



**MARMARA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KLOPIDOGREL'İN MEMBRAN  
BÜTÜNLÜĞÜNE  
OLAN ETKİSİNİN AML12 HEPATOSİT  
HÜCRE SOYUNDA ARAŞTIRILMASI**

---

**DİDEM KUTLU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

**DANIŞMAN**

Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ

**İSTANBUL,2019**

---



**MARMARA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KLOPİDOGREL'İN MEMBRAN  
BÜTÜNLÜĞÜNE  
OLAN ETKİSİNİN AML12 HEPATOSİT  
HÜCRE SOYUNDA ARAŞTIRILMASI**

---

**DİDEM KUTLU**  
**520116015**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

**DANIŞMAN**

Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ

**İSTANBUL, 2019**

---



**MARMARA UNIVERSITY**  
**INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES**  
**IN PURE AND APPLIED SCIENCES**



**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF  
CLOPIDOGREL IN AML12 HEPATOCYTE  
CELL LINE OVER PLASMA MEMBRANE  
INTEGRITY**

---

**DİDEM KUTLU**  
520116015

**MASTER THESIS**  
Department of Biology

**ADVISOR**  
Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ

**İSTANBUL, 2019**

---

# MARMARA ÜNİVERSİTESİ

## FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Ece ÇARPAR'ın "AML12 Hepatosit Hücre Soyunda Klopidoğrel'in Lizozomal Aktiviteye Olan Etkisinin Araştırılması" başlıklı tez çalışması, 08./02./19 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

### Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Belgin SÜSLEYİCİ

(Danışman)

Marmara Üniversitesi

Dr.Öğr. Üyesi Güler DARTAN

(Üye)

Marmara Üniversitesi

Doç.Dr. Duygu GEZEN AK

(Üye)

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

### ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 02/02/2019 tarih ve 2019.0502...sayılı kararı ile Ece ÇARPAR'ın Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Balent EKİCİ



## **TEŞEKKÜR**

Bu çalışmanın, fikir halinden bu yana somutlaşmasına yaptığı katkılar nedeniyle, saygıdeğer hocam Prof.Dr.Belgin SÜSLEYİCİ'ye teşekkürü bir borç bilirim. Sevgili Belgin Hocama ders ve proje döneminde akademisyen olmanın yanında iyi bir eğitimci olmanın tarifini davranışlarıyla göstermesi, eğitim hayatımda yol gösterici bir sorumluluk üstlenmesi ve sevgisini benden esirgememesine büyük şükran duymaktayım.

Araştırma süresi boyunca verdiği destek ve yardımları nedeniyle Uzm. Bio. Mehtap ÇEVİK'e, ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum yol arkadaşlarım Ece ÇARPAR, Miray KARABAY ve Melike ÜLKER 'e teşekkürlerimi sunarım.

Başarılı olmam için her zaman beni destekleyen, koşulsuz yanımda olan annem, babam ve ablama teşekkür ederim.

**Didem KUTLU**

**Ocak 2019**

# İÇİNDEKİLER

	SAYFA
TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vi
SEMBOLLER.....	vii
KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ .....	x
TABLO LİSTESİ .....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Tromboz.....	1
1.1.1 Tromboz mekanizması .....	1
1.1.2. Antitrombotik ajanlar .....	3
1.1.2.1. Trombolitik ajanlar .....	4
1.1.2.2. Antikoagülan ajanlar.....	4
1.1.2.3. Antiplatelet ajanlar .....	4
1.1.3. Antiplatelet ilaçlar ve sınıflandırılması .....	5
1.1.3.1. Siklooksigenaz (COX) inhibitörleri .....	5
1.1.3.2. GPIIb/IIIa inhibitörleri .....	6
1.1.3.3. Fosfodiesteraz inhibitörleri.....	6
1.1.3.4. P <sub>2</sub> Y <sub>12</sub> reseptör inhibitörleri .....	6
1.2. Klopidoğrel (P <sub>2</sub> Y <sub>12</sub> reseptör inhibitörü) .....	7
1.2.1 Klopidoğrel'in etki mekanizması .....	9
1.2.2. Klopidoğrel'in yan etkileri ve hepatositlerdeki sitotoksitesisi .....	11

1.3. Hepatositler ve Özellikleri.....	11
1.3.1. AML 12 hepatositleri : .....	12
1.4. Sitotoksosite .....	12
1.4.1. Hepatotoksosite .....	13
1.4.1.1. İlaç kaynaklı hepatosit toksisitesi.....	13
1.4.1.2. Hepatotoksosite ve karaciğer Hasarında Rol Alan Moleküler Mekanizmalar .....	14
1.5. Plazma membran hasarı.....	15
1.6. Apoptoz .....	19
1.6.1. İntrensek yolak .....	19
1.6.2. Ölüm reseptörü yolağı .....	20
1.7. Nekroz .....	20
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>23</b>
2.1. Materyal.....	23
2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler .....	23
2.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar .....	23
2.2. Yöntem .....	24
2.2.1. AML12 hepatosit kültürü .....	24
2.2.1.1. Hücre kültür besiyerinin hazırlanışı .....	24
2.2.1.2. Hücrelerin 25 cm <sup>2</sup> 'lik flasklara ekilmesi .....	25
2.2.1.3. Hücrelerin inkübasyonu.....	25
2.2.1.4 Hücrelerin pasajlanma işlemi .....	26
2.2.1.5. Hücrelerin sayım işlemi.....	26
2.2.2 Hepatosit sitotoksosite analizi .....	26
2.2.2.1. Hepatotoksosite ve LDH testi.....	26

2.2.2.2. Negatif kontrol ve total LDH kontrolün hazırlanması.....	28
2.2.2.3. Hücrelerin klopidoğrel'e maruziyeti .....	28
2.2.3. LDH test prosedürü .....	30
2.2.4. Sonuçların değerlendirilmesi .....	31
<b>3.BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>33</b>
3.1 BULGULAR .....	33
3.2.TARTIŞMA .....	36
<b>4. SONUÇLAR .....</b>	<b>43</b>
<b>5.KAYNAKLAR.....</b>	<b>45</b>

## ÖZET

### KLOPIDOGREL'İN MEMBRAN BÜTÜNLÜĞÜNE OLAN ETKİSİNİN AML12 HEPATOSİT HÜCRE SOYUNDA ARAŞTIRILMASI

Türkiye’de bulaşıcı olmayan hastalıkların yol açtığı ölümlerin %37’si kardiyovasküler hastalıklar sebebi ile gerçekleşmiştir.

Adenozin difosfat reseptör antagonisti olan Klopidoğrel, felç, damar tıkanıklığı, inme, kalp krizi gibi kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavi edilmesinde görev alan önemli bir antiplatelet ajandır ve kardiyovasküler olay riskini %30-40 oranında azaltmaktadır. İlacın aktif metabolitleri adenozin difosfatın P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> reseptörüne bağlanmasını engelleyerek platelet oluşumunu geri dönüşümsüz olarak engellemektedir.

Çalışmamızda antiplatelet tedavide kullanılan Klopidoğrel’in AML12 hepatositlerinin plazma membranında oluşturduğu etkileri araştırılmıştır. Klopidoğrel’in aktif metabolitlerinin oluşabilmesi için karaciğer hücrelerinde metabolize edilmesi gerektiğinden, çalışmamızda AML12 hepatositleri kullanılmıştır. Kültürü yapılan ve olgunluğa erişen hücreler 100, 300, 400 ve 500 µM Klopidoğrel ile muamele edilmiş ve hücrelere LDH testi uygulanarak plazma membranı hasarı araştırılmıştır. Laktat dehidrogenaz enzimi, plazma membranında hasar olması durumunda ekstraselüler boşluğa salınarak kültür ortamındaki varlığı ile sitotoksikite tayininde kullanılır.

Çalışmamızda, 100, 300, 400 ve 500 µM Klopidoğrel ile muamele edilen hücrelere LDH testi uygulanarak, test bileşenleriyle hücrelerin oluşturduğu OD340 dalga boyundaki absorpsanları spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Sonuçlar değerlendirilerek, IC<sub>50</sub> dozları 100 ve 300 µM Klopidoğrel dozu olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda AML12 hepatositlerine 100, 300, 400 ve 500 µM olmak üzere uygulanan tüm Klopidoğrel dozlarının plazma membranında hasar oluşturarak sitotoksik olduğu belirlenmiştir.

Literatür taramalarımızda, Klopidoğrel’in AML12 hepatositlerinde plazma membran bütünlüğüne olan etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmadığından çalışmamız özgün nitelik taşımaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** LDH, sitotoksikite, hepatosit, AML12, hepatotoksikite, hücre kültürü, plazma membranı, Klopidoğrel

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CLOPIDOGREL IN AML12 HEPATOCYTE CELL LINE OVER MEMBRANE INTEGRITY**

37% of deaths caused by non-communicable diseases in Turkey is realized with the causes of cardiovascular diseases.

Clopidogrel, an ADP receptor antagonist, is an important antiplatelet agent used in the prevention and treatment of cardiovascular diseases such as stroke, vascular occlusion, heart attack and known as having the capability to reduce the risk of cardiovascular events by 30-40%. The active metabolites of the drug prevent the binding of ADP to P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> receptor and prevent formation of platelets irreversibly.

In our study, we investigated the effects of Clopidogrel over the plasma membrane of AML12 hepatocytes. Clopidogrel needs to be metabolized in order to form the active metabolites in liver cells. Cells that were cultured and reached maturity were treated with 100, 300, 400 and 500 µM Clopidogrel and LDH test was applied in order to assess the plasma membrane damage that drug has caused. The lactate dehydrogenase enzyme in cells are released into the extracellular space in case of damage to the plasma membrane and the presence of the enzyme in the culture medium is determined as a cytotoxicity marker.

LDH test was performed on the cells treated with 100, 300, 400 and 500 µM Clopidogrel. The results were evaluated and LDH activity graph was plot to determine IC<sub>50</sub> doses. As a result of the calculations, IC<sub>50</sub> value was determined to be 100 and 300 µM. In our study, all clopidogrel doses which are 100, 300, 400 and 500 µM administered to AML12 hepatocytes were determined to be cytotoxic by causing damage on the plasma membrane.

Any research is not found in the literature investigating the effects of Clopidogrel in AML12 hepatocytes over plasma membrane integrity. Our study has characteristics of being an original work.

**Key Words:** LDH, cytotoxicity, hepatocyte, AML12, hepatotoxicity, cell culture, plasma membrane, Clopidogrel

## SEMBOLLER

<b>%</b>	: Yüzde
<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>µL</b>	: Mikro litre
<b>µM</b>	: Mikro molar
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	: Kalsiyum
<b>Cm</b>	: Santimetre
<b>Dk</b>	: Dakika
<b>K<sup>+</sup></b>	: Potasyum
<b>L</b>	: Litre
<b>M</b>	: Molar
<b>m<sup>2</sup></b>	: Metrekare
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>rpm</b>	: Dakikada dönme hızı (Revolutions per minute)
<b>α</b>	: Alfa
<b>β</b>	: Beta

## KISALTMALAR

<b>ADP</b>	: Adenozin Difosfat
<b>ADPaz</b>	: Adenozin Difosfataz
<b>AKS</b>	: Akut Koroner Sendrom
<b>ATP</b>	: Adenozin Trifosfat
<b>ATPaz</b>	: Adenozin Trifosfataz
<b>BOH</b>	: Bulaşıcı Olmayan Hastalık
<b>cAMP</b>	: Siklik Adenozin Monofosfat
<b>COX</b>	: Siklooksijenaz
<b>CYP</b>	: Sitokrom P450 enzim sistemi
<b>dATP</b>	: Deoksiadenozin Trifosfat
<b>DILI</b>	: İlaç Kaynaklı Karaciğer Hasarı
<b>DMEM</b>	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>GPRC</b>	: G-protein-bağımlı-reseptör
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>IC50</b>	: <i>The half maximal inhibitory concentration</i>
<b>KAH</b>	: Koroner Arter Hastalığı
<b>LDH</b>	: Laktat Dihidrogenaz
<b>Mİ</b>	: Miyokart İnfarktüsü
<b>NO</b>	: Nitrik Oksit
<b>PARP-1</b>	: Poli [ADP-riboz] polimeraz
<b>PBS</b>	: Fosfat tamponlu tuz solüsyonu ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
<b>PCI</b>	: Perkütan Koroner Girişimi

<b>PDGF</b>	: Platelet Türevli Büyüme Faktörü
<b>PGH2</b>	: Prostaglandin
<b>PGI2</b>	: Prostasiklin
<b>PI-3 K</b>	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
<b>RIP</b>	: <i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase</i>
<b>ROT</b>	: Reaktif Oksijen Türleri ( <i>Reactive oxygen species</i> )
<b>TGFβ</b>	: Transforme Edici Büyüme Faktörü β ( <i>Tumor necrosis factor beta</i> )
<b>TNF α</b>	: Tümör Nekroz Faktörü alfa ( <i>Tumor necrosis factor alpha</i> )
<b>TNP</b>	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
<b>t-PA</b>	: Doku Plazminojen Aktivatörü
<b>TRAIL</b>	: <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
<b>TXA2</b>	: Tromboksan A
<b>VASP</b>	: <i>Vasodilator stimulated phosphoprotein</i>
<b>VTE</b>	: Venöz Tromboembolizmi
<b>vWF</b>	: von Willebrand Faktörü

## ŞEKİL LİSTESİ

	<b>SAYFA</b>
<b>Şekil 1.1.</b> Trombüs oluşum mekanizması	3
<b>Şekil 1.2.</b> Antiplatelet ilaçların sınıflandırılması	5
<b>Şekil 1.3.</b> Klopidoğrel'in aktif ve inaktif metabolitleri	8
<b>Şekil 1.4.</b> Klopidoğrel'in etki mekanizması	10
<b>Şekil 1.5.</b> ATP bağımlı sodyum-potasyum pompası	16
<b>Şekil 1.6.</b> Sitolik kalsiyum iyonu artışı ve sonuçları	17
<b>Şekil 1.7.</b> Kararlı bir molekül ve serbest radikalın şematik gösterimi	18
<b>Şekil 1.8.</b> Nekroz aktivasyonu ve sonuçları	21
<b>Şekil 2.1.</b> Hücre kültür besiyerinin değiştirilme işlemi	25
<b>Şekil 2.2.</b> Hepatosit flasklarının etüvde inkübasyonu	25
<b>Şekil 2.3.</b> 96 kuyucuklu mikrolakadaki çalışma düzeni	29
<b>Şekil 2.4.</b> Klopidoğrel dozları eklendikten sonra, inkübasyona hazır olan 96 kuyucuklu plaka	30
<b>Şekil 2.5.</b> Klopidoğrel maruziyeti tamamlanmış olan plakadan çok kanallı bir pipet ile süpernatantının yeni bir plakaya aktarılması	30
<b>Şekil 2.6.</b> LDH II/LDHIII karışımının her bir kuyucuğa eklenmesi.	31
<b>Şekil 2.7.</b> Süpernatant aktarımı tamamlanmış olan, 340 nm OD'de okunmaya hazır olan plaka	31
<b>Şekil 3.1.</b> 25 cm <sup>2</sup> 'lik flask'a ekimi yapılan invert mikroskop görüntüsü (40X)	33
<b>Şekil 3.2.</b> Çoğalan ve flask yüzeyini kaplayan hepatositlerin invert mikroskop görüntüsü (10X)	33
<b>Şekil 3.3.</b> Klopidoğrel'e maruz bırakılan hepatositlerde belirlenen LDH aktivitesi %50 inhibisyon (IC <sub>50</sub> ) dozları	35

## TABLO LİSTESİ

	SAYFA
<b>Tablo 1.1.</b> Klopidoğrel metabolizmasında görev alan CYP2C19 enziminin polimorfik allelleri	9
<b>Tablo 1.2.</b> Klopidoğrel'in yaygın, az yaygın ve nadir görülen yan etkileri	11
<b>Tablo 2.1.</b> Tüketilen NADH miktarının belirlenmesinde kullanılan formül	32
<b>Tablo 3.1.</b> Pozitif kontrol ile birlikte uygulanan 100, 300, 400 ve 500 $\mu\text{M}$ 'lık Klopidoğrel dozlarının 340 nm OD'de her on dakikada bir yapılan spektrofotometrik ölçümleri	34
<b>Tablo 3.2.</b> Tablo 3.1. den seçilen zaman aralığındaki değerlerin formülasyonu, tüketilen NADH miktarı ile Maksimum % değerlerinin eldesi.	34

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Tromboz

Tromboz, bir kan damarının içinde kan pıhtısının (trombüs) oluşumudur. Hemostatik pıhtılar, sağlıklı kişilerde yara oluşan bölgede kan akışını durduran ve zararsız pıhtılardır. Ancak herhangi bir yara bölgesinde yer almayan trombüs, oluştuğu veya taşındığı bölgede kan akışını engelleyebileceğinden birey için oldukça zararlıdır [1,2].

### 1.1.1 Tromboz mekanizması

Sağlıklı bireylerde plateletler (trombosit), kan damarlarının endotel hücreleri tarafından salınan nitrik oksit (NO) ve prostasiklin (PGI<sub>2</sub>) ile inaktif halde tutulmaktadır. Endotel hücreleri aynı zamanda ADPaz enzimi üreterek, aktif trombositlerdeki ADP'yi (adenozin difosfat) indirgeyerek daha ileri düzeyde bir platelet agregasyonunu engeller [3]. PGI<sub>2</sub>, tromboksan A<sub>2</sub>'nin (TXA<sub>2</sub>) etkisini azaltarak, plateletlerin bir araya gelmesini ve salınımını engeller. Tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), aktif trombositler tarafından üretilen ve protrombotik özelliklere sahip olan bir tromboksan tipidir. TXA<sub>2</sub> yeni trombositlerin aktivasyonunu uyardığı gibi trombosit agregasyonunu da artırır. Antitrombin III (AT-III, bir plazma proteini); XII, XI, IX, X ve II gibi faktörlerin etkisini bloke eder [4].

Protein C (plazma proteini) AT-III tarafından bloke edilmeyen V ve VIII faktörünü inaktive eder ve aynı zamanda doku plazminojen aktivatörünün (t-PA) etkisini artırır. Ayrıca, endotel hücreleri tarafından sentezlenen heparan sülfat (heparin ile ilişkili bir proteoglikan), AT-III'nin aktivitesini artırır [4].

Plateletler iki spesifik granül türünü içermektedirler. Alfa granülleri, zarlarında faktör V' adezyon molekülü P'yi ifade ederler ve yapılarında von Willebrand faktör (vWF), fibrinojen ve transforme edici büyüme faktörü (TGF $\beta$ ), platelet türevli büyüme faktörü (PDGF) içerirler. Delta granülleri ise ADP, serotonin, histamin ve kalsiyum içerir [5].

Platelet aktivasyonu aracılığı ile gerçekleşen tromboz olayı;

-Trombosit adezyonu,

-Trombosit aktivasyonu,

-Trombosit agregasyonu olmak üzere üç temel adımdan oluşur [6-8].

Başlangıç aşaması olan trombosit adezyonu, plateletlerin yüzeyinde yer alan GP Ib/V/IX reseptör kompleksi ile vasküler yaralanma yerine maruz kalarak kollajene ve von Willebrand faktörü (vWF) ile reseptörü arasındaki etkileşimler tarafından gerçekleştirilir [1].

Bu aşama ayrıca plateletler üzerindeki kollajen reseptörleri GP VI ve GP Ia'yı kollajen ile etkileşime sokar [1].

Kollajenin bu reseptörlere bağlanması, platelet aktivasyonunu başlatır ve platelet integrin'lerini yüksek afiniteli duruma getiren hücre içi mekanizmaları tetiklediğinden, aktive edici faktörlerin (ADP gibi) salınımını indüklenir ve agregasyon ile birlikte dolaşımdaki trombositlerin ileri aktivasyonu teşvik edilir [1,8]. Aktive edici faktörler ADP, epinefrin, serotonin, trombin ve tromboksan A<sub>2</sub>' yi kapsar [6,7]. Bu faktörler ve kollajen gibi mediatörler ile gerçekleşen platelet aktivasyonu, plateletlerde morfolojik değişikliklere, proinflamatuvar moleküllerin (P-selektin, CD40 ligandı gibi) fazla ekspresyonuna sebep olmaktadır ve platelet prokoagülan aktivitesini indükleyerek etki etmektedir [6-8].

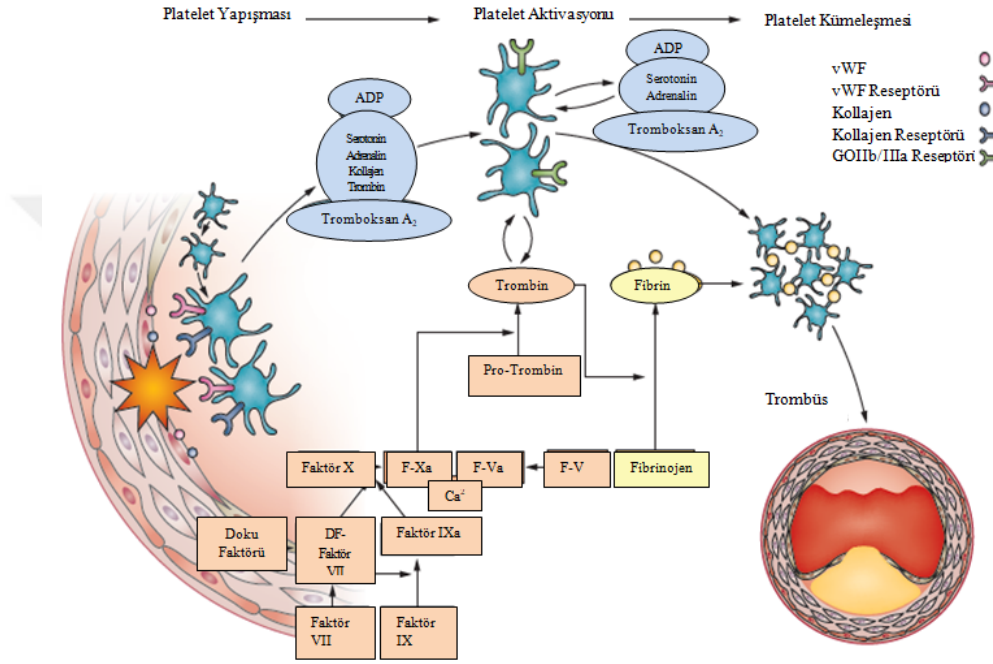
ADP salınımından sonraki aşamada, TXA<sub>2</sub> salınır. TXA<sub>2</sub>'de platelet agregasyonunda görev alan önemli araçlardan bir diğeridir. Ayrıca, trombosit aktivasyonunu ve toplanmasını artırır ve aynı zamanda doku faktörü koagülasyonu başlatır.

Platelet agregasyonu ve trombus oluşumundaki son adım, kümeleşmede görev alan ve ana reseptör olan platelet GPIIb/IIIa'nın aktif formuna dönüşmesini içerir. Aktif form oluşumu fibrinojen ve vWF ligandlarının reseptöre bağlanmasını sağlayarak platelet-platelet etkileşimi ile trombus oluşumuna yol açar [1,2]. Agregasyon kaskadının son basamağında ADP, P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> reseptörüne bağlanarak ADP-aracılı glikoprotein GPIIb/IIIa kompleks oluşumuna neden olur. P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> reseptörünün aktive olması ile hücre içi kalsiyum (Ca<sup>2+</sup>) seviyelerinde artışa neden olurken, P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>'nin aktivasyonu siklik adenosin monofosfat (cAMP) seviyelerinde düşüşe sebep olmaktadır. Glikoprotein GPIIb/IIIa kompleksi fibrinojenin başlıca reseptörüdür, fibrinojenin fibrine dönüştükten sonra trombositlere bağlanmasını sağlar [9].

Ek olarak, vasküler yaralanma, faktör VIIa ile bir kompleks oluşturan, pıhtılaşma kaskadını harekete geçiren ve trombin oluşumuna yol açan bir endotelial doku

faktörünü açığa çıkarmaktadır [10]. Ancak, koagülasyon kaskadı sonucunda az miktarda üretilen trombinin ana kaynağı aktif plateletlerin yüzeyidir [8,11].

Trombin fibrinojeni fibrine dönüştürerek fibrin açısından zengin bir 'pıhtı' oluşturur ve plateletleri proteaz ile aktive olan reseptöre PAR-1 ve PAR-4'e bağlayarak aktive eder [6,7,12,13]. Böylece trombositlerle birlikte fibrinler, fibrin-platelet ağını ve trombüs tıkaçını oluştururlar (Şekil 1.1.) [5,14].



Şekil 1.1. Trombüs oluşum mekanizması [10]

### 1.1.2. Antitrombotik ajanlar

Tromboz oluşumu arteriyel veya venöz olabilmektedir, bu durumda venöz ve arteriyel tromboz oluşumunu engellemek ve tedavi etmek amacı ile antitrombotik ajanlar kullanılır [10].

Antitrombotik ajanlar esas olarak üç tipe ayrılmaktadır [11].

1. Trombolitik (Fibrinolitik)
2. Antikoagülanlar
3. Antiplatelet ajanlar.

### **1.1.2.1. Trombolitik ajanlar**

Trombolitik tedavi, atardamar ya da toplardamarları aniden bloke eden ve potansiyel olarak ciddi veya hayati tehlike oluşturan etkileri bulunan kan pıhtılarını çözmek için litik veya "pıhtı bozucu" olarak adlandırılan ilaçların hastaya verilmesidir [12]. Trombolitik ajanlar, miyokard infarktüsü, pulmoner embolizm ve inme geçmişine sahip olan hastalarda tedavi amacıyla kullanılmaktadır [12].

Doku plazminojen aktivatörü (tPA) ve ürokinaz dahil olmak üzere fibrinolitiklerin anti-tromboz etkisi, inaktif plazminojenin etkin enzim plazmine dönüştürülmesinin sağlanmasıyla elde edilir ve trombüsün stabilize edilmesinden sorumlu olan fibrin dokusunun parçalanmasıyla sonuçlanır [15].

Pıhtı giderici ajanlar hastaya periferik intravenöz yolu veya bir kateter yolu ile verilir [13].

### **1.1.2.2. Antikoagülan ajanlar**

Antikoagülanlar, koagülasyonunu engelleyen veya azaltan ajanlardır. Özellikle venöz tromboembolizm (VTE) tedavisinde kullanılırlar. Venöz tromboembolizm genellikle toplardamarlarda gelişen trombüsler ve ayrılan parçaların pulmoner tıkanıklığını ifade eder [16].

Antikoagülan ilaçlar koagülasyon kaskadına etki ederek, fibrinojenin fibrine dönüşmesini inhibe eder ve trombüs oluşumunu engellerler.

### **1.1.2.3. Antiplatelet ajanlar**

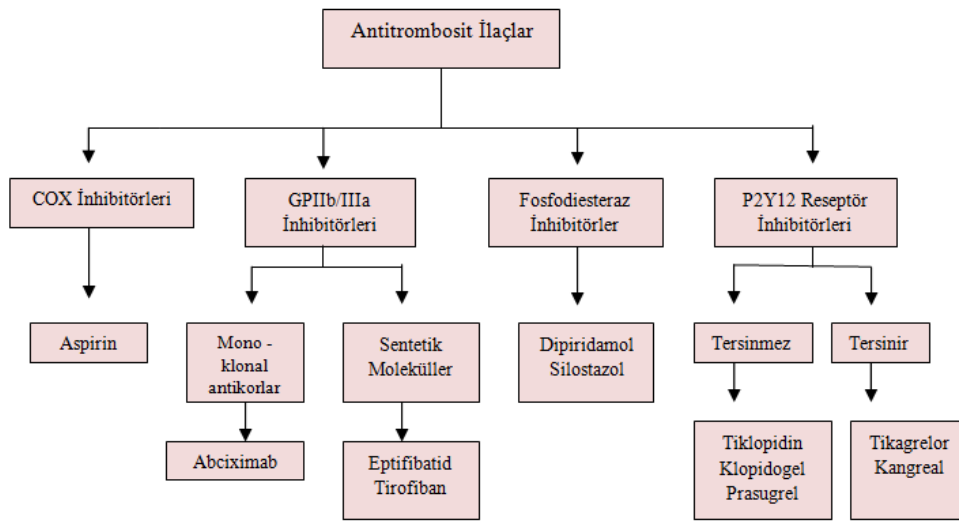
Plateletler (Trombosit) fizyolojik hemostazın korunumu ve trombüs oluşumunda oldukça önemli bir rol üstlenir. Trombosit agregasyonu, koroner arter hastalıklarını ve periferik arteriyel hastalıklarını da içeren iskemik olayların gelişmesinde ve büyümesinde temel görev alan patofizyolojik faktördür. Bu sebeple, antiplatelet tedavi, bu koşullardan birinden etkilenen bireylerde tekrarlayan olayların önlenmesinde çok önemli bir rol oynar [17].

Trombositler vücudun kanamaya ve kan kaybına karşı savunmasında görev alan hücrelerdir. Tromboz adı verilen kan pıhtısı oluşturma süreci şiddetli kanama geçiren

bir kişide faydalı olsa da, özellikle de kalp ya da beyin dolaşımında bir pıhtı oluştuğunda antiplatelet ajan kullanımı gerekebilir [18].

### 1.1.3. Antiplatelet ilaçlar ve sınıflandırılması

Antiplatelet ilaçlar, platelet aktivasyonunu ve agregasyonunu engelleme mekanizmalarına göre COX inhibitörleri, GPIIb/IIIa inhibitörleri ve fosfodiesteraz inhibitörleri ve ADP antagonisti- P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> reseptör inhibitörleri olmak üzere 4 gruba ayrılır [19,20] (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. Antiplatelet ilaçların sınıflandırılması [19,20]

#### 1.1.3.1. Siklooksigenaz (COX) inhibitörleri

Siklooksigenaz inhibitörleri, anahtar bir platelet enzimi olan siklooksigenazı (COX) daimi olarak inaktive eder [21].

COX, 2 izoformda bulunur ve prostanoid sentezinde, araşidonik asitin prostaglandin' e (PGH<sub>2</sub>) dönüştürülmesini katalize eder. PGH<sub>2</sub>, tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) ve PGI<sub>2</sub> de dahil olmak üzere çeşitli prostanoidlere hızla dönüştürülür [22]. Siklooksigenaz inhibitörü, COX enzimindeki aktif bölgede bulunan bir serin kalıntısına asetil grubu ekleyerek asetilasyon ajanı gibi davranır. Böylece araşidonik asitin katalitik bölgesine bağlanması engellenerek, platelet agregasyonunda önemli rolü olan TXA<sub>2</sub>'nin oluşumu inhibe edilir [23].

### **1.1.3.2. GPIIb/IIIa inhibitörleri**

İnsan glikoprotein GPIIb/IIIa reseptörü (integrin  $\alpha$ IIBb3 olarak da bilinir) platelet yüzeyinde bulunan en iyi karakterize edilmiş integrin ailesinden olan membran reseptörlerinden biridir [24]. GPIIb / IIIa reseptörü platelet agregasyonunda ve dolayısıyla trombüs oluşumunda rol oynayan temel integrinler arasında yer aldığından, GPIIb / IIIa antagonistlerinin gelişimi, antiplatelet tedavi için beklenen güçlü ve spesifik bir etkiyle cazip bir strateji haline gelmiştir [25].

GPIIb / IIIa inhibitörleri prensibi, fibrinojenin bağlama bölgesini geri çevrilemez şekilde bloke eden monoklonal antikörlere veya RGD dizisi (integrinler için tanıma dizisi) için bağlanma yerini rekabetçi ve geri dönüşümlü olarak bloke eden küçük sentetik moleküllere dayanmaktadır [26].

### **1.1.3.3. Fosfodiesteraz inhibitörleri**

Fosfodiesteraz inhibitörleri, fosfodiesterazı inhibe eder, platelet agregasyonunun bir engelleyicisi olan cAMP'nin indirgenmesini önler. cAMP'deki bu yükselme araziidonik asitin zar fosfolipidlerinden salınmasını engeller ve agregasyonda görev alan tromboksan A2 etkinliğini azaltır. PDE inhibitörü, ayrıca, adenilat siklaz aktivitesini indükleyen prostasiklinin salınmasını da doğrudan uyarır ve böylece cAMP'nin platelet içi konsantrasyonunu yükseltir ve trombosit agregasyonunu inhibisyonunu şiddetlendirir [27].

### **1.1.3.4. P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> reseptör inhibitörleri**

P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> reseptörü plateletler üzerinde bulunmaktadır ve ADP' nin bağlanma bölgesi olarak görev yapmaktadır. ADP, ADP reseptörlerini (P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>) aktive ederek, platelet agregasyonu için gerekli olan şekil değişikliğini indükler. Bu reseptörlerde gerçekleşen herhangi bir inaktivasyon, platelet aktivasyonu ve agregasyonunu engeller [28].

Platelet aktivasyon sürecinde gerçekleşen en önemli adım, ADP' nin platelet P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> reseptörü ile etkileşimidir. P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> reseptörü, glikoprotein IIB/IIIa reseptörünün ADP ile uyarılan aktivasyonunda yer alan baskın reseptördür. Glikoprotein IIB/IIIa reseptörünün aktivasyonu, platelet degranülasyonu ve tromboksan üretiminin artması ile birlikte uzamış platelet agregasyonu ile sonuçlanır [19,29-31].

## 1.2. Klopidoğrel (P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> reseptör inhibitörü)

Klopidoğrel, platelet-membran ADP reseptörüne (P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>) bağlanan ve platelet agregasyonunu engelleyen, antiplateletlerin tiyepiridin grubuna ait olan bir ajandır [32].

P<sub>2</sub>Y reseptörleri, her bir dizi pirimidin ve pürinlere farklı aktivite gösteren P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>Y<sub>2</sub>, P<sub>2</sub>Y<sub>4</sub>, P<sub>2</sub>Y<sub>11</sub>, P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>, P<sub>2</sub>Y<sub>13</sub> ve P<sub>2</sub>Y<sub>14</sub>'ü içeren G-protein-bağımlı-reseptörler (GPCR) ailesindedir. ADP, P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> ve P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> reseptörlerine bağlanarak trombosit fonksiyonunun kritik bir düzenleyicisi olarak görevini üstlenir [33-36].

Pürinerjik reseptör aktivasyonunun etkileri, trombosit agregasyonu, platelet şekil değişikliği ve yoğun granül salınımı ile ilgili olarak yoğun olarak çalışılmıştır. P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> üzerinde etki gösteren ADP, trombosit agregasyonu ve trombosit şekil değişimini başlatır, P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> aktivasyonu amplifikasyon, sürekli agregasyon ve sekresyon ile sonuçlanır [37-39].

P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>'nin farmakolojik olarak bloke edilmesi, koroner aterosklerozla ilişkili arteriyel trombozun tedavisinde ve önlenmesinde güçlü bir antiplatelet stratejidir.

Trombosit adezyonu, aktivasyonu ve agregasyonu aterotrombozda önemli bir görev yapar. İntrakoroner aterotromboz, akut koroner sendromun (AKS) gelişmesinin en sık nedenidir ve nükseden AKS, prosedürle ilişkili miyokard infarktüsü (Mİ) veya stent trombozu da dahil olmak üzere perkütan koroner girişim (PKG) etrafında oluşan komplikasyonlarda merkezi bir rol oynar [18,28].

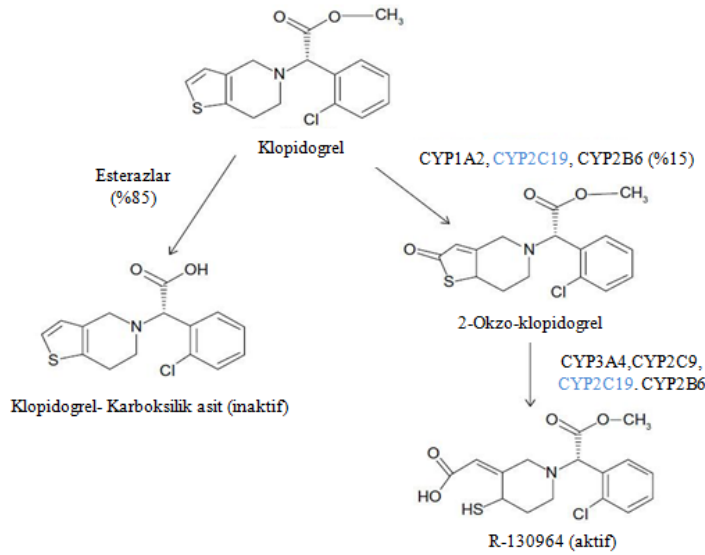
Klopidoğrel tedavisi, trombosit agregasyonunun engellenmesi, trombotik süreçlerin oluşumu ve ilerlemesini durdurarak, AKS veya PKG sonrası komplikasyonların önlenmesinde büyük önem taşır [40,41]. Ayrıca, stent prosedürü geçirmiş hastalarda stent trombozunu engellemek amacı ile kullanılır [7,42].

Klopidoğrel son yıllarda yaygın olarak kullanılan bir antiplatelet ajandır. Kanama ve hematolojik komplikasyonlar, antiplatelet tedavinin en yaygın sonuçlarından olmasına rağmen; klopidoğrel, hematolojik advers etkiler göz önüne alındığında tiyepiridinler sınıfındaki en güvenli ilaçtır [43].

Klopidoğrel bir ön ilaçtır ve antiplatelet aktivitesi üzerinde direkt bir etkisi bulunmamaktadır. Antiplatelet etkisi için aktif metabolitinin sitokrom P450 enzimleri

tarafından oksidasyon geçirmesi gerekmektedir. Oral olarak kullanımından sonra, ilaç yaklaşık %'50 biyoyararlanım ile absorbe edilir [44].

Absorbe edilen Klopidoğrel'in çoğunluğu (%85) esterazlar tarafından aktif olmayan karboksilik asit metabolitine (SR26334.109) dönüştürülür [45]. Klopidoğrel'in yalnızca %15'i karaciğer sitokrom P450 (CYP) enzimleri tarafından metabolize edilir. CYP3A4, CYP3A5 ve CYP2C19 enzimleri Klopidoğrel'in tiyofen halkasını oksitleyerek ara formu olan 2-okzoklopidoğrel'in oluşumundan sorumludur. İleri bir oksitleme ile tiyofen halkası açılarak karboksil ve tiyol grubu oluşur ve Klopidoğrel'in antiplatelet etki gösteren aktif metaboliti (R130964) meydana gelir (Şekil 1.3.) [46,47].



Şekil 1.3. Klopidoğrel'in aktif ve inaktif metabolitleri [94]

Karaciğerde Klopidoğrel metabolizmasında görev alan temel enzim CYP2C19dur .[8] CYP2C19, 55.93 kDa'luk (490 aa) bir proteindir ve CYP2C19 (90.21 kDa) geni tarafından kodlanmaktadır. Kromozomal lokasyonu 10q24.1q24.3 olan CYP2C19 geninin 9 adet ekzonu bulunmaktadır [46].

CYP2C19 geninde 50'ye yakın tek nükleotid polimorfizmi (TNP) sonucunda oluşan varyantı, hastaların ilaca verdiği yanıtları etkilerken, varyasyonlar Klopidoğrel'in hızlı ve yavaş gibi metabolizör fenotiplerini ve dozunu belirler.

Normal veya yabanıl tip (*wild type*) allel genellikle \*1 olarak ifade edilmektedir [10].

CYP2C19 geninde en çok gözlemlenen polimorfik alleller ise CYP2C19\*2, CYP2C19\*3 ve CYP2C19\*17dir [Tablo 1.1.].

**Tablo 1.1.** Klopidogrel metabolizmasında görev alan CYP2C19 enziminin polimorfik allelleri[49, 50]

Polimorfik Allel	Lokasyon	Enzimatik Aktivite	Oluşan Fenotip (%)
CYP2C19*2	5. ekzon bölgesinde 681 G>A	Yok	Yavaş Metabolizör (~ %2-15)
CYP2C19*3	4. ekzon bölgesinde 636 G>A	Yok	Yavaş metabolizör (~ %2-15)
CYP2C19*17	5' regülatör bölgesinde 991A > G	Enzimatik Aktivite Yüksek	Hızlı metabolizör (~ %30)

### 1.2.1 Klopidogrel'in etki mekanizması

Klopidogrel'in etki mekanizmasında görev alan ADP ve G protein bağlı reseptörleri kritik rol oynarlar. Trombüs oluşumu için ADP, G-protein bağlı reseptörlerine ( $P_2Y_1$  ve  $P_2Y_{12}$ ) bağlanır [51].

Gq-bağlı  $P_2Y_1$  reseptörünün uyarılması, fosfolipaz C'yi aktive eder ve sitozolik kalsiyumda geçici bir artışı indükleyerek, trombositlerde konformasyonel değişime ve geçici kümeleşmeye sebep olur [52].

Gi-bağlı  $P_2Y_{12}$  reseptörünün ADP ile aktivasyonu, bağımsız sinyalizasyon olaylarını bir araya getiren ve sürekli bir trombosit kümeleşmesine yol açan, Gi protein alt ünitelerinden  $\alpha$ Gi ve  $\beta\gamma$ 'yi serbest bırakır [53].

$\alpha$ Gi alt birimi, adenilat siklazın inhibisyonu ile trombosit siklik adenosin monofosfat (cAMP) seviyesini azaltır. cAMP inhibisyonu, vazodilatör ile uyarılan fosfoprotein (VASP) cAMP-bağlı protein kinaz aracılı fosforilasyonunu engelleyerek trombosit aktivasyonu üzerinde kolaylaştırıcı bir etkiye yol açar.  $\alpha$ Gi alt birimi ayrıca bazı spesifik kinazların aktivasyonunda azalmaya da yol açarak vazodilatör ile uyarılan fosfoprotein



Klopidogrel'in ADP reseptörüne bağlanması ile, fosfolipaz C seviyesindeki gerçekleşen azalma ve buna bağlı olarak kalsiyum miktarındaki azalış ile trombositlerin aktivasyonu ve agregasyonunda önemli role sahip olan şekil değişikliğinin oluşması engellenir. Klopidogrel'in P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>'ye bağlanarak bağımsız sinyalizasyonları azaltması, αGi ve βγ'nin serbest kalmasını engelleyerek GPIIb/IIIa reseptör aktivasyonunu azaltır. Fibrinojen, aktivasyonu engellenen GPIIb/IIIa reseptörüne bağlanamayacağından trombosit agregasyonu inhibe edilmektedir [52,53,61].

### 1.2.2. Klopidogrel'in yan etkileri ve hepatositlerdeki sitotoksitesisi

Son yıllarda yapılan Klopidogrel çalışmaları aktif metabolitlerin sadece Klopidogrel'in farmakolojik aktivasyonunu değil, hepatotoksik etkileri de oluşturduğunu göstermiştir. Klopidogrel'in neden olduğu yan etkiler arasında; gastrointestinal hastalıklar, kanama, nötropeni, hepatositlerde toksik etki, karaciğer yetmezliği sayılabilir. Ayrıca, Klopidogrel'in bazı hücre soylarında sitotoksik etkileri de olduğu bildirilmiştir (Tablo1.2) [63].

**Tablo 1.2.** Klopidogrel'in yaygın, az yaygın ve nadir görülen yan etkileri [63]

Yaygın Yan Etkiler	Az Yaygın Yan Etkiler	Nadir Görülen Yan Etkiler
Göğüs ağrısı	Burun kanaması	Nötropeni
Deride morarma	Ağrılı idrar	Kan kusma
Kızarıklık	Nefes alıp vermede kısılma	Ülser
Kaşıntı	Kan sayısında azalma	Deri dökülmesi

### 1.3. Hepatositler ve özellikleri

Karaciğer vücuttaki en büyük dokudur ve karaciğer hacminin % 70-85'i parankimal hepatositlerle kaplıdır. Hepatositler büyük miktarda protein ekspresyonu yapar ve proteinleri kana bırakır [64].

Hepatositler, memelilerde tek tabakalı kalın plakalar halinde yer alır ve plakalar, birbirlerinden büyük kılcal boşluklar (sinüzoid) ile ayrılır. Sinüzoidler, bazal membran içermeyen kesintili, endotelial hücrelerle karakterizedir. Karaciğerin fonksiyonel birimleri olarak kabul edilen hepatik plakalar lobüller halinde düzenlenmektedir [65]. Hepatositler çeşitli metabolik ve biyokimyasal fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynarlar. Karaciğer dokusu, serum proteinlerinin, karbonhidratların ve lipidlerin metabolizmasından sorumludur. Ayrıca, karaciğer detoks sistemi olarak hayati bir rol oynamaktadır [66].

Hepatositlerin işlevleri aynı seviyede gerçekleştirmez ve karaciğerdeki asinüs modeli farklı bölgelerdeki hepatositler arasında fizyolojik ve metabolik heterojeniteyi yansıtmaktadır [67]. Karaciğer, biyotransformasyon yollarını takip eden bol miktarda metabolik enzime sahiptir; bu yollar, gerçekleştirilen reaksiyonların türüne göre “Faz I” ve “Faz II” olarak adlandırılır. Faz I reaksiyonları, Faz II konjugasyon reaksiyonlarına maruz kalabilecek fonksiyonel grupları ortaya çıkarmaktadır. Nihai amaç, oluşan metaboliti, idrar veya safra yoluyla eliminasyon için suda daha çözünür hale getirir. Faz I enzimleri birçok ilacın metabolize edilmesinde görev olan CYP450 enzimlerini kapsar [68].

### **1.3.1. AML 12 hepatositleri**

Hepatositler, gen regülasyonu ve biyotransformasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak tümörjenik olmayanlar dışında replike olan, farklılaşmış hücreler olarak uzun süreli kültürde muhafaza edilemezler [69].

Bir fare (CD1 suşu, MT42)’den elde edilen AML12 (alfa fare karaciğer 12) hücre hattı, insan TGF alfa için transgenik olduğundan (yüksek seviyede insan TGF alfa ifade eder) bu çalışmalarda kullanılması oldukça uygundur.

AML12 hepatositlerinin elektron mikroskobu incelemelerinde peroksizom ve safra kanalı benzeri yapılardan ibaret tipik hepatosit özelliklerini sergiledikleri bilinmektedir [70].

### **1.4. Sitotoksisite**

Sitotoksisite, bir kimyasal veya fiziksel ajanın hücrede advers reaksiyon yaratmasıyla oluşmaktadır. Advers reaksiyon, bir ilacın, hastalıktan korunma, hastalığı teşhis ve

tedavi etme amacıyla normal dozda kullanımı sonucunda oluşan zararlı etkidir. Sitotoksositeyi tayin etmede kullanılan yöntemlerde genellikle kontrol hücrelerindeki hücre işlevini ve / veya bütünlüğünü toksik, stres veya hastalığa maruz bırakılan hücreler ile karşılaştırır [71].

Toksinler ile etkileşime geçen memeli hücreleri, membran bütünlüğünün de kaybolmasına yol açan bir dizi yapısal ve morfolojik değişikliğe uğramaktadırlar [72].

Hücre plazma membranı, hücreyi dış ortamdan ayıran, hücreyi saran ve yarı geçirgen özelliğe sahip olan bir yapıdır. Plazma membranının hücre sınırlarını belirleme, hücreye gelen sinyalleri algılama ve hücreyi koruma gibi hayati görevleri bulunmaktadır. Plazma membranında toksisite sonucu oluşan bir hasar, hücrenin bütünlüğünü kaybetmesine sebep olmaktadır [73].

Hasar kontrol mekanizması ökaryotik hücrelerin hayatta kalması için bir gereklilik olup, plazma membranında oluşan hasarlar kontrolsüz kalsiyum ve potasyum birikimine ve sitoplazmik içeriklerin dış ortama akışına sebep olarak hücrenin ölümüne yol açar [74].

Karaciğer hücrelerinde gerçekleşen sitotoksosite, hepatotoksosite olarak adlandırılır.

#### **1.4.1. Hepatotoksosite**

Karaciğer, ilaç toksisitesinde rol alan en önemli doku olup, metabolizmanın gerçekleştiği başlıca bölgedir [75].

Çoğu ilaç lipofiliktir. İlaçlar, karaciğer hücrelerinde biyokimyasal işlemlerle (biyotransformasyon) daha hidrofilik hale gelir ve idrar veya safradan atılan suda çözünen ürünleri verir. Bu hepatik biyotransformasyon öncelikle sitokrom P-450 enzim sistemi vasıtasıyla gerçekleşen oksidatif yolları içermektedir. İleri metabolik basamaklardan sonra genellikle bir glukuronid, bir sülfat veya glutatyona konjugasyon içeren hidrofilik ürün, hepatosit zarında bulunan nakil proteinleri ile plazma veya safra içine ihraç edilir ve daha sonra böbrek veya gastrointestinal sistem tarafından atılır [75].

##### **1.4.1.1. İlaç kaynaklı hepatosit toksisitesi**

İlaç kaynaklı karaciğer hasarı ( *Drug Induced Liver Injury*, DILI), batı ülkelerinde ciddi karaciğer hastalığının önde gelen nedeni haline gelmiştir ve bu nedenle önemli bir klinik ve düzenleyici sorun teşkil etmektedir.

İlaç kaynaklı hepatosit toksisitesi ve hasarı genellikle intrinsek (*intrinsic*) ve idiyosenkratik hepatotoksisite olarak sınıflandırılmaktadır.

İntrinsik hepatotoksisite doz bağımlı olarak kabul edilir ve eşik dozun üzerinde alınan durumlarda öngörülebilir. Toksisite ilacın kendisine veya oluşan bir metabolitine bağlı olarak gözlemlenebilir [76-79].

İdiyosenkratik hepatotoksisite, doza bağlı olmaksızın, öngörülmesi mümkün olmayan bir toksisite şeklidir. İdiyosenkratik hepatotoksisitede, majör histokompatibilite kompleksikompleks hücre yüzeyi reseptörleri (HLA) ve ileri immün reaksiyonlarla ekspresyonları artan TNF-alfa ve interlökin 10 gibi sitokinlerin görev aldığı düşünülmektedir. Alerjik idiyosenkratik hepatotoksisite de ise ateş, deri reaksiyonları, eozinofilisi, otoantikorlar oluşumu gibi tipik semptomların ve adaptif immün reaksiyon belirtilerinin varlığı ile karakterizedir [76-79].

İlaç kaynaklı oluşan toksisitenin sonuçları hücrenin tipine, durumuna, adaptasyonuna ve genetik yapısına bağlıdır. Aynı toksin dozuna maruz kaldığında, sitokrom P450 kodlayan genlerde varyasyonu bulunan kişiler, toksini farklı oranlarda katabolize edebilirler. İlaçlara ve toksinlere verilen yanıtlarda genetik polimorfizmlerin rolünün anlaşılmasına yönelik çalışmalara halen devam edilmektedir.

#### **1.4.1.2. Hepatotoksisite ve Karaciğer Hasarında Rol Alan Moleküler Mekanizmalar**

Sitokrom P-450 enzimlerini içeren yüksek enerjili reaksiyonlar, ilacın hücre içi proteinlere kovalent olarak bağlanarak, hücre içinde işlevsel bozukluklara neden olur. Bu durum, iyonik gradyan kaybı, ATP seviyesinde düşüş ve aktin polimerizasyonunda bozulmaya neden olur. Hepatosit yüzeyindeki aktin fibrillerinin parçalanması, tomurcuklanma, plazma membranında parçalanma ve son olarak hücre ölümü ile sonuçlanabilir [80,81].

Bazolateral (sinüsoidal) veya apikal (kanaliküler) taşıma sistemlerini etkileyen genetik veya çevresel faktörler, hepatositlerin sadece ilaçların toksik ürünlerine değil, aynı zamanda toksik safra bileşenlerine de maruz kalmasına yol açarak hepatotoksisiteye neden olur [82].

İlaçlar nispeten küçük moleküller olduğundan herhangi bir immün cevabı oluşturmaları olası değildir. Bununla birlikte, yüksek enerjili reaksiyonları içeren biyotransformasyon, ‘komplekslerin’ oluşumuna sebep olabilmektedir. Oluşan kompleksler, enzimlere kovalent olarak bağlanan ilaçların ürünlerine karşılık gelir. Bağışıklık sistemindeki hedefler olarak algılanması gereken bu kompleksler, antikor oluşumunu uyarmak (antikor aracılı sitotoksosite) veya direkt sitolitik T hücre yanıtını indüklemek amacı ile hepatosit yüzeyine göç ederler. Böylece uyarılmış olan ikincil sitokin reaksiyonu, iltihaplanma ve nötrofil aracılı hepatotoksositeye neden olur.

Programlanmış hücre ölümü (apoptoz) immün aracılı hasar ile ortaya çıkabilir ve hepatositleri tümör nekroz faktörü (TNF) ve Fas yolları ile tahrip ederek, hücre plazma membranının tomurcuklanmasına, nükleer kromatinin parçalanmasına ve son olarak hücre ölümüne neden olmaktadır. [83,84].

Reaktif metabolitler veya ana ilaçlar ATP tükenmesine, solunum zincirini aktivitesini engellemeye, reaktif oksijen türlerinin (ROT) konsantrasyonunun artmasına ve mitokondriyal DNA hasarına sebep olabilir. Doğrudan mitokondriyal geçirgenlik geçişine (MPT), yani iç zar içinde bulunan “MPT gözeneğinin” açılmasına neden olur [55,56]. Bazı ilaçlar, her iki beta-oksidasyonu (nikotinamid adenin dinükleotit ve flavin adenin dinükleotidin sentezini inhibe ederek enerji üretimini etkileyerek, ATP üretiminin azalmasıyla sonuçlanan) ve solunum zincir enzimleri üzerinde ikili bir etki ile mitokondriyal fonksiyonu inhibe eder [85].

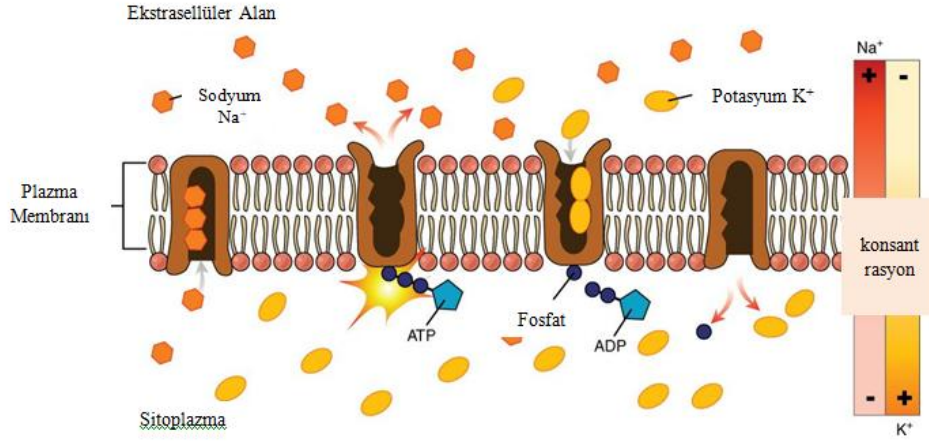
Serbest yağ asitleri metabolize edilemez ve aerobik solunum yetersizliği laktat ve reaktif oksijen türlerinin birikimine neden olur. Reaktif oksijen türlerinin varlığı, mitokondriyal DNA'yı daha da bozabilir [85].

Yukarıda belirtilen ilaç kaynaklı oluşan hepatotoksosite mekanizmaları, hepatositlerde aşağıda açıklandığı gibi plazma membranı hasarına sebep olabilmektedir.

### **1.5. Plazma membran hasarı**

Belirtildiği üzere, yüksek enerjili reaksiyonlar ve biyotransformasyon sonucu üretilen reaktif metabolitler, hücrede ATP yoksunluğuna sebep olabilmektedir. ATP yetersizliği görülen hücrelerde, ATP-bağımlı sodyum pompalarının aktivitesi azalır bu durum hücre içi sodyum birikimi ve hücre dışı potasyum akışı ile sonuçlanmaktadır. Hücredeki

sodyum birikimi, suyun hücre içine doğru akışı ile takip edilerek hücre şişmesi ve membran parçalanması ile sonuçlanmaktadır (Şekil 1.5).



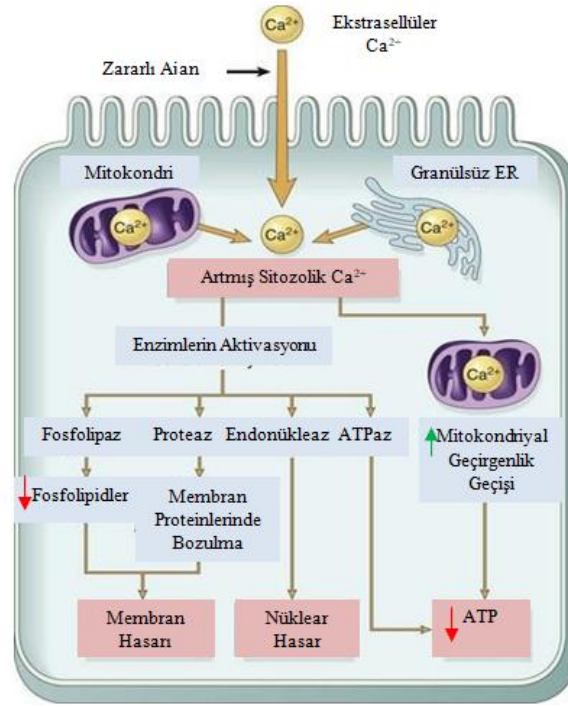
Şekil 1.5. ATP bağımlı sodyum-potasyum pompası [96]

ATP seviyesinde bir düşüş meydana geldiğinde, hücrelerdeki fosfolipid sentezi gibi enerji bağımlı aktivitelerde aksamlar gerçekleşmektedir. Bu durum, tüm hücre membranlarını etkilemektedir [96].

Sitozolik kalsiyum artışına bağlı gerçekleşen plazma membran hasarında; kalsiyum iyonuna bağlı gelişen moleküllerin aktivasyonu ile birlikte, hücre sinyalizasyonu da yer almaktadır. Kalsiyum ikinci haberci bir molekül olup hücre içi konsantrasyonu oldukça düşüktür ( $\sim 10^{-8}$  mol). Kalsiyumun ekstraselüler seviyeleri ise yaklaşık  $10^3$  moldür [96].

Kalsiyumun hücre içinde düzenleyici rol oynaması sebebiyle, konsantrasyonunun düşük seviyede tutulması son derece önemlidir. Endoplazmik retikulum ve mitokondri hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu ayarlayarak, kalsiyum deposu görevi görmektedirler [96].

İlaçların aktif metabolitleri başlangıçta hücre içi depolardan kalsiyum iyonunun salınması ve daha sonra plazma zarı boyunca artan kalsiyum akışına sebep olarak sitozolik kalsiyum konsantrasyonunda artışa neden olmaktadır. Artan sitozolik kalsiyum iyonları, hücrede zararlı etkileri olan fosfolipazlar, proteazlar ve endonükleazlar ile ATPazları kapsayan bir dizi enzimi aktive eder (Şekil 1.6) [96].



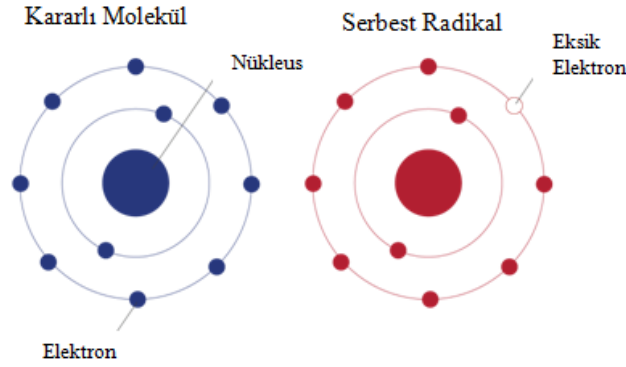
**Şekil 1.6.** Sitozolik kalsiyum iyonu artışı ve sonuçları [96]

Sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun yükselmesiyle gerçekleşen fosfolipaz aktivasyonu, membran fosfolipidlerinin parçalanması ile ilişkilidir [96].

Esterleşmemiş serbest yağ asitleri, açıl karnitin, ve lisofosfolipidler, lipidlerin yıkımı ile oluşan ürünlerdir. Tüm bu ürünler, fosfolipidlerin bozulması sonucu hücrede birikir ve bu katabolik ürünlerin plazma membranı üzerinde deterjan etkisi olduğundan zarı parçalayarak hücrenin ölümüne sebep olur [96].

Hücre iskeleti filamentleri, plazma zarını hücre iç kısmına bağlayan bağlantılar gibi davranır ve normal hücresel mimari, motilite ve sinyalizasyonda birçok fonksiyona hizmet eder. Proteazların artmış sitozolik kalsiyum iyonu ile aktivasyonu, hücre iskeletinin elemanlarına zarar vererek membran hasarına yol açar [96].

Serbest radikallerin birikimi sonucu oluşan plazma membran hasarında; en dış yörüngesinde tek bir eşlenmemiş elektronu olan kimyasallar rol almaktadır (Şekil 1.7) [96].



Şekil 1.7. Kararlı bir molekül ve serbest radikalın şematik gösterimi [87]

Süperoksit anyon ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH \bullet$ ) gibi reaktif oksijen türleri (*Reactive Oxygen Species, ROS, ROT*), oksijenin kısmi indirgenmesiyle oluşur [87].

ROT, normalde redoks reaksiyonları sırasında tüm hücrelerde küçük miktarlarda üretilir. Nötrofiller ve makrofajlar tarafından inflamasyon ve konakçı savunması sırasında mikroorganizmaları ve diğer maddeleri yok etmek için bir silah olarak üretilir.

ROT, zarların lipid peroksidasyonu mekanizması ile plazma membran hasarına neden olmaktadır. Plazma membranında bulunan çoklu doymamış lipidlerdeki çift bağlar oksijen türevi serbest radikallerin saldırısına karşı savunmasızdır [88]. Lipid-radikal etkileşimleri kendiliğinden kararsız ve reaktif olan peroksidazları üretir ve otokatalitik zincir reaksiyonu oluşur. Lipidlerin ve membran proteinlerinin oksidasyonu ile artan zar geçirgenliği, iyon değişimlerini bozarak metabolik süreçleri değiştirir [89].

Kaçak iletkenliğin güçlü bir şekilde artması membran potansiyelinin depolarizasyonuna katkıda bulunur, zarın bariyer özelliklerini yok eder ve sitoplazmik kalsiyum konsantrasyonunun artışı yoluyla hücre ölümüne yol açar [90].

Plazma zarı hasarı, ozmotik dengenin kaybolmasına ve sıvı ve iyonların akmasına ve ayrıca hücre içeriğinin kaybına neden olur. Hücreler ayrıca, ATP için hayati öneme sahip olan metabolitleri sızdırarak enerji depolarını tüketebilir [89,90].

## 1.6. Apoptoz

Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz süreci genellikle farklı morfolojik özellikler ve enerjiye bağlı biyokimyasal mekanizmalar ile karakterize edilir. Apoptoz, hücrenin kendi nükleer dna ve sitoplazmik proteinleri parçalayan enzimleri aktive ettiği hücre ölümünün bir şekli olup genetik kontrol altındadır. Normal hücre döngüsü, bağışıklık sisteminin uygun gelişimi ve işleyişi, hormona bağlı atrofi, embriyonik gelişim ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü gibi çeşitli işlemlerin hayati bir bileşeni olarak kabul edilir [91].

Apoptoz, kaspaz adı verilen enzimlerin aktivasyonu ile gerçekleşir. Mekanizma, aktif yerlerinde bir sistein olan ve hedef proteini aspartik asitlerden kesen bir proteaz ailesi olan kaspazlar tarafından kontrol edilir. Kaspazlar dışsal yolak (ölüm reseptörü olarak da adlandırılır) veya intrinsik yolak (mitokondriyal olarak da adlandırılır) olmak üzere iki mekanizma ile aktive edilir [92].

### 1.6.1. İntrensek yolak

Mitokondri, apoptozu indükleyebilen bir çok proteini içermektedir; bu proteinler sitokrom c ve apoptoz inhibitörlerini nötralize eden diğer proteinlerden oluşmaktadır. Hücre yaşamı ve ölümü, 20 proteini içeren Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenmektedir [96].

Bcl-2 protein ailesi, proapoptotik BH3 üyeleri (Bim, Bid, Puma, Noxa, Bad), proapoptotik efektör molekülleri (Bax, Bak) ve antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerini (Bcl-2, Bcl-xl, A1, Bcl-B) içeren üç alt familyaya sahiptir [84].

Sağlıklı hücrelerde, Bax/Bak eylemi antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından engellenmektedir. Büyüme, hayatta kalma faktörleri yoksunluğu, genotoksik ajanlar gibi apoptotik uyarılara karşı oluşan cevapta ise BH3 üyelerinin transkripsiyonu artmaktadır. Aktifleşen BH3 ailesi proteinleri ise Bak ve Bax üzerinde etkili olarak antiapoptotik Bcl-2 aile üyelerini antagonize etmektedir. Bax ve Bak daha sonra mitokondriden sitokrom c salınımını uyarır ve sitokrom c, Apaf-1 (apoptotik proteaz aktivasyon faktörü 1) ile dATP / ATP-bağımlı bir şekilde apoptozom olarak adlandırılan heptametik bir kompleks oluşturur [84].

Bu kompleks, monomerik prokaspaz 9 u stimüle ederek, aktif heterodimerik kompleks oluşturmak için otokatalitik bölünmeye maruz kalan bir dimer oluşturmaya yardımcı olur. Aktive edilmiş kaspaz 9, kaspaz 3'ü ayırarak aktive eder. Böylece kaspaz kaskadı başlayarak, nükleer fragmentasyon ile sonuçlanır [84].

### 1.6.2. Ölüm reseptörü yolağı

Ölüm reseptörü yolağı, TNF familyasının ölüm faktörleri (Fas ligandı- FasL, tümör nekroz faktörü  $\alpha$ - TNF  $\alpha$  , TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand-T TRAIL ) tarafından tetiklenmektedir [4,9]. Bir ölüm faktörünün kendine özgü reseptörüne bağlanması, *DISC* (ölüm indükleyen sinyalleşme kompleksi) üretir.

TNF reseptör ailesi, 'ölüm bölgesi' olarak adlandırılan, yaklaşık 80 aminoasitten oluşan sistein zengin bir ekstraselüler domain ve sitoplazmik domaine sahiptir [93].

Bu ölüm bölgesi, ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içi sinyalizasyon yollarına iletilmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Ölüm faktörü ile indüklenen apoptozu iki yolağa takip etmektedir. Tip I hücrelerinde (timosit), kaspaz 8 prokaspaz 3 ü doğrudan aktive eder. Tip II hücrelerde (hepatositler, fibroblastlar), kaspaz 8 sadece bir BH3 üyesine sahip Bid'i ayırır. Bcl-2 ailesi ve ayrılmış Bid (tBid), mitokondriden sitokrom c salınımını indükler [9,30]. Sitokrom c, daha sonra intrinsik ölüm yolunda gerçekleştiği gibi kaspaz 9- kaspaz 3 yolunu aktive eder.

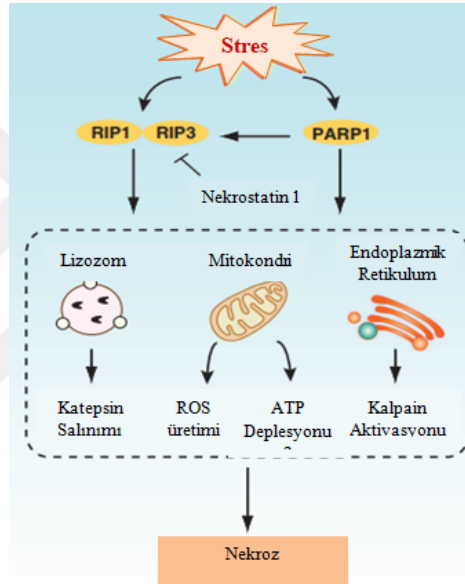
Apoptoz geçiren hücrelerde sonuç olarak, hücre büzülür ve hacmi azalır. Kromozomal DNA fragmentasyon geçirerek 180-200 baz çiftlik nükleozomal birimlere ayrılır. Hücre zarı ile çevrili olan apoptotik cisimler oluşur, hücre bütünlüğü bozulmaz ancak geçirgenliği etkilenebilir. Hücre yüzeyine fosfatidil serin göçü gerçekleşir ve son olarak apoptotik cisimler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından sindirilir. [63,83,84,86].

### 1.7. Nekroz

Nekroz organellerin şişmesi, reaktif oksijen türlerinde ve kalsiyum miktarında artış, ATP miktarında azalma, kalpain ve katepsin proteazların aktivasyonu ve son olarak organellerin ve hücre zarının parçalanması ile takip edilen tipik moleküler ve hücresel olaylar dizisini takiben gerçekleştiği saptanmıştır. Genetik ve kimyasal manipülasyonlar, nekrozun inhibe edilebileceğini belirterek nekrozun kontrol edilebileceğini ve belirli bir "programı" izlediğini göstermektedir [36]. "Nekroptoz"

terimi hücrelerin ölüm reseptörü aracılığı ile kaspaz-8'i aktive etmesinden yoksun olduğu zaman programlanmış nekrozu tarif etmek için kullanılmaktadır.

Kinaz reseptör-birleştirici protein RIP1/RIP3 içeren 'nekrozomlar' nekroptik sinyalizasyonu aktive etmektedirler. Nekrotik ölüm uyarıları ayrıca, RIP kinazlarının veya başka bir sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla nekrozu indükleyebilen PARP-1'i de aktive edebilir. RIP1 / RIP3 ve PARP-1 aracılı nekroz aktivasyonunun katepsin salınımı, artan ROS üretimi, ATP tükenmesi ve kalpain aktivasyonu ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Nekrostatin 1, RIP1'in küçük bir molekülü inhibitörüdür (Şekil 1.8) [10].



**Şekil 1.8.** Nekroz aktivasyonu ve sonuçları [14]

Morfolojik olarak nekroz, hücre zarının bozulması, sitoplazma ve mitokondrilerin şişmesi ve organellerin parçalanması ile karakterizedir. Apoptotik hücrelerdeki DNA spesifik olarak parçalanırken, nekrotik hücrelerdeki DNA genellikle hücre dışı DNAz I veya lizozomal DNAz II tarafından rastgele ayrılır. Nekrozda, hücre içi içerikler enflamasyonu artıran bir "tehlike sinyali" olarak hareket edebilecekleri hücre dışı çevreye sızarlar. Nekrozun temel nedenleri arasında kalsiyum aşırı yüklenmesi, ROS oluşumu, hücre içi enerji tükenmesi ve membran lipid hasarı sayılabilir [14].

Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) DNA iplikçik kırılmaları ile aktive edilir, böylece DNA onarımı ve hasar görmüş DNA'ya enzim erişimi kolaylaştırılır. PARP-1'in

indüklenmiş aşırı aktivasyonu, TRAF2 / RIP1 / JNK-bağımlı bir şekilde nekroza yol açan ATP tükenmesine neden olur. Nekroz aktivasyonu sıklıkla artmış ROT üretimi, kalpain aktivasyonu, lizozomal destabilizasyon ve katepsin salınımı ile gerçekleşir.

Sitoplazmik  $Ca^{2+}$  miktarındaki artış, kalpain gibi kalsiyum bağımlı proteazların aktivasyonuna yol açmaktadır. Kalsiyum miktarındaki artış, hücre içi depolardan olabileceği gibi hücre dışı kaynaklardan da olabilmektedir. Mitokondriyal geçirgenlik geçişinin hasar görmesi, membran potansiyel kaybına, mitokondriyal şişmeye ve organellerin hasarına yol açmaktadır. Lizozomal parçalanma, sitoplazmanın asidifikasyonuna ve katepsinlerin salınımına yol açar [96].



## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

1. Klopidoğrel Hidrojen Sülfat (419.891 g/mol) (*Sigma Aldrich*)
2. DMEM (DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) / Ham's F-12 (1:1) (*Merck*)
3. Fosfatla Tamponlanmış Tuz Çözeltisi (PBS) (1X).0067M (PO<sub>4</sub>) (*Thermo Scientific™*)
4. Transferin (*Nalgene*)
5. Selenyum (*Aldrich*)
6. Deksametazon (*Sigma*)
7. İnsülin (*Sigma*)
8. Tripsin (*Thermo*)
9. Penisilin (*Biosera*)
10. Amfisilin (*Fisher Scientific*)
11. Triton X-100 (*Sigma*)
12. LDH Kiti (PAN I 96.1200 Kit Ürünü) (*Xenometrix*)
13. Dimetil Sülfoksit (*Thermo Scientific™*)
14. Amfoterisin (*Fisher Scientific*)
15. Etanol (*Merck*)
16. Fetal Sığır Serumumu (*Biosera*)
17. Tripsin/EDTA (*PAN Biotech*)

#### 2.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

1. Forma Steri Cycle CO<sub>2</sub> inkübatör (*Thermo Scientific*)
2. -80° C derin dondurucu (*Thermo Scientific*)
3. Multiskan FC mikropilaka okuyucu (*Thermo Scientific*)
4. Mikrofuje 16 setüstü mini santrifüj (*Beckman Coulter*)
5. 3-18KH ısıtmalı ve soğutmalı santrifüj (*Sigma*)
6. Otoklav (*Alp*)
7. Su banyosu (*Stuart*)
8. İntert Faz-kontrast mikroskop (*Euromex*)

9. Vortex (*Grant Bio*)
10. Hassas tartı (*Radwag*)
11. Ultra Saf su cihazı (*Elga Option-Q*)
12. Manyetik karıştırıcı (*Stuart*)
13. 25 cm<sup>2</sup>lik flask (*Spl lifesciences*)
14. 96 kuyucuklu mikropılaka(*NEST*)
15. Falkon Tüp(*TPP TubeSpin Bioreactor*) (50 ml'lik)
16. Elektronik pipet seri (*Thermo Scientific™*)
17. Steril enjektör(*Set Inject*)
18. 0,2 µ filtre (*Sartorius*)
19. Çeker ocak(*SETLAB ®*)
20. + 4 Buz dolanı (*Vestel*)
21. Ultraviyole Steril Kabin (*Tez-San Biosafety cabinet Class II*)
22. -20 Derin dondurucu (*Vestel no frost*)
23. CO<sub>2</sub> Etüv (*Thermo Scientific*)
24. Tripan Mavisı (*Rhex-ID*)
25. Neubauer Lamı (*MARIENFELD*)

## **2.2. Yöntem**

### **2.2.1. AML12 hepatosit kültürü**

#### **2.2.1.1. Hücre kültür besiyerinin hazırlanışı**

-45 ml *DMEM & Ham's F12*

-50 µl Transferin

-50 µl Selenyum

-400 µl Deksametazon

-125 µl İnsülin

50 ml'lik falkon tüpe eklendi ve filtreden steril enjektör yardımı ile süzöldü.

-500 µl penisilin

-500 µl amfisilin

-5 ml serum eklenerek, besiyeri hazır hale getirildi (Şekil 2.1).



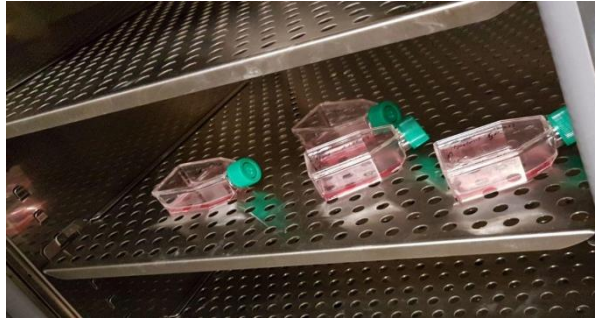
**Şekil 2.1.** Hücre kültür besiyerinin değiştirilme işlemi

### **2.2.1.2. Hücrelerin 25 cm<sup>2</sup>'lik flaslara ekilmesi**

1. Kültür besiyeri hazırlandıktan sonra, hücrelerin ekileceği her bir flaska 3 ml kültür meydamu eklenerek hazır hale getirildi.
2. Likit nitrojende donmuş olan AML12 hepatositleri çözünmeye bırakıldı.
3. Hücreler çözüldükten sonra, tüpe 1 ml besiyer eklenerek pipetaj yapıldı.
4. Pipetaj sonucunda oluşan süspansiyon, hazır halde bulunan 25 cm<sup>2</sup>'lik flask a ekilerek üzerine 3 ml kültür besiyeri eklendi.
5. Hücrelerin ekili olduğu flask invert mikroskop altında incelenerek ve hücre CO<sub>2</sub> etüvüne eklendi.

### **2.2.1.3. Hücrelerin inkübasyonu**

Hücreler çoğalmaları için 37° C derece ve %5 oranında CO<sub>2</sub> içeren etüvde bekletildiler (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2.** Hepatosit flaslarnın etüvde inkübasyonu

#### **2.2.1.4 Hücrelerin pasajlanma işlemi**

Çoğalan hücreler buldukları flaskın zemininin %90'ını kapladığında hücreler pasajlandı.

Hücre Pasajlama işlemi;

1. Öncelikle flask'da bulunan kültür besiyeri uzaklaştırıldı.
2. 25 cm<sup>2</sup>'lik flaskdaki zemine tutunan hücreler 3ml PBS ile yıkandı.
3. PBS uzaklaştırıldı ve hücreleri kaldırmak için 1ml tripsin basınçlı bir şekilde flaska eklendi.
4. 1 ml hücre kültür besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı.
5. Pipetajlanan homojen karışım 5 ml'lik PCR tüplerine aktarıldı ve 1500 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifüj işleminden sonra, süpernatant tüpten uzaklaştırıldı ve pelletin üzerine kültür besiyeri eklendi ve oluşan süspansiyon yeni flaslara bölüştürüldü.
8. Pasajlanan hücreler 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübasyona bırakıldı.

#### **2.2.1.5. Hücrelerin sayım işlemi**

Eppendorf tüpe 1 mL kültür besiyeri ile sulandırılan hücrelerden 10 µL alındı, üzerine 90 µL tripan mavisi boyası eklendi. Bu karışım Neubauer lamı 36 üzerine konuldu ve lam üzerindeki 5 bölmede hücre sayımları yapıldı. Elde edilen rakam ile dilüsyon faktörü (50.000) ile çarpıldı. Çıkan sonuç 1 mL besiyerde kaç milyon hücre olduğunu göstermektedir. Ekim yapılırken, hesaplanan bu sayı dikkate alındı ve hücrelerin petriye ekimleri yapıldı. Böylece her 100 mm<sup>2</sup>'lik kültür petrisine 5x10<sup>6</sup> hücre ve 96 kuyucuklu kültür plağının her kuyucuğuna en az 5000 hücre transferi sağlandı.

#### **2.2.2 Hepatosit sitotoksosite analizi**

##### **2.2.2.1. Hepatotoksosite ve LDH testi**

Hepatositlerde sitotoksositeyi tayin etmek için LDH (laktat di hidrogenaz) kiti ve yöntemi kullanılmıştır.

Hücre ölümü veya sitotoksosite klasik olarak plazma membran hasarı miktarının belirlenmesi ile değerlendirilir. Hücreler sitotoksik bileşiklere maruz kaldıklarında ve hücre zarları herhangi bir şekilde tehlikeye girdiğinde veya hasar gördüğünde, her canlı hücrenin içinde bulunan çözünebilir ancak kararlı bir enzim olan laktat dehidrojenaz (LDH), ekstraselüler boşluğa salınır. LDH salınımı sadece hücre zar bütünlüğünün tehlikeye girmesiyle gerçekleştiğinden, enzimin kültür ortamındaki varlığı bir hücre ölüm belirteci olarak kullanılmaktadır.

LDH aktivitesi enzimatik bir test ile belirlenmektedir. İlk adımda, LDH NADH'yi nikotinamid adenin dinükleotit (NAD<sup>+</sup>)'ye oksitleyerek piruvatı laktata indirgemektedir.

NADH'nin 340 nm'de absorbanası maksimum olduğu için, NADH seviyesindeki azalma oranı ölçülebilir ve LDH aktivitesini belirlemek için kullanılabilir. Bu prensipten yararlanılarak, 340 nm'de OD'de bir azalma ile NADH tüketimi spektrofotometrik olarak ölçülür.



LDH testi, ajanların hücrelerde yarattığı membran hasarını belirlemek için oldukça hızlı ve basit bir yöntem olduğundan, klopidogrel'in neden olduğu hepatotoksosite analizinde kullanımına uygundur.

Klopidogrel'in AML12 hepatositlerinin plazma membranında sebep olduğu hasar ve sitotoksosite, bu yöntemle göre değerlendirilmiştir. Uygulamada LDH kitinin talimatları izlenmiştir.

LDH testinin uygulanmasından 48 saat önce, 96 kuyucuklu plakaya her bir kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde 300 µL hücre-kültür besiyeri süspansiyonu eklenerek ekim yapıldı. 96 kuyucuklu plaka 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübasyona konuldu ve hücrelerin plaka yüzeyine yapışması sağlandı.

Hücrelerin 96 kuyucuklu plakaya ekiminden 24 saat sonra, hücrelere Klopidogrel uygulandı ve plaka tekrar inkübatör ortamına konuldu ve Klopidogrel'in sitotoksitesini için 24 saat inkübe edildi.

### 2.2.2.2. Negatif kontrol ve total LDH kontrolün hazırlanması

1 plaka için:

- 500 µl çözücü, 4.5 ml kültür besiyeri ile karıştırıldı ve çözücü kontrolü elde edildi (SC).
- Total LDH kontrolü için %1 Triton X-100 içeren 900 µl kültür meydanı hazırlandı (TL).

### 2.2.2.3 . Hücrelerin klopidogrel'e maruziyeti

- Plakanın B2, C2 ve D2 kuyucuklarına 300 µl kültür besiyeri eklendi (hücre büyümesi kontrolü –GC-).
- E11, F11 ve G11 kuyucuklarına yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan %1 Triton X-100 içeren kültür besiyeri 300 µl eklendi ( Pozitif Kontrol).
- E2, F2, G2, B11, C11, D11 %1 çözücü içeren (DMSO) 300 µl kültür besiyeri eklendi (çözücü kontrolü –SC-).
- Kolon 1 ve 12'nin B-G kuyucuklarına %1 çözücü içeren (DMSO) 300 µl kültür besiyeri eklendi (Kör *Blank*=B).

A ve H satırları kuyucukları hariç;

- Kolon 3'ün tüm kuyucuklarına 500 µM Klopidogrel içeren, 300 µl kültür besiyeri eklendi (X1).
- Kolon 4'ün tüm kuyucuklarına 500 µM Klopidogrel içeren, 300 µl kültür besiyeri eklendi (X1).
- Kolon 5'in tüm kuyucuklarına 400 µM Klopidogrel içeren, 300 µl kültür besiyeri eklendi (X2).
- Kolon 6'ın tüm kuyucuklarına 400 µM Klopidogrel içeren, 300 µl kültür besiyeri eklendi (X2).
- Kolon 7'nin tüm kuyucuklarına 300 µM Klopidogrel içeren, 300 µl kültür besiyeri eklendi (X3).
- Kolon 8'in tüm kuyucuklarına 300 µM Klopidogrel içeren, 300 µl kültür besiyeri eklendi (X3).

-Kolon 9'un tüm kuyucuklarına 100 µM Klopidoğrel içeren, 300 µl kültür besiyeri eklendi (X4).

-Kolon 10'un kuyucuklarına 100 µM Klopidoğrel içeren, 300 µl kültür besiyeri eklendi (X4) [Şekil 2.3].

Plaka 24 saat boyunca 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> inkübe edildi (Şekil 2.4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	B	GC	500 µM (X1)	500 µM (X1)	400 µM (X2)	400 µM (X2)	300 µM (X3)	300 µM (X3)	100 µM (X4)	100 µM (X4)	SC	B
C	B	GC	500 µM (X1)	500 µM (X1)	400 µM (X2)	400 µM (X2)	300 µM (X3)	300 µM (X3)	100 µM (X4)	100 µM (X4)	SC	B
D	B	GC	500 µM (X1)	500 µM (X1)	400 µM (X2)	400 µM (X2)	300 µM (X3)	300 µM (X3)	100 µM (X4)	100 µM (X4)	SC	B
E	B	SC	500 µM (X1)	500 µM (X1)	400 µM (X2)	400 µM (X2)	300 µM (X3)	300 µM (X3)	100 µM (X4)	100 µM (X4)	TL	B
F	B	SC	500 µM (X1)	500 µM (X1)	400 µM (X2)	400 µM (X2)	300 µM (X3)	300 µM (X3)	100 µM (X4)	100 µM (X4)	TL	B
G	B	SC	500 µM (X1)	500 µM (X1)	400 µM (X2)	400 µM (X2)	300 µM (X3)	300 µM (X3)	100 µM (X4)	100 µM (X4)	TL	B
H												

**Şekil 2.3.** 96 kuyucuklu mikropalakadaki çalışma düzeni

A-H Satırları : Steril su

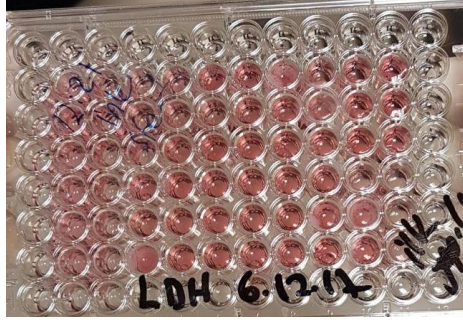
B : Kültür ortamı + Hücre içermeyen çözücü (Negatif kontrol- *blank*)

GC : Kültür ortamı + Hücreler (Hücre büyümesi kontrol- *growth control*)

SC : Kültür ortamı + Hücreler + Çözücü (Çözücü kontrol –*solvent control*)

TL : Kültür ortamı + Hücreler + %1 Triton X-100 (Total LDH içeriği- pozitif kontrol)

X1, X2, X3, X4 : Kültür ortamı + Hepatositler + X (Klopidoğrel) bileşiğinin farklı konsantrasyonları



**Şekil 2.4.** Klopidoğrel dozları eklendikten sonra inkübasyona hazır olan 96 kuyucuklu plaka

### 2.2.3. LDH test prosedürü

Kitlerin kullanımından önce, LDH II 130 ml ve LDH III 60 ml LDH I ile sulandırıldı.

Sulandırma işleminden sonra,

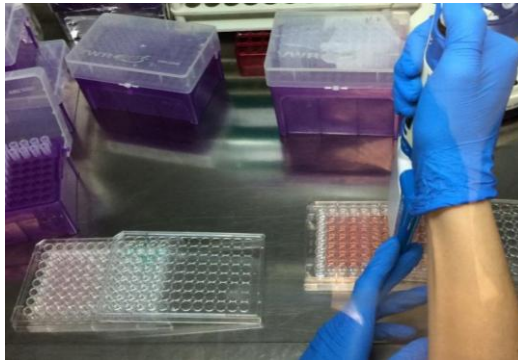
96 kuyucuklu plaka inkübatörden çıkarıldı.

Çok kanallı bir pipet ile her bir kuyucuktan 30 µl süpernatant çekildi ve yeni bir plakaya önceki plaka düzeni tekrarlanarak aktarıldı [Şekil 2.5] .

16 ml LDH II, 3.4 ml LDH III ile steril rezervuarda karıştırıldı.

LDH II/LDHIII karışımından her bir kuyucuğa 240 µl eklendi ve reaksiyon başlatıldı (Şekil 2.6).

Plaka mikropilaka okuyucuda, bir saat boyunca, on dakikada bir okutuldu ve değerler kaydedildi (Şekil 2.7).



**Şekil 2.5.** Klopidoğrel maruziyeti tamamlanmış olan plakadan çok kanallı bir pipet ile süpernatantının yeni bir plakaya aktarılması



**Şekil 2.6.** LDH II/LDHIII karışımının her bir kuyucuğa eklenmesi



**Şekil 2.7.** Süpernatant aktarımı tamamlanmış olan, 340 nm OD'de okunmaya hazır olan plaka

#### **2.2.4. Sonuçların değerlendirilmesi**

LDH testine tabii tutulan plakaların, OD340 dalga boyundaki spektrofotometrik ölçümünün ardından elde edilen absorbans değerleri ve değerlere karşılık gelen dakikaların grafiği çizildi.

Çizilen OD340-Dakika grafiğine göre eğrilerin doğrusal olduğu bir zaman aralığı belirlendi.

Her bir kuyucuk için  $\Delta OD / \text{dakika}$  değeri, seçilen zaman aralığının farkı dakika değerine bölünerek hesaplanarak sonuçtan kör değeri çıkarıldı.

Hücre dışı LDH'ın birimi ise "nanomol NADH tüketilen / min / ml" olarak ifade edilir.

Tüketilen NADH miktarı Tablo 2.1. deki formüle göre hesaplandı.

**Tablo 2.1.** Tüketilen NADH miktarının belirlenmesinde kullanılan formül

$$\text{Tüketilen NADH} = \frac{[(\Delta\text{OD}/\text{dk}) - \text{kör değeri}] \times 0.260 \times 1000}{6.2 \times 30}$$

0.260 ml: ml'de reaksiyon hacmi

1000 µl: sonucu ml olarak hesaplamaya izin verir

6.2: 340 nm'de NADH'nin millimolar tükenme katsayısı

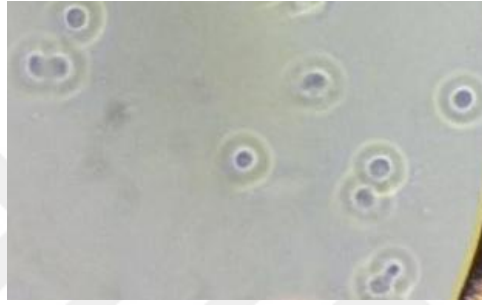
30 µl: test için kullanılan hacim

Pozitif kontrol olarak kullanılan Triton X-100 ile muamele edilen kuyucuklardaki NADH tüketimi referans alınarak (100 birim), her bir klopidogrel dozunun NADH tüketimi oranlanarak, ilaç dozlarının LDH aktivitesi (maksimum %) değeri hesaplandı. (Tablo 3.2).

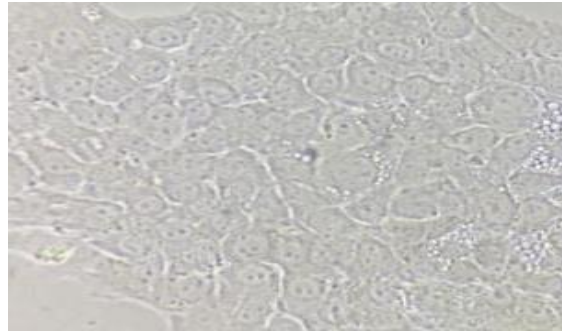
### 3.BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 3.1 BULGULAR

Olgunluğa erişen AML 12 hepatositleri (Şekil 3.2), deney plakasında Şekil 2.3'deki gibi hazırlanmalarının ardından 24 saat süresince 500, 400, 300, ve 100  $\mu$ M Klopidoğrel'e maruz bırakıldı. Klopidoğrel'e cevap olarak hepatosit toksisitesinin saptanması için LDH testi uygulandı ve plakaların bir saat boyunca on dakikada bir 340 nm OD'de spektrofotometrik ölçümleri sağlandı. Spektrofotometrik ölçümlerden elde edilen değerler düzenlenerek Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.1.** 25 cm<sup>2</sup>'lik flask'a ekimi yapılan hepatositlerin invert mikroskop görüntüsü (40X)



**Şekil 3.2.** Çoğalan ve flask yüzeyini kaplayan hepatositlerin invert mikroskop görüntüsü (10X)

**Tablo 3.1.** Pozitif kontrol ile birlikte uygulanan 100, 300, 400 ve 500  $\mu\text{M}$ 'lık Klopidoğrel dozlarının 340 nm OD'de her on dakikada bir yapılan spektrofotometrik ölçümleri

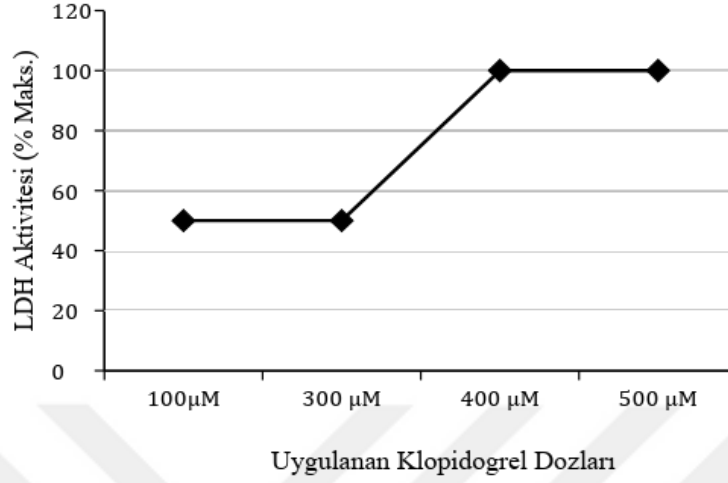
	t=0	t=10	t=20	t=30	t=40	t=50	t=60
<b>Kör</b>	0,04	0,039	0,04	0,04	0,041	0,04	0,04
<b>Büyüme Kontrolü</b>	0,081	0,081	0,081	0,081	0,081	0,08	0,081
<b>Çözücü Kontrolü</b>	0,102	0,102	0,103	0,102	0,102	0,102	0,101
<b>Triton X-100 (Pozitif Kontrol)</b>	0,129	0,11	0,109	0,108	0,108	0,107	0,107
<b>500 <math>\mu\text{M}</math></b>	0,098	0,099	0,098	0,098	0,098	0,098	0,098
<b>400 <math>\mu\text{M}</math></b>	0,083	0,084	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083
<b>300 <math>\mu\text{M}</math></b>	0,085	0,083	0,083	0,082	0,082	0,082	0,082
<b>100 <math>\mu\text{M}</math></b>	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,079

Tablo 3.1' de verilen değerler, aynı plaka düzeni içinde triplike olarak yapılan LDH testinden elde edilen değerlerin ortalamasıdır. Tablo 3.1.'de elde edilen değerler içinden doğrusal zaman aralığı seçilerek (t10-t20) Tablo 3.2. oluşturuldu

**Tablo 3.2.** Tablo 3.1. den seçilen zaman aralığındaki değerlerin formülasyonu, tüketilen NADH miktarı ile Maksimum % değerlerinin eldesi.

Formül	Kör	GC	SC	500 $\mu\text{M}$	400 $\mu\text{M}$	300 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>t10-t20</b>	-0,001	0	-0,001	0,001	0,001	0	0
<b>t10-t20/dk</b>	-0,0001	0	-0,0001	0,0001	0,0001	0	0
<b>(t10-t20/dk)-kör</b>		0,0001	0	0,0002	0,0002	0,0001	0,0001
<b>Kullanılan NADH (ünite)</b>		0,00014	0	0,00028	0,0028	0,00014	0,00014
<b>Maksimum %</b>		50	0	100	100	50	50

Tablo 3.2.'den elde edilen veriler kullanılarak farklı Klopidoğrel dozlarındaki LDH aktivitesi (maksimum %) Şekil 3.3. de gösterilmiştir.



**Şekil 3.3.** Klopidoğrel'e maruz bırakılan hepatositlerde belirlenen LDH aktivitesi %50 inhibisyon (IC50) dozları

Şekil 3.3'de verilen sonuçlara göre, Klopidoğrel'in test edilen 100 µM, 300 µM'lık dozlarının LDH aktivite değeri % 50 sınırında iken, 400 µM ve 500 µM'lık dozları ise %100 değerine ulaşmıştır.

Klopidoğrel'in AML12 Hepatositlerine uygulanan 100 µM, 300 µM, 400 µM ve 500 µM'lık tüm dozlarının hücre bütünlüğünü bozarak sitotoksositeye sebep olduğu saptanmıştır.

Uygulanan 100 µM ve 300 µM Klopidoğrel dozlarıyla sitotoksik etki oluşmakla birlikte 400 ve 500 µM'lık dozlarda gerçekleştiği gibi, doz miktarı arttıkça sitotoksiteninde arttığı izlenmiştir.

### 3.2.TARTIŞMA

Kardiyovasküler hastalıklar dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. 2013 yılında dünya genelinde görülen 54 milyon ölümün %32'sinin (17 milyon birey) kardiyovasküler hastalıklar sebebiyle gerçekleştiği bildirilmiştir [97].

Türkiye'de ise, Türkiye İstatistik Kurumu'nun (TÜİK) verilerine göre; gerçekleşen tüm mortalite olaylarının içerisinde kalp hastalıklarının payının gittikçe artma eğiliminde olduğu rapor edilmiştir. Kalp hastalıkları 1989'da yüzde 40, 1993'te yüzde 45, 2009'da yüzde 40 ve 2014 yılında yüzde 40 ile tüm ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır.

Hızlı kentleşme, stresli yaşam, hava kirliliği, sigara veya alkol kullanımı kişilerin kardiyovasküler hastalığa yakalanma riskini arttırmaktadır [98].

Klopidogrel, miyokard infarktüs (kalp krizi) geçmişi olan hastalarda aterosklerotik olay riskini azaltmak amacıyla ve stent prosedürü geçirmiş hastalarda stent trombozunu engellemek amacı ile kullanılmaktadır. Klopidogrel 90 milyon adet reçete edilen ilaç olarak dünya genelinde en fazla kullanılan ikinci sıradaki ilaçtır [99].

Klopidogrel, kimyasal adı ile (S) -metil (2-klorofenil) (6,7-dihidro-4H-tieno [3,2-c] piridin-5-il) asetat, bir tiyenopiridin türevidir [100].Klopidogrel bağırsakta emilen ve karaciğerde aktive olan bir ön ilaçtır. Aktif metabolitinin üretilmesi için karaciğer sitokrom P450 (CYP) enzimleri tarafından ilacın metabolize edilmesi gerekir. Klopidogrel metabolizmasında görev alan başlıca sitokrom P450 enzimleri CYP2C19, CYP3A4 ve CYP3A5'dir [101].

Klopidogrel'in %85'i karboksiesteraz enzimi tarafından inaktif karboksilik asit metabolitine dönüştürülürken yalnızca %15'i sitokrom P450 enzimleri tarafından aktif metabolitine dönüştürülmektedir. Bahsi geçen sitokrom P450 enzimleri, Klopidogrel'in tiyofel halkasını oksitleyerek ara metabolit olan 2-okzo-klopidogrel oluşumunda rol alır ve reaksiyon ardından tiyofen halkası açılarak ilacın aktif metaboliti olan karboksil ve tiyol grupları oluşur [12,46]. Oluşan reaktif tiyol grubu, P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> reseptörünün sistein kalıntıları arasında disülfit köprüsü oluşturarak agregasyonu geri dönüşümsüz olarak engellemektedir [102].

CYP2C19 geninde bulunan tek nükleotid polimorfizmleri (TNP) sonucu oluşan varyantlar, Klopidoğrel kullanan bireylerin ilaca verdiği yanıtları etkilemekle birlikte, Klopidoğrel kaynaklı karaciğer hasarı ve yan etki oluşumunda da yer almaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, Klopidoğrel'in farmakodinamik yanıtının bireyler arasında değişken olduğu, hastaların % 20 ila % 40'ının ilaca yanıt vermediği, veya zayıf yanıt verdiği saptanmıştır [103]. Bireylerin Klopidoğrel'e verdiği cevabı etkileyen faktörler arasında yaş, diyabet, alkol kullanımı, fazla kilo, böbrek yetmezliği ve kalp yetmezliği gibi faktörler yer almaktadır [104].

Klopidoğrel genellikle aspirin ile birlikte kullanılarak aspirinin işlevselliğini artırır. Klopidoğrel'in kombin kullanımında tolere edilebilmesi ve güvenirliliği tiklopidine kıyasla daha yüksektir [105].

Klopidoğrel kullanımına bağlı olarak gerçekleşen ilaç yan etkileri arasında gastrointestinal rahatsızlıklar, kızarıklık, kaşıntı ve kanama bulunurken, ciddi ancak nadir görülen advers etkiler arasında anemi, trombotik trombositopenik purpura ve nötropeni bulunur [106]. Klopidoğrel'in güvenirliliğine ve iyi tolere edilebilme özelliklerine rağmen, Klopidoğrel kaynaklı karaciğer hasarı ve hepatotoksisite gibi ciddi yan etkilerinin de var olduğu bilinmektedir [107].

İlaç kaynaklı hepatotoksisite, ABD'de akut karaciğer yetmezliğinin en sık nedenidir. Goyal ve arkadaşlarının 2009 yılında yayınladıkları raporda, nadir komplikasyonları içeren 13 adet klopidoğrel kaynaklı hepatotoksisite vakası yer almaktadır [107].

Sibbing ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, Klopidoğrel'in en önemli yan etkilerinden biri olan kanamanın CYP2C19 17\* allelik varyantına (CYP2C19'un gen anlatımını artırarak yüksek enzimatik aktiviteye sahip olmasını sağlayan varyant) sahip olan bireylerde daha fazla görüldüğü rapor edilmiştir [20]. Etnik köken gözetmeksizin yapılan yirmi farklı araştırmanın sonuçlarının değerlendirildiği bir meta analiz çalışmasında, CYP2C19\*17alelline sahip olan bireylerin (n = 6868), yabancı tip allele (n=14.429) sahip olanlara kıyasla daha yüksek oranda yan etki ve toksisite riski taşıdığını rapor etmişlerdir [108].

Klopidoğrel'in aktif metaboliti olan tiyol bir merkaptto grup içerir. Tiyol grubu P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> reseptörüne bağlanarak agregasyonu geri dönüşümsüz olarak inhibe eder ancak tiyolun glutasyon ve CYP gibi diğer farklı proteinlere hedef dışı olarak bağlanabildiği tespit

edilmiştir. Hedef dışı bağlanmalar ve kompleksleşümünün hepatotoksisiteyi oluşumunu indüklediği düşünülmektedir. Klopidoğrel'in aktif metaboliti, trombosit  $P_2Y_{12}$  reseptörüne kovalent olarak bağlanabilen, aynı zamanda glutatyon ve CYP'ler gibi diğer proteinlere de bağlanabilen amerkapto grubu taşıyıcı [63].

Yapılan çalışmalarda, Klopidoğrel'in CYP3A4 enzimi ile birlikte inkübe edilmesiyle oluşan yan metabolitlerin bazı kan hücreleri için toksik olduğu kanıtlanmıştır. Taubert ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, ketokonazol (CYP3A4 inhibitörü) ile inkübe edilen hücrelerin CYP3A4'ün enzimatik aktivitesini azaltması sebebi ile Klopidoğrel'in oluşturacağı sitotoksitenin de azalacağını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, yüksek CYP3A4 enzimatik aktivitesinin, Klopidoğrel'in hepatoselüler toksisiteye sebep olan bir risk faktörü olduğunu ifade etmişlerdir. Yüksek enzimatik aktiviteye sahip olan bireylerin ilaca bağlı olarak hepatotoksisite geliştirmeleri bu sebeple daha olası olduğu var sayılmaktadır [44].

Karaciğer hasarı ve nötropeni, agranülositoz ve aplastik anemi gibi hematolojik toksisite klopidoğrel için tanımlanmış olup, bu yan etkiler tiklopidin toksisitesine kıyasla daha az sık ve ciddi kabul edilmektedir. Literatürde Tiklopidin ve Klopidoğrel'in hematotoksisitesi ile ilişkili mekanizmalar tam olarak aydınlığa kavuşturulmamıştır. Her iki ilaç için de aplastik anemi bildirildiğinden, her iki maddenin de kemik iliğindeki hücreler üzerinde doğrudan etki gösterebileceği açıktır [109].

Klopidoğrel metabolizmasında görev alan sitokrom P450 enzimlerini kodlayan genlerin anlatımlarının hiç biri kemik iliğinde yüksek olmadığından Klopidoğrel'in kemik iliğinde aktive olamayacağı düşünülmektedir [109]. Maseneni ve arkadaşları, CYP3A4 enziminin insan mononükleer hücrelerinde ifade edilmediğini ve rekombinant CYP3A4 ile önceden muamele edilen mononükleer hücrelerine 10  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M Klopidoğrel uygulamasının toksik olduğunu tespit etmişlerdir [109]. Çalışmamızda, Klopidoğrel dozlarını miyeloid progenitor hücrelerinden farklı olarak AML12 hepatosit hücre soyuna uygulayarak, 100, 300, 400 ve 500  $\mu$ M olmak üzere uygulanan tüm dozların hücreler üzerindeki etkisini LDH testi ile araştırdık. Maseneni ve arkadaşlarının çalışmasına uyumlu olarak, uygulanan tüm dozların AML12 hepatosit hücre soyunda toksisite yaratarak plazma membranı hasarı oluşturduğunu tespit ettik.

Zahno ve arkadaşları, primer insan hepatositlerini rifampisin eşliğinde 1,10,100  $\mu\text{M}$  Klopidoğrel ile muamele etmişler ve Adenilat Siklaz ile birlikte hücrese ATP içeriğini de ölçerek uygulanan tüm dozların toksisiteye sebep olduğunu tespit etmişlerdir. Klopidoğrel'in inaktif formu olan Klopidoğrel Karboksilat'ın ise sitotoksiteye neden olmadığını saptamışlardır. Zahno ve arkadaşları aynı çalışmalarında Rifampisin konsantrasyonunda CYP3A4 enziminin ifade ve fonksiyonu için indükleyici bir rol oynadığını bildirmişlerdir. CYP3A4 inhibitörü ketokonazol varlığında, rifampisinle muamele edilen hücrelerde Klopidoğrel toksisitesi engellenmesi CYP3A4'ün Klopidoğrel kaynaklı hepatotoksitesindeki önemini vurgulamaktadır [63].

Zahno ve arkadaşları CYP3A4 enziminin toksisitedeki yerini anlamak amacıyla yüksek CYP3A4 ifadesine sahip HepG2 (HepG2/CYP3A4) ve rekombinant CYP3A4 ile ko-inkübasyonu yapılan HepG2'lere (HepG2/rCYP3A4) 1, 10, 100  $\mu\text{M}$  Klopidoğrel uygulamışlar ve uygulanan tüm dozlarda hepatotoksitesite varlığını saptamışlardır [63]. Araştırmamızda, 100, 300, 400 ve 500  $\mu\text{M}$  Klopidoğrel dozlarının plazma membranında oluşturacağı etkiyi tespit etmek için Zahno ve arkadaşlarından farklı olarak HepG2 hücre soyundan farklı olarak AML12 hepatositlerini kullandık. Zahno ve arkadaşlarının çalışmasına benzer ve uyumlu olarak tüm dozların hepatotoksitesiteye neden olduğunu belirledik.

Zahno ve arkadaşları 2010 yılında yaptığı çalışmada, glutasyon enziminin (GSH) Klopidoğrel'in aktif metabolitlerine bağlanarak ilacın farmakolojik aktivitesini zayıflattığı bildirmişlerdir [110].

HepG2 hücreleri glutasyon tüketme ajanı olan DEM ile işleme tabi tutulduğunda, GSH içeriğinde önemli bir azalma olduğu Zahno ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. Araştırmacılar 200 mM'lık bir DEM konsantrasyonunda, hücrese glutasyon içeriğinin yaklaşık %20 azaldığını ve Klopidoğrel'in kendisinde hücrese glutasyon içeriğindeki azalmayla ilişkili olduğunu vurgulamışlardır. DEM maruziyetinin, hücrese ATP içeriğindeki % 15-20 oranında bir düşüşle ilişkili olduğu bilinmektedir. DEM'in yokluğunda ise 100  $\mu\text{M}$ 'lık Klopidoğrel dozu hücrese ATP içeriğini yaklaşık %15 azaltırken, rekombinant CYP3A4 enzimi varlığında bu oran %25'e yükselmektedir. Hücrese GSH içeriğindeki düşüş, artan klopidoğrel toksisitesi ile ilişkili olduğundan,

GSH ilavesinin Klopidoğrel ile ilişkili sitotoksisiteyi azalttığı literatürde ortaya konmuştur [63].

Hücre glutasyon içeriğindeki Klopidoğrel varlığında gözlenen düşüş ROT'un hücre birikimi ile ilişkili olabileceği glutasyon ROT bozunmasındaki rolü nedeniyle ön görülebilir. GSH'ın ROT indirgenmesinde görev almasıyla birlikte Klopidoğrel varlığında gözlenen hücrel GSH içeriğinin düşüşünün ROT'un hücre içi birikimi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Zahno ve arkadaşlarının bir diğer çalışmalarında Klopidoğrel tedavisine yanıt olarak HepG2/CYP3A4 hücrelerindeki ROT oluşumunda zaman ve konsantrasyona bağlı bir artış ifade edilmiştir. ROT birikimi, lipid peroksidasyonuna neden olarak mitokondriyal membran geçirgenliğini bozar ve mitokondriyal deformasyona sebep olmaktadır. Mitokondri membran deformasyonu sonucunda, dış membrandan sitozole sitokrom c salınımı gerçekleşir. Sitokrom c salınımı sonrasında hücrede apoptoz veya nekroz olayları tetikleyerek plazma membranının bütünlüğü bozulur [63]. Hücrel ROT birikimi mitokondriyal porlarının açılmasını tetikleyebileceğinden mitokondri ile ilişkili apoptozda kilit rol oynayan sitoplazmik sitokrom c salınımı gerçekleşir.

Primer insan hepatositlerinde, Klopidoğrel'in rifampisin ile CYP indüksiyonundan sonra toksisiteye sebep olduğu saptanmıştır. Sitotoksisite, 10 µM'lik klopidoğrel konsantrasyonunda gözlenmiştir ki bu doz, günlük 75 mg'lık tedaviye karşılık gelmektedir [63].

Yapılan araştırmalarda, CYP3A4 inhibitörü ketokonazol ile inkübasyonun sadece Klopidoğrel metabolizmasını değil, aynı zamanda sitotoksisitesini de önlediği gösterilmiştir. CYP3A4'ün Klopidoğrel'in metabolizmasında önemli bir enzim olduğu doğrulanarak CYP3A4 metabolizmasının Klopidoğrel'in sitotoksisitesi için gerekli olduğu ön görülmektedir.

Literatürdeki mevcut veriler yüksek CYP3A4 aktivitesinin, Klopidoğrel'in hepatoselüler toksisitesi için bir risk faktörü olduğunu düşündürmektedir [63].

İlaç kaynaklı karaciğer hasarı hepatotoksisite oluşumunda iki bilimsel yaklaşım bulunmaktadır. İlk yaklaşımda, ilacın kendisinin doğrudan karaciğer hasarına yol açtığı, diğer yaklaşımda ise, reaktif metabolitler (RM) aracılığıyla karaciğer hasarının indüklenmesi söz konusudur. ABD'de en sık reçete edilen oral ilaçlardan 207'si ile

yapılan bir çalışmada, RM oluşumlu bileşiklerin % 62-69'unun DILI ile ilişkili olduğu belirlenmiştir [111].

Reaktif metabolitler genellikle düşük elektron yoğunluğuna sahip olup, yüksek elektron yoğunluğa sahip reaksiyonlara girerler. RM'ler hücrel makromoleküllere kovalent bağlanarak karaciğer toksisitesine sebep olabilirler. GSH, elektrofilik RM'lerin detoksifikasyonunda görev alırken aynı zamanda onlar için yakalayıcı madde olarak da görev alabilir [111].

Hücredeki GSH miktarının azalması ile RM'lerin daha kararlı bir yapıya geçerek hücre içi konsantrasyonlarının yükselmesi nedeniyeltoksisite riskinin arttığı bilinmektedir [112].

Zhai ve arkadaşları [112], Klopidoğrel ile indüklenen hepatosellüler toksisitenin CYP2C19 ve CYP2B6 metabolitleri ile ilişkili olası mekanizmalarını ve risk faktörlerini LDH analizi, hücrel ROT içeriği ve mitokondriyal membran geçirgenliği (MMP) analizleri ile araştırmışlardır.

Aynı araştırmacılar, Klopidoğrel kaynaklı toksisiteyi primer fare karaciğer hücrelerinde, GSH aktivitesi engellenmiş bir fare hücresi üzerinde, HepG2/wt, HepG2/CYP2C19 rekombinant ve HepG2/CYP2B6 rekombinant hücrelerinde test etmişlerdir. 100 ve 300 µM Klopidoğrel uygulanan primer fare hepatositlerinde, LDH aktivitesinin doza bağımlı olarak arttığı gözlemlenerek hepatotoksisite tespit etmişlerdir. 100 ve 300 µM Klopidoğrel hücre içi ROT birikimini arttırarak toksisiteye sebep olduğu saptamışlardır.

Zhai ve arkadaşları araştırmalarında, rekombinant CYP2C19 ve CYP2C6 ile uygulanan 100 ve 300µM'lık Klopidoğrel dozları HepG2 hücrelerinde ROT birikimini doza bağılı olarak arttığını gözlemlemişlerdir. LDH analizine göre ise 100 µM'dan 300 µM'a doğru LDH aktivitesinde artış bildirmişlerdir.100 µM ve 300 µM'lık Klopidoğrel dozlarının hem primer hepatosit hücrelerinde hemde HepG2 hücrelerinde toksik olduğu saptanarak plazma membran yapısının bozulduğu bildirilmiştir [112]. Zhai ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmadan farklı olarak, çalışmamızda Klopidoğrel'in 100, 300, 400 ve 500 µM'lık dozlarının plazma membranında oluşturduğu hasarı tespit etmek amacıyla Klopidoğrel'i AML12 hepatositlerine uyguladığımızda, Zhai ve arkadaşlarının sonuçlarıyla uyumlu olarak tüm dozlarda LDH aktivitesinin artmış olduğunu tespit ederek, hepatotoksisiteye sebep olduğunu gözlemledik.

Bu çalışma, yüksek CYP2C19 ve CYP2B6 aktivitelerinin Klopidoğrel'in hepatoselüler toksisitesi için risk faktörleri olduğunu düşündürmektedir. CYP2C19 ve CYP2B6 induksiyonlu hastalar bu nedenle Klopidoğrel ile indüklenen hepatotoksisite riski altında olabilirler. BSO (GSH inhibitörü) uygulanmış fare modelinde, GSH seviyeleri metabolizmadan sorumlu olan hepatik mikrozomal ve sitosolik enzimler üzerinde herhangi bir aşırı toksisite olmaksızın anlamlı şekilde azalması beklenmektedir [112,113].



#### 4. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında Klopidoğrel'in AML12 Hepatositlerinin plazma membranına olan etkisi araştırılmıştır. Uygulanan 100, 300, 400 ve 500 µM'lık Klopidoğrel dozlarının yarattığı toksisitenin analizi ve IC50 dozunun bulunmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır.

Klopidoğrel AML12 hepatositlerinde oluşturduğu reaktif veya aktif metabolitler hücrede ATP içeriğinin azalmasına, ROT konsantrasyonunun yükselmesine ve mitokondriyal geçirgenliğin artmasına sebep olarak hücrede apoptoz veya nekroza neden olabilir. Plazma membran bütünlüğünün bozulması ile birlikte ekstrasellüler boşluğa LDH salınımının gerçekleşmesi sonucunda membran hasarı tespit edilmektedir. Klopidoğrel'in aktif metabolitleri hücre içi depolardan Ca<sup>2+</sup> iyonu salınımını tetikler ve fosfolipaz ve proteazları aktive ederek plazma zarı parçalanmasını indükleyerek hücre ölümüne sebep olur. Ca<sup>2+</sup> miktarındaki artış, kalpain gibi kalsiyum bağımlı proteazların aktivasyonuna yol açmaktadır. Nekrozun temel nedenleri arasında Ca<sup>2+</sup> aşırı yüklenmesi, ROT oluşumu, hücresel enerji tükenmesi gibi nedenler bulunmaktadır. Klopidoğrel'in hücrede meydana getirdiği bu mekanizmalar ile hücre nekroza uğrayarak membran yapısı bozulur ve takiben LDH aktivitesi araştırılarak sitotoksite tespit edilir.

Kültürü yapılan ve olgunluğa erişen AML12 hepatositleri 96 kuyucuklu plakalara aktarıldı 100, 300, 400 ve 500 µM Klopidoğrel ve Triton X-100 (pozitif kontrol) ile muamele edildi. Klopidoğrel'in sebep olduğu plazma membran hasarı ve sitotoksitenin analizi, hücresel laktat dehidrogenaz enzim miktarını belirleyen enzimatik LDH testi gerçekleştirildi.

Çalışmamızda, Klopidoğrel uygulanan AML12 hepatositlerinin 340 nm OD'de spektrofotometrik ölçümü yapıldı ve zamana bağlı olarak azalan NADH miktarı tespit edildi. 100, 300, 400 ve 500 µM olmak üzere uygulanan tüm dozların plazma membranı bütünlüğünü bozduğu saptandı. Klopidoğrel'in AML12 hepatositler üzerindeki öldürücü doz (IC50) 100 ve 300 µM olarak belirlendi. Uygulanan 400 ve 500 µM'lık dozlarda ise LDH aktivitesinin yükselerek öldürücü etkinin arttığı tespit edilmiştir.

Çalışmamız mevcut literatür bilgisine Klopidoğrel'in plazma membranı bütünlüğüne olan etkisini yenilikler katarak AML12 hepatositleri üzerindeki etkisini araştırmış olması nedeniyle özgün bir çalışmadır.

## **Bilgilendirme**

“Klopidogrel’in Membran Bütünlüğüne Olan Etkisinin AML12 Hepatosit Hücre Soyunda Araştırılması” başlıklı tez çalışmasında, herhangi bir destek alınmamış olup, tez danışmanım Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ’nin laboratuvarındaki mevcut imkanlar ve kendi öz imkanlarım ile gerçekleştirilmiştir.



## 5.KAYNAKLAR

- 1.del Zoppo, G. J. (2008). Virchow's triad: the vascular basis of cerebral injury. *Reviews in neurological diseases*, 5(Suppl 1), S12.
2. Handin, R. I. (2005). Bleeding and thrombosis. *Harrison's principles of internal medicine*.
- 3.Ruggeri, Z. M. (2002). Platelets in atherothrombosis. *Nature medicine*, 8(11), 1227.
- 4.Sharma, H. L.,& Sharma, K. K. (2007). *Principles of pharmacology*. Paras medical publisher.
5. Richard, N. M. (2004). Haemodynamic disorders, Thromboembolic disease and Shock. *Robbins and Cotran Pathologic basis of disease*. 7th ed. Pennsylvania: Elsevier Publications, 126-7.
- 6.Bellemain-Appaix, A., O'connor, S. A., Silvain, J., Cucherat, M., Beygui, F., Barthélémy, O., ... & ACTION group, F. (2012). Association of clopidogrel pretreatment with mortality, cardiovascular events, and major bleeding among patients undergoing percutaneous coronary intervention: a systematic review and meta-analysis. *Jama*, 308(23), 2507-2516.
- 7.Sorrentino, M. J.,& O'Donnell, P. H. (2015). Pharmacogenomics and cardiology: improving treatment with existing drugs. *Pharmacogenomics*, 16(11), 1223-1226.
- 8.Pleines, I., Eckly, A., Elvers, M., Hagedorn, I., Eliautou, S., Bender, M., ... & Nieswandt, B. (2010). Multiple alterations of platelet functions dominated by increased secretion in mice lacking Cdc42 in platelets. *Blood*, blood-2009.
- 9.Close, S. L. (2011). Clopidogrel pharmacogenetics: metabolism and drug interactions. *Drug metabolism and drug interactions*, 26(2), 45-51.
10. Gross, P. L.,& Weitz, J. I. (2009). New antithrombotic drugs. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 86(2), 139-146.
11. Becker, R. C., Meade, T. W., Berger, P. B., Ezekowitz, M., O'Connor, C. M., Vorchheimer, D. A., ... & Harrington, R. A. (2008). The primary and secondary prevention of coronary artery disease: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 133(6), 776S-814S.
- 12.White, H. D.,& Van de Werf, F. J. (1998). Thrombolysis for acute myocardial infarction. *Circulation*, 97(16), 1632-1646.
13. Kabrhel, C., Ali, A., Choi, J. G., & Hur, C. (2017). Systemic Thrombolysis, Catheter-Directed Thrombolysis, and Anticoagulation for Intermediate-risk Pulmonary Embolism: A Simulation Modeling Analysis. *Academic Emergency Medicine*, 24(10), 1235-1243.

14. Hou, W., Zhang, Q., Yan, Z., Chen, R., Zeh Iii, H. J., Kang, R., ... & Tang, D. (2013). Strange attractors: DAMPs and autophagy link tumor cell death and immunity. *Cell death & disease*, 4(12), e966.
15. Simpson, D., Siddiqui, M. A. A., Scott, L. J., & Hilleman, D. E. (2007). Spotlight on reteplase in thrombotic occlusive disorders. *BioDrugs*, 21(1), 65-68.
- 16.A. Şahin (2006). Venöz Tromboembolizm Tanı ve Tedavisinde Yenilikler. *Dahili Tıp Bilimleri Dergisi* 13(3): 111-122.
- 17.Thachil, J. (2016). Antiplatelet therapy—a summary for the general physicians. *Clinical Medicine*, 16(2), 152-160.
- 18.Zahno, A., Bouitbir, J., Maseneni, S., Lindinger, P. W., Brecht, K., & Krähenbühl, S. (2013). Hepatocellular toxicity of clopidogrel: mechanisms and risk factors. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 208-216.
- 19.Burnstock, G. (2007). Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and molecular life sciences*, 64(12), 1471.
- 20.M.H.Crawford (2014). Antiplatelet Therapy Classification of Antiplatelet Drugs. *CURRENT Diagnosis & Treatment Cardiology*, 4e
21. Roth, G. J., Stanford, N., & Majerus, P. W. (1975). Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(8), 3073-3076.
22. Vane, J. R.,& Botting, R. M. (1995). New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflammation research*, 44(1), 1-10.
- 23 .Catella-Lawson, F., Reilly, M. P., Kapoor, S. C., Cucchiara, A. J., DeMarco, S., Tournier, B., ... & FitzGerald, G. A. (2001). Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *New England Journal of Medicine*, 345(25), 1809-1817.
24. Calvete, J. J. (1995). On the structure and function of platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, the fibrinogen receptor. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208(4), 346-360.
25. De Meyer, S. F., Vanhoorelbeke, K., Broos, K., Salles, I. I., & Deckmyn, H. (2008). Antiplatelet drugs. *British journal of haematology*, 142(4), 515-528.
26. Topol, E. J., Byzova, T. V., & Plow, E. F. (1999). Platelet GPIIb-IIIa blockers. *The Lancet*, 353(9148), 227-231.
27. Schwartz, L., Bourassa, M. G., Lespérance, J., Aldridge, H. E., Kazim, F., Salvatori, V. A., ... & David, P. R. (1988). Aspirin and dipyridamole in the prevention of re-stenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *New England Journal of Medicine*, 318(26), 1714-1719.

28. Jennings, L. K. (2009). Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thrombosis and haemostasis*, 101(02), 248-257.
29. Davi, G., & Patrono, C. (2007). Platelet activation and atherothrombosis. *New England Journal of Medicine*, 357(24), 2482-2494.
30. Dorsam, R. T., & Kunapuli, S. P. (2004). Central role of the P2Y<sub>12</sub> receptor in platelet activation. *The Journal of clinical investigation*, 113(3), 340-345.
31. Wallentin, L. (2009). P2Y<sub>12</sub> inhibitors: differences in properties and mechanisms of action and potential consequences for clinical use. *European heart journal*, 30(16), 1964-1977.
32. Pereillo, J. M., Maftouh, M., Andrieu, A., Uzabiaga, M. F., Fedeli, O., Savi, P., ... & Picard, C. (2002). Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(11), 1288-1295.
33. Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., ... & Weisman, G. A. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological reviews*, 58(3), 281-341.
34. Burnstock, G. (2007). Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and molecular life sciences*, 64(12), 1471.
35. Jin, J., Daniel, J. L., & Kunapuli, S. P. (1998). Molecular basis for ADP-induced platelet activation II. The P2Y<sub>1</sub> receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *Journal of Biological Chemistry*, 273(4), 2030-2034.
36. McCall, K. (2010). Genetic control of necrosis—another type of programmed cell death. *Current opinion in cell biology*, 22(6), 882-888.
37. Storey, R. F., Sanderson, H. M., White, A. E., May, J. A., Cameron, K. E., & Heptinstall, S. (2000). The central role of the P2T receptor in amplification of human platelet activation, aggregation, secretion and procoagulant activity. *British journal of haematology*, 110(4), 925-934.
38. Hechler, B., Léon, C., Vial, C., Vigne, P., Frelin, C., Cazenave, J. P., & Gachet, C. (1998). The P2Y<sub>1</sub> Receptor Is Necessary for Adenosine 5'-Diphosphate-Induced Platelet Aggregation. *Blood*, 92(1), 152-159.
39. Hechler, B., Eckly, A., Ohlmann, P., Cazenave, J. P., & Gachet, C. (1998). The P2Y<sub>1</sub> receptor, necessary but not sufficient to support full ADP-induced platelet

aggregation, is not the target of the drug clopidogrel. *British journal of haematology*, 103(3), 858-866.

40. Developed with the special contribution of the European Association for Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI), Wijns, W., Kolh, P., Danchin, N., Di Mario, C., Falk, V., ... & Knuuti, J. (2010). Guidelines on myocardial revascularization: the task force on myocardial revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *European heart journal*, 31(20), 2501-2555.

41. Silber, S., Albertsson, P., Avilés, F. F., Camici, P. G., Colombo, A., Hamm, C., ... & Urban, P. (2005). Guidelines for percutaneous coronary interventions: the Task Force for Percutaneous Coronary Interventions of the European Society of Cardiology. *European heart journal*, 26(8), 804-847.

42. Rodríguez-González, F., Martínez-Quintana, E., Saavedra, P., Medina-Gil, J. M., Riaño, M., Garay-Sánchez, P., & Tugores, A. (2018). CYP2C19 or CYP3A5 Genotyping Does Not Predict Clinical Response to Clopidogrel. *The Journal of Clinical Pharmacology*.

43. Balamuthusamy, Saravanan, and Rohit Arora. "Hematologic adverse effects of clopidogrel." *American journal of therapeutics* 14.1 (2007): 106-112

44. Taubert, D., Kastrati, A., Harlfinger, S., Gorchakova, O., Lazar, A., von Beckerath, N., ... & Schömig, E. (2004). Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of a high loading dose. *Thrombosis and haemostasis*, 92(02), 311-316.

45. Lins, R., Broekhuysen, J., Necciari, J., & Deroubaix, X. (1999). Pharmacokinetic profile of <sup>14</sup>C-labeled clopidogrel. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* (Vol. 25, pp. 29-33).

46. Brown, S. A., & Pereira, N. (2018). Pharmacogenomic impact of CYP2C19 variation on clopidogrel therapy in precision cardiovascular medicine. *Journal of personalized medicine*, 8(1), 8.

47. Close, S. L. (2011). Clopidogrel pharmacogenetics: metabolism and drug interactions. *Drug metabolism and drug interactions*, 26(2), 45-51.

48. Amin, A. M., Sheau Chin, L., Azri Mohamed Noor, D., Kader, S. A., Ali, M., Kah Hay, Y., & Ibrahim, B. (2017). The personalization of clopidogrel antiplatelet therapy: the role of integrative pharmacogenetics and pharmacometabolomics. *Cardiology research and practice*, 2017.

49. Shin, D. J., Kwon, J., Park, A. R., Bae, Y., Shin, E. S., Park, S., & Jang, Y. (2012). Association of CYP2C19\* 2 and\* 3 genetic variants with essential hypertension in Koreans. *Yonsei medical journal*, 53(6), 1113-1119.
50. Deshpande, N., Sharanya, V., VV, R. K., Murthy, H. V. V., Sasikala, M., Banerjee, R., ... & Reddy, N. (2016). Rapid and ultra-rapid metabolizers with CYP2C19\* 17 polymorphism do not respond to standard therapy with proton pump inhibitors. *Meta gene*, 9, 159-164.
51. Kunapuli, S. P., Dorsam, R. T., Kim, S., & Quinton, T. M. (2003). Platelet purinergic receptors. *Current opinion in pharmacology*, 3(2), 175-180.
52. Jin, J., Daniel, J. L., & Kunapuli, S. P. (1998). Molecular basis for ADP-induced platelet activation II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *Journal of Biological Chemistry*, 273(4), 2030-2034.
53. Geiger, J., Brich, J., Honig-Liedl, P., Eigenthaler, M., Schanzenbacher, P., Herbert, J. M., & Walter, U. (1999). Specific impairment of human platelet P2Y<sub>1</sub> ADP receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 19(8), 2007-2011.
54. Haslam, R. J. (1973). Interactions of the pharmacological receptors of blood platelets with adenylate cyclase. *Series haematologica* (1968), 6(3), 333-350.
55. Savi, P., Pflieger, A. M., & Herbert, J. M. (1996). cAMP is not an important messenger for ADP-induced platelet aggregation. *Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis*, 7(2), 249-252.
56. Schwarz, U. R., Geiger, J., Walter, U., & Eigenthaler, M. (1999). Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets. *Thrombosis and haemostasis*, 81(03), 1145-1152.
57. Aleil, B., Ravanat, C., Cazenave, J. P., Rochoux, G., Heitz, A., & Gachet, C. (2005). Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(1), 85-92.

58. Trumel, C., Payraastre, B., Plantavid, M., Hechler, B., Viala, C., Presek, P., ... & Gachet, C. (1999). A key role of adenosine diphosphate in the irreversible platelet aggregation induced by the PAR1-activating peptide through the late activation of phosphoinositide 3-kinase. *Blood*, 94(12), 4156-4165.
59. Kauffenstein, G., Bergmeier, W., Eckly, A., Ohlmann, P., Leon, C., Cazenave, J. P., ... & Gachet, C. (2001). The P2Y<sub>12</sub> receptor induces platelet aggregation through weak activation of the  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin—a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *FEBS letters*, 505(2), 281-290.
60. Gurbel, P. A., Bliden, K. P., Hayes, K. M., & Tantry, U. (2004). Platelet activation in myocardial ischemic syndromes. *Expert review of cardiovascular therapy*, 2(4), 535-545.
61. Conley, P. B., & Delaney, S. M. (2003). Scientific and therapeutic insights into the role of the platelet P2Y<sub>12</sub> receptor in thrombosis. *Current opinion in hematology*, 10(5), 333-338.
62. Joo, S. J. (2012). Mechanisms of platelet activation and integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *Korean circulation journal*, 42(5), 295-301.
63. Zahno, A., Bouitbir, J., Maseneni, S., Lindinger, P. W., Brecht, K., & Krähenbühl, S. (2013). Hepatocellular toxicity of clopidogrel: mechanisms and risk factors. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 208-216.
64. Gao, B., Jeong, W. I., & Tian, Z. (2008). Liver: an organ with predominant innate immunity. *Hepatology*, 47(2), 729-736.
- 65 Mall, F. P. (1906). A study of the structural unit of the liver. *American Journal of Anatomy*, 5(3), 227-308.
- 66 Jungermann, K., & Keitzmann, T. (1996). Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annual review of nutrition*, 16(1), 179-203.
- 67 Haschek, W. M., Rousseaux, C. G., Wallig, M. A., Bolon, B., & Ochoa, R. (Eds.). (2013). *Haschek and Rousseaux's handbook of toxicologic pathology*. Academic Press.
- 68 . Czaja, M. J., Ding, W. X., Donohue, T. M., Friedman, S. L., Kim, J. S., Komatsu, M., ... & Perlmutter, D. H. (2013). Functions of autophagy in normal and diseased liver. *Autophagy*, 9(8), 1131-1158.

69. Wu, J. C., Merlino, G., & Fausto, N. (1994). Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic for transforming growth factor alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(2), 674-678.
70. Wu, J. C., Merlino, G., & Fausto, N. (1994). Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic for transforming growth factor alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(2), 674-678.
71. Cummings, B. S., & Schnellmann, R. G. (2004). Measurement of cell death in mammalian cells. *Current protocols in pharmacology*, 25(1), 12-8.
72. Leist, M., & Jäätelä, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(8), 589.
73. Geoffrey M Cooper (2000). *Structure of the Plasma Membrane. The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition.
74. Draeger, A., Schoenauer, R., Atanassoff, A. P., Wolfmeier, H., & Babiychuk, E. B. (2014). Dealing with damage: plasma membrane repair mechanisms. *Biochimie*, 107, 66-72.
75. Guengerich, F. P. (2001). Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical research in toxicology*, 14(6), 611-650.
76. Krähenbühl, S., Brauchli, Y., Kummer, O., Bodmer, M., Trendelenburg, M., Drewe, J., & Haschke, M. (2007). Acute liver failure in two patients with regular alcohol consumption ingesting paracetamol at therapeutic dosage. *Digestion*, 75(4), 232-237.
77. Thummel, K. E., Slattery, J. T., Ro, H., Chien, J. Y., Nelson, S. D., Lown, K. E., & Watkins, P. B. (2000). Ethanol and production of the hepatotoxic metabolite of acetaminophen in healthy adults. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 67(6), 591-599.
78. Robin, M. A., Le Roy, M., Descatoire, V., & Pessayre, D. (1997). Plasma membrane cytochromes P450 as neoantigens and autoimmune targets in drug-induced hepatitis. *Journal of hepatology*, 26, 23-30.

79. Jaeschke, H., Gores, G. J., Cederbaum, A. I., Hinson, J. A., Pessayre, D., & Lemasters, J. J. (2002). Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicological sciences*, 65(2), 166-176.
80. J. Yun, C. H., Okerholm, R. A., & Guengerich, F. P. (1993). Oxidation of the antihistaminic drug terfenadine in human liver microsomes. Role of cytochrome P-450 3A (4) in N-dealkylation and C-hydroxylation. *Drug metabolism and Disposition*, 21(3), 403-409.
81. Beaune, P. H., Dansette, P. M., Mansuy, D., Kiffel, L., Finck, M., Amar, C., ... & Homberg, J. C. (1987). Human anti-endoplasmic reticulum autoantibodies appearing in a drug-induced hepatitis are directed against a human liver cytochrome P-450 that hydroxylates the drug. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(2), 551-555.
82. Trauner, M., Meier, P. J., & Boyer, J. L. (1998). Molecular pathogenesis of cholestasis. *New England Journal of Medicine*, 339(17), 1217-1227.
83. Robin, M. A., Le Roy, M., Descatoire, V., & Pessayre, D. (1997). Plasma membrane cytochromes P450 as neoantigens and autoimmune targets in drug-induced hepatitis. *Journal of hepatology*, 26, 23-30.
84. Reed, J. C. (2001). Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends in molecular medicine*, 7(7), 314-319.
85. Pessayre, D., Berson, A., Fromenty, B., & Mansouri, A. (2001). Mitochondria in steatohepatitis. In *Seminars in liver disease* (Vol. 21, No. 01, pp. 057-070).
86. Nagata, S. (2018). Apoptosis and clearance of apoptotic cells. *Annual review of immunology*, 36, 489-517.
87. Trachootham, D., Alexandre, J., & Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?. *Nature reviews Drug discovery*, 8(7), 579.
88. Brodnitz, M. H. (1968). Autoxidation of saturated fatty acids. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 16(6), 994-999.

89. Stark, G. (1991). The effect of ionizing radiation on lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1071(2), 103-122.
90. Stark, G. (2005). Functional consequences of oxidative membrane damage. *The Journal of membrane biology*, 205(1), 1-16.
91. Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
92. Henson, P. M. (2003). The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave. *Essays in biochemistry*, 39, 105-117.
93. Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *science*, 281(5381), 1305-1308.
94. Nawarskas, J. J., Newsome, C., Anderson, J. R., & Ahmed, B. (2015). P2Y<sub>12</sub> inhibitors for acute coronary syndromes: current perspectives. *Research Reports in Clinical Cardiology*, 6, 123-143.
95. Nguyen, T. A., DiDati, J. G., & Pharand, C. (2005). Resistance to clopidogrel: a review of the evidence. *Journal of the American College of Cardiology*, 45(8), 1157-1164.
96. Kumar, V., Abbas, A., & Aster, J. (2013). *Robbins Basic Pathology* (9. baskı). Kanada: Elsevier Saunders
97. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015;385:117–171
98. Frenk, J., BOBADILLA, J. L., Sepuúlveda, J. A. I. M. E., & CERVANTES, M. L. (1989). Health transition in middle-income countries: new challenges for health care. *Health policy and planning*, 4(1), 29-39.
99. Polasek, T. M., Doogue, M. P., & Miners, J. O. (2011). Metabolic activation of clopidogrel: in vitro data provide conflicting evidence for the contributions of CYP2C19 and PON1. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 2(6), 253-261.
100. S Sharis, P. J., Cannon, C. P., & Loscalzo, J. (1998). The antiplatelet effects of ticlopidine and clopidogrel. *Annals of Internal Medicine*, 129(5), 394-405. aris PJ, Cannon CP, Loscalzo J. (1988). The antiplatelet effects of ticlopidine and clopidogrel. *Ann Intern Med* 129:394–405

- 101 Savi, P., Pereillo, J. M., Uzabiaga, M. F., Combalbert, J., Picard, C., Maffrand, J. P., ... & Herbert, J. M. (2000). Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thrombosis and haemostasis*, 84(05), 891-896.
102. Angiolillo, D. J., Fernandez-Ortiz, A., Bernardo, E., Alfonso, F., Macaya, C., Bass, T. A., & Costa, M. A. (2007). Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives. *Journal of the American College of Cardiology*, 49(14), 1505-1516.
103. Brandt, J. T., Close, S. L., Iturria, S. J., Payne, C. D., Farid, N. A., Ernest, C. S., ... & Winters, K. J. (2007). Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(12), 2429-2436.
- 104 Geisler, T., Schaeffeler, E., Dippon, J., Winter, S., Buse, V., Bischofs, C., ... & Schwab, M. (2008). CYP2C19 and nongenetic factors predict poor responsiveness to clopidogrel loading dose after coronary stent implantation.
- 105 Bertrand, M. E., Rupprecht, H. J., Urban, P., & Gershlick, A. H. (2000). Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting: the clopidogrel aspirin stent international cooperative study (CLASSICS). *Circulation*, 102(6), 624-629.
106. Wolf I, Mouallem M, Rath S, Farfel Z. Clopidogrel-induced systemic inflammatory response syndrome. *Mayo Clin Proc.* 2003;78:618-20.
107. Goyal RK, Srivastava D, Lessnau KD. (2009). Clopidogrel-induced hepatocellular injury and cholestatic jaundice in an elderly patient: case report and review of the literature. *Pharmacotherapy* 29:608–612.
108. Sibbing D., Koch W., Gebhard D., Schuster T., Braun S., Stegherr J., et al. (2010) Cytochrome 2C19\*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation* 121: 512–518
109. Maseneni, S.; Donzelli, M.; Taegtmeier, A. B.; Brecht, K.; Krähenbühl, S. Toxicity of clopidogrel and ticlopidine on human myeloid progenitor cells: importance of metabolites. *Toxicology* 299:139–145; 2012.
110. Zahno, A., Brecht, K., Bodmer, M., Bur, D., Tsakiris, D. A., & Krähenbühl, S. (2010). Effects of drug interactions on biotransformation and antiplatelet effect of clopidogrel in vitro. *British journal of pharmacology*, 161(2), 393-404.
111. Lammert, C., Bjornsson, E., Niklasson, A., & Chalasani, N. (2010). Oral medications with significant hepatic metabolism at higher risk for hepatic adverse events. *Hepatology*, 51(2), 615-620.

112. Zhai, Y., Wang, L., Yang, F., Feng, G., Feng, S., Cui, T., ... & He, X. (2016). The mechanism and risk factors of clopidogrel-induced liver injury. *Drug and chemical toxicology*, 39(4), 367-374.

113. Watanabe, T., Sagisaka, H., Arakawa, S., Shibaya, Y., Watanabe, M., Igarashi, I., ... & Manabe, S. (2003). A novel model of continuous depletion of glutathione in mice treated with L-buthionine (S, R)-sulfoximine. *The Journal of toxicological sciences*, 28(5), 455-469.



## ÖZGEÇMİŞ

**AdıSoyadı** : Didem KUTLU  
**Doğum Yeri ve Tarihi:** İstanbul -28.05.1993  
**YabancıDili** :İngilizce  
**E-Posta** :[didemkutlu1@gmail.com](mailto:didemkutlu1@gmail.com)

### Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite/Lise	MezuniyetYılı
Lise	Fen Bilimleri	Bingül Erdem Lisesi	2011
Lisans - Erasmus	Biyoloji Bölümü	Coruna Üniversitesi (İspanya)	2013-2014
Lisans	Biyoloji Bölümü	Fatih Üniversitesi	2016

İş Tecrübeleri	Yıl
Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Genetik Tanı Merkezi - Biyolog (Stajyer)	07.2015 - 08.2015
Burç Genetik Tanı Merkezi - Biyolog (Stajyer)	08.2015 - 09.2015
Generali Sigorta - CRM Sorumlusu	03.2016 - 08.2016
Marmara Üniversitesi Çevre Sorunları Uyg. Ve Arş. Merkezi – Biyolog	01.2017-06.2018

### Bilimsel Eserler

1.Investigation of the Effects of Clopidogrel in AML12 Hepatocyte Cell Line over Membrane Integrity. **Didem KUTLU**, Miray Cahide KARABAY, Ece ÇARPAR, Mehtap ÇEVİK , Belgin SÜSLEYİCİ. 5. Ulusal ve 3. Akdeniz Morbid Obezite ve

Metabolik Hastalıklar Cerrahisi Kongresi, 12 – 15 Ekim 2017. Belek, Antalya. (Poster Bildirisi)

2. Investigation of the Effects of Clopidogrel in AML12 Hepatocyte Cell Line over Mitochondrial Activity. Miray Cahide KARABAY, **Didem KUTLU**, Ece ÇARPAR, Mehtap ÇEVİK, Belgin SÜSLEYİCİ. 5. Ulusal ve 3. Akdeniz Morbid Obezite ve Metabolik Hastalıklar Cerrahisi Kongresi, 12 – 15 Ekim 2017. Belek, Antalya. (Poster Bildirisi)

3. Investigation of the Effects of Clopidogrel in AML12 Hepatocyte Cell Line over Lysosomal Activity .Ece ÇARPAR,Miray Cahide KARABAY, **Didem KUTLU**, Mehtap ÇEVİK, Belgin SÜSLEYİCİ. 5. Ulusal ve 3. Akdeniz Morbid Obezite ve Metabolik Hastalıklar Cerrahisi Kongresi, 12 – 15 Ekim 2017. Belek, Antalya. (Poster Bildirisi)