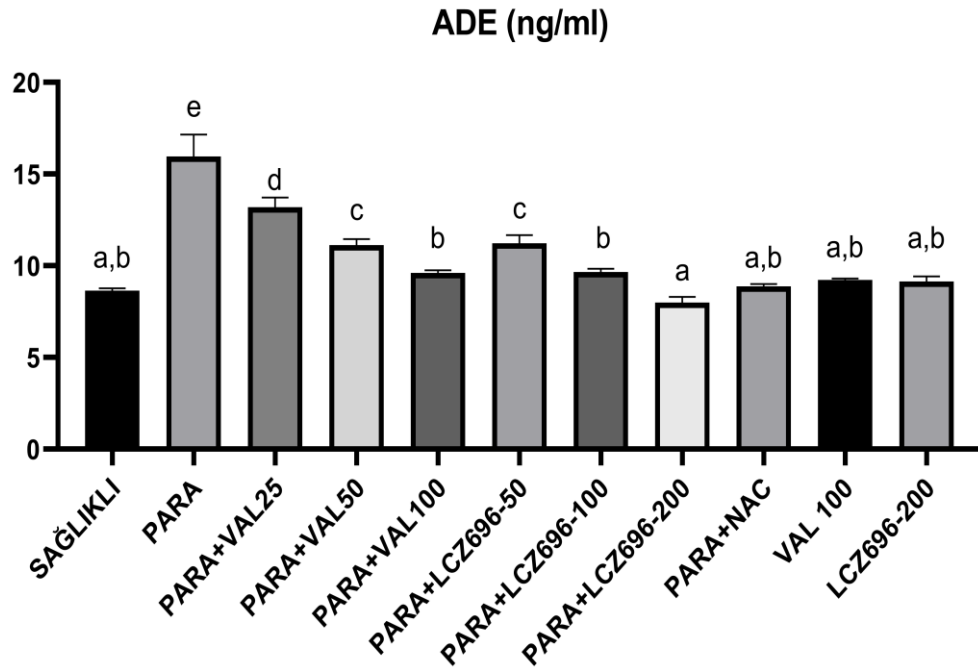
Şekil 4.5. MDA ölçümüne ait grafik

4.1.3. Karaciğer Dokusunda ADE-NEP Bulguları

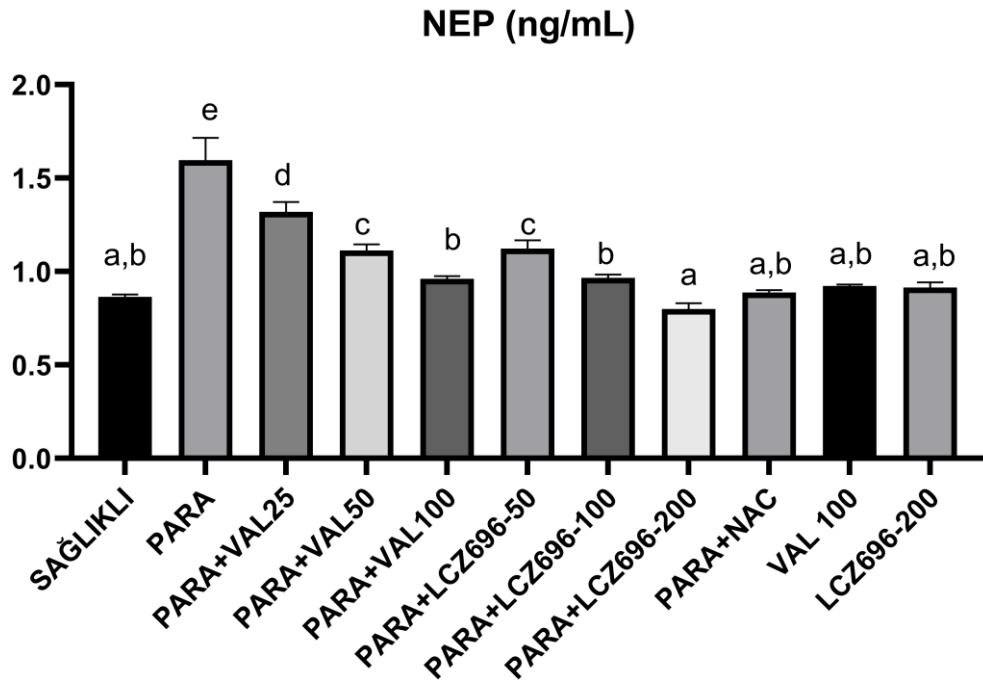
ADE ve NEP seviyeleri sonuçları Tablo 4.3 de gösterilmiştir. En yüksek ADE seviyesi 15.97 ± 1.20 ng/mL olarak PARA grubunda ölçülmüştür. Sağlıklı, PARA+NAC, VAL100, LCZ696-200 grupları ADE seviyeleri benzer olarak ölçülmüştür. PARA+VAL gruplarında doza bağlı olarak ADE seviyelerinde düşüş gözlemlenmiştir. PARA+VAL50 ve PARA+LCZ696-50 ADE seviyesi benzer olarak ölçülmüştür. PARA+VAL100 ve PARA+LCZ696-100 grupları ADE seviyeleri de benzer olarak ölçülmüştür. PARA+LCZ696 gruplarında da artan doza bağlı olarak ADE seviyelerinde düşüş gözlemlenmiştir. PARA+NAC, VAL100, LCZ696-200 ve Sağlıklı gruplarındaki ADE seviyeleri istatistiksel olarak aynı seviyededir. En düşük ADE seviyesi 7.98 ± 0.32 ng/mL olarak PARA+LCZ696-200 grubunda ölçülmüştür. (Şekil 4.6)

Tablo 4.3. ADE ve NEP ölçüm sonuçları

Gruplar	ADE (ng/mL)	NEP (ng/mL)
Sağlıklı	8.65 ± 0.13^{ab}	0.86 ± 0.01^{ab}
Parasetamol	15.97 ± 1.20^e	1.60 ± 0.12^e
2g/kg Parasetamol + Valsartan (25mg/kg)	13.19 ± 0.54^d	1.32 ± 0.05^d
2g/kg Parasetamol + Valsartan (50mg/kg)	11.13 ± 0.33^c	1.11 ± 0.03^c
2g/kg Parasetamol + Valsartan (100mg/kg)	9.61 ± 0.15^b	0.96 ± 0.01^b
2g/kg Parasetamol + LCZ696 (50mg/kg)	11.23 ± 0.44^c	1.12 ± 0.04^c
2g/kg Parasetamol + LCZ696 (100mg/kg)	9.66 ± 0.18^b	0.97 ± 0.02^b
2g/kg Parasetamol + LCZ696 (200mg/kg)	7.98 ± 0.32^a	0.80 ± 0.03^a
2g/kg Parasetamol + NAC (140mg/kg)	8.87 ± 0.15^{ab}	0.89 ± 0.01^{ab}
Valsartan (100mg/kg)	9.22 ± 0.09^{ab}	0.92 ± 0.009^{ab}
LCZ 696 (200mg/kg)	9.13 ± 0.28^{ab}	0.91 ± 0.03^{ab}

**Şekil 4.6.** ADE ölçümüne ait grafik

NEP seviyelerine bakıldığında en yüksek değer PARA grubunda 1.60 ± 0.12 ng/mL olarak ölçülmüştür. PARA grubunu PARA+VAL gruplarıyla kıyasladığımızda PARA grubuna en çok yaklaşan grup PARA+VAL25 grubudur. Sağlıklı gruba en yakın NEP seviyeleri PARA+NAC, VAL100, LCZ696-200 gruplarında ölçülmüştür. PARA+VAL gruplarında artan doza bağlı olarak NEP seviyelerinde düşüş gözlemlenmiştir. PARA+VAL50 ve PARA+LCZ696-50 grupları NEP seviyeleri benzer olarak ölçülmüştür. PARA+VAL100 ve PARA+LCZ696-100 grupları NEP seviyesi benzer olarak ölçülmüştür. PARA+LCZ696 gruplarında da aynı şekilde artan doza bağlı olarak NEP seviyelerinde düşüş gözlemlenmiştir. En düşük NEP seviyesi PARA+LCZ696-200 grubunda (0.80 ± 0.03 ng/mL) ölçülmüştür. (Şekil 4.7)



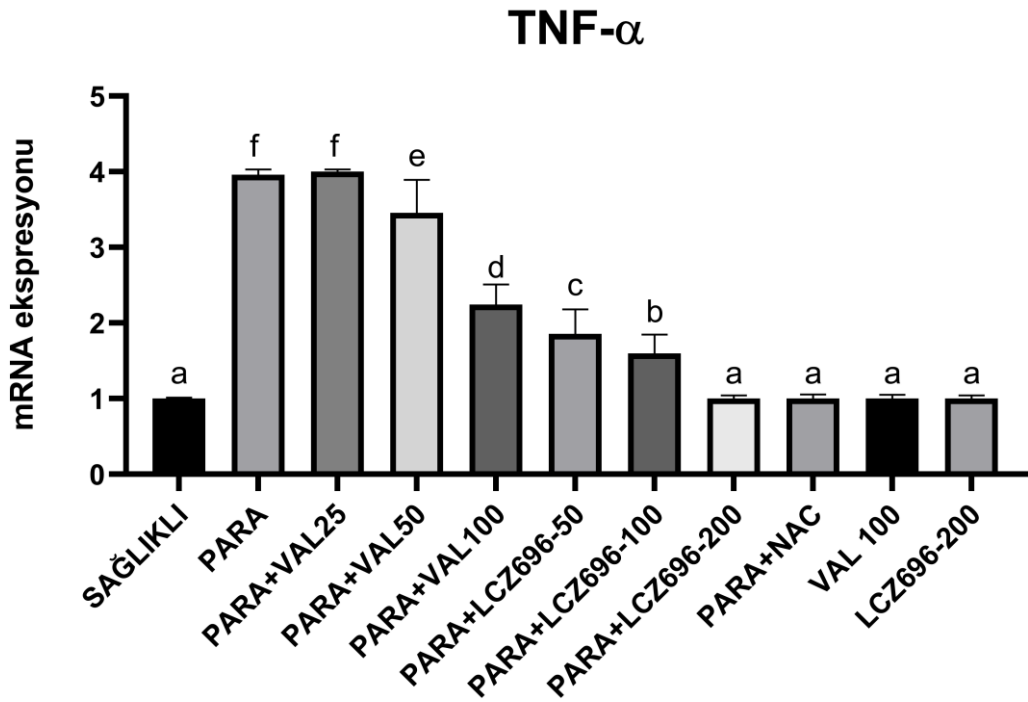
Şekil 4.7. NEP ölçümüne ait grafik

4.2. Moleküler Bulgular

4.2.1. TNF- α , IL-1 β ve iNOS Bulguları

TNF- α mRNA ekspresyonlarına bakıldığında en düşük Sağlıklı grubunda, en yüksek PARA grubunda ölçülmüştür. PARA+VAL 25 grubunun TNF- α mRNA

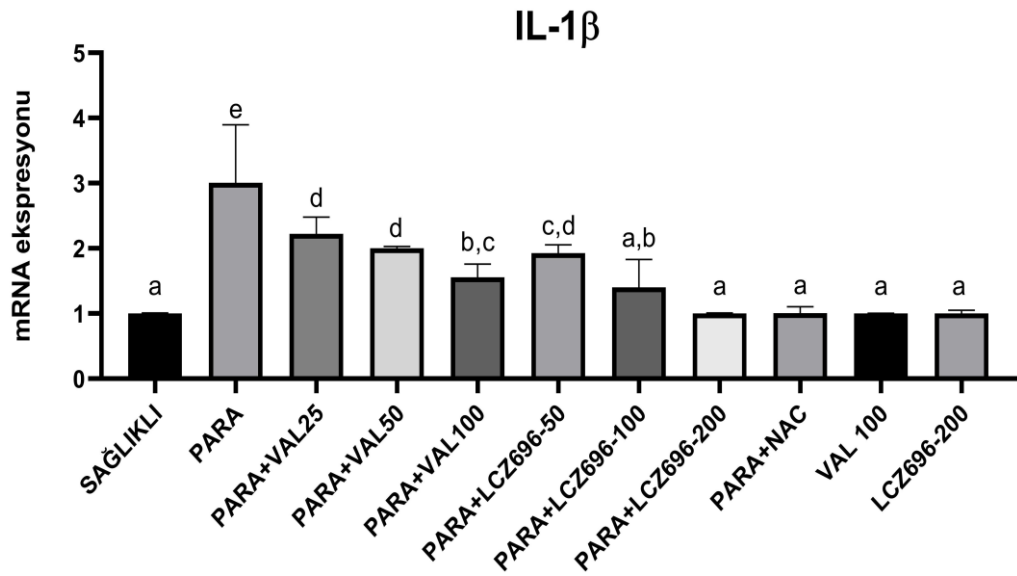
ekspresyonunun PARA grubuyla benzer olarak ölçülmüştür. PARA+VAL grubunda doza bağlı olarak mRNA ekspresyonunda düşüş gözlemlenmiştir. PARA grubunu PARA+LCZ696 grubuyla kıyaslandığında PARA grubuna göre TNF- α mRNA ekspresyonlarının çok düşük olarak ölçülmüştür, ayrıca TNF- α mRNA ekspresyonunun doza bağlı olarak azaldığı ölçülmüştür. PARA+LCZ696-200 grubu TNF- α mRNA ekspresyonunun PARA+NAC grubundan daha düşük olup, Sağlıklı grubuna yaklaşmıştır. PAR+VAL ve PARA+LCZ696 grupları kıyaslandığında en yüksek TNF- α mRNA ekspresyonu PARA+VAL 25 grubunda en düşük PARA+LCZ696-200 grubunda ölçülmüştür. LCZ696-200, VAL 100, PARA+NAC ve Sağlıklı grup TNF- α mRNA ekspresyonları benzer olarak ölçülmüştür (Şekil 4.6).



Şekil 4.8. TNF- α ölçümlerine ait grafik

IL-1 β mRNA ekspresyonuna bakıldığında en yüksek ölçümün PARA grubunda en düşük ölçümün sağlıklı grupta olduğu görülmektedir. Sağlıklı grubuyla PARA+VAL grubu kıyaslandığında IL-1 β mRNA ekspresyonu artmış olmasına rağmen doza bağlı olarak düşüş gerçekleşmiştir. Aynı şekilde Sağlıklı grupla PARA+LCZ696 grubu

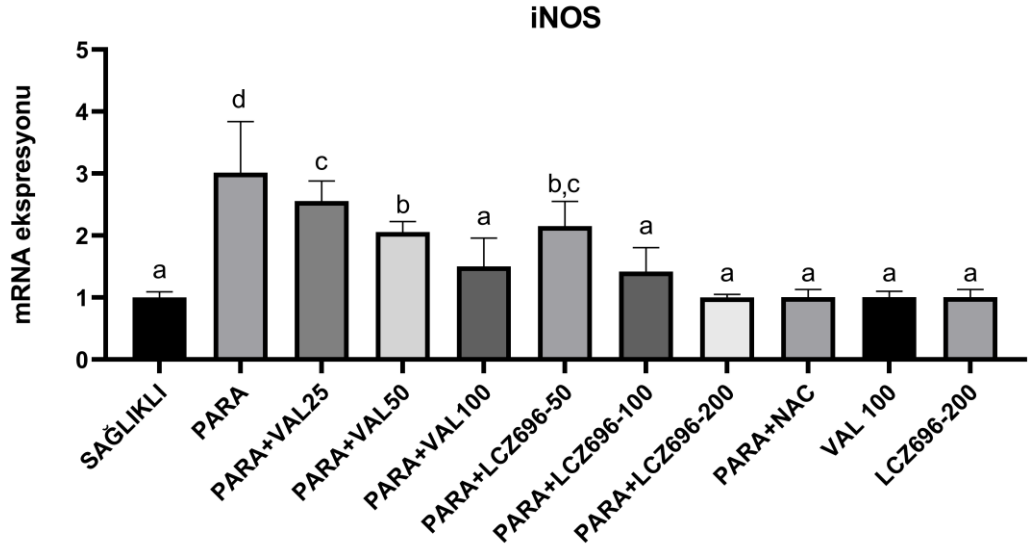
karşılaştırıldığında IL-1 β mRNA ekspresyonu artmış olmasına rağmen doza bağlı olarak düşüş gözlemlenmiş hatta PARA+LCZ696-200 grubu Sağlıklı grubuyla benzer ekspresyon göstermiştir. PARA+VAL ve PARA+LCZ 696 grupları kıyaslandığında en yüksek ekspresyon PARA+VAL25 grubunda en düşük ekspresyon PARA+LCZ696-200 grubunda ölçülmüştür. VAL100, PARA+LCZ696-200, LCZ696-200, PARA+NAC ve Sağlıklı grup IL-1 β mRNA ekspresyonları benzer olarak ölçülmüştür.(Şekil 4.7).



Şekil 4.9. IL-1 β ölçümlerine ait grafik

İnflamasyon belirteci bakıldığında en düşük PARA+ LCZ696-200 grubunda en yüksek PARA grubunda ölçülmüştür. PARA grubuyla PARA+VAL grubu kıyaslandığında en yüksek iNOS mRNA ekspresyonunun PARA+VAL 25 grubunda olduğu ve doza bağlı olarak düşüş gözlemlenmiştir. PARA+LCZ696 gruplarında iNOS mRNA ekspresyonlarında doza bağlı olarak düşüş gözlemlenmiştir. PARA grubuyla PARA+LCZ696 grubu kıyaslandığında ölçümlerin oldukça düşüş gösterdiği ve en düşük iNOS mRNA ekspresyonunun PARA+LCZ696-200 grubunda ölçülmüştür.

PARA+NAC, VAL100, LCZ696-200, Sağlıklı grubu iNOS mRNA ekspresyonu benzer olarak ölçülmüştür. (Şekil 4.8.).



Şekil 4.10. iNOS ölçümlerine ait grafik

5.TARTIŞMA

Bu çalışmada sıçanlarda parasetamolle oluşturulan hepatotoksisite modelinde Anjiyotensin-1 reseptör blokörü Valsartan ve Anjiyotensin-1 reseptör blokörü ve neprilisin inhibitörü LCZ696'nın olası hepatoprotektif etki mekanizması araştırıldı. Bu bağlamda LCZ696 ve Valsartan üç farklı dozda uygulanarak ALT, AST, SOD, GSH, MDA, ADE, NEP düzeyleri biyokimyasal yöntemlerle, TNF- α , IL-1 β , iNOS düzeyleri moleküler düzeyde incelendi.

Çalışmada 2g/kg parasetamol dozu literatüre uygun olarak seçilerek, deneysel hepatotoksisite modeli oluşturulmuştur (Chattopadhyay, 2003; Kuralay ve ark., 1998). Literatüre bakıldığında LCZ696'nın deney hayvanlarında yapılan kronik çalışmalarda çok farklı düşük dozlarda kullanıldığı görülmektedir (Chaumais ve ark., 2021; Habibi ve ark., 2019). LCZ696'nın insanlarda başlangıç günlük dozu 50-100 mg olduğu bilinmektedir (Polina ve ark., 2020) . Hsu Shao-Jung ve arkadaşları portal hipertansif sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada LCZ696'nın insan dozu olan 50 mg/kg karşısında 25 mg/kg Valsartan'ın etkilerini incelemişlerdir (Hsu ve ark., 2020) . Bu nedenlerle literatürde bir ilk olarak LCZ696'yı akut bir çalışma olan parasetamolle oluşturulan karaciğer hasarı modelinde kullanarak dozlarımızı düşük (50mg/kg), orta (100mg/kg) ve yüksek doz (200mg/kg) olarak çalıştık. LCZ696 1:1 oranında neprilisin inhibitörü olan sakubitril ve anjiyotensin reseptör blokörü olan Valsartanın kombinasyonu olduğundan (Gu ve ark., 2010) Valsartan dozları da 25mg/kg, 50mg/kg, 100 mg/kg olacak şekilde hazırlandı.

Karaciğer hastalıklarının teşhisi ve tedavisinde kullanılan önemli belirteçler ALT ve AST enzimleridir (Price & Alberti, 1979). Yüksek doz parasetamol alımı sonucunda, 24-72 saat içinde karaciğer hasarının göstergesi olarak ALT ve AST seviyeleri yükselir. Bu aminotransferaz enzimlerinin yükselmesinin derecesi kabaca hepatoselüler hasarın

derecesine karşılık gelmektedir (Larson, 2007). Kamanaka ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada parasetamolle oluşturulan toksisite modelinde ALT ve AST değerleri toksik grupta kontrol gruplarına göre önemli derecede artış göstermiştir (Kamanaka ve ark., 2003). Yine literatürde yapılan başka bir araştırmaya göre sıçanlarda oral yolla parasetamolle toksisite oluşturulmuş ve toksisite gruplarında ALT ve AST enzimlerinde belirgin artış saptanmıştır (Ayenew & Wasihun, 2023).

Yaptığımız çalışmada parasetamol intoksikasyonu sonrası sıçanlardan alınan kan örneklerinden yapılan ölçümlerde PARA grubunda ALT ve AST seviyelerinde sağlıklı gruba göre önemli derecede artış olduğu gösterildi. İlaç uygulanan gruplara bakıldığında, Valsartan 25mg/kg grubunda ALT ve AST seviyeleri PARA grubuna oldukça yakın bulunmuştur. Artan Valsartan dozuna bağlı olarak ALT ve AST seviyeleri düşmüş ve hepatotoksisite azalmıştır. Literatürde yapılan bir araştırmaya göre karbontetraklorürle oluşturulan hepatotoksistide Valsartan uygulaması ALT ve AST seviyelerini oldukça düşürmüştür (Xu ve ark., 2006). Bulgularımız literatürle uyumludur. LCZ696 uygulaması ALT ve AST değerlerini oldukça düşürmüş ve LCZ696 200 mg/kg dozunda ALT ve AST değerleri neredeyse sağlıklı gruba yaklaşmıştır. LCZ696 200 mg/kg dozundaki ALT değeri spesifik tedavi grubu olarak görülen PARA+NAC grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Alınan sonuçlara göre LCZ696 uygulaması tek başına Valsartana kıyasla hepatotoksisite üzerinde daha başarılı etki göstermiştir. Burdan hareketle tek başına Anjiyotensin-1 reseptörü inhibisyonundan ziyade neprilisin ve AT1-R inhibisyonunun daha etkili olduğu görülmektedir.

Tüm biyolojik sistemler, yaşam için uygun koşulları elde etmek için oksidatif ve indirgeyici reaksiyonları dengeleyen bir düzende tutulurlar. Bu denge oksitleyici moleküllerin kaybı ya da aşırı birikmesi nedeniyle bozulur. Reaktif oksijen türleri (ROT) hücrelerdeki yaygın oksidanlardan bazılarıdır. ROT, moleküler oksijenin süperoksit (O_2),

hidrojen peroksit (H_2O_2), lipid peroksitler (ROOH) veya karşılık gelen hidroksil ($HO\cdot$) ve peroksil radikallerine (ROO $\cdot$) kısmi indirgenmesiyle oluşur. Lipitler, hücre zarlarının bütünlüğünü korumaktan sorumlu olduğundan, lipidlerin aşırı peroksidasyonu, lipid zarların bileşimini, yapısını ve dinamiklerini değiştirir. Lipit peroksitler ayrıca daha fazla ROT oluşumunu yayabilir veya DNA ve proteinleri çapraz bağlayabilen reaktif bileşiklere dönüşebilirler (Ricciotti & FitzGerald, 2011; Turini & DuBois, 2002). Yapılan çalışmalarda hücre zarında oluşan lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak MDA sıklıkla çalışılmaktadır. ROT oldukça reaktiftir ve çevrelerinde bulunan doymamış yağ asitlerine saldırır. Çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu malondialdehit oluşur. MDA lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak sıklıkla kullanılır (Tsikas, 2017).

Vücutta oksidatif stresin neden olduğu hasarların önlenmesi için bazı antioksidan sistemler bulunmaktadır. Bunlardan en iyi bilinenleri glutatyon ve süperoksit dismutaz olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu sistem serbest oksijen radikallerinin özellikle hücresel boyutta hasar oluşturmaya engel olarak homeostazı sağlamaktadır. Ancak bu antioksidan sistemlerin de aşırı oksidatif stres karşısında yetersiz kalabileceği unutulmamalıdır. Parasetamolün büyük bir kısmı karaciğerde glukronidasyon ve sülfonasyon reaksiyonları ile metabolize edilir, küçük bir kısmı ise oksidasyona uğrayarak oldukça reaktif metabolit olan N-asetil-p-benzokinonimin (NAPQI) oluşturur (Dahlin ve ark., 1984; Hodgman & Garrard, 2012). Parasetamolün metabolik aktivasyonunda karaciğer sitokrom P450 (CYP) enzimlerinin, özellikle CYP2E1 ve CYP3A4'ün, anahtar rol oynadığına inanılmaktadır (Patten ve ark., 1993; Thummel ve ark., 1993). Terapötik dozda parasetamol alındığında oluşan NAPQI, glutatyon (GSH) ile metabolize edilerek devre dışı bırakılır (Mitchell ve ark., 1973). Parasetamole bağlı gelişen hepatoksisitede, glutatyon (GSH) miktarının tükenmesinin sorumlu olduğu çok iyi bilinmektedir. Yüksek doz parasetamol alındığında GSH'nin hücre içi depoları tükenir.

GSH depoları normal değerlerin %30'undan daha azına tükendiğinde hepatosit hasarı tetiklenir. Bu tip hepatotoksisite, akut karaciğer yetmezliğine ve sonuçta ciddi mortalite ve morbiditeye yol açabilir (Ghanem ve ark., 2016). Parasetamol'ün hepatotoksisitedeki asıl mekanizmasının bu yolla olduğu dūřınılmaktadır (Bessems & Vermeulen, 2001). SOD (süperoksitdismutaz) süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir. Süperoksit gibi oldukça saldırgan bir radikalın etkisini ortadan kaldıran SOD, canlılarda önemli bir rol üstlenmiştir (McCord & Fridovich, 1970).

Çalışmamızda oksidatif stres ve hepatotoksisite arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla sıçanlardan alınan karaciğer dokularında SOD, GSH, MDA analizi yaptık. SOD sonuçlarına bakıldığında, Sağlıklı grubuna en yakın olan PARA+VAL100 ve PARA+LCZ696-200 gruplarıdır. Tek başına LCZ696 ve Valsartan uygulaması neredeyse aynı etkiyi göstermiş olup PARA+NAC grubuyla istatistiksel olarak benzerdir. Toksisite grubu olan PARA grubu en düşük SOD aktivitesi göstermiş olup, PARA+VAL25 grubu SOD aktivitesi de bu gruba yakın ölçülmüştür. SOD gibi antioksidan enzimler lipit peroksidazlar ya da reaktif oksijen ürünleri tarafından kolayca inaktive olurlar ve bu nedenle parasetamol toksisitesinde bu enzim aktivitelerinde azalmalar saptanır (Chularojmontri ve ark., 2005). Bulgularımız literatürle uyumludur. PARA+VAL gruplarında doza bağlı olarak SOD aktivitesinde artış görülmüştür. Valsartanın parasetamolle oluşturulan hepatotoksisite modeli üzerinde bir çalışması yoktur. Ancak yine bir anjiyotensin reseptör blokörü olan telmisartanın karbontetraklorürle oluşturulan hepatotoksisite deneyinde telmisartan uygulaması kontrol grubuna göre SOD seviyesinde artışa neden olmuştur (Atawia ve ark., 2017). PARA+LCZ696 gruplarında da benzer şekilde doza bağlı olarak SOD aktivitesinde artış görülmüştür. PARA+LCZ696-200 grubu SOD aktivitesi tedavi grubu olan PARA+NAC

grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek ölçülmüştür. PARA+LCZ696 grubu PARA+Valsartan grubuyla karşılaştırıldığında SOD aktivitesini önemli oranda artırmıştır. LCZ696'nın parasetamolle oluşturulan hepatotoksisite modeli üzerinde bir çalışması yoktur. Yapılan bir araştırmaya göre streptozosin ile indüklenen hiperglisemik ratlarda LCZ696 uygulaması Valsartana göre SOD seviyelerinde artış sağlamış ve hepatotoksisiteyi azaltmıştır (Alqahtani ve ark., 2020).

GSH sonuçlarına bakıldığında, PARA+VAL25 ve PARA+VAL50 gruplarındaki GSH düzeyi düşük olup istatistiksel olarak benzerdir. PARA+LCZ696-100 ve PARA+LCZ696-200 grupları en yüksek aktivite göstermiştir. PARA+LCZ696 uygulaması doza bağlı olarak GSH düzeylerinde yükselme göstermiştir. PARA+LCZ696-200 grubu GSH düzeyi, PARA+NAC grubundan daha yüksek olarak ölçülmüştür. SOD sonuçlarına benzer bir şekilde PARA+LCZ696 uygulaması PARA+VAL uygulamasından daha başarılı sonuç göstermiştir. Literatürde Valsartan ve LCZ696'nın parasetamolle indüklenen hepatotoksisitede GSH üzerine etkisini gösteren bir kayıt bulunamamıştır. Literatürde yapılan bir araştırmaya göre parasetamolle oluşturulan hepatotoksisitede anjiyotensin reseptör blokörü olan irbesartan uygulanması GSH seviyelerinde yükselme göstermiştir (Helal & Samra, 2020). Yine literatürde yapılan başka bir araştırmaya göre sıçanlarda oluşturulan hepatik iskemi modelinde operasyon öncesi Valsartan tedavisi GSH seviyesinde yükselme sağlamıştır (Abdelghany ve ark., 2015). Başka bir çalışmaya göre streptozosin ile indüklenen hiperglisemik ratlarda LCZ696 uygulaması Valsartana göre GSH seviyelerinde artış sağlamış ve hepatotoksisiteyi azaltmıştır (Alqahtani ve ark., 2020). Bulgular literatürle uyumluluk göstermektedir.

Oksidatif stres göstergesi olarak MDA sonuçlarına bakıldığında, en yüksek ölçüm PARA+VAL25 ve PARA+LCZ696-50 gruplarında ölçülmüş olup istatistiksel olarak

benzerdir. PARA+NAC, VAL100, LCZ696-200 grupları MDA ölçümleri de kendi aralarında istatistiksel olarak benzerdir. PARA+VAL ve PARA+LCZ696 gruplarında doza bağlı olarak MDA seviyelerinde azalma görülmüştür. Diğer ölçümlerde olduğu gibi PARA+LCZ696 grubu PARA+VAL grubuna kıyasla doku hasarını daha az seviyeye indirmiştir. Literatürde Valsartan ve LCZ696'nın parasetamolle indüklenen hepatotoksisitede MDA üzerine etkisini gösteren bir kayıt bulunamamıştır. Yapılan bir araştırmaya göre 5/6 oranında nefrektomi yapılmış ratlarda LCZ 696 uygulaması oksidatif stresi ve böbrek fonksiyonlarını iyileştirmiştir. Tek başına Valsartanla uygulanan tedaviye göre LCZ 696 daha etkili bulunmuştur (Jing ve ark., 2017).

İnflamatuvar bir süreç olduğu bilinen hepatotoksisitede çeşitli uyaranlar tarafından Nitrik Oksit (NO) sentaz indüklenebilir (Kamanaka ve ark., 2003). Endotel hücreleri tarafından salınan NO'nin vasküler bütünlüğün korunmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir, ana etkisi vasküler gevşemenin indüklenmesidir (Yuan ve ark., 2006). Genel olarak, karaciğer endotel hücrelerinde eNOS'dan türetilen NO, hastalık gelişimine karşı koruyucu iken, iNOS kaynaklı NO patolojik süreçlere katkıda bulunur (Iwakiri & Kim, 2015). Oluşan hasarın değerlendirilmesinde genellikle iNOS parametresi çalışılmaktadır.

Yapılan çalışmada iNOS parametresi de ölçülmüştür. PARA grubunda en yüksek iNOS mRNA ekspresyonu gözlemlenmiştir. PARA+VAL gruplarında ve PARA+LCZ696 gruplarında artan doza bağlı olarak iNOS ekspresyonunda düşüş gözlemlenmiştir. Parasetamolün iNOS üzerindeki etkisini en iyi gideren grup PARA+LCZ696-200 grubu olmuştur. PARA+NAC ve LVC696-200 grubu eşit iNOS ekspresyonu göstermişlerdir. VAL100 grubu Sağlıklı grubuyla neredeyse aynı seviyede ekspresyon göstermiştir. PARA+LCZ696 grubu PARA+VAL grubuna kıyasla parasetamolün iNOS üzerindeki etkisini gidermede daha başarılı bulunmuştur. Literatürde

Valsartan ve LCZ696'nın parasetamolle indüklenen hepatotoksisitede iNOS ekspresyonu üzerine etkisini gösteren bir kayıt bulunamamıştır. Yapılan bir araştırmaya göre sıçanlarda metotreksatla oluşturulmuş hepatotoksisite modelinde, bir anjiyotensin reseptör blokörü olan telmisartan uygulanması toksisite grubuna göre iNOS ekspresyonunu oldukça düşürmüştür (Kelleni ve ark., 2016). Bulgularımız literatürle uyumludur.

Sitokinler, çeşitli hücrelerden (lenfositler, makrofajlar, doğal öldürücü (NK) hücreler, mast hücreleri ve stromal hücreler) salgılanan, düşük moleküler ağırlıklı proteinlerdir (Kulbe ve ark., 2012; O'Shea & Murray, 2008). Görevlerine bağlı olarak sitokinler proinflamatuvar veya antiinflamatuvar olarak sınıflandırılabilir (Sprague & Khalil, 2009). IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α ve interferonlar proinflamatuvar sitokinler olup inflamatuvar reaksiyonları kolaylaştırırlar. Antiinflamatuvar sitokinler olan IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13, IL-1 reseptör antagonisti (IL-1RA) ve TGF- β ise inflamasyonu inhibe eder ve bağışıklığı baskılar (Boshtam ve ark., 2017). Interlökin-1 (IL-1) sitokin ailesi, birçok akut ve kronik hepatotoksisitede önemli rol oynamaktadır (Barbier ve ark., 2019). Yapılan çalışmalarda da gösterildiği üzere parasetamolle oluşturulan hepatotoksisite de doğal immün yanıtın bir göstergesi olarak proinflamatuvar sitokinlerden özellikle IL-1 β seviyesi incelenmiştir (Guo ve ark., 2019). Tümör nekroz faktörü (TNF), mononükleer fagositlerden salınan TNF- α ve lenfositlerden salınan TNF- β olmak üzere ikiye ayrılır (Beutler & Cerami, 1989): TNF- α ; makrofajlar, dendritik hücreler, T lenfositler ve NK hücreleri tarafından sentez edilen, enfeksiyöz ve malign hastalıklara karşı savunmada önemli bir rol oynayan proinflamatuvar bir sitokindir (Idriss & Naismith, 2000). TNF- α parasetamol gibi çeşitli hepatotoksik maddelerin akut faz yanıtlarına aracılık eden önemli proinflamatuvar sitokinlerden biridir (Bradham ve ark.,

1998). Hepatotoksisite inflamatuvur bir süreç olduğundan inflamatuvur stokinler olan TNF- α , IL-1 β seviyelerinin ölçülmesiyle de hasar durumu belirlenmiş olacaktır.

TNF- α ölçümlerine baktığımızda, en yüksek ölçüm PARA+VAL25 grubunda gösterilmiştir. PARA+VAL gruplarında doza bağlı düşüş gözlemlenmesine rağmen PARA+LCZ696 grubu açık şekilde üstünlük sağlamıştır. Sağlıklı grubuna en yakın ölçüm PARA+LCZ696 ve LCZ696-200 grubu olup parasetamolün TNF- α üzerindeki etkisini önemli ölçüde azaltmıştır. Literatürde Valsartan ve LCZ696'nın parasetamolle indüklenen hepatotoksisitede TNF- α ekspresyonu üzerine etkisini gösteren bir kayıt bulunamamıştır. Literatürde yapılan bir çalışmaya göre ratlarda tiyoasetamid ile oluşturulan hepatotoksisite modelinde bir anjiyotensin reseptör blokörü olan eprosartan uygulaması TNF- α ekspresyonunu oldukça azaltmıştır (Shaban ve ark., 2022). Literatürde yapılan başka bir araştırmada parasetamolle oluşturulmuş hepatotoksisite modelinde telmisartan uygulaması toksisite grubuna göre TNF- α ekspresyonunu oldukça düşürmüştür (Fouad ve ark., 2012). Ratlarda yapılan başka bir araştırmaya göre streptozosinle indüklenen diyabette LCZ 696 uygulaması TNF- α ekspresyonunda düşüşe neden olmuştur. Bulgularımız literatürle uyumludur.

Yapılan çalışmada IL-1 β parametresi en çok PARA grubunda artmıştır. Sağlıklı grubuna en yakın IL-1 β seviyesi VAL100 ve PARA+NAC gruplarında ölçülmüştür. IL-1 β seviyesi PARA+VAL gruplarında doza bağlı düşmesine rağmen Sağlıklı gruba yaklaşmamıştır. PARA+LCZ696 gruplarında da doza bağlı düşüş gözlemlenmiş olup PARA+LCZ696-200 grubu Sağlıklı gruba eş değer IL-1 β ekspresyonu göstermiştir. Literatürde Valsartan ve LCZ696'nın parasetamolle indüklenen hepatotoksisitede IL-1 β ekspresyonu üzerine etkisini gösteren bir kayıt bulunamamıştır. Literatürde yapılan bir araştırmada streptozosinle indüklenen diyabette LCZ 696 uygulaması valsartana göre IL-1 β ekspresyonunu daha çok azaltmıştır (Mohany ve ark., 2020).

Sitokinlerin hepatotoksisite de önemli rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan çalışmada LCZ696'nın sitokin üretimini azaltmasındaki başarısı Valsartandan daha üstün bulunmuştur.

Bir sakubitril/Valsartan kombinasyonu olan LCZ696 , hem AT-II inhibisyonu hem nötral endopeptidaz inhibisyonu yapıp, vazokonstriksiyonu engelleyerek etki gösterir. LCZ 696 içeriğindeki sakubitril, neprilisin inhibitörüdür (Solomon ve ark., 2012). NEP inhibitörlerinin ANP seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir ve bu nedenle hipertansiyon ve kalp yetmezliği dahil olmak üzere bir dizi kardiyovasküler hastalığın tedavisi için faydalı etkilere sahiptir(Gu ve ark., 2010). ANP'nin, vazodilatasyon, natriürez ve diürez dahil olmak üzere kalp yetmezliğinde potansiyel olarak faydalı fizyolojik etkiler sağladığı tanımlanmıştır, ancak neprilisin tarafından hızla parçalanır. Neprilisin inhibisyonunda amaç yararlı vazodilatör etkilerinin daha uzun sürmesine izin vermek için natriüretik peptidlerin parçalanmasını en aza indirmektir. Neprilisin aynı zamanda vazokonstriktörlerinde (Anjiyotensin I, II ve Endotelin-1) parçalanmasına neden olur. Bu yüzden kalp yetmezliği ve hipertansiyon tedavisinde anjiyotensin reseptör blokörleriyle kombine olarak kullanılmaktadır (Kang & Banerjee, 2017). Sakubitril hem vazokonstürktör hem vazodilatör etkili olduğundan tek başına tedavide kullanılmaz. Neprilisin inhibitörleri ile anjiyotensin reseptör blokörleri kombine olarak kullanılır ve ARNi olarak bilinir (Sagnella, 2002). Neprilisin inhibitörü-Anjiyotensin reseptör blokörü, sakubitril / Valsartan, NEP'i inhibe ederek eş zamanlı natriüretik peptit seviyesini artırır ve anjiyotensin II reseptörünü bloke ederek RAAS'ı inhibe eder (Singh ve ark., 2017). Valsartan, AT1-R' yi seçici olarak bloke ederek Anjiyotensin II bağımlı aldesteron salınımını inhibe eder. AT-1R'nin blokajı vazokonstriksiyonu, sodyum ve su tutulmasını ve miyokardiyal hipertrofiyi azaltır (Dargad ve ark., 2018).

Yaptığımız çalışmada ADE ve NEP seviyelerini ölçerek RAAS yolağının hepatotoksitedeki etkisi incelenmiştir. En yüksek ADE düzeyi PARA grubunda ölçülmüştür. PARA+VAL ve PARA+LCZ696 gruplarında artan doza bağlı olarak ADE seviyelerinde düşüş gözlemlenmiştir. En düşük ADE seviyesi PARA+LCZ696-200 grubunda ölçülmüştür. Aynı şekilde NEP düzeylerine bakıldığında en yüksek PARA grubunda ölçülmüştür. PARA+VAL ve PARA+LCZ696 gruplarında doza bağlı olarak NEP seviyesinde düşme gözlemlenmiştir. En düşük NEP seviyesi PARA+LCZ696-200 grubunda ölçülmüştür. PARA+LCZ696 grupları PARA+VAL gruplarına kıyasla daha fazla ADE ve NEP inhibisyonu yaparak, hepatoprotektif etkiyi artırmıştır.

Günümüzde parasetamol zehirlenmelerinde ortaya çıkan ciddi karaciğer hasarında kabul edilmiş tek tedavi seçeneği olarak NAC(N-Asetilsistein) karşımıza çıkmaktadır. Ancak genellikle ilk birkaç saat içinde uygulandığı zaman etkili olabilmekte ve her hastada da aynı yanıt alınamamaktadır (Ghanem ve ark., 2016). Bu nedenle parasetamolün neden olduğu karaciğer hasarının tedavisinde veya önlenmesi ile ilgili literatürde çok sayıda ve güncel insan ve deney hayvanı çalışması bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan bir araştırmaya göre STZ ile indüklenen hiperglisemik sıçanlarda, LCZ696'nın uygulanması karaciğer fonksiyonlarını iyileştirmiş ve antioksidan enzimleri yükseltmiştir. Ayrıca Valsartan grubuyla karşılaştırıldığında antioksidan parametreleri belirgin ölçüde artırmıştır (Alqahtani ve ark., 2020). Yapılan bir araştırmaya göre 5/6 oranında nefrektomi yapılmış ratlarda LCZ 696 uygulaması oksidatif stresi ve böbrek fonksiyonlarını iyileştirmiştir. Tek başına Valsartanla uygulanan tedaviye göre LCZ 696 daha etkili bulunmuştur (Jing ve ark., 2017). Ratlarda yapılan başka bir araştırmaya göre streptozosinle indüklenen diyabette LCZ 696 uygulaması inflamatuvar sitokin düzeyinde belirgin düşüş sağlamıştır (Mohany ve ark., 2020). Yeni bir araştırmaya göre de izoproterenolle indüklenmiş akut kalp yetmezliği modelinde LCZ 696 uygulanması

miyokardiyal hasarı önemli ölçüde iyileştirerek kalp yetmezliğine bağlı oksidatif stresi azaltmıştır (Hou ve ark., 2022). Yapılan güncel bir araştırmaya göre renin inhibitörü aliskrenin parasetamol toksisitesinde etkili olduğu gösterilmiştir (Karcioglu ve ark., 2016). Yine literatürde yapılan çalışmalarda, anjiyotensin reseptör blokörü Valsartanın karbontetraklorür ile oluşturulan hepatotoksistede etkili olduğu belirtilmiştir (Xu ve ark., 2006).

Valsartanın hepatoprotektif özelliği diyabet ve karbon tetra klorür ile oluşturulmuş karaciğer hasarında çalışılmış olmasına rağmen, Valsartanın parasetamol ile oluşturulan karaciğer toksisite modelinde etkisini gösteren herhangi bir literatür bilgisi yoktur (Alqahtani ve ark., 2020; Xu ve ark., 2006). Ayrıca kullanacağımız sakubitril/valsartan kombinasyonu olan LCZ 696'nın da herhangi bir karaciğer toksisite modeli üzerine etkilerini araştıran bir literatür bilgisine rastlanmamıştır. Dolayısıyla ne valsartanın, ne de LCZ 696'nın parasetamol ile oluşturulan karaciğer harabiyetine etkisi bilinmemektedir. Aynı zamanda LCZ696'nın valsartana üstün olup olmadığı da araştırılmamıştır. Yapılmış araştırmalar, LCZ 696 'nın iflamasyonu azaltıp, oksidatif stresi baskıladığını gösterdiği için, inflamatuvar ve oksisatif strese bağımlı olarak gelişen bir süreç olan hepatotoksistede bu ilaçların etkili olabileceği akla gelmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada sıçanlarda parasetamolle oluşturulmuş hepatotoksisite modeli üzerinde AT-1 reseptör blokörü Valsartan ve AT-1 reseptör blokörü, neprilisin inhibitörü LCZ696'nın muhtemel hepatoprotektif etkisini deneysel olarak inceledik. Elde edilen bulgulara göre LCZ696 ve Valsartanın karaciğer toksisitesine karşı koruyuculuğun doza bağlı olarak artış gösterdiğini belirledik. LCZ696 grubu hem ALT, AST enzim seviyelerinde hem de SOD, GSH, MDA oksidan-antioksidan parametrelerinde Valsartan grubuna göre Sağlıklı grubuna daha fazla yakınlaşmış ve daha güçlü bir koruyuculuk sergilemiştir. Ayrıca yaptığımız moleküler çalışmalarda da LCZ696 koruyuculuğu açık şekilde gösterilmiştir.

Çalışmada alınan veriler doğrultusunda LCZ696 ve valsartanın parasetamol toksisitesi üzerindeki tedavi edici etkilerinin NAC ile karşılaştırılabilir seviyede olduğu gösterilmiştir. Hepatoprotektif etkinin hem inflamasyonun baskılanması hem de oksidan-antioksidan dengesinin antioksidan lehine sağlanmasından kaynaklı olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak LCZ696'nın koruyuculuğu ispatlanmıştır. Etki mekanizmasının tam olarak aydınlatılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKÇA

- Abdel-ghany, S., Abdel-Malek Elashry, H., Mohamad Ameen, M., Mohamed Abd-El Rhman, K., & Abdel-Fatah Yassin, A.-R. 2015. POTENTIAL EFFECT OF CAPTOPRIL, VALSARTAN ON NUCLEAR FACTOR KAPPA B AND LIPID PEROXIDATION IN HEPATIC ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY IN RATS. *Mansoura Medical Journal*, 44(1), 169-193.
- Agarwal, A., & Prabakaran, S. A. 2005. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J Exp Biol*, 43(11), 963-974.
- Agrawal, S., & Khazaeni, B. 2022. Acetaminophen Toxicity. In *StatPearls*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28722946>
- Ahmed, B., Dwivedi, S., Abdin, M. Z., Azam, A., Al-Shaeri, M., Khan, M. S., Saquib, Q., Al-Khedhairi, A. A., & Musarrat, J. 2017. Mitochondrial and Chromosomal Damage Induced by Oxidative Stress in Zn(2+) Ions, ZnO-Bulk and ZnO-NPs treated Allium cepa roots. *Sci Rep*, 7, 40685.
- Akdoğan, M., & Yöntem, M. 2018. Sitokinler. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(1), 36-45.
- Alloui, A., Chassaing, C., Schmidt, J., Ardid, D., Dubray, C., Cloarec, A., & Eschalier, A. 2002. Paracetamol exerts a spinal, tropisetron-reversible, antinociceptive effect in an inflammatory pain model in rats. *Eur J Pharmacol*, 443(1-3), 71-77.
- Alqahtani, F., Mohany, M., Alasmari, A. F., Alanazi, A. Z., Belali, O. M., Ahmed, M. M., & Al-Rejaie, S. S. 2020. Angiotensin II receptor Neprilysin inhibitor (LCZ696) compared to Valsartan attenuates Hepatotoxicity in STZ-induced hyperglycemic rats. *Int J Med Sci*, 17(18), 3098-3106.

- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(17), 7915-7922.
- Ando, S., Rahman, M. A., Butler, G. C., Senn, B. L., & Floras, J. S. 1995. Comparison of candoxatril and atrial natriuretic factor in healthy men. Effects on hemodynamics, sympathetic activity, heart rate variability, and endothelin. *Hypertension*, 26(6 Pt 2), 1160-1166.
- Atawia, R. T., Esmat, A., Elsherbiny, D. A., & El-Demerdash, E. 2017. Telmisartan ameliorates carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. *Environ Toxicol*, 32(2), 359-370.
- Atlas, S. A. 2007. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm*, 13(8 Suppl B), 9-20.
- Aydin, M. M., & Akcali, K. C. 2018. Liver fibrosis. *Turk J Gastroenterol*, 29(1), 14-21.
- Ayenew, K. D., & Wasihun, Y. 2023. Hepatoprotective effect of methanol extract of *Agave americana* leaves on paracetamol induced hepatotoxicity in Wistar albino rats. *BMC Complement Med Ther*, 23(1), 99.
- Ayoub, S. S., Colville-Nash, P. R., Willoughby, D. A., & Botting, R. M. 2006. The involvement of a cyclooxygenase 1 gene-derived protein in the antinociceptive action of paracetamol in mice. *Eur J Pharmacol*, 538(1-3), 57-65.
- Balkwill, F. 2002. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev.*, 13, 135-141.
- Barbier, L., Ferhat, M., Salame, E., Robin, A., Herbelin, A., Gombert, J. M., Silvain, C., & Barbarin, A. 2019. Interleukin-1 Family Cytokines: Keystones in Liver Inflammatory Diseases. *Front Immunol*, 10, 2014.
- Baruch, L., Anand, I., Cohen, I. S., Ziesche, S., Judd, D., & Cohn, J. N. 1999. Augmented short- and long-term hemodynamic and hormonal effects of an angiotensin

- receptor blocker added to angiotensin converting enzyme inhibitor therapy in patients with heart failure. Vasodilator Heart Failure Trial (V-HeFT) Study Group. *Circulation*, 99(20), 2658-2664.
- Bataller, R., Gabele, E., Parsons, C. J., Morris, T., Yang, L., Schoonhoven, R., Brenner, D. A., & Rippe, R. A. 2005. Systemic infusion of angiotensin II exacerbates liver fibrosis in bile duct-ligated rats. *Hepatology*, 41(5), 1046-1055.
- Bataller, R., Gabele, E., Schoonhoven, R., Morris, T., Lehnert, M., Yang, L., Brenner, D. A., & Rippe, R. A. 2003. Prolonged infusion of angiotensin II into normal rats induces stellate cell activation and proinflammatory events in liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 285(3), G642-651.
- Baxter, G. F. 2004. The natriuretic peptides. *Basic Res Cardiol*, 99(2), 71-75.
- Benson, G. D., Koff, R. S., & Tolman, K. G. 2005. The therapeutic use of acetaminophen in patients with liver disease. *Am J Ther*, 12(2), 133-141.
- Bernal, W., Wendon, J., Rela, M., Heaton, N., & Williams, R. 1998. Use and outcome of liver transplantation in acetaminophen-induced acute liver failure. *Hepatology*, 27(4), 1050-1055.
- Bertolini, A., Ferrari, A., Ottani, A., Guerzoni, S., Tacchi, R., & Leone, S. 2006. Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS Drug Rev*, 12(3-4), 250-275.
- Bessems, J. G., & Vermeulen, N. P. 2001. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Crit Rev Toxicol*, 31(1), 55-138.
- Beutler, B., & Cerami, A. 1989. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol*, 7, 625-655.

- Bhagat, A. A., Greene, S. J., Vaduganathan, M., Fonarow, G. C., & Butler, J. 2019. Initiation, Continuation, Switching, and Withdrawal of Heart Failure Medical Therapies During Hospitalization. *JACC Heart Fail*, 7(1), 1-12.
- Bjorkman, R. 1995. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. Experimental studies in the rat. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl*, 103, 1-44.
- Boshtam, M., Asgary, S., Kouhpayeh, S., Shariati, L., & Khanahmad, H. 2017. Aptamers Against Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review. *Inflammation*, 40(1), 340-349.
- Botting, R. M. 2006. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *J Physiol Pharmacol*, 57 Suppl 5, 113-124.
- Boveris, A., & Chance, B. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*, 134(3), 707-716.
- Bradham, C. A., Plumpe, J., Manns, M. P., Brenner, D. A., & Trautwein, C. 1998. Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am J Physiol*, 275(3), G387-392.
- Brodie, B. B., & Axelrod, J. 1948. The fate of acetanilide in man. *J Pharmacol Exp Ther*, 94(1), 29-38.
- Brok, J., Buckley, N., & Glud, C. 2006. Interventions for paracetamol (acetaminophen) overdose. *Cochrane Database Syst Rev*(2), CD003328.
- Brough, D., & Rothwell, N. J. 2007. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. *J Cell Sci*, 120(Pt 5), 772-781.
- Burcham, P. C., & Harman, A. W. 1991. Acetaminophen toxicity results in site-specific mitochondrial damage in isolated mouse hepatocytes. *J Biol Chem*, 266(8), 5049-5054.

- Burkhardt, K. K., Janco, N., Kulig, K. W., & Rumack, B. H. 1995. Cimetidine as adjunctive treatment for acetaminophen overdose. *Hum Exp Toxicol*, 14(3), 299-304.
- Burska, A., Boissinot, M., & Ponchel, F. 2014. Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*, 2014, 545493.
- Campbell, D. J. 2017. Long-term neprilysin inhibition—implications for ARNIs. *Nature Reviews Cardiology*, 14(3), 171-186.
- Chappell, D., Hofmann-Kiefer, K., Jacob, M., Rehm, M., Briegel, J., Welsch, U., Conzen, P., & Becker, B. F. 2009. TNF-alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Res Cardiol*, 104(1), 78-89.
- Chattopadhyay, R. R. 2003. Possible mechanism of hepatoprotective activity of *Azadirachta indica* leaf extract: part II. *J Ethnopharmacol*, 89(2-3), 217-219.
- Chaumais, M. C., Djessas, M. R. A., Thuillet, R., Cumont, A., Tu, L., Hebert, G., Gaignard, P., Huertas, A., Savale, L., Humbert, M., & Guignabert, C. 2021. Additive protective effects of sacubitril/valsartan and bosentan on vascular remodelling in experimental pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res*, 117(5), 1391-1401.
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, 49(3), 481-493.
- Chen, S. K., Hsu, C. H., Tsai, M. L., Chen, R. H., & Drummen, G. P. 2013. Inhibition of oxidative stress by low-molecular-weight polysaccharides with various functional groups in skin fibroblasts. *Int J Mol Sci*, 14(10), 19399-19415.
- Chiew, A. L., Gluud, C., Brok, J., & Buckley, N. A. 2018. Interventions for paracetamol (acetaminophen) overdose. *Cochrane Database Syst Rev*, 2(2), CD003328.

- Chiolero, A., Maillard, M., Nussberger, J., Brunner, H. R., & Burnier, M. 2000. Proximal sodium reabsorption: An independent determinant of blood pressure response to salt. *Hypertension*, 36(4), 631-637.
- Chularojmontri, L., Wattanapitayakul, S. K., Herunsalee, A., Charuchongkolwongse, S., Niumsakul, S., & Srichairat, S. 2005. Antioxidative and cardioprotective effects of *Phyllanthus urinaria* L. on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biol Pharm Bull*, 28(7), 1165-1171.
- Chung, Y., Chang, S. H., Martinez, G. J., Yang, X. O., Nurieva, R., Kang, H. S., Ma, L., Watowich, S. S., Jetten, A. M., Tian, Q., & Dong, C. 2009. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*, 30(4), 576-587.
- Cleland, J. G., & Swedberg, K. 1998. Lack of efficacy of neutral endopeptidase inhibitor ecdotril in heart failure. The International Ecdotril Multi-centre Dose-ranging Study Investigators. *Lancet*, 351(9116), 1657-1658.
- Colussi, D. M., Parisot, C., Rossolino, M. L., Brunner, L. A., & Lefevre, G. Y. 1997. Protein binding in plasma of valsartan, a new angiotensin II receptor antagonist. *J Clin Pharmacol*, 37(3), 214-221.
- Craig, D. G., Ford, A. C., Hayes, P. C., & Simpson, K. J. 2010. Systematic review: prognostic tests of paracetamol-induced acute liver failure. *Aliment Pharmacol Ther*, 31(10), 1064-1076.
- Craig, D. G., Lee, A., Hayes, P. C., & Simpson, K. J. 2010. Review article: the current management of acute liver failure. *Aliment Pharmacol Ther*, 31(3), 345-358.
- Crisan, D., & Carr, J. 2000. Angiotensin I-converting enzyme: genotype and disease associations. *J Mol Diagn*, 2(3), 105-115.

- Dahlin, D. C., Miwa, G. T., Lu, A. Y., & Nelson, S. D. 1984. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(5), 1327-1331.
- Dargad, R. R., Prajapati, M. R., Dargad, R. R., & Parekh, J. D. 2018. Sacubitril/valsartan: A novel angiotensin receptor-neprilysin inhibitor. *Indian Heart J*, 70 Suppl 1(Suppl 1), S102-S110.
- Dargan, P. I., & Jones, A. L. 2002. Acetaminophen poisoning: an update for the intensivist. *Crit Care*, 6(2), 108-110.
- De Mello, W. C. 2015. Chemical Communication between Heart Cells is Disrupted by Intracellular Renin and Angiotensin II: Implications for Heart Development and Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 6, 72.
- De Mello, W. C., & Frohlich, E. D. 2014. Clinical perspectives and fundamental aspects of local cardiovascular and renal Renin-Angiotensin systems. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 5, 16.
- Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., & Davies, M. J. 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*, 324 (Pt 1)(Pt 1), 1-18.
- Dinarello, C. A. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87(6), 2095-2147.
- Dinchuk, J. E., Liu, R. Q., & Trzaskos, J. M. 2003. COX-3: in the wrong frame in mind. *Immunol Lett*, 86(1), 121.
- Doran, D. E., Weiss, D., Zhang, Y., Griendling, K. K., & Taylor, W. R. 2007. Differential effects of AT1 receptor and Ca²⁺ channel blockade on atherosclerosis, inflammatory gene expression, and production of reactive oxygen species. *Atherosclerosis*, 195(1), 39-47.

- Drenjancevic-Peric, I., Jelakovic, B., Lombard, J. H., Kunert, M. P., Kibel, A., & Gros, M. 2011. High-salt diet and hypertension: focus on the renin-angiotensin system. *Kidney Blood Press Res*, 34(1), 1-11.
- Dussaule, J. C., Stefanski, A., Bea, M. L., Ronco, P., & Ardaillou, R. 1993. Characterization of neutral endopeptidase in vascular smooth muscle cells of rabbit renal cortex. *Am J Physiol*, 264(1 Pt 2), F45-52.
- El-Demerdash, E., Salam, O. M., El-Batran, S. A., Abdallah, H. M., & Shaffie, N. M. 2008. Inhibition of the renin-angiotensin system attenuates the development of liver fibrosis and oxidative stress in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 35(2), 159-167.
- Erdos, E. G., & Skidgel, R. A. 1989. Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *FASEB J*, 3(2), 145-151.
- Fala, L. 2015. Entresto (Sacubitril/Valsartan): First-in-Class Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibitor FDA Approved for Patients with Heart Failure. *Am Health Drug Benefits*, 8(6), 330-334.
- Farrell, S. E. *Acetaminophen Toxicity*. Access Date | URL
- Feener, E. P., Northrup, J. M., Aiello, L. P., & King, G. L. 1995. Angiotensin II induces plasminogen activator inhibitor-1 and -2 expression in vascular endothelial and smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 95(3), 1353-1362.
- Feng, L., Karpinski, P. H., Sutton, P., Liu, Y., Hook, D. F., Hu, B., Blacklock, T. J., Fanwick, P. E., Prashad, M., & Godtfredsen, S. 2012. LCZ696: a dual-acting sodium supramolecular complex. *Tetrahedron letters*, 53(3), 275-276.
- Flesch, G., Muller, P., & Lloyd, P. 1997. Absolute bioavailability and pharmacokinetics of valsartan, an angiotensin II receptor antagonist, in man. *Eur J Clin Pharmacol*, 52(2), 115-120.

- Forrest, J. A., Clements, J. A., & Prescott, L. F. 1982. Clinical pharmacokinetics of paracetamol. *Clin Pharmacokinet*, 7(2), 93-107.
- Fouad, A. A., Al-Mulhim, A. S., Jresat, I., & Gomaa, W. 2012. Therapeutic role of telmisartan against acetaminophen hepatotoxicity in mice. *Eur J Pharmacol*, 693(1-3), 64-71.
- Friedman, S. L. 2008. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*, 134(6), 1655-1669.
- Fu, J. Y., Masferrer, J. L., Seibert, K., Raz, A., & Needleman, P. 1990. The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem*, 265(28), 16737-16740.
- Gemborys, M. W., Mudge, G. H., & Gribble, G. W. 1980. Mechanism of decomposition of N-hydroxyacetaminophen, a postulated toxic metabolite of acetaminophen. *J Med Chem*, 23(3), 304-308.
- Ghanem, C. I., Perez, M. J., Manautou, J. E., & Mottino, A. D. 2016. Acetaminophen from liver to brain: New insights into drug pharmacological action and toxicity. *Pharmacol Res*, 109, 119-131.
- Graf, K., Koehne, P., Grafe, M., Zhang, M., Auch-Schwelk, W., & Fleck, E. 1995. Regulation and differential expression of neutral endopeptidase 24.11 in human endothelial cells. *Hypertension*, 26(2), 230-235.
- Graham, G. G., Scott, K. F., & Day, R. O. 2005. Tolerability of paracetamol. *Drug Saf*, 28(3), 227-240.
- Gu, J., Noe, A., Chandra, P., Al-Fayoumi, S., Ligueros-Saylan, M., Sarangapani, R., Maahs, S., Ksander, G., Rigel, D. F., Jeng, A. Y., Lin, T. H., Zheng, W., & Dole, W. P. 2010. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of LCZ696, a novel dual-

- acting angiotensin receptor-neprilysin inhibitor (ARNi). *J Clin Pharmacol*, 50(4), 401-414.
- Guo, H., Sun, J., Li, D., Hu, Y., Yu, X., Hua, H., Jing, X., Chen, F., Jia, Z., & Xu, J. 2019. Shikonin attenuates acetaminophen-induced acute liver injury via inhibition of oxidative stress and inflammation. *Biomed Pharmacother*, 112, 108704.
- Gupta, S. K., Saxena, A., Singh, U., & Arya, D. S. 2005. Bosentan, the mixed ETA-ETB endothelin receptor antagonist, attenuated oxidative stress after experimental myocardial ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem*, 275(1-2), 67-74.
- Gutteridge, J. M. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, 41(12 Pt 2), 1819-1828.
- Habibi, J., Aroor, A. R., Das, N. A., Manrique-Acevedo, C. M., Johnson, M. S., Hayden, M. R., Nistala, R., Wiedmeyer, C., Chandrasekar, B., & DeMarco, V. G. 2019. The combination of a neprilysin inhibitor (sacubitril) and angiotensin-II receptor blocker (valsartan) attenuates glomerular and tubular injury in the Zucker Obese rat. *Cardiovasc Diabetol*, 18(1), 40.
- Haines, D. D., Juhasz, B., & Tosaki, A. 2013. Management of multicellular senescence and oxidative stress. *J Cell Mol Med*, 17(8), 936-957.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*, 219(1), 1-14.
- Harman, A. W., Kyle, M. E., Serroni, A., & Farber, J. L. 1991. The killing of cultured hepatocytes by N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) as a model of the cytotoxicity of acetaminophen. *Biochem Pharmacol*, 41(8), 1111-1117.
- Harrison, P. M., O'Grady, J. G., Keays, R. T., Alexander, G. J., & Williams, R. 1990. Serial prothrombin time as prognostic indicator in paracetamol induced fulminant hepatic failure. *BMJ*, 301(6758), 964-966.

- Helal, M. G., & Samra, Y. A. 2020. Irbesartan mitigates acute liver injury, oxidative stress, and apoptosis induced by acetaminophen in mice. *J Biochem Mol Toxicol*, 34(12), e22447.
- Hinz, B., & Brune, K. 2002. Cyclooxygenase-2--10 years later. *J Pharmacol Exp Ther*, 300(2), 367-375.
- Hitomi, H., Kiyomoto, H., & Nishiyama, A. 2007. Angiotensin II and oxidative stress. *Curr Opin Cardiol*, 22(4), 311-315.
- Hodgman, M. J., & Garrard, A. R. 2012. A review of acetaminophen poisoning. *Crit Care Clin*, 28(4), 499-516.
- Hou, M., Lu, L., Wu, X., & Liu, H. 2022. LCZ696 Ameliorates Isoproterenol-Induced Acute Heart Failure in Rats by Activating the Nrf2 Signaling Pathway. *Appl Bionics Biomech*, 2022, 6077429.
- Hsu, S. J., Huang, H. C., Chuang, C. L., Chang, C. C., Hou, M. C., Lee, F. Y., & Lee, S. D. 2020. Dual Angiotensin Receptor and Neprilysin Inhibitor Ameliorates Portal Hypertension in Portal Hypertensive Rats. *Pharmaceutics*, 12(4).
- Idriss, H. T., & Naismith, J. H. 2000. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*, 50(3), 184-195.
- Iwakiri, Y., & Kim, M. Y. 2015. Nitric oxide in liver diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 36(8), 524-536.
- Jacques, C., Gosset, M., Berenbaum, F., & Gabay, C. 2006. The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. *Vitam Horm*, 74, 371-403.
- Jaeschke, H., & Bajt, M. L. 2006. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicol Sci*, 89(1), 31-41.
- Jaeschke, H., Knight, T. R., & Bajt, M. L. 2003. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Lett*, 144(3), 279-288.

- Jensen, M. S., Rebordosa, C., Thulstrup, A. M., Toft, G., Sorensen, H. T., Bonde, J. P., Henriksen, T. B., & Olsen, J. 2010. Maternal use of acetaminophen, ibuprofen, and acetylsalicylic acid during pregnancy and risk of cryptorchidism. *Epidemiology*, 21(6), 779-785.
- Jing, W., Vaziri, N. D., Nunes, A., Suematsu, Y., Farzaneh, T., Khazaeli, M., & Moradi, H. 2017. LCZ696 (Sacubitril/valsartan) ameliorates oxidative stress, inflammation, fibrosis and improves renal function beyond angiotensin receptor blockade in CKD. *Am J Transl Res*, 9(12), 5473-5484.
- Jollow, D. J., Thorgeirsson, S. S., Potter, W. Z., Hashimoto, M., & Mitchell, J. R. 1974. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. VI. Metabolic disposition of toxic and nontoxic doses of acetaminophen. *Pharmacology*, 12(4-5), 251-271.
- Kabel, A. M. 2014. Relationship between cancer and cytokines. *J Cancer Res Treat*, 2(2), 41-43.
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. 2012. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*, 298, 229-317.
- Kamanaka, Y., Kawabata, A., Matsuya, H., Taga, C., Sekiguchi, F., & Kawao, N. 2003. Effect of a potent iNOS inhibitor (ONO-1714) on acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *Life Sci*, 74(6), 793-802.
- Kang, G., & Banerjee, D. 2017. Neprilysin Inhibitors in Cardiovascular Disease. *Curr Cardiol Rep*, 19(2), 16.
- Karcioglu, S. S., Palabiyik, S. S., Bayir, Y., Karakus, E., Mercantepe, T., Halici, Z., & Albayrak, A. 2016. The Role of RAAS Inhibition by Aliskiren on Paracetamol-Induced Hepatotoxicity Model in Rats. *J Cell Biochem*, 117(3), 638-646.

- Kaur, H., & Halliwell, B. 1994. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett*, 350(1), 9-12.
- Kayaalp, S. 2012. Antihipertansif İlaçlar. In S. Kayaalp (Ed.), *Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* (Vol. 2, pp. 388-389). Pelikan Yayıncılık.
- Kelleni, M. T., Ibrahim, S. A., & Abdelrahman, A. M. 2016. Effect of captopril and telmisartan on methotrexate-induced hepatotoxicity in rats: impact of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Toxicol Mech Methods*, 26(5), 371-377.
- Kim, W. R., Flamm, S. L., Di Bisceglie, A. M., Bodenheimer, H. C., & Public Policy Committee of the American Association for the Study of Liver, D. 2008. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. *Hepatology*, 47(4), 1363-1370.
- Kolakovic, A., Zivkovic, M., & Stankovic, A. 2017. Involvement of renin-angiotensin system in atherosclerosis. *Renin-angiotensin system: past, present and Future. London: IntechOpen*, 15-38.
- Kopp, U. 2011. Neural control of renin secretion rate. *Neural Control of Renal Function. San Rafael, CA: Morgan & Claypool Life Sciences*.
- Kostis, J. B., Packer, M., Black, H. R., Schmieder, R., Henry, D., & Levy, E. 2004. Omapatrilat and enalapril in patients with hypertension: the Omapatrilat Cardiovascular Treatment vs. Enalapril (OCTAVE) trial. *Am J Hypertens*, 17(2), 103-111.
- Kozer, E., & Koren, G. 2001. Management of paracetamol overdose: current controversies. *Drug Saf*, 24(7), 503-512.
- Kulbe, H., Chakravarty, P., Leinster, D. A., Charles, K. A., Kwong, J., Thompson, R. G., Coward, J. I., Schioppa, T., Robinson, S. C., Gallagher, W. M., Galletta, L.,

- Australian Ovarian Cancer Study, G., Salako, M. A., Smyth, J. F., Hagemann, T., Brennan, D. J., Bowtell, D. D., & Balkwill, F. R. 2012. A dynamic inflammatory cytokine network in the human ovarian cancer microenvironment. *Cancer Res*, 72(1), 66-75.
- Kumaran, K. S., & Prince, P. S. 2010. Caffeic acid protects rat heart mitochondria against isoproterenol-induced oxidative damage. *Cell Stress Chaperones*, 15(6), 791-806.
- Kuralay, F., Akarca, U. S., Ozutemiz, A. O., Kutay, F., & Batur, Y. 1998. Possible role of glutathione in prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity enhanced by fish oil in male Wistar rats. *J Toxicol Environ Health A*, 53(3), 223-229.
- Landmesser, U., Spiekermann, S., Preuss, C., Sorrentino, S., Fischer, D., Manes, C., Mueller, M., & Drexler, H. 2007. Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(4), 943-948.
- Larson, A. M. 2007. Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin Liver Dis*, 11(3), 525-548, vi.
- Larson, A. M., Polson, J., Fontana, R. J., Davern, T. J., Lalani, E., Hynan, L. S., Reisch, J. S., Schiodt, F. V., Ostapowicz, G., Shakil, A. O., Lee, W. M., & Acute Liver Failure Study, G. 2005. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology*, 42(6), 1364-1372.
- Laskin, D. L., Gardner, C. R., Price, V. F., & Jollow, D. J. 1995. Modulation of macrophage functioning abrogates the acute hepatotoxicity of acetaminophen. *Hepatology*, 21(4), 1045-1050.
- LeDoux, S. P., Driggers, W. J., Hollensworth, B. S., & Wilson, G. L. 1999. Repair of alkylation and oxidative damage in mitochondrial DNA. *Mutat Res*, 434(3), 149-159.

- Lee, S. S., Buters, J. T., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P., & Gonzalez, F. J. 1996. Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen. *J Biol Chem*, 271(20), 12063-12067.
- Leung, L. 2012. From ladder to platform: a new concept for pain management. *J Prim Health Care*, 4(3), 254-258.
- Lewis, R. K., & Paloucek, F. P. 1991. Assessment and treatment of acetaminophen overdose. *Clin Pharm*, 10(10), 765-774.
- Lin, J. H., & Levy, G. 1981. Sulfate depletion after acetaminophen administration and replenishment by infusion of sodium sulfate or N-acetylcysteine in rats. *Biochem Pharmacol*, 30(19), 2723-2725.
- Linden, C. H., & Rumack, B. H. 1984. Acetaminophen overdose. *Emerg Med Clin North Am*, 2(1), 103-119.
- Liu, G., Qi, M., Hutchinson, M. R., Yang, G., & Goldys, E. M. 2016. Recent advances in cytokine detection by immunosensing. *Biosens Bioelectron*, 79, 810-821.
- Lloyd, R. V., Hanna, P. M., & Mason, R. P. 1997. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med*, 22(5), 885-888.
- Lohinai, Z. M., & Szabo, C. 1999. Role of nitric oxide in physiology and patophysiology of periodontal tissues. *Medical Science Monitor*, 4, 1089-1095.
- Lubel, J. S., Herath, C. B., Burrell, L. M., & Angus, P. W. 2008. Liver disease and the renin-angiotensin system: recent discoveries and clinical implications. *J Gastroenterol Hepatol*, 23(9), 1327-1338.
- Maini, R. N., Elliott, M. J., Brennan, F. M., & Feldmann, M. 1995. Beneficial effects of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) blockade in rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol*, 101(2), 207-212.

- Makin, A. J., Wendon, J., & Williams, R. 1995. A 7-year experience of severe acetaminophen-induced hepatotoxicity (1987-1993). *Gastroenterology*, 109(6), 1907-1916.
- Malhi, H., Gores, G. J., & Lemasters, J. J. 2006. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology*, 43(2 Suppl 1), S31-44.
- Mallet, C., Barriere, D. A., Ermund, A., Jonsson, B. A., Eschalier, A., Zygmunt, P. M., & Hogestatt, E. D. 2010. TRPV1 in brain is involved in acetaminophen-induced antinociception. *PLoS One*, 5(9).
- Mangiafico, S., Costello-Boerrigter, L. C., Andersen, I. A., Cataliotti, A., & Burnett, J. C., Jr. 2013. Neutral endopeptidase inhibition and the natriuretic peptide system: an evolving strategy in cardiovascular therapeutics. *Eur Heart J*, 34(12), 886-893c.
- Marnett, L. J. 2002. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 181-182, 219-222.
- Matthew, H. 1973. Acute acetaminophen poisoning. *Clin Toxicol*, 6(1), 9-11.
- McBride, P. V., & Rumack, B. H. 1992. Acetaminophen intoxication. *Seminars in Dialysis*, 5, 292-297.
- McCord, J. M., & Day, E. D., Jr. 1978. Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Lett*, 86(1), 139-142.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. 1970. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrome c reduction by a variety of electron carriers. *J Biol Chem*, 245(6), 1374-1377.
- McDowell, G., & Nicholls, D. P. 1999. The endopeptidase inhibitor, candoxatril, and its therapeutic potential in the treatment of chronic cardiac failure in man. *Expert Opin Investig Drugs*, 8(1), 79-84.

- McGilveray, I. J., & Mattok, G. L. 1972. Some factors affecting the absorption of paracetamol. *J Pharm Pharmacol*, 24(8), 615-619.
- McMurray, J. J., Packer, M., Desai, A. S., Gong, J., Lefkowitz, M. P., Rizkala, A. R., Rouleau, J. L., Shi, V. C., Solomon, S. D., Swedberg, K., Zile, M. R., Investigators, P.-H., & Committees. 2014. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med*, 371(11), 993-1004.
- Mehta, P., McAuley, D. F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R. S., Manson, J. J., & Hllh Across Speciality Collaboration, U. K. 2020. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*, 395(10229), 1033-1034.
- Melli, M., & Kayaalp, S. 2012. Non-steroidal Antiinflamatuvar İlaçlar. In S. Kayaalp (Ed.), *Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* (Vol. 2, pp. 862). Pelikan Yayıncılık.
- Mitchell, J. R., Jollow, D. J., Potter, W. Z., Gillette, J. R., & Brodie, B. B. 1973. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther*, 187(1), 211-217.
- Mitchell, J. R., Thorgeirsson, S. S., Potter, W. Z., Jollow, D. J., & Keiser, H. 1974. Acetaminophen-induced hepatic injury: protective role of glutathione in man and rationale for therapy. *Clin Pharmacol Ther*, 16(4), 676-684.
- Mohany, M., Alanazi, A. Z., Alqahtani, F., Belali, O. M., Ahmed, M. M., & Al-Rejaie, S. S. 2020. LCZ696 mitigates diabetic-induced nephropathy through inhibiting oxidative stress, NF-kappaB mediated inflammation and glomerulosclerosis in rats. *PeerJ*, 8, e9196.
- Mollnau, H., Wendt, M., Szocs, K., Lassegue, B., Schulz, E., Oelze, M., Li, H., Bodenschatz, M., August, M., Kleschyov, A. L., Tsilimingas, N., Walter, U., Forstermann, U., Meinertz, T., Griendling, K., & Munzel, T. 2002. Effects of

- angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res*, 90(4), E58-65.
- Mommsen, P., Barkhausen, T., Hildebrand, F., Zeckey, C., Krettek, C., & van Griensven, M. 2011. Regulation of L-selectin expression by trauma-relevant cytokines. *Pathol Res Pract*, 207(3), 142-147.
- Moore, J. B., & June, C. H. 2020. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science*, 368(6490), 473-474.
- Moudgil, K. D., & Choubey, D. 2011. Cytokines in autoimmunity: role in induction, regulation, and treatment. *J Interferon Cytokine Res*, 31(10), 695-703.
- Moukette, B. M., Pieme, C. A., Njimou, J. R., Biapa, C. P., Marco, B., & Ngogang, J. Y. 2015. In vitro antioxidant properties, free radicals scavenging activities of extracts and polyphenol composition of a non-timber forest product used as spice: *Monodora myristica*. *Biol Res*, 48(1), 15.
- Mujahid, A., Pumford, N. R., Bottje, W., Nakagawa, K., Miyazawa, T., Akiba, Y., & Toyomizu, M. 2007. Mitochondrial oxidative damage in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress. *The Journal of Poultry Science*, 44(4), 439-445.
- Navar, L. G. 2014. Physiology: hemodynamics, endothelial function, renin-angiotensin-aldosterone system, sympathetic nervous system. *J Am Soc Hypertens*, 8(7), 519-524.
- Nedoszytko, B., Sokolowska-Wojdylo, M., Ruckemann-Dziurdzinska, K., Roszkiewicz, J., & Nowicki, R. J. 2014. Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. *Postepy Dermatol Alergol*, 31(2), 84-91.
- Neurath, M. F. 2014. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*, 14(5), 329-342.

- Nimmo, W. S., Heading, R. C., Wilson, J., Tothill, P., & Prescott, L. F. 1975. Inhibition of gastric emptying and drug absorption by narcotic analgesics. *Br J Clin Pharmacol*, 2(6), 509-513.
- O'Connell, J. E., Jardine, A. G., Davidson, G., & Connell, J. M. 1992. Candoxatril, an orally active neutral endopeptidase inhibitor, raises plasma atrial natriuretic factor and is natriuretic in essential hypertension. *J Hypertens*, 10(3), 271-277.
- O'Grady, J. G. 1997. Paracetamol-induced acute liver failure: prevention and management. *J Hepatol*, 26 Suppl 1, 41-46.
- O'Shea, J. J., & Murray, P. J. 2008. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity*, 28(4), 477-487.
- Opal, S. M., & DePalo, V. A. 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 117(4), 1162-1172.
- Patten, C. J., Thomas, P. E., Guy, R. L., Lee, M., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., & Yang, C. S. 1993. Cytochrome P450 enzymes involved in acetaminophen activation by rat and human liver microsomes and their kinetics. *Chem Res Toxicol*, 6(4), 511-518.
- Paul, A. T., Gohil, V. M., & Bhutani, K. K. 2006. Modulating TNF-alpha signaling with natural products. *Drug Discov Today*, 11(15-16), 725-732.
- Pawlinski, R., Pedersen, B., Kehrle, B., Aird, W. C., Frank, R. D., Guha, M., & Mackman, N. 2003. Regulation of tissue factor and inflammatory mediators by Egr-1 in a mouse endotoxemia model. *Blood*, 101(10), 3940-3947.
- Peterson, R. G., & Rumack, B. H. 1977. Treating acute acetaminophen poisoning with acetylcysteine. *JAMA*, 237(22), 2406-2407.

- Pickering, G., Esteve, V., Lorient, M. A., Eschalier, A., & Dubray, C. 2008. Acetaminophen reinforces descending inhibitory pain pathways. *Clin Pharmacol Ther*, 84(1), 47-51.
- Pickering, G., Lorient, M. A., Libert, F., Eschalier, A., Beaune, P., & Dubray, C. 2006. Analgesic effect of acetaminophen in humans: first evidence of a central serotonergic mechanism. *Clin Pharmacol Ther*, 79(4), 371-378.
- Pinchuk, I., Schnitzer, E., & Lichtenberg, D. 1998. Kinetic analysis of copper-induced peroxidation of LDL. *Biochim Biophys Acta*, 1389(2), 155-172.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*, 97, 55-74.
- Polina, I., Domondon, M., Fox, R., Sudarikova, A. V., Troncoso, M., Vasileva, V. Y., Kashyrina, Y., Gooz, M. B., Schibalski, R. S., DeLeon-Pennell, K. Y., Fitzgibbon, W. R., & Ilatovskaya, D. V. 2020. Differential effects of low-dose sacubitril and/or valsartan on renal disease in salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*, 319(1), F63-F75.
- Potter, L. R., Abbey-Hosch, S., & Dickey, D. M. 2006. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev*, 27(1), 47-72.
- Potter, W. Z., Davis, D. C., Mitchell, J. R., Jollow, D. J., Gillette, J. R., & Brodie, B. B. 1973. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. 3. Cytochrome P-450-mediated covalent binding in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*, 187(1), 203-210.
- Potter, W. Z., Thorgeirsson, S. S., Jollow, D. J., & Mitchell, J. R. 1974. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. V. Correlation of hepatic necrosis, covalent binding and glutathione depletion in hamsters. *Pharmacology*, 12(3), 129-143.

- Prescott, L. F. 1980. Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. *Br J Clin Pharmacol*, 10 Suppl 2(Suppl 2), 291S-298S.
- Prescott, L. F. 1981. Treatment of severe acetaminophen poisoning with intravenous acetylcysteine. *Arch Intern Med*, 141(3 Spec No), 386-389.
- Prescott, L. F. 1983. Paracetamol overdosage. Pharmacological considerations and clinical management. *Drugs*, 25(3), 290-314.
- Prescott, L. F., Park, J., Ballantyne, A., Adriaenssens, P., & Proudfoot, A. T. 1977. Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine. *Lancet*, 2(8035), 432-434.
- Price, C., & Alberti, K. 1979. Biochemical assessment of liver function. *Liver and biliary disease—pathophysiology, diagnosis, management*. London: WB Saunders, 381-416.
- Radi, R. 2018. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(23), 5839-5848.
- Rees, D. D., Monkhouse, J. E., Cambridge, D., & Moncada, S. 1998. Nitric oxide and the haemodynamic profile of endotoxin shock in the conscious mouse. *Br J Pharmacol*, 124(3), 540-546.
- Renner, B., Clarke, G., Grattan, T., Beisel, A., Mueller, C., Werner, U., Kobal, G., & Brune, K. 2007. Caffeine accelerates absorption and enhances the analgesic effect of acetaminophen. *J Clin Pharmacol*, 47(6), 715-726.
- Rhoads, D. M., Umbach, A. L., Subbaiah, C. C., & Siedow, J. N. 2006. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiol*, 141(2), 357-366.
- Ricciotti, E., & FitzGerald, G. A. 2011. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(5), 986-1000.

- Richards, M., Espiner, E., Frampton, C., Ikram, H., Yandle, T., Sopwith, M., & Cussans, N. 1990. Inhibition of endopeptidase EC 24.11 in humans. Renal and endocrine effects. *Hypertension*, 16(3), 269-276.
- Richter, C., Park, J. W., & Ames, B. N. 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(17), 6465-6467.
- Rouleau, J. L., Pfeffer, M. A., Stewart, D. J., Isaac, D., Sestier, F., Kerut, E. K., Porter, C. B., Proulx, G., Qian, C., & Block, A. J. 2000. Comparison of vasoepitidase inhibitor, omapatrilat, and lisinopril on exercise tolerance and morbidity in patients with heart failure: IMPRESS randomised trial. *Lancet*, 356(9230), 615-620.
- Rubattu, S., Sciarretta, S., Valenti, V., Stanzione, R., & Volpe, M. 2008. Natriuretic peptides: an update on bioactivity, potential therapeutic use, and implication in cardiovascular diseases. *Am J Hypertens*, 21(7), 733-741.
- Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., & Freeman, B. A. 1994. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem*, 269(42), 26066-26075.
- Ruffalo, R. L., & Thompson, J. F. 1982. Cimetidine and acetylcysteine as antidote for acetaminophen overdose. *South Med J*, 75(8), 954-958.
- Ruilope, L. M., Dukat, A., Bohm, M., Lacourciere, Y., Gong, J., & Lefkowitz, M. P. 2010. Blood-pressure reduction with LCZ696, a novel dual-acting inhibitor of the angiotensin II receptor and neprilysin: a randomised, double-blind, placebo-controlled, active comparator study. *Lancet*, 375(9722), 1255-1266.
- Rumack, B. H., & Matthew, H. 1975. Acetaminophen poisoning and toxicity. *Pediatrics*, 55(6), 871-876.

- Rumack, B. H., Peterson, R. C., Koch, G. G., & Amara, I. A. 1981. Acetaminophen overdose. 662 cases with evaluation of oral acetylcysteine treatment. *Arch Intern Med*, 141(3 Spec No), 380-385.
- Ruster, C., & Wolf, G. 2006. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 17(11), 2985-2991.
- Saccomano, S. J. 2019. Acute acetaminophen toxicity in adults. *Nurse Pract*, 44(11), 42-47.
- Sagnella, G. A. 2002. Vasopeptidase inhibitors. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 3(2), 90-95.
- Saito, K., Kobayashi, D., Sasaki, M., Araake, H., Kida, T., Yagihashi, A., Yajima, T., Kameshima, H., & Watanabe, N. 1999. Detection of human serum tumor necrosis factor-alpha in healthy donors, using a highly sensitive immuno-PCR assay. *Clin Chem*, 45(5), 665-669.
- Salles, A. M., Galvao, T. F., Silva, M. T., Motta, L. C., & Pereira, M. G. 2012. Antioxidants for preventing preeclampsia: a systematic review. *ScientificWorldJournal*, 2012, 243476.
- Sanders, D. B., Larson, D. F., Hunter, K., Gorman, M., & Yang, B. 2001. Comparison of tumor necrosis factor-alpha effect on the expression of iNOS in macrophage and cardiac myocytes. *Perfusion*, 16(1), 67-74.
- Satoh, M., & Yamazaki, M. 1992. Tumor necrosis factor stimulates DNA synthesis of mouse hepatocytes in primary culture and is suppressed by transforming growth factor beta and interleukin 6. *J Cell Physiol*, 150(1), 134-139.
- Schiering, N., D'Arcy, A., Villard, F., Ramage, P., Logel, C., Cumin, F., Ksander, G. M., Wiesmann, C., Karki, R. G., & Mogi, M. 2016. Structure of neprilysin in complex with the active metabolite of sacubitril. *Sci Rep*, 6, 27909.

- Schwab, J. M., Beiter, T., Linder, J. U., Laufer, S., Schulz, J. E., Meyermann, R., & Schluesener, H. J. 2003. COX-3--a virtual pain target in humans? *FASEB J*, 17(15), 2174-2175.
- Seferovic, J. P., Claggett, B., Seidelmann, S. B., Seely, E. W., Packer, M., Zile, M. R., Rouleau, J. L., Swedberg, K., Lefkowitz, M., Shi, V. C., Desai, A. S., McMurray, J. J. V., & Solomon, S. D. 2017. Effect of sacubitril/valsartan versus enalapril on glycaemic control in patients with heart failure and diabetes: a post-hoc analysis from the PARADIGM-HF trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 5(5), 333-340.
- Segura, J., Salazar, J., & Ruilope, L. M. 2013. Dual neurohormonal intervention in CV disease: angiotensin receptor and Neprilysin inhibition. *Expert Opin Investig Drugs*, 22(7), 915-925.
- Shaban, N. Z., Zaki, M. M., Koutb, F., Abdul-Aziz, A. A., Elshehawy, A. A., & Mehany, H. 2022. Protective and therapeutic role of mango pulp and eprosartan drug and their anti-synergistic effects against thioacetamide-induced hepatotoxicity in male rats. *Environ Sci Pollut Res Int*, 29(34), 51427-51441.
- Shan, S., Shen, Z., & Song, F. 2018. Autophagy and acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Arch Toxicol*, 92(7), 2153-2161.
- Shankar, G., & Cohen, D. A. 1997. Enhanced cytokine detection by a novel cell culture-based ELISA. *J Immunoassay*, 18(4), 371-388.
- Sharma, G. N., Gupta, G., & Sharma, P. 2018. A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 28(2), 139-154.
- Sheth, S. G., Flamm, S. L., Gordon, F. D., & Chopra, S. 1998. AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol*, 93(1), 44-48.

- Simmons, D. L., Chandrasekharan, N. V., Hu, D., Roos, K. L., & Tomsik, J. 2005. Comments on "acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties". *J Pharmacol Exp Ther*, 315(3), 1412-1414; author reply 1415-1416.
- Singer, A. J., Carracio, T. R., & Mofenson, H. C. 1995. The temporal profile of increased transaminase levels in patients with acetaminophen-induced liver dysfunction. *Ann Emerg Med*, 26(1), 49-53.
- Singh, J. S. S., Burrell, L. M., Cherif, M., Squire, I. B., Clark, A. L., & Lang, C. C. 2017. Sacubitril/valsartan: beyond natriuretic peptides. *Heart*, 103(20), 1569-1577.
- Sisein, E. A. 2014. Biochemistry of free radicals and antioxidants. *Scholars Academic Journal of Biosciences*, 2, 110-118.
- Slattery, J. T., McRorie, T. I., Reynolds, R., Kalhorn, T. F., Kharasch, E. D., & Eddy, A. C. 1989. Lack of effect of cimetidine on acetaminophen disposition in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 46(5), 591-597.
- Slattery, J. T., Wilson, J. M., Kalhorn, T. F., & Nelson, S. D. 1987. Dose-dependent pharmacokinetics of acetaminophen: evidence of glutathione depletion in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 41(4), 413-418.
- Smilkstein, M. J., Bronstein, A. C., Linden, C., Augenstein, W. L., Kulig, K. W., & Rumack, B. H. 1991. Acetaminophen overdose: a 48-hour intravenous N-acetylcysteine treatment protocol. *Ann Emerg Med*, 20(10), 1058-1063.
- Smilkstein, M. J., Knapp, G. L., Kulig, K. W., & Rumack, B. H. 1988. Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. Analysis of the national multicenter study (1976 to 1985). *N Engl J Med*, 319(24), 1557-1562.
- Smith, H. S. 2009. Potential analgesic mechanisms of acetaminophen. *Pain Physician*, 12(1), 269-280.

- Solomon, S. D., Zile, M., Pieske, B., Voors, A., Shah, A., Kraigher-Krainer, E., Shi, V., Bransford, T., Takeuchi, M., Gong, J., Lefkowitz, M., Packer, M., McMurray, J. J., & Prospective comparison of, A. w. A. R. B. o. M. O. h. f. w. p. e. f. I. 2012. The angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 in heart failure with preserved ejection fraction: a phase 2 double-blind randomised controlled trial. *Lancet*, 380(9851), 1387-1395.
- Sonnenberg, J. L., Sakane, Y., Jeng, A. Y., Koehn, J. A., Ansell, J. A., Wennogle, L. P., & Ghai, R. D. 1988. Identification of protease 3.4.24.11 as the major atrial natriuretic factor degrading enzyme in the rat kidney. *Peptides*, 9(1), 173-180.
- Sousa, A. M., & Prado, W. A. 2001. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res*, 897(1-2), 9-19.
- Sprague, A. H., & Khalil, R. A. 2009. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol*, 78(6), 539-552.
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. 2000. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci*, 899, 191-208.
- Starkov, A. A. 2008. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 1147, 37-52.
- Steinman, L. 2010. Modulation of postoperative cognitive decline via blockade of inflammatory cytokines outside the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(48), 20595-20596.
- Sun, W. Y., Wei, W., Gui, S. Y., Wu, L., & Wang, H. 2008. Protective effect of extract from *Paeonia lactiflora* and *Astragalus membranaceus* against liver injury induced by bacillus Calmette-Guerin and lipopolysaccharide in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 103(2), 143-149.

- Sung, C. C., Hsu, Y. C., Chen, C. C., Lin, Y. F., & Wu, C. C. 2013. Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 301982.
- Szlosarek, P., Charles, K. A., & Balkwill, F. R. 2006. Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *Eur J Cancer*, 42(6), 745-750.
- Tabernero, A., Schneider, F., Potenza, M. A., Randriamboavonjy, V., Chasserot, S., Wolf, P., Mitolo-Chieppa, D., Stoclet, J. C., & Andriantsitohaina, R. 2003. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in omental arteries harvested from patients with severe liver diseases: immuno-localization and influence on vascular tone. *Intensive Care Med*, 29(2), 262-270.
- Takeuchi, O., & Akira, S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805-820.
- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J., & et al. 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, 356(6372), 768-774.
- Thummel, K. E., Lee, C. A., Kunze, K. L., Nelson, S. D., & Slattery, J. T. 1993. Oxidation of acetaminophen to N-acetyl-p-aminobenzoquinone imine by human CYP3A4. *Biochem Pharmacol*, 45(8), 1563-1569.
- Tisoncik, J. R., Korth, M. J., Simmons, C. P., Farrar, J., Martin, T. R., & Katze, M. G. 2012. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev*, 76(1), 16-32.
- Tovmasyan, A., Maia, C. G., Weitner, T., Carballal, S., Sampaio, R. S., Lieb, D., Ghazaryan, R., Ivanovic-Burmazovic, I., Ferrer-Sueta, G., Radi, R., Reboucas, J. S., Spasojevic, I., Benov, L., & Batinic-Haberle, I. 2015. A comprehensive

- evaluation of catalase-like activity of different classes of redox-active therapeutics. *Free Radic Biol Med*, 86, 308-321.
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. A., Nilsa, R. D., & Huang, P. 2008. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal*, 10(8), 1343-1374.
- Tsai, C. L., Chang, W. T., Weng, T. I., Fang, C. C., & Walson, P. D. 2005. A patient-tailored N-acetylcysteine protocol for acute acetaminophen intoxication. *Clin Ther*, 27(3), 336-341.
- Tsikas, D. 2017. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem*, 524, 13-30.
- Turini, M. E., & DuBois, R. N. 2002. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med*, 53, 35-57.
- Underhill, T. J., Greene, M. K., & Dove, A. F. 1990. A comparison of the efficacy of gastric lavage, ipecacuanha and activated charcoal in the emergency management of paracetamol overdose. *Arch Emerg Med*, 7(3), 148-154.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160(1), 1-40.
- Vallance, P., & Chan, N. 2001. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart*, 85(3), 342-350.
- Vardeny, O., Tacheny, T., & Solomon, S. D. 2013. First-in-class angiotensin receptor neprilysin inhibitor in heart failure. *Clin Pharmacol Ther*, 94(4), 445-448.
- Varfolomeev, E. E., & Ashkenazi, A. 2004. Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell*, 116(4), 491-497.

- Vepsalainen, S., Helisalmi, S., Mannermaa, A., Pirttila, T., Soininen, H., & Hiltunen, M. 2009. Combined risk effects of IDE and NEP gene variants on Alzheimer disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 80(11), 1268-1270.
- Verdecchia, P., Angeli, F., Mazzotta, G., Gentile, G., & Reboldi, G. 2008. The renin angiotensin system in the development of cardiovascular disease: role of aliskiren in risk reduction. *Vasc Health Risk Manag*, 4(5), 971-981.
- von Lueder, T. G., Wang, B. H., Kompa, A. R., Huang, L., Webb, R., Jordaan, P., Atar, D., & Krum, H. 2015. Angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 attenuates cardiac remodeling and dysfunction after myocardial infarction by reducing cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circ Heart Fail*, 8(1), 71-78.
- Wang, B. H., von Lueder, T. G., Kompa, A. R., Huang, L., Webb, R., Jordaan, P., Atar, D., & Krum, H. 2015. Combined angiotensin receptor blockade and neprilysin inhibition attenuates angiotensin-II mediated renal cellular collagen synthesis. *Int J Cardiol*, 186, 104-105.
- Wang, T. D., Tan, R. S., Lee, H. Y., Ihm, S. H., Rhee, M. Y., Tomlinson, B., Pal, P., Yang, F., Hirschhorn, E., Prescott, M. F., Hinder, M., & Langenickel, T. H. 2017. Effects of Sacubitril/Valsartan (LCZ696) on Natriuresis, Diuresis, Blood Pressures, and NT-proBNP in Salt-Sensitive Hypertension. *Hypertension*, 69(1), 32-41.
- Welch, W. J. 2008. Angiotensin II-dependent superoxide: effects on hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension*, 52(1), 51-56.
- Whiteside, T. L. 1994. Cytokines and cytokine measurements in a clinical laboratory. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1(3), 257-260.

- Williams, A. L., & Hoofnagle, J. H. 1988. Ratio of serum aspartate to alanine aminotransferase in chronic hepatitis. Relationship to cirrhosis. *Gastroenterology*, 95(3), 734-739.
- Williams, B., Cockcroft, J. R., Kario, K., Zappe, D. H., Brunel, P. C., Wang, Q., & Guo, W. 2017. Effects of Sacubitril/Valsartan Versus Olmesartan on Central Hemodynamics in the Elderly With Systolic Hypertension: The PARAMETER Study. *Hypertension*, 69(3), 411-420.
- Woo, O. F., Mueller, P. D., Olson, K. R., Anderson, I. B., & Kim, S. Y. 2000. Shorter duration of oral N-acetylcysteine therapy for acute acetaminophen overdose. *Ann Emerg Med*, 35(4), 363-368.
- Xu, W., Song, S., Huang, Y., & Gong, Z. 2006. Effects of perindopril and valsartan on expression of transforming growth factor-beta-Smads in experimental hepatic fibrosis in rats. *J Gastroenterol Hepatol*, 21(8), 1250-1256.
- Yatabe, J., Yoneda, M., Yatabe, M. S., Watanabe, T., Felder, R. A., Jose, P. A., & Sanada, H. 2011. Angiotensin III stimulates aldosterone secretion from adrenal gland partially via angiotensin II type 2 receptor but not angiotensin II type 1 receptor. *Endocrinology*, 152(4), 1582-1588.
- Yuan, G. J., Zhou, X. R., Gong, Z. J., Zhang, P., Sun, X. M., & Zheng, S. H. 2006. Expression and activity of inducible nitric oxide synthase and endothelial nitric oxide synthase correlate with ethanol-induced liver injury. *World J Gastroenterol*, 12(15), 2375-2381.
- Zhao, Z. K., Yu, H. L., Liu, B., Wang, H., Luo, Q., & Ding, X. G. 2016. Antioxidative mechanism of Lycium barbarum polysaccharides promotes repair and regeneration following cavernous nerve injury. *Neural Regen Res*, 11(8), 1312-1321.

EKLER

EK-1. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ Graduate School of Health Sciences	
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU¹		
Öğrencinin Adı ve Soyadı	Gökçe KAYA BOZKURT	
Öğrencinin Numarası		
Ana Bilim Dalı	Tıbbi Farmakoloji	
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Doktora	
Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.		
Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	%14	% 15
II. Genel Bilgiler	%15	% 35
III. Materyal ve Metod	%30	% 35
IV. Bulgular	%4	% 15
V. Tartışma	%7	% 20
<i>Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.</i>		

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Rektörlük

Sayı : 75296309-050.01.04-E.2100073455
Konu : HADYЕК Kararı.

09.03.2021

ECZACILIK FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 19.02.2021 tarihli ve 93722986-000-E.2100051127 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 26.02.2021 tarihli ve 2 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 50 no'lu kararı ile sözkonusu tez çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmanın Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülmesine ve taahhütname hükümlerine göre çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYЕК Sonuç Raporu"nun Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

TOPLANTI TARİHİ : 26.02.2021

TOPLANTI SAYISI : 2

KARAR N0 50: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığı, Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü, Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Beyzagül ERKAYMAN'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan **“Sıçanlarda Parasetamolle İndüklenen Karaciğer Toksisitesinde Valsartan/sakubitril Kombinasyonu LCZ 696 ile Valsartanın Etkilerinin Karşılaştırılması”** isimli tez çalışması ile ilgili Eczacılık Fakültesi Dekanlığının 19.02.2021 tarihli ve 93722986-000-E.2100051127 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen tez çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, taahhütname hükümleri gereğince çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.