

DEĞİŞİK DOZLARDAKİ ASETAMİNOFENİN KARACİĞER NİTRİK OKSİT SENTAZ ENZİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER KULLANILARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Ahmet Koçak,¹ Prof. Dr. Alpaslan Gökçimen,² Dr. Nigar Yılmaz,³ Prof. Dr. Hüseyin Vural³

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Isparta

² Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Aydın

³ Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Isparta

ÖZET

Amaç: Asetaminofenin günlük tavsiye edilen doz sınırının üzerinde kullanılmasının, karaciğer üzerinde akut yetersizliğe kadar varan çeşitli olumsuz etkileri vardır. Yapılan bazı çalışmalarda, karaciğer parankiminde üretilen bazı metabolitlerin de bu sürece katkı sağladığı bildirilmiştir. Nitrik oksit (NO), yangısal medyatörlere karşı sentezlenen oldukça reaktif bir maddedir. Bu çalışmada, değişik dozlarda uygulanan asetaminofenin karaciğer üzerindeki muhtemel yapısal etkilerinin iNOS enzimi, NO ve diğer biyokimyasal parametrelerle olan bağlantısını incelemeyi amaçladık.

Materyal ve Metod: Bu çalışmada, toplam 70 adet Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar, periton içi yoldan enjekte edilen asetaminofen dozuna göre yedi eşit gruba ayrıldı: Grup-I (Kontrol, n=10), Grup-II (5 mg/kg, n=10), Grup-III (10 mg/kg, n=10), Grup-IV (20 mg/kg, n=10), Grup-V (100 mg/kg, n=10), Grup-VI (200 mg/kg, n=10) ve Grup VII (500 mg/kg, n=10). Enjeksiyondan 24 saat sonra, hayvan-

lar anestezi altında açılarak karaciğer ve kan örnekleri alındı. Alınan doku örnekleri histopatoloji ve lipit peroksidasyonu yönünden, kan örnekleriyse serum NO, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) seviyeleri bakımından incelendi.

Bulgular: Grup-II, Grup-III ve Grup-IV'ten elde edilen veriler kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, arada herhangi bir farkın olmadığı görüldü ($p > 0,05$). Öte yandan, Grup-V, Grup-VI ve Grup-VII ile kontrol grubu arasında karaciğerdeki yapısal değişiklikler, iNOS enzimine ait reseptör dağılımı ve serum NO seviyeleri yönünden anlamlı bir farklılık vardı ($p < 0,05$).

Sonuç: Elde edilen bulgular, NO'nun asetaminofenin karaciğer üzerindeki etkilerine paralel olarak artmasının, lipit peroksidasyonunu engellemesinin yanı sıra farklı mekanizmalar üzerinden doku hasarlanmasında da rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Asetaminofen, karaciğer, nitrik oksit, iNOS. Nobel Med 2011; 7(2): 88-95

EVALUATION OF THE EFFECT OF ACETAMINOPHEN AT DIFFERENT DOSES ON HEPATIC NITRIC OXIDE SYNTHASE ENZYME BY USING IMMUNOHISTOCHEMICAL AND BIOCHEMICAL METHODS

ABSTRACT

Objective: Excessive administration of acetaminophen have some negative effects on liver that may even progress to acute failure. It has been reported that some metabolites produced in liver parenchyme may also contribute to this process. Nitric oxide (NO) is a highly reactive substance which is synthesized in response to inflammatory mediators.

In this study, we aimed to investigate the relationship between the possible structural effects of acetaminophen at different doses on liver with iNOS enzyme, NO and other biochemical parameters.

Material and Method: A total of 70 male Wistar albino rats were included in this study. Animals were equally

divided to seven groups as follows: Group-I (Controls), Group-II (5 mg/kg), Group-III (10 mg/kg), Group-IV (20 mg/kg), Group-V (100 mg/kg), Group-VI (200 mg/kg) and Group VII (500 mg/kg). After 24 hours, animals were sacrificed under general anesthesia. Liver and blood samples were collected. Tissues have undergone histopathological analysis and lipid peroxidation look-up, whereas blood samples were analyzed by means of serum NO, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px).

Results: There was a significant difference between Group-V, VI, VII and the controls by means of hepatic structural changes, iNOS receptor distribution and serum NO levels ($p > 0,05$).

Conclusion: Current evidence suggest that increase in NO in parallel to the effects of acetaminophen on liver may play a role in tissue damage via different mechanisms, beside its preventive effect on lipid peroxidation.

Key Words: Acetaminophen, liver, nitric oxide, iNOS.. Nobel Med 2011; 7(2): 88-95

GİRİŞ

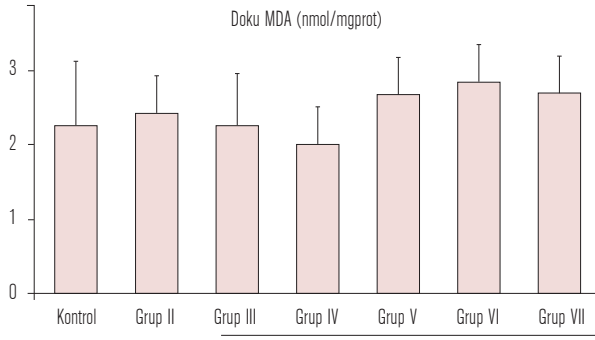
Akut şekilde gelişen karaciğer yetersizliği vakalarının %50'sinden fazlasında, ilaçlar sorumlu tutulmuştur. Duyarlılığa bağlı olarak meydana gelen ilaç reaksiyonlarının yaklaşık %75'inin karaciğer nakli ve ölümlü sonuçlandığı bildirilmiştir.¹ Asetaminofen (parasetamol), etkinliği ve göreceli güvenilirliği dolayısıyla bütün dünya çapında en yaygın şekilde kullanılan antipiretik (ateş düşürücü) ve analjezik (ağrı kesici) ilaçlardan biridir. Fakat, bu ilacın karaciğerde hasarlanma yaparak yetersizliğe yol açtığına dair çok sayıda çalışma vardır.²⁻⁴ Ağır karaciğer hasarlanmasıyla asetaminofen arasındaki ilk bağlantı, 1966 yılında bildirilmiştir.⁵ Bu ilacın karaciğerde hasarlanmaya yol açtığı tespit edilen dozlarının, tedavi amacıyla kullanılan sınırlar içinde olduğu bilgisi önemlidir.⁶

Asetaminofen, bazı kimyasal reaksiyonların aracılık ettiği ve karaciğer epitel hücreleri arasında meydana gelen etkileşimler sonucunda, karaciğer dokusunda nekroza yol açmaktadır. Bu ajana, "doğrudan hepatotoksin" de denmiştir.⁷ Bağışıklık mekanizmaları, bu süreçte yer almaz. Toksik etkiye yol açan mekanizmalar arasında protein arilasyonu, oksidatif stres, kalsiyum dengesizliği, transkripsiyon yollarında meydana gelen değişiklikler, iltihabi (yangısal) değişikliklere öncülük eden sinyaller ve hücre ölüm yollarının harekete geçirilmesi sayılmıştır.⁸ Asetaminofen, karaciğer üzerindeki toksik etkilerini N-asetil-p-benzokinimin (NAPQI) denilen ve sitokrom P-450 sistemi üze-

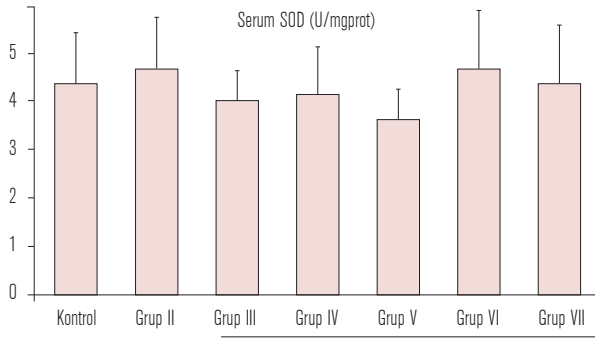
rinden açığa çıkan bir metaboliti aracılığıyla gösterir. Bu metabolit, genellikle iç kaynaklı bir antioksidan olan glutatyonla etkileşime geçerek zararsız hale gelmektedir. Diğer taraftan, asetaminofenin yüksek dozda alınması sonrasında metabolitlerin miktarında artış olur. Bu durumda, glutatyon açığa çıkan fazla miktardaki NAPQI molekülünü bağlayamaz. Serbest haldeki NAPQI, karaciğerdeki diğer büyük çaplı moleküllere kovalent şekilde bağlanarak, karaciğer dokusunda hasarlanmaya yol açar.⁹

Karaciğerdeki glutatyon depolarının besin eksikliği veya alkol bağımlılığı gibi sebepler dolayısıyla tükenmesi, zehirlenmeyi kolaylaştırır. Kötü beslenme alışkanlığı olan kişilerde ve alkoliklerde, toksik dozdan daha düşük dozların alınması bile toksik etkilerin ortaya çıkmasına yol açabilir.^{9,10} Karaciğerde meydana gelen hasarlanma, glutatyon seviyelerini yükselten N-asetilsisteinin dışarıdan verilmesi yoluyla önlenmektedir. Asetaminofen aracılıklı karaciğer hasarlanması, sadece NAPQI'nın doğrudan açığa çıkan etkilerine bağlanamaz. Yakın geçmişte yapılan çalışmalarda, bazı sitokinlerin ve nitrik oksidin (NO) de bu süreçte rol oynayabileceğine ilişkin bulgular elde edilmiştir.¹¹ NO, karaciğerdeki parankim hücrelerinde ve parankim olmayan diğer hücrelerde L-arginin amino asidinden uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enzimi aracılığıyla üretilen ve yüksek reaktif oksidan kapasiteye sahip bir bileşendir.¹² NO'nun karaciğerde fazla miktarda üretilmesinin, endotoksin şokunda ve karaciğerdeki iltihabi reaksiyona ve hasarlanmaya ilişkin →

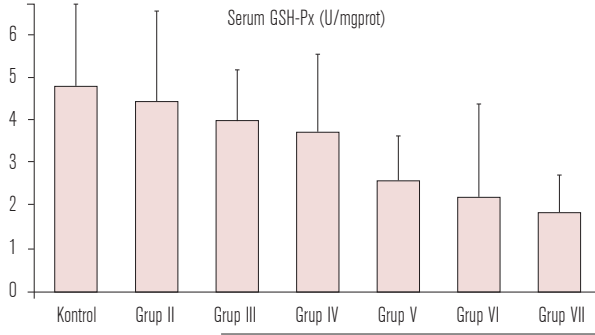
DEĞİŞİK DOZLARDAKİ
ASETAMİNOFENİN KARACİĞER
NİTRİK OKSİT SENTAZ ENZİMİ
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL
VE BİYOKİMYASAL
YÖNTEMLER KULLANILARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ



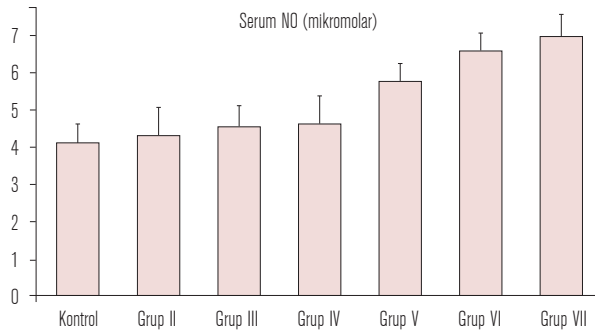
Şekil 1. Karaciğer dokusunda ölçülen ortalama malondialdehit (MDA) seviyeleri.



Şekil 2. Ortalama serum süperoksit dismutaz (SOD) seviyeleri.



Şekil 3. Ortalama serum glutatyon peroksidaz (GSH-Px) seviyeleri.



Şekil 4. Ortalama serum nitrik oksit (NO) seviyeleri.

diğer modellerde rol oynayan önemli bir unsur olduğu düşünülmüştür.¹³ NO'nun karaciğerdeki etkilerinin altında yatan mekanizma tam olarak bilinmemesine rağmen, bu bileşenin sitokrom P-450'de azalmaya yol açtığı¹⁴, karaciğerdeki proteinlerin DNA sentezini baskıladığı¹⁵ ve apoptozun yanı sıra nekrozu da uyardığı¹⁶ bildirilmiştir. Diğer yandan, NO'nun antioksidan etkilerinin olduğuna dair yayınlar da mevcuttur.^{17,18} Dolayısıyla, NO'nun karaciğer üzerindeki etkileri tek yönlü değildir ve organizmanın içinde bulunduğu duruma göre değişebilmektedir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, periton içine enjeksiyon yoluyla uygulanan değişik dozlardaki asetaminofenin sıçanların karaciğer dokusunda yapısal değişikliklere yol açıp açmadığını ve doza bağlı olarak görülen değişikliklerin iNOS reseptör dağılımıyla olan bağlantısının yanı sıra, bu etkinin serum NO seviyeleriyle ve diğer biyokimyasal parametrelerle olan ilişkisini incelemeyi amaçladık.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada, altı deney grubu ve bir kontrol grubu oluşturuldu. Her bir grupta onar adet olmak üzere toplam 70 adet sıçan kullanıldı. Deney planı, Tablo 1'de verilmiştir. Deneyin başlangıcında, ilk gün sıçanların ağırlıkları ölçüldü. Çalışmanın başlangıcından 24 saat sonra deney sonlandırıldı ve ketamin anestezisi altında karaciğerler ve kan örnekleri alındı. Alınan karaciğerin bir kısmı biyokimyasal analiz için ayrıldı ve fosfat tamponuna konuldu. Karaciğerin geri kalan kısmı ise, histolojik çalışma için %10'luk nötral formaldehit çözeltisine konularak tespit edildi. Hazırlanan parafin bloklardan, Leica tipi kızaklı mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve hematoksilen-eozin kullanılarak boyama yapıldı. Boyanan örneklerin incelenmesinde ve fotoğraflarının çekiminde, Olympus BX-50 tipi binoküler araştırma mikroskobu ve görüntüleme donanımı kullanıldı. İmmünohistokimyasal incelemede, Elde edilen tüm doku örnekleri, %10'luk formalin solüsyonuna alındı. Dokular en fazla 24 saat formalin solüsyonunda bekletildi. Daha sonra yukarıda sayılan rutin histolojik yöntemler kullanılarak dokular parafine gömüldü. Mikrotom (Leica tipi kızaklı mikrotom) ile alınan 5 µm kalınlığında seri kesitler lizinli lamlara alındı. Parafin kesitler, etüvde 37°C'de bir gece bekletildi. Dokular, bir saat süreyle oda ısısında primer antikor iNOS (Epitope Specific Rabbit Antibody) Labvision Fremont CA 94539 USA ile 1/50'lik dilüsyonda enkübe edildi. İkincil antikor Biotinylated Goat Anti-Polyvalent- Labvision TP-125-BN ile 20 dakika muamele edildi. Hematoksilen ile zıt boyama uygulanan kesitler, entellan kullanılarak kapatıldı. İmmünohistokimyasal yöntemle boyanan karaciğer doku kesit→

lerindeki iNOS reseptör yoğunluklarının belirlenmesinde, yarı nitel değerlendirme yöntemi kullanıldı.¹⁹

Biyokimyasal analizde, karaciğer doku numuneleri, karnın uzaklaştırılması amacıyla önce soğuk distile su ile yıkandı. Daha sonra, doku örnekleri 150 ml'lik soğuk potasyum fosfat tamponu içine alınarak -20°C'de muhafaza edildi. Derin dondurucudan çıkarılan karaciğer örnekleri, buzlarının çözülmesinin ardından üç kez soğuk distile su ile yıkandı ve kurutma kağıdı ile kurulandı. Kurulanan karaciğer örnekleri tartılarak, hacim doku ağırlığının 10 katı olacak şekilde fosfat tamponu içine alındı ve buz üzerinde homojenizatörle 16,000 devir/dk hızında iki dakika boyunca homojenize edildi. Elde edilen homojenatlardan, süperoksit dismutaz (SOD), malondialdehit (MDA), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ölçümü yapıldı. Ayrıca, alınan kan örneklerinde, serum nitrik oksit (NO) seviyelerine bakıldı.

İstatistik analizde, SPSS 15.0 ve InStat 3.0 yazılımları kullanılarak yapıldı ve yarı nitel değerlendirme ölçümünde Ki-kare testi uygulandı. İkili grup karşılaştırmaları için parametrik olmayan Mann-Whitney U testi kullanıldı ve 0.05'in altındaki P değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Kontrol grubu ve deney gruplarına ait karaciğer doku kesitlerinde incelenen yapısal değişikliklerin değerlendirilmesinde, Abdel-Wahhab ve arkadaşlarının kullandıkları yarı-nitel değerlendirme yöntemi kullanıldı.²⁰ Buna göre (-) (negatif puan): hiçbir yapısal değişikliğin olmaması, (+) (1 pozitif puan): hafif derecede, (++) (2 pozitif puan): orta derecede, (+++) (3 pozitif puan): ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir (Tablo 2).

Bu yöntemle elde edilen sonuçlar, istatistik analizden geçirildi. Gruplara ait "p" değerleri, Tablo 1'te verilmiştir. Kontrol grubu sıçanlara ait karaciğer doku kesitlerinin histolojik incelenmesinde, bu organa ait histolojik yapılar dışında herhangi bir bulguya rastlanmamıştır (Resim 1). Grup-II, Grup-III ve Grup-IV'e ait 5, 10 ve 20 mg/kg asetaminofen verilen sıçanların karaciğer doku örnekleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, arada herhangi bir yapısal farklılığın olmadığı görüldü ($p > 0.05$) (Resim 2-4). Grup-V'te yer alan ve 100 mg/kg dozunda ilaç uygulaması yapılan hayvanlara ait karaciğer doku örnekleri incelendiğinde, portal venin etrafındaki sahada mononükleer hücre infiltrasyonu, parankimde piknotik ve hiperkromatik çekirdekli hücrelerin ve hepatositlerde granüler ve vakuoler bozunmaların olduğu gözlemlendi ve bu değişimler, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlıydı ($p < 0.05$) (Resim 5).

Gruplar	Hayvan sayısı	Tedavi	Doz	Süre
I	10	Kontrol	1 ml SF	1 Gün
II	10	Asetaminofen	5 mg / kg	1 Gün
III	10	Asetaminofen	10 mg / kg	1 Gün
IV	10	Asetaminofen	20 mg / kg	1 Gün
V	10	Asetaminofen	100 mg / kg	1 Gün
VI	10	Asetaminofen	200 mg / kg	1 Gün
VII	10	Asetaminofen	500 mg / kg	1 Gün

Gruplar	Hepatosit dejenerasyonu	Sinüzoidal dilatasyon	Piknotik çekirdek	Nekroza giden hücre	Parankimde MN hücre infiltrasyonu
Kontrol	-	-	-	-	-
Grup II	-	-	-	-	-
Grup III	-	-	-	-	-
Grup IV	-	-	-	-	-
Grup V	+	+	+	+	++
Grup VI	++	++	+	++	++
Grup VI	+++	++	++	++	++

Benzer şekilde, 200 mg/kg ve 500 mg/kg dozlarında asetaminofen enjekte edilen ve Grup-VI ile Grup-VII'ye ait karaciğer doku kesitlerinde sinüzoidal genişleme, piknotik ve nekroza giden hücrelerin yanı sıra, şiddeti daha da artan şekilde hepatosit bozunmalarının olduğu ve bu değişimlerin kontrol grubuna göre anlamlı oldukları gözlemlendi ($p < 0,05$) (Resim 6 ve 7).

İmmünohistokimyasal incelemede, kontrol grubundaki (Grup-I) hayvanlara ait karaciğer dokularının sentrilobüler sahalarında iNOS reseptörlerinin çok hafif şekilde boyandıkları, diğer yandan 5, 10 ve 20 mg/kg dozlarında asetaminofen enjekte edilen ve Grup-II, Grup-III ve Grup-IV'te yer alan sıçan karaciğerlerine ait kesit örneklerinde ise, iNOS reseptörlerinin sentrilobüler bölgelerde ve parankim sahalarında yer alan hepatosit hücrelerinde az miktarda, fakat kontrol grubuna göre daha belirgin oranda boyandıkları gözlemlendi (Resim 8). Buna karşılık olarak 100, 200 ve 500 mg/kg dozlarında asetaminofen enjekte edilen ve Grup-V, Grup-VI ve Grup-VII'de yer alan sıçanlara ait karaciğer doku kesitlerindeki iNOS reseptörlerinin daha yoğun ve kuvvetli şekilde boyandıkları, özellikle 500 mg/kg asetaminofen enjeksiyonu yapılan gruptaki parankim dokusunun daha belirgin ve yaygın şekilde boya tuttuğu tespit edildi (Resim 9). Boyanma şiddetinin durumu şu şekildeydi: Kontrol grubu (- / +), Grup-II (+), Grup-III (+), Grup-IV (+), Grup-V (++) , Grup-VI (+++) ve Grup-VII (+++). Bu bakımdan, →

**DEĞİŞİK DOZLARDAKİ
ASETAMİNOFENİN KARACİĞER
NİTRİK OKSİT SENTAZ ENZİMİ
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL
VE BİYOKİMYASAL
YÖNTEMLER KULLANILARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Tablo 3: Gruplar arasında gözlenen yapısal değişikliklere ait p değerleri					
Gruplar	Hepatosit dejenerasyonu	Sinüoidal dilatasyon	Piknotik çekirdek	Nekroza giden hücre	Parankimde MN hücre infiltrasyonu
Kontrol Grup II	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05
Kontrol Grup III	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05
Kontrol Grup IV	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05
Kontrol Grup V	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.01
Kontrol Grup VI	< 0.01	< 0.01	< 0.05	< 0.01	< 0.01
Kontrol Grup VI	< 0.001	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

Tablo 4: Gruplara ait biyokimyasal parametrelerin ölçüm değerleri.				
Gruplar	SOD	MDA	Gsh-Px	NO
Kontrol	4,25 ± 1,14	2,20 ± 0,90	4,83 ± 1,90	4,13 ± 0,43
Grup - II	4,56 ± 1,17	2,31 ± 0,47	4,45 ± 2,13	4,26 ± 0,69
Grup - III	4,09 ± 0,50	2,24 ± 0,77	3,99 ± 1,25	4,47 ± 0,46
Grup - IV	4,23 ± 0,92	2,13 ± 0,38	3,92 ± 1,63	4,53 ± 0,50
Grup - V	3,75 ± 0,52	2,66 ± 0,54	2,60 ± 1,12	5,63 ± 0,36
Grup - VI	4,48 ± 1,50	2,83 ± 0,52	2,52 ± 1,87	6,53 ± 0,38
Grup - VII	4,28 ± 1,26	2,79 ± 0,95	2,26 ± 0,69	7,11 ± 0,46



Resim 1. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu. (SV: Santral ven, yıldız: sinüzoid). (Hematoksilen-Eozin, x40).

Resim 2. Grup-II'ye ait karaciğer dokusu. (Hematoksilen-Eozin, x40).

Resim 3. Grup-III'e ait karaciğer dokusu (Hematoksilen-Eozin, x40).

kontrol grubuyla düşük doz asetaminofen verilen gruplar arasında ($p < 0,05$) ve aynı zamanda, düşük doz gruplarıyla yüksek dozda ilaç verilen gruplar arasında istatistik açıdan anlamlı farklılık vardı ($p < 0,05$).

Biyokimyasal incelemede, kontrol ve çalışma gruplarında yer alan sıçanlara ait serum SOD, GSH-Px ve NO değerleri ve karaciğer doku homojenatlarından ölçülen malondialdehit (MDA) seviyelerinin

ortalama±standart sapma değerleri, Tablo 4'te verilmiştir. Düşük dozlarda (5, 10 ve 20 mg/kg) asetaminofen uygulanan sıçanların karaciğer dokusunda lipid peroksidasyon (TBARS=MDA) seviyeleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, arada anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p > 0,05$). Yüksek dozlarda (100, 200 ve 500 mg/kg) ilaç uygulaması yapılan ve Grup-V, Grup-VI ve Grup-VII'de yer alan sıçanların doku MDA seviyelerinde, kontrol grubuna ve düşük dozlarda uygulama yapılan gruplara göre oldukça hafif bir artış olduğu fakat, bu artışın da istatistik açıdan anlamlı olmadığı görüldü ($p > 0,05$) (Tablo 3 ve Şekil 1).

Serum SOD etkinlik değerleri yönünden, çalışma gruplarıyla kontrol grubu arasında bir farklılık yoktu ($p > 0,05$) (Tablo 4 ve Şekil 2). Serum GSH-Px enzim etkinlik seviyeleri ölçüldüğünde ise, bu etkinliğin kontrol grubuna göre diğer çalışma gruplarında giderek azaldığı görüldü ve kontrol grubu ile Grup-VI (200 mg/kg) ve Grup-VII (500 mg/kg) arasında istatistik açıdan anlamlı bir farkın olduğu bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 4 ve Şekil 3). Düşük dozlarda asetaminofen verilen grupların (Grup-II, Grup-III ve Grup-IV) serum NO seviyelerinde hafif bir artış olduğu görüldü fakat, bu artış kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistik açıdan anlamlı değildi ($p > 0,05$). Öte yandan, daha yüksek dozlarda uygulama yapılan Grup-V, Grup-VI ve Grup-VII'deki ortalama serum NO seviyelerinde, kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu görüldü ($p < 0,05$) (Tablo 4 ve Şekil 4).

TARTIŞMA

Nitrik oksidin, bahsedilen toksisite mekanizmasında yer aldığı öne sürülmektedir. Asetaminofen uygulaması sonrasında, uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enziminin etkinliğinde ve serum nitrik oksit seviyelerinde artış meydana geldiği gözlenmiştir.²¹ Daha önce yapılan bazı immünohistokimya çalışmalarında, hepatositlerde iNOS ekspresyonunun olduğu ve bu hücrelerin iNOS için birer kaynak teşkil ettikleri gösterilmiştir. Aynı zamanda, izole edilerek kültür ortamına alınan hepatositlerde NO üretiminin olduğu ve glutasyon gibi dışarıdan kültür ortamına eklenen bazı maddelerle nitrik oksit sentezinde artış olduğu da rapor edilmiştir.²²

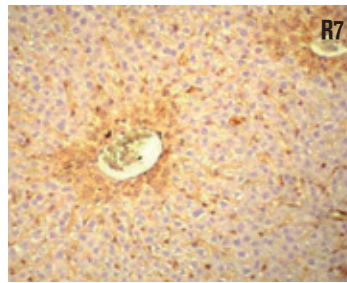
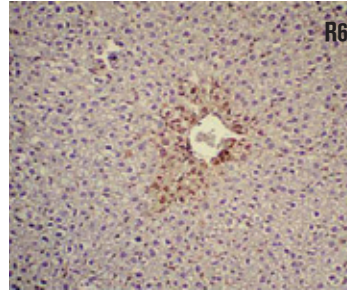
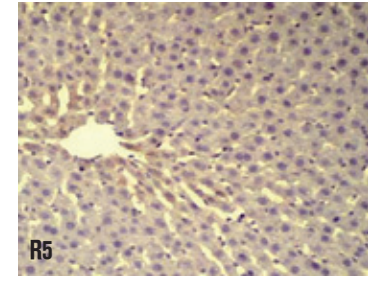
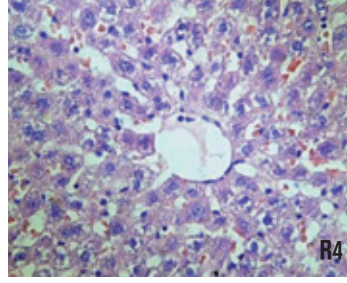
Çalışmamızda, değişik dozlardaki asetaminofen uygulaması sonrasında karaciğerdeki iNOS reseptör dağılımının biyokimyasal parametrelerle ve lipid peroksidasyonu olan bağlantısını incelemeyi amaçladık. Çalışmamızda kullanmış olduğumuz asetaminofen dozlarıyla karaciğer dokusunda meydana gelen değişiklikler arasındaki bağlantıya ilişkin olarak yapmış olduğumuz literatür araştırmasında, düşük dozlarda (5, 10 ve 20 mg/kg) periton içi yoldan verilen aseta→

minofenin karaciğer üzerine olan etkilerini doğrudan veya dolaylı yollardan incelemeyi amaçlayan herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Yapmış olduğumuz çalışmada, bu doz seviyelerinde verilen asetaminofenin karaciğer üzerinde herhangi bir akut toksik etkiye veya yapısal değişikliğe yol açmadığını gözlemledik.

Daha yüksek doz seviyeleri olan 100 ve 200 mg/kg asetaminofenin periton içi yoldan enjeksiyonu söz konusu olduğunda da, bu dozlara ilişkin herhangi bir çalışma bulunamadı. Bununla birlikte, asetaminofenin daha yüksek doz seviyelerindeki uygulamalarına ilişkin çalışmalar mevcuttur. Iwalokun ve arkadaşlarının gerçekleştirmiş oldukları bir çalışmada, yedi gün boyunca 300 mg/gün dozunda uygulanan asetaminofenin kan bilirübin, karaciğer enzimleri, MDA ve demir seviyelerini belirgin şekilde artırdığı bildirilmiştir.²³ Yine Macrides ve arkadaşlarının gerçekleştirmiş oldukları bir diğer çalışmada, periton içi yoldan 250 ve 500 mg/kg dozlarında verilen asetaminofenin karaciğerde akut toksik etkiye yol açtığı ve bunun ardından 250 mg/kg dozunda uygulanan N-asetil sisteinin (NAC), karaciğerdeki akut yapısal ve enzimatik değişiklikleri geriye çevirebildiği ve dolayısıyla koruyucu etkisinin olduğu rapor edilmiştir.²⁴

Biz de, yapmış olduğumuz çalışmada yukarıda adı geçen çalışmalardan elde edilen sonuçlara paralel olarak 100, 200 ve 500 mg/kg dozlarında uyguladığımız asetaminofenin karaciğer dokusunda hepatosit dejenerasyonu, piknotik ve nekroza giden hücreler ve sinüzoidlerde genişleme gibi akut yapısal değişikliklere yol açtığını gözledik. Yaptığımız literatür taramasında, çalışmamızda kullanmış olduğumuz doz seviyelerinde periton içi yoldan uygulanan asetaminofenin karaciğerdeki iNOS reseptörleri üzerine olan etkilerini immünohistokimyasal yönden karşılaştırmalı olarak veya her bir dozu ayrı ayrı inceleyen bir çalışmaya rastlamadık.

Bu sahada yapılan benzeri bir çalışmada, Gardner ve arkadaşları 1 g/kg parasetamol enjekte edilen sıçanların karaciğer dokusundaki iNOS reseptörlerinde kontrol grubuna göre belirgin bir artışın olduğunu tespit etmişlerdir.²⁵ Yapmış olduğumuz çalışmada, düşük dozlarda (5, 10 ve 20 mg/kg) ilaç uygulaması yapılan sıçanların karaciğer dokularındaki iNOS reseptörlerinin immünohistokimyasal yöntemle boyanması sonucu ortaya çıkan dağılımın hafif olduğunu tespit ettik. Bunun yanında, daha yüksek dozlarda (100, 200 ve 500 mg/kg) asetaminofen uygulaması yapılan ve Grup-V, Grup-VI ve Grup-VII'de yer alan sıçanların karaciğer dokusundaki iNOS reseptör yoğunluklarında ise istatistik açıdan belirgin bir artışın meydana geldiğini bulduk.



Resim 4. Grup-IV'e ait karaciğer dokusu (Hematoksilen-Eozin, x40).

Resim 5. Grup-V'e ait karaciğer dokusu. Mononükleer hücre infiltrasyonu (yıldız), piknotik ve hiperkromatik çekirdek (ince oklar), hepatositlerde granüler ve vakuoler dejenerasyonlar (kalın oklar) (Hematoksilen-Eozin, x40).

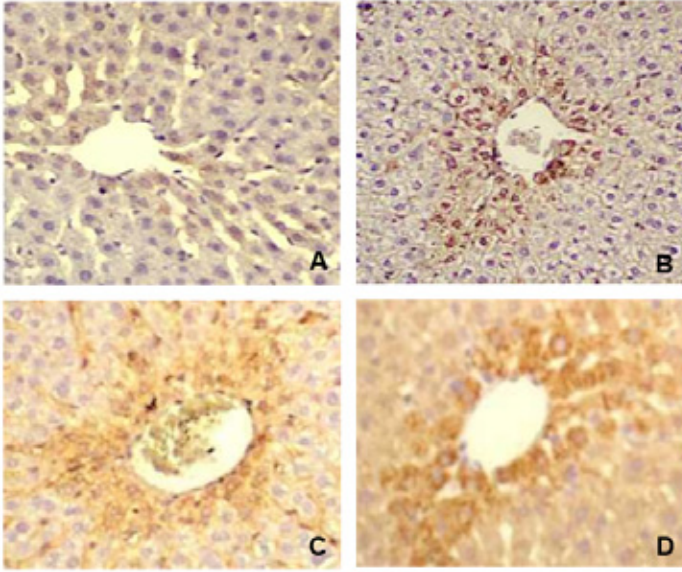
Resim 6. Grup-VI'ya ait karaciğer dokusu. İnce oklar: piknotik çekirdekli hücreler, kalın oklar: hepatosit dejenerasyonu, S: sinüzoidal dilatasyon (Hematoksilen-Eozin, x40)

Resim 7. Grup-VII'ye ait karaciğer dokusu. Yıldız: sinüzoidal genişleme, ince oklar: granüler ve vakuoler dejenerasyonlar, kalın oklar: hiperkromatik ve piknotik çekirdekli hücreler (Hematoksilen-Eozin, x40).

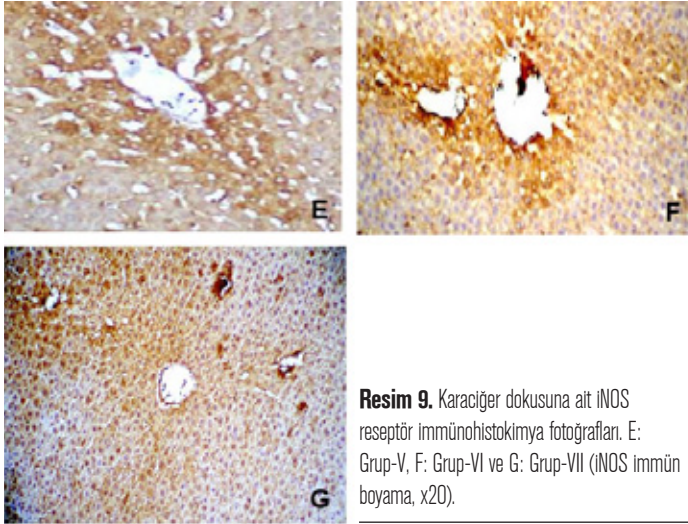
Oksidatif hasarlanmanın, asetaminofen toksisitesi için katkı sağlayıcı bir mekanizma olduğu düşünülmüştür.²⁶ Yaptığımız literatür araştırmasında 5, 10 ve 20 mg/kg dozlarında asetaminofen enjeksiyonu sonrasında SOD veya GSH-Px seviyelerindeki değişime ilişkin olarak halihazırda herhangi bir bilgi bulamadık. Yapmış olduğumuz çalışmada Grup-II, III ve IV ile kontrol grubu arasında bu enzimlerin etkinlik seviyeleri yönüyle istatistik açıdan herhangi bir farklılık olmadığını bulduk. Lores ve arkadaşları, 375 mg/kg dozundaki asetaminofen uygulaması sonrasında SOD'un etkinliğinde herhangi bir değişikliğin olmadığını, buna karşılık olarak GSH-Px enziminin etkinliğinde %40-53'lük bir azalmanın olduğunu tespit etmişlerdir.²⁷ Mirochnitchenko ve arkadaşlarının antioksidan enzimleri fazla oranlarda üreten transgenik hayvanlar üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada, SOD ve GSH-Px enzimlerini aşırı şekilde üreten hayvanların asetaminofen toksisitesine karşı oldukça belirgin bir direnç gösterdikleri ifade edilmiştir.²⁸

Mevcut çalışmamızda Grup-V, Grup-VI ve Grup-VII'de yer alan sıçanların serum glutatyon peroksidaz seviyelerinde, kontrol grubuna ve düşük dozda uygulama yapılan diğer gruplara göre istatistik açıdan anlamlı bir azalmanın olduğunu tespit ettik. Buna karşılık, söz konusu gruplardaki SOD enzim etkinlik seviyelerini kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda, anlamlı herhangi bir değişiklik gözlemedik. →

**DEĞİŞİK DOZLARDAKİ
ASETAMİNOFENİN KARACİĞER
NİTRİK OKSİT SENTAZ ENZİMİ
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL
VE BİYOKİMYASAL
YÖNTEMLER KULLANILARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**



Resim 8. Karaciğer dokusuna ait iNOS reseptör immünohistokimya fotoğrafları. A: Kontrol Grubu, B: Grup-II, C: Grup-III ve D: Grup-IV (iNOS immün boyama, x20).



Resim 9. Karaciğer dokusuna ait iNOS reseptör immünohistokimya fotoğrafları. E: Grup-V, F: Grup-VI ve G: Grup-VII (iNOS immün boyama, x20).

Şener ve arkadaşları, 900 mg/kg dozundaki asetaminofen uygulaması sonrasında glutasyon seviyelerinde azalmanın yanı sıra, MDA seviyelerinde artış meydana geldiğini rapor etmişlerdir.²⁹ Diğer yandan, akut asetaminofen toksisitesinde lipid peroksidasyonunun tartışmalı bir konu olduğu bildirilmiştir.³⁰ Yapmış olduğumuz çalışmada, sıçanların karaciğer dokularından ölçülen MDA seviyelerinde doza bağımlı olarak

çok hafif bir artışın olduğunu fakat, gruplar arasında bu yönden herhangi bir farklılık olmadığını bulduk. Benzer şekilde, Knight ve arkadaşları 300 mg/kg dozundaki asetaminofenin karaciğer dokusundaki MDA seviyelerinde herhangi bir değişikliğe yol açmadığını rapor etmişlerdir.³¹ NO üretimini uyaran V-PYRRO/NO ve interlökin-1 gibi bazı maddelerin asetaminofen maruziyetine paralel olarak kullanılmasının, lipid peroksidasyonunda önemli azalmalara yol açtığını rapor eden bazı çalışmalar vardır.³²

Asetaminofen uygulaması sonrasında NO üretiminin arttığı ve iNOS yönünden eksikliği olan (knockout) farelerde NO üretiminin artmadığı, ayrıca bu tür farelerde lipid peroksidasyonunun görüldüğü rapor edilmiştir.³³ Taylor ve arkadaşları, özgün olmayan NOS engelleyicisi ajanların kemirgen endotoksemi modelinde karaciğer hasarlanmasını belirgin bir şekilde artırdığını ve NO'nun platelet adezyonunu önlemesinin yanı sıra, toksik oksijen radikallerini nötralize edici etkisinin olduğunu da bildirmişlerdir.³⁴

Literatür araştırmasında, serum NO seviyelerini çalışmamızda kullandığımız dozlardaki ilaç uygulamalarını kapsayacak şekilde karşılaştıran veya bu dozların tek tek ele alındığı bir araştırmaya rastlamadık. Biz, yapmış olduğumuz çalışmada düşük dozlarda asetaminofen verilen Grup-II, Grup-III ve Grup-IV'te yer alan sıçanların serum NO seviyelerinde kontrol grubuyla karşılaştırıldıkları zaman belirgin bir artış olmadığını, Grup-V, Grup-VI ve Grup-VII'de yer alan sıçanların serum nitrik oksit seviyelerindeyse, kontrol grubuna ve düşük dozda ilaç alan gruplara göre anlamlı bir artış olduğunu bulduk.

SONUÇ

Bu çalışmanın sonucu olarak, asetaminofenin karaciğer üzerinde doza bağlı olarak yol açtığı yapısal değişikliklere ve glutasyon üzerindeki azaltıcı etkisine ek olarak karaciğer dokusunda uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) etkinliğini artırdığını, artan iNOS etkinliğinin, bir yandan NO üretiminde artış sağlama yoluyla lipid peroksidasyonu reaksiyonlarını önemli ölçüde engellerken, diğer yandan doz artımına paralel olarak zararlı etki gösterebileceği sonucuna ulaştık.

İ	İLETİŞİM İÇİN: Dr. Ahmet Koçak, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Isparta dr.ahmet@gmail.com
✓	GÖNDERİLDİĞİ TARİH: 21 / 08 / 2009 • KABUL TARİHİ: 11 / 08 / 2010

KAYNAKLAR

1. Eren M, Saltık-Temizel İN, Koçak N. İlaça bağlı hepatotoksite. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2004; 47: 222-227.
2. Bonkovsky HL, Kane RE, Jones DP, Galinsky RE, Banner B. Acute hepatic and renal toxicity from low doses of acetaminophen in

the absence of alcohol abuse or malnutrition: evidence for increased susceptibility to drug toxicity due to cardiopulmonary and renal insufficiency. Hepatology 1994; 19: 1141-1148.

3. Larson AM, Polson J, Fontana RJ, et al. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. Hepatology 2005; 42: 1364-1372.

4. Gallanosa AG, Spyker DA. Sulindac hepatotoxicity: a case report and review. *J Toxicol Clin Toxicol* 1995; 23: 205-238.
5. Davidson DGD, Eastham WN. Acute liver necrosis following overdose of paracetamol. *Br Med J* 1966; 2: 497-499.
6. Black M. Acetaminophen Hepatotoxicity. *Ann Rev Med* 1984; 35: 577-593.
7. Zimmerman HJ. Classification of hepatotoxins and mechanisms of toxicity. In *Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and Other Chemicals on the Liver*. New York: Appleton-Century-Crofts 1978; 91-121.
8. Gibson JD, Pumford NR, Samokyszyn VM, Hinson JA. Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: covalent binding versus oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 1996; 9: 580-585.
9. Goldfrank R. *Toxicologic Emergencies: Chapter-15. 4th International Edition*. East Norwalk: Appleton and Lange 1990; 183-85: 251-257.
10. Prescott LF. *Effect of non-narcotic analgesics on the liver*. University Department of Clinical Pharmacology. Edinburg: The Royal Infirmary 1986; 138-142.
11. Wallace JL. Acetaminophen hepatotoxicity: NO to the rescue. *Br J Pharm* 2004; 143: 1-2.
12. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012.
13. Laskin DL, Rodriguez del Valle M, Heck DE, et al. Hepatic nitric oxide production following acute endotoxemia in rats is mediated by increased nitric oxide synthase gene expression. *Hepatology* 1995; 22: 223-234.
14. Hodgson PD, Renton KW. The role of nitric oxide generation in interferon- γ -evoked cytochrome P450 down-regulation. *Int J Immunopharmacol* 1995; 17: 995-1000.
15. Nussler AK, Beger H-G, Liu ZZ, Billiar TR. Nitric oxide, hepatocytes and inflammation. *Res Immunol* 1995; 146: 671-677.
16. Shinagawa T, Yoshioka K, Kakumu S, et al. Apoptosis in cultured rat hepatocytes: the effects of tumour necrosis factor- α and interferon- γ . *J Pathol* 1991; 165: 247-253.
17. Laskin JD, Heck DE, Gardner CR, Laskin DL. Prooxidant and antioxidant functions of nitric oxide in liver toxicity. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3: 261-271.
18. Wink DA, Miranda KM, Espey MC, Pluta RM, Hewett SJ, et al. Mechanism of the antioxidant effects of nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3: 203-213.
19. Rahman MA, Dhar DK, Yamaguchi E, et al. Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of COX-2 in the angiogenesis of hepatitis C virus-positive cases. *Clin Cancer Res*. 2001; 7: 1325-1332.
20. Abdel-Wahhab MA, Nada SA, Arbid MS. Ochratoxicosis: Prevention of developmental toxicity by L-methionine in rats m. *Journal of applied toxicology. J Appl Toxicol* 1999; 19: 7-12.
21. Hinson JA, Pike SL, Pumford NR, Mayeux PR. Nitrotyrosine-Protein Adducts in Hepatic Centrilobular Areas following Toxic Doses of Acetaminophen in Mice. *Chem Res Toxicol* 1998; 11: 604-607.
22. Harbrecht BG, Di Silvio M, Chough V, et al. Glutathione regulates nitric oxide synthase in cultured hepatocytes. *Ann Surg* 1997; 225: 76-87.
23. Iwalokun BA, Efedede BU, Alabi-Sofunde JA, et al. Hepato protective and antioxidant activities of *Vernonia amygdalina* on acetaminophen-induced hepatic damage in mice. *J Med Food* 2006; 9: 524-530.
24. Macrides TA, Naylor LM, Kalafatis N, Shihata A, Wright PF. Hepatoprotective effects of the shark bile salt 5 β -scymnol on acetaminophen-induced liver damage in mice. *Fundam Appl Toxicol* 1996; 33: 31-37.
25. Gardner CR, Heck DE, Yang CS, et al. Role of nitric oxide in acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *Hepatology* 1998; 27: 748-754.
26. Cohen SD, Hoivik DJ and Khairallah EA. *Acetaminophen-induced hepatotoxicity in: Toxicology of the Liver*. Philadelphia: Taylor & Francis 1998; 159-186.
27. Lores Arnaiz S, Llesuy S, Cutrín JC, Boveris A. Oxidative stress by acute acetaminophen administration in mouse liver. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 303-310.
28. Mirochnitchenko O, Weisbrot-Lefkowitz M, Reuhl K, et al. Acetaminophen toxicity. Opposite effects of two forms of glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1999; 274: 10349-10355.
29. Sener G, Toklu HZ, Sehirli AQ, et al. Protective effects of resveratrol against acetaminophen-induced toxicity in mice. *Hepatol Res* 2006; 35: 62-68.
30. Wendel A, Feuerstein S, Konz KH. Acute paracetamol intoxication of starved mice leads to lipid peroxidation in vivo. *Biochem Pharmacol* 1979; 28: 2051-2055.
31. Knight TR, Fariss MW, Farhood A, Jaeschke H. Role of lipid peroxidation as a mechanism of liver injury after acetaminophen overdose in mice. *Toxicol Sci* 2003; 76: 229-236.
32. Liu J, Li C, Waalkes MP, et al. The nitric oxide donor, V-PYRRO/NO, protects against acetaminophen-induced hepato toxicity in mice. *Hepatology* 2003; 37: 324-333.
33. Michael SL, Mayeux PR, Bucci TJ, et al. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice lacking inducible nitric oxide synthase activity. *Nitric Oxide* 2001; 5: 432-441.
34. Taylor BS, Alarcon LH, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function. *Biochemistry (Mosc)* 1998; 63: 766-781.