TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLNUPİRAVİRİN OLASI HEPATOTOKSİSİTESİNİN *İN VİTRO* ARAŞTIRILMASI

MÜZEYYEN TUĞÇE KARAKAŞ DEMİR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ TUĞÇE YEŞİL EKİCİ
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL- 2025

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLNUPİRAVİRİN OLASI HEPATOTOKSİSİTESİNİN *İN VİTRO* ARAŞTIRILMASI

MÜZEYYEN TUĞÇE KARAKAŞ DEMİR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ TUĞÇE YEŞİL EKİCİ
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL- 2025

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Müzeyyen Tuğçe Karakaş Demir

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve hazırlamış olduğum tez sürecimde değerli zamanını bana ayıran, zor durumlarda anlayışını ve yardımlarını esirgemeyen, özverili bir şekilde bilgi ve deneyimini paylaşarak bana yol gösteren değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe Yeşil Ekici'ye;

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren ve emeği çok büyük olan başta M.Ü. Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç.Dr. Seher Karslı, Dr. Öğr. Üyesi Ayfer Beceren ve Araş. Gör. Sena Ergun'a ve yüksek lisans dönem arkadaşım Merve Yardımcı'ya; bu çalışmada akış sitometri değerlendirmesinde yönlendirilmeleri için Dr. Tamer Kahraman'a;

Hayatımda yer bulmuş ve bugünlere ulaşmamda katkıda bulunmuş tüm arkadaşlarıma ve sevdiklerime;

Tüm hayatım boyunca her türlü destekleriyle yanımda olan sevgili babam Mustafa Kemal Karakaş, annem Tülay Karakaş ve kardeşim Begüm Karakaş'a;

Lisansüstü eğitimimi tamamlamamda motivasyon kaynağım ve en büyük destekçilerim biricik kızım Defne Demir ve sevgili eşim Murat Demir'e;

en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, bu çalışmayı (Proje No: 124S178) destekleyen, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR LİSTESİ.....i
TABLO LİSTESİ.....iv
ŞEKİL LİSTESİ.....v
1. ÖZET.....1
2. SUMMARY.....2
3. GİRİŞ ve AMAÇ.....3
4. GENEL BİLGİLER.....5
4.1. COVID-19..... 5
4.1.1. COVID-19 tedavisi.....10
4.2. Molnupiravir.....13
4.2.1. Farmakodinamiği.....16
4.2.2. Farmakokinetiği.....19
4.2.3.Molnupiravirin advers etkileri ve toksisitesi.....20
4.3. Karaciğer Hasarı.....27
4.3.1. Apoptoz, nekroz, serbest radikaller ve biyokimyasal parametreler.....27
4.3.2. COVID-19 ve karaciğer hasarı.....38
4.3.3. İlaca bağlı karaciğer hasarı (DILI).....43
4.3.3.1. Molnupiravir çalışmalarında karaciğer ile ilgili raporlanan bulgular.....48
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....53
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler.....53
5.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar.....54
5.3. Kullanılan Sarf Malzemeler.....54
5.4. Hücre Kültürü Çalışmaları.....55
5.5. Hücre Canlılığı Analizi ve Dozların Belirlenmesi.....56
5.5.1. MTT testi.....56
5.6. Reaktif Oksijen Türlerinin Ölçülmesi.....58
5.7.1. DCF testi.....58
5.8. Biyokimyasal Analiz.....60
5.8.1. AST ve ALT ölçümü.....60
5.8.2. Bilirubin ölçümü.....62
5.8.3. Üre ölçümü.....63
5.8. Apoptoz Ölçümü.....64
5.9. İstatistiksel Değerlendirme.....66

6. BULGULAR.....67
6.1. Sitotoksisite Bulguları.....67
6.2. Oksidatif Hasar Bulguları.....68
6.3. Biyokimyasal Analiz Bulguları.....70
6.4. Apoptoz Bulguları.....73
7. TARTIŞMA ve SONUÇ.....76
8. KAYNAKLAR.....81
9. BİLİMSEL FAALİYETLER.....89

KISALTMALAR LİSTESİ

μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ALT	Alanin aminotransferaz
APAP	Asetaminofen (parasetamol)
AST	Aspartat aminotransferaz
cm	Santimetre
C_{maks}	Zirve konsantrasyon
CO_2	Karbondioksit
COVID-19	Coronavirüs Hastalığı 2019
CYP450	Sitokrom P450
DCF	Diklorofluoressein
DCFDA	2'7'-diklorofluoresin diasetat
DCFH2	Dihidroklorofluoressein
DCFH2 –DA	Dihidroklorofluoressein diasetat
dk	Dakika
DILI	Drug-Induced Liver Injury-İlaca bağlı karaciğer hasarı
DMEM	Dulbecco'nun modifiye edilmiş besiyeri
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ (WHO)	Dünya Sağlık Örgütü
EAA	Eğri altında kalan alan

ELISA	Enzime bağlı immunosorbent assay
EUA	Acil Kullanım İzni
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
EMEM	Eagle’s Minimum Essential Medium
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	ABD Gıda ve İlaç İdaresi
FFA	Karaciğerdeki Yağ Asidi
FITC	Floresan izotiyosiyanat
g	Gram
GGT	Gama glutamil transferaz
HepG2	İnsan Hepatosellüler Karsinoma Hücreleri
IC_{50}	Hücrelerin %50’sinin öldüğü inhibisyon konsantrasyonu
IL	İnterlökin
L	Litre
MERS	Orta Doğu Solunum Sendromu
MHRA	UK Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency - Birleşik Krallık Sağlık Otoritesi
mg	Miligram
mL	Mililitre
MTT	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür
ng	Nanogram
NHC	Beta-D-N4-hidroksisitidin
NÜS	Normalin üst sınırı
OATP	Organik Anyon Taşıyan Polipeptit

PBS	Fosfat tamponu çözeltisi
PCR	Polymerase Chain Reaction- Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PLP	Fosfolipit
RNA	Ribonükleik asit
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SARS	Şiddetli Akut Solunum Sendromu
TBHP	Tert-butil hidroperoksid
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
UK	Birleşik Krallık
VLDL	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler

TABLO LİSTESİ

Sayfa Numarası

Tablo 1. DSÖ 14 Nisan 2024 tarihli verilerine göre en çok COVID-19 olgusu olan 20 ülke 6

Tablo 2. DSÖ 14 Nisan 2024 tarihli verilerine göre en çok COVID-19 kaynaklı ölüm olgusu olan 20 ülke.....7

Tablo 3. DSÖ 31 Mart 2024 tarihli verilerine göre yeni bildirilen ve toplam COVID-19 olguları ve ölümleri 7

Tablo 4. Türkiye'de COVID-19 verileri.....8

Tablo 5. Molnupiravir uluslararası ruhsatlandırma durumu.....14

Tablo 6. MOVe-OUT çalışması birincil son nokta sonuçları.....18

Tablo 7. Molnupiravirin farmakokinetik parametreleri.....19

Tablo 8. Kısa ürün bilgisinde yer alan advers reaksiyonların listesi.....20

Tablo 9. DSÖ - Molnupiravir advers reaksiyon sayıları.....21

Tablo 10. DSÖ - Molnupiravir karaciğer ile ilgili advers reaksiyon sayıları.....22

Tablo 11. Apoptoz ve nekroz farkları.....31

Tablo 12. Serbest radikal türleri.....32

Tablo 13. Serbest radikal kaynakları.....33

Tablo 14. Serbest radikallerin zararları.....34

Tablo 15. Hepatobiliyer hastalıklarda temel serum değerleri.....35

Tablo 16. Karaciğer enzim düzeylerindeki yüksekliğe göre derecelendirme.....36

Tablo 17. De Ritis oranına göre bazı hastalıkların değerlendirilmesi.....37

Tablo 18. Aminotransferaz yüksekliği seyir hızlarına göre hastalıklar.....38

Tablo 19. HepG2 hücre dizisinde ölçülen AST, ALT, bilirubin ve üre seviyeleri.....73

Tablo 20. Molnupiravir uygulanan hücrelerde canlı/apoptotik/nekrotik hücre oranı.....75

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa Numarası

Şekil 1. DSÖ 10 Kasım 2023 Tedavi Rehberine göre kabul edilen güçlü tavsiyeler.....11

Şekil 2. DSÖ 10 Kasım 2023 Tedavi Rehberine göre karşıt güçlü tavsiyeler.....……11

Şekil 3. DSÖ 10 Kasım 2023 Tedavi Rehberine göre kabul edilen ve karşıt zayıf veya koşullu tavsiyeler …….…….....12

Şekil 4. EIDD-2801, EIDD-1931 ve EIDD-1931-5'-trifosfat Kimyasal Yapısı…….……13

Şekil 5. DSÖ - Molnupiravir ilgili advers reaksiyon sayılarının cinsiyetlere göre dağılımı.....…….……23

Şekil 6. DSÖ - Molnupiravir ilgili advers reaksiyon sayılarının yaş gruplarına göre dağılımı.....…….……23

Şekil 7. DSÖ - Molnupiravir ilgili advers reaksiyon sayılarının kıtalara göre dağılımı.....…….……24

Şekil 8. DSÖ - Molnupiravir ilgili advers reaksiyon sayılarının yıllara göre dağılımı.....…….……24

Şekil 9. Apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yolaklarının başlıca bileşenlerinin özeti….....29

Şekil 10. Normal bir hücrenin nekrotik hücreye dönüşümünün özeti.....30

Şekil 11. Karaciğer enzimlerinin hastalıklardaki düzeyleri.....37

Şekil 12. SARS-CoV-2 karaciğer enfeksiyonunun patofizyolojik kavramları…….....39

Şekil 13. Otoimmun benzeri DILI mekanizması…….....45

Şekil 14. İlaç kaynaklı steatoz mekanizması…….....46

Şekil 15. İlaç kaynaklı fosfolipidoz mekanizması…….....47

Şekil 16. İlaç kaynaklı kolestaz mekanizması…….....48

Şekil 17. MTT'nin formazana dönüşmesi…….....57

Şekil 18. MTT mekanizması…….....58

Şekil 19. DCF testi mekanizması.....59

Şekil 20. AST ve ALT kitleri çalışma prensibi…….....61

Şekil 21. Anneksin V'nin hücre membranındaki fosfatidilserin ile bağlanma mekanizması…….....65

Şekil 22. HepG2 hücre dizisinin mikrosobik görüntüsü.....67

Şekil 23. Molnupiravirin HepG2 hücre dizisinde sitotoksik etkisinin MTT testi sonucu.....68

Şekil 24. Molnupiravirin HepG2 hücre dizisinde 24 saatlik maruziyet sonrası floresan yoğunluğu ölçümü.....69

Şekil 25. Molnupiravirin HepG2 hücre dizisinde 4 saatlik maruziyet sonrası floresan yoğunluğu ölçümü.....69

Şekil 26. HepG2 hücre süpernatantında AST seviyeleri değerlendirilmesi.....70

Şekil 27. HepG2 hücre ekstraktında AST seviyeleri değerlendirilmesi.....70

Şekil 28. HepG2 hücre süpernatantında ALT seviyeleri değerlendirilmesi.....71

Şekil 29. HepG2 hücre ekstraktında ALT seviyeleri değerlendirilmesi.....71

Şekil 30. HepG2 hücre dizisinde billirubin seviyeleri değerlendirilmesi.....72

Şekil 31. HepG2 hücre dizisinde üre seviyeleri değerlendirilmesi.....72

Şekil 32. HepG2 hücre dizisinde molnupiravirin akış sitometrik analizi.....74

1. ÖZET

Tezin başlığı : Molnupiravirin Olası Hepatotoksisitesinin *İn Vitro* Araştırılması
Öğrencinin Adı Soyadı : Müzeyyen Tuğçe Karakaş Demir
Danışmanın Adı Soyadı : Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe Yeşil Ekici
Programın Adı : Farmasötik Toksikoloji Yüksek Lisans Programı

Amaç: Viral enfeksiyonlarda; karaciğer hasarı, önemli komplikasyonlardan biri olduğundan tedavi ilacına bağlı olup olmadığının kapsamlı değerlendirilmesi önemlidir. Molnupiravir, COVID-19 tedavisinde ilk oral antiviral olarak, ülkemiz dahil birçok Sağlık Otoritesinin tedavi şemasında yer almaktadır. Bazı klinik araştırmalarda mevcut hepatik advers olaylar sebebiyle toksisite şüphesinin yer aldığı görülmektedir. Bu yüksek lisans tez çalışmasının amacı, molnupiravirin hepatotoksisitesinin *in vitro* değerlendirilerek, ilaca bağlı karaciğer hasarına neden olma potansiyelinin aydınlatılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: İnsan karaciğer hücre dizisinde (HepG2) uygulanacak dozların belirlenmesi için MTT testi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerinin belirlenmesi için DCF testi, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), üre ve bilirubin biyokimyasal göstergelerinin ölçümü ve apoptotik/nekrotik hücre ölümü değerlendirmesi için Anneksin testi yapılmıştır.

Bulgular: HepG2 hücre dizisinde MTT testi sonucu molnupiravirin IC_{50} değeri 93,27 µg/mL olarak C_{max} değerinin 30 katı bulunmuştur. Çalışmada ilaç konsantrasyonu 10 µg/mL ve 30 µg/mL (C_{max} değerinin sırasıyla 3 ve 10 katı) uygulanmıştır. DCF testi sonucu; molnupiravirin 10 µg/mL ve 30 µg/mL konsantrasyonlarında 24 ve 4 saatlik maruziyetlerde ROS seviyelerinde kontrole kıyasla azalma görülmüştür, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Bilirubin seviyeleri ve hem süpernatantta hem hücre ekstraktında ölçülen AST ve ALT değerleri her iki konsantrasyonda kontrole kıyasla artış göstermekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). 24 saatlik molnupiravir uygulamasının her iki konsantrasyonunda geç apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonu kontrol grubuna oranla artmış ancak istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Sonuç: Molnupiravirin tek sefer 24 saat uygulanmasında karaciğer hasarı ile ilgili parametrelerdeki istatistiksel olmayan artış, karaciğer hasarı açısından potansiyelinin gözardı edilmemesi gerektiğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Molnupiravir, COVID-19, hepatotoksisite, ilaca bağlı karaciğer hasarı

2. SUMMARY

Title of Thesis: *In Vitro* Assessment of Possible Hepatotoxicity of Molnupiravir
Student Name, Surname: Müzeyyen Tuğçe Karakaş Demir
Supervisor Name : Assist.Prof.Dr. Tuğçe Yeşil Ekici
Program Name : Pharmaceutical Toxicology Master Program

Objective: Since liver injury is one of the important complications in viral infections, it is important to comprehensively evaluate whether it is related to the treatment drug. Molnupiravir is included in the treatment scheme of many Health Authorities, including our country, as the first oral antiviral in the treatment of COVID-19. It is seen that there is a suspicion of toxicity due to existing hepatic adverse events in some clinical studies. The aim of this master's thesis study is to evaluate the hepatotoxicity of molnupiravir *in vitro* and to elucidate its potential to cause drug-induced liver injury.

Materials and Methods: MTT test to determine the doses to be applied, DCF test to determine reactive oxygen species (ROS) levels, measurement of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), urea and bilirubin biochemical indicators and Annexin test to evaluate apoptotic/necrotic cell death were performed in human liver cell line (HepG2).

Results: As a result of the MTT test in HepG2 cell line, the IC_{50} value of molnupiravir was found to be 93.27 µg/mL, which is 30 times the Cmax value. In the study, drug concentrations of 10 µg/mL and 30 µg/mL (3 and 10 times the Cmax value, respectively) were applied. As a result of the DCF test; ROS levels decreased compared to control at 10 µg/mL and 30 µg/mL molnupiravir concentrations for 24 and 4 hours of exposure, but it was not found to be statistically significant ($p>0.05$). Bilirubin levels and AST and ALT values measured in both supernatant and cell extract increased compared to control at both concentrations, but it was not found to be statistically significant ($p>0.05$). Late apoptotic and necrotic cell population increased compared to control group at both concentrations of 24-hour molnupiravir administration, but it was not found to be statistically significant ($p>0.05$).

Conclusion: The non-statistical increase in liver injury-related parameters following a single 24-hour administration of molnupiravir suggests that its potential for liver injury should not be ignored.

Keywords: Molnupiravir, COVID-19, hepatotoxicity, drug-induced liver injury

3. GİRİŞ ve AMAÇ

İlaca bağlı karaciğer hasarı (DILI) en sık rapor edilen ilaç toksisitelerinden biridir ve ilaçların geri çekilmesinin başlıca nedenlerindendir. Semptomatik SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında serum aminotransferaz ve bilirubin yükselmesi yaygındır, özellikle ciddi hastalığı olan hastaların %70'inde gözlenmekte ve erkek cinsiyet, ileri yaş, daha yüksek vücut kitle indeksi ve diyabet gibi Coronavirüs Hastalığı 2019 (COVID-19) şiddeti için bilinen risk faktörlerine sahip olanlarda daha sık görülmektedir. Viral enfeksiyonlarda; özellikle de COVID-19'un seyrinde hastalığa bağlı karaciğer hasarı, viral enfeksiyonun önemli komplikasyonlarından biri olduğundan karaciğer hasarının tedavide kullanılan ilaca bağlı olup olmadığının kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi önemlidir. Aday ilaçları COVID-19 hastalarında test etmek için yapılan klinik araştırmalarda, farklı derecelerde bir dizi hepatik/safra advers olayı bildirilmektedir, ancak çalışma ilacı ile nedensellik ilişkisi her zaman net değildir (Casalini ve ark., 2022).

Molnupiravir, nazofaringeal SARS-CoV-2 enfeksiyöz virüsünü ve viral RNA'yı azaltmada oldukça etkili ilk oral, doğrudan etkili antiviraldir ve yüksek komplikasyon riski taşıyan COVID-19 enfeksiyonlu hastaneye yatırılmamış yetişkinlerin tedavisi için bu ilaca Aralık 2021'de Acil Kullanım İzni (EUA) verilmiştir. Başta Dünya Sağlık Örgütü olmak üzere, ülkemiz de dahil birçok Sağlık Otoritesinin tedavi şemasında yer almaktadır (National Library of Medicines, 2022).

Molnupiravir için klinik deneyim sınırlıdır ve literatürde *in vitro* hepatotoksisite değerlendirilmesinin yapıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Molnupiravirin güvenlilik profilindeki tüm yolakların aydınlatılamadığı ve bazı klinik araştırma çalışmalarında mevcut hepatik advers olaylar sebebiyle toksisite şüphesinin yer aldığı görülmektedir (National Library of Medicines, 2022).

Bu bağlamda; bu yüksek lisans tez çalışmasında molnupiravirin, literatürde *in vitro* hepatotoksisite değerlendirmesi için etkinliği gösterilmiş olan insan karaciğer hücre modeli ile hepatotoksisitesinin değerlendirilmesi ve ilaca bağlı karaciğer hasarına neden olma potansiyelinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

Bu amaca uygun olarak aşağıdaki basamaklarda açıklanan sonlanım noktalarının değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

- İnsan karaciğer hücre dizisinin protokole uygun şekilde ve koşullarda hazırlanması ve molnupiravir uygulanması
- Olası hepatik hasarda oksidatif stresin rolünün aydınlatılmasına yönelik olarak insan karaciğer hücre dizisine molnupravir uygulamasının ardından reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerinin değerlendirilmesi
- Molnupiravirin insan karaciğer hücre dizisine uygulanacak dozlarının belirlenmesi
- İnsan karaciğer hücre dizisine molnupiravir uygulamasının ardından hepatik hasarın biyokimyasal göstergeleri olarak aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), üre ve bilirubin seviyelerinin ölçülmesi
- Molnupiravirin insan karaciğer hücre dizisine apoptik/nekrotik hücre ölümü üzerine etkisinin değerlendirilmesi

Bahsedilen değerlendirmenin yapılması ile molnupiravirin klinik araştırmalarda bildirilen ancak nedensellik kurulması açısından yeterli verinin olmadığı olası hepatotoksik etkisi *in vitro* koşullarda farklı sonlanımlar için araştırılmıştır.

Molnupiravir için kapsamlı güvenlilik değerlendirmesi bulunmadığından, çalışma sonucu elde edilecek verilerle; molnupiravirin COVID-19 tedavisi sırasında daha güvenli kullanımı için halk sağlığına, farmakovijilans sistemine ve farmakoekonomiye katkı sağlanması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1.COVID-19

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Çin Ülke Ofisi 31 Aralık 2019'da, Çin'in Hubei Eyaleti, Wuhan şehrinde etiyolojisi bilinmeyen (nedeni bilinmeyen) pnömoni olguları konusunda bilgilendirilmiştir. 31 Aralık 2019'dan 3 Ocak 2020'ye kadar, etiyolojisi bilinmeyen pnömonili toplam 44 olgu, Çin'deki ulusal yetkililer tarafından DSÖ'ye bildirilmiştir ve bu dönemde nedensel kaynak belirlenememiştir. Çinli yetkililer ilk olarak 7 Ocak 2020'de, izole edilen yeni bir tip koronavirüs tespit etmiştir ve 12 Ocak 2020'de Çin tarafından, ülkeler için spesifik teşhis kitlerinin geliştirilmesinde kullanılmak üzere yeni koronavirüsün (2019-nCoV) genetik dizisi paylaşılmıştır. 20 Ocak 2020 itibariyle, Çin (278 olgu), Tayland (2 olgu), Japonya (1 olgu) ve Kore (1 olgu) dahil olmak üzere dört ülkeden 282 doğrulanmış 2019-nCoV olgusu rapor edilmiştir; Çin-Wuhan Şehrinden 6 ölüm bildirilmiştir (WHO, 2020).

DSÖ, COVID-19 salgınını 2020 yılı 30 Ocak'ta "uluslararası boyutta halk sağlığı acil durumu" olarak sınıflandırmış, ilk salgının başladığı Çin dışında 113 ülkede COVID-19 olgularının görülmesi, virüsün yayılımı ve şiddeti nedeniyle 11 Mart'ta küresel salgın (pandemi) olarak tanımlamıştır. 2019-nCoV hastalığının adı COVID-19 olarak kabul edilmiş, virüs SARS CoV'e yakın benzerliğinden dolayı SARS-CoV-2 olarak isimlendirilmiştir (TC Sağlık Bakanlığı, 2020).

DSÖ, 2020'den beri ülkelerden aldığı verileri günlük olarak "COVID_19 Gösterge Tablosunda" yayınlamaktadır ve Tablo 1 ve Tablo 2'de gösterilmiştir. Ayrıca, DSÖ, haftalık ve aylık olarak COVID-19 Epidemiyoloji Raporlarını yayınlamaktadır. 12 Nisan 2024 tarihli COVID-19 Epidemiyoloji Raporları'na göre; küresel olarak, 4 - 31 Mart 2024 arasındaki 28 günlük dönemde 98 ülke COVID-19 olgusu bildirmiş ve 39 ülke COVID-19'dan ölüm bildirmiştir. Birçok ülkenin raporlama sıklığını durdurması veya değiştirmesi sebebiyle, olguların veya ölümlerin meydana geldiği gerçek ülke sayısının yansıtılamadığına değinilmiştir. Mevcut verilere göre, 28 günlük dönemde rapor edilen olgu ve ölümlerin sayısı 275.000'den fazla yeni olgu ve 4.200 yeni ölüm olacak şekilde , önceki 28 güne kıyasla sırasıyla %11 ve %41 düşüş göstermiştir. Bildirilen yeni olgu ve ölüm sayısındaki eğilimlerin, birçok ülkede raporlama gecikmelerinin yanı sıra testlerin de azalması nedeniyle dikkatle yorumlanması gerektiği vurgulanmıştır (Tablo 3). Ayrıca yine mevcut verilere göre, 28 günlük dönemde 49.000'den fazla yeni hastaneye yatış ve 1.200'den fazla yeni yoğun bakım ünitesine

kabul rapor edilmiştir. Tutarlı bir şekilde raporlama yapan ülkelerin verilerine bakıldığında, yeni hastaneye yatışlarda ve yeni yoğun bakım ünitesine kabullerde sırasıyla %44 ve %46'lık genel bir düşüş yaşanmıştır. DSÖ, "COVID-19 2023-2025 Güncellenmiş Stratejik Hazırlık ve Müdahale Planı"na uyacak şekilde veri paylaşımına devam edeceğini belirtmiştir (WHO, 2024).

Tablo 1. DSÖ verilerine göre 14 Nisan 2024 tarihli en çok COVID-19 olgusu olan 20 ülke (WHO, 2024)

Ülkeler	Toplam Olgu Sayısı (milyon)
ABD	103
Çin	99.4
Hindistan	45
Fransa	39
Almanya	38.4
Brezilya	37.5
Kore	34.6
Japonya	33.8
İtalya	26.7
Birleşik Krallık	24.9
Rusya	24.1
Türkiye	17
İspanya	14
Avustralya	11.8
Vietnam	11.6
Arjantin	10.1
Hollanda	8.6
Meksika	7.7
İran	7.6
Endonezya	6.8
Diğer Ülkeler	173.4
Toplam	**775**

Tablo 2. DSÖ verilerine göre 14 Nisan 2024 tarihli en çok COVID-19 kaynaklı ölüm olgusu olan 20 ülke (WHO, 2024)

Ülkeler	Toplam Ölüm Sayısı
ABD	1.2 milyon
Brezilya	702 bin
Hindistan	534 bin
Rusya	403 bin
Meksika	335 bin
Birleşik Krallık	232 bin
Peru	221 bin
İtalya	197 bin
Almanya	175 bin
Fransa	168 bin
Endonezya	162 bin
İran	147 bin
Kolombiya	143 bin
Arjantin	131 bin
Çin	122 bin
İspanya	122 bin
Polonya	121 bin
Ukrayna	110 bin
Güney Afrika	103 bin
Türkiye	101 bin
Diğer Ülkeler	1.6 milyon
Toplam	**7 milyon**

Tablo 3. DSÖ verilerine göre 31 Mart 2024 tarihli yeni bildirilen ve toplam COVID-19 olguları ve ölümleri (WHO, 2024)

Bölgeler	Son 28 günde yeni olgular (%)	Toplam olgular (%)	Son 28 günde yeni ölümler (%)	Toplam ölümler (%)
Avrupa	118816 (%43)	**279243990 (%36)**	538 (%13)	**2271451 (%32)**
Batı Pasifik	114586 (%42)	**208379324 (%27)**	266 (%6)	**420714 (%6)**
Amerika	32692 (%12)	**193361300 (%25)**	3346 (%79)	**3015459 (%43)**
Güneydoğu Asya	7636 (%3)	**61273832 (%8)**	76 (%2)	**808583 (%11)**
Doğu Akdeniz	1040 (%0)	**23414772 (%3)**	4 (%0)	**351935 (%5)**
Afrika	783 (%0)	**9577797 (%1)**	0 (%0)	**175505 (%2)**
Toplam	**275553 (%100)**	**775251779 (%100)**	**4230 (%100)**	**7043660 (%100)**

Ülkemizde COVID-19 ile ilgili çalışmalar 2020 yılı 10 Ocak'ta başlamış ve 22 Ocak'ta Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Bilimsel Danışma Kurulu ilk toplantısı gerçekleştirilmiş, alınan önlemler ile ilk COVID-19 olgusu 11 Mart'ta görülmüştür (TC Sağlık Bakanlığı, 2020).

Ayrıca Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı tarafından oluşturulan COVID-19 Bilgilendirme Platformu (https://covid19.saglik.gov.tr/) aracılığıyla COVID-1 ile ilgili bilgilendirmeler ve Türkiye'ye ait veriler paylaşılmaktadır (Tablo 4).

Tablo 4. Türkiye'de COVID-19 verileri (WHO, 2024)

Tarih	Toplam Olgu	Toplam Ölüm
31/03/2024	17004714	101419

COVID-19 Bilgilendirme Platformu aracılığıyla hastalıkla ilgili bilgilendirme aşağıdaki başlıklar altında özetlenmektedir:

"Koronavirüsler, hayvanlarda veya insanlarda hastalığa neden olabilecek büyük bir virüs ailesidir. İnsanlarda, birkaç koronavirüsün soğuk algınlığından Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS) ve Şiddetli Akut Solunum Sendromu (SARS) gibi daha şiddetli hastalıklara kadar solunum yolu enfeksiyonlarına neden olduğu bilinmektedir. Yeni Koronavirüs Hastalığına SAR-CoV-2 virüsü neden olur.

Belirtileri: Belirtisiz olgular olabileceği bildirilmekle birlikte, bunların oranı bilinmemektedir. En çok karşılaşılan belirtiler ateş, öksürük ve nefes darlığıdır. Şiddetli olgularda zatürre, ağır solunum yetmezliği, böbrek yetmezliği ve ölüm gelişebilmektedir.

Bulaş Yolu: Hasta bireylerin öksürmeleri aksırmaları ile ortama saçılan damlacıkların solunması ile bulaşır. Hastaların solunum parçacıkları ile kirlenmiş yüzeylere dokunulduktan sonra ellerin yıkanmadan yüz, göz, burun veya ağıza götürülmesi ile de virüs alınabilir. Kirli ellerle göz, burun veya ağıza temas etmek risklidir.

Risk Grubu: COVID-19 enfeksiyonu ile ilgili şimdiye kadar edinilen bilgiler, bazı insanların daha fazla hastalanma ve ciddi semptomlar geliştirme riski altında olduğunu göstermiştir.

- Olguların yüzde 80'i hastalığı hafif geçirmektedir.

- Olguların %20'si hastane koşullarında tedavi edilmektedir.

- Hastalık, genellikle 60 yaş ve üzerindeki kişileri daha fazla etkilemektedir.

- Ciddi kronik tıbbi rahatsızlıkları olan insanlar (kalp hastalığı, hipertansiyon, diyabet, kronik solunum yolu hastalığı, kanser gibi)

- Sağlık Çalışanları

Çocuklar Üzerine Etkisi: Çocuklarda hastalık nadir ve hafif görünmektedir. Çocuklarda şimdiye kadar ölüm görülmemiştir.

Hamileler Üzerine Etkisi: COVID-19 enfeksiyonu gelişen gebe kadınlarda hastalığın ciddiyeti konusunda sınırlı bilimsel kanıt vardır. Bununla birlikte mevcut kanıtlar COVID-19 enfeksiyonu sonrası hamile kadınlar arasındaki hastalık şiddetinin, hamile olmayan yetişkin COVID-19 olgularına benzer olduğunu ve hamilelik sırasında COVID-19 ile enfeksiyonun fetüste olumsuz bir etkisi olduğunu gösteren hiçbir veri olmadığını göstermektedir. Şu ana kadar COVID-19'un hamilelik sırasında anneden bebeğe bulaştığına dair de bir kanıt bulunmamaktadır.

Tanı: Yeni Koronavirüs tanısı için gerekli moleküler testler ülkemizde mevcuttur. Tanı testi sadece Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal Viroloji Referans Laboratuvarında ve belirlenmiş Halk Sağlığı Laboratuvarlarında yapılmaktadır.

Akut solunum yolu enfeksiyonlarının genel bulaşma riskini azaltmak için önerilen temel ilkeler Yeni Koronavirüs Hastalığı (COVID-19) için de geçerlidir. Bunlar;

-El temizliğine dikkat edilmelidir. Eller en az 20 saniye boyunca sabun ve suyla yıkanmalı, sabun ve suyun olmadığı durumlarda alkol bazlı el antiseptiği kullanılmalıdır. Antiseptik veya antibakteriyel içeren sabun kullanmaya gerek yoktur, normal sabun yeterlidir.

- Eller yıkanmadan ağız, burun ve gözlerle temas edilmemelidir.

- Hasta insanlarla temastan kaçınmalıdır (mümkün ise en az 1 m uzakta bulunulmalı).

- Özellikle hasta insanlarla veya çevreleriyle doğrudan temas ettikten sonra eller sık sık temizlenmelidir

- Hastaların yoğun olarak bulunması nedeniyle mümkün ise sağlık merkezlerine gidilmemeli, sağlık kuruluşuna gidilmesi gereken durumlarda diğer hastalarla temas en aza indirilmelidir.

- Öksürme veya hapşırma sırasında burun ve ağız tek kullanımlık kağıt mendil ile örtülmeli, kağıt mendilin bulunmadığı durumlarda ise dirsek içi kullanılmalı, mümkünse kalabalık yerlere

girilmemeli, eğer girmek zorunda kalınıyorsa ağız ve burun kapatılmalı, tıbbi maske kullanılmalıdır.

- Çiğ veya az pişmiş hayvan ürünleri yemekten kaçınılmalıdır. İyi pişmiş yiyecekler tercih edilmelidir.

- Çiftlikler, canlı hayvan pazarları ve hayvanların kesilebileceği alanlar gibi genel enfeksiyonlar açısından yüksek riskli alanlardan kaçınılmalıdır.

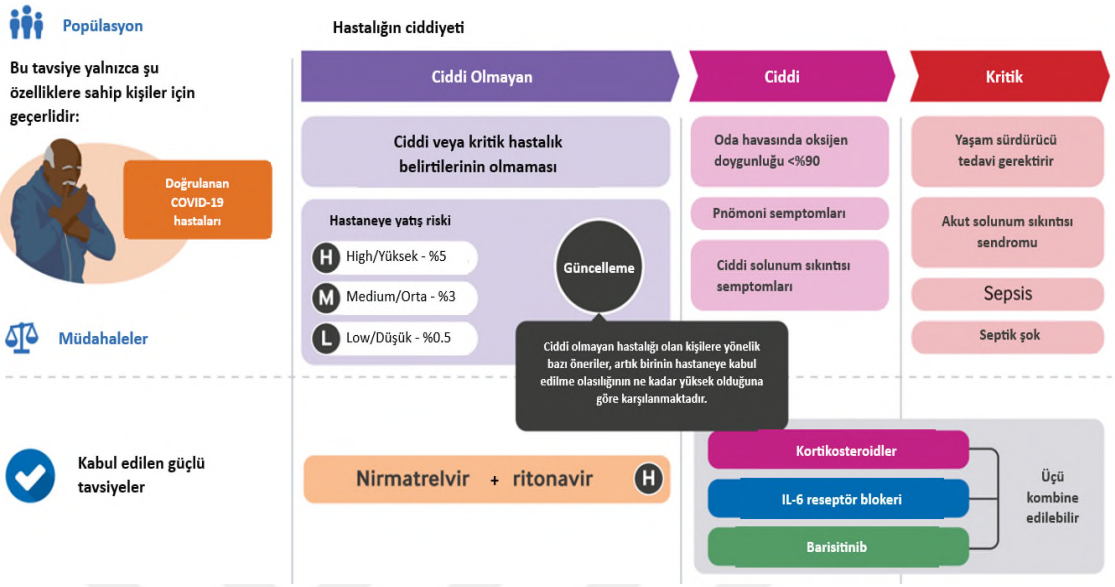
- Seyahat sonrası 14 gün içinde herhangi bir solunum yolu semptomu olursa maske takılarak en yakın sağlık kuruluşuna başvurulmalı, doktora seyahat öyküsü hakkında bilgi verilmelidir."

4.1.1. COVID-19 tedavisi

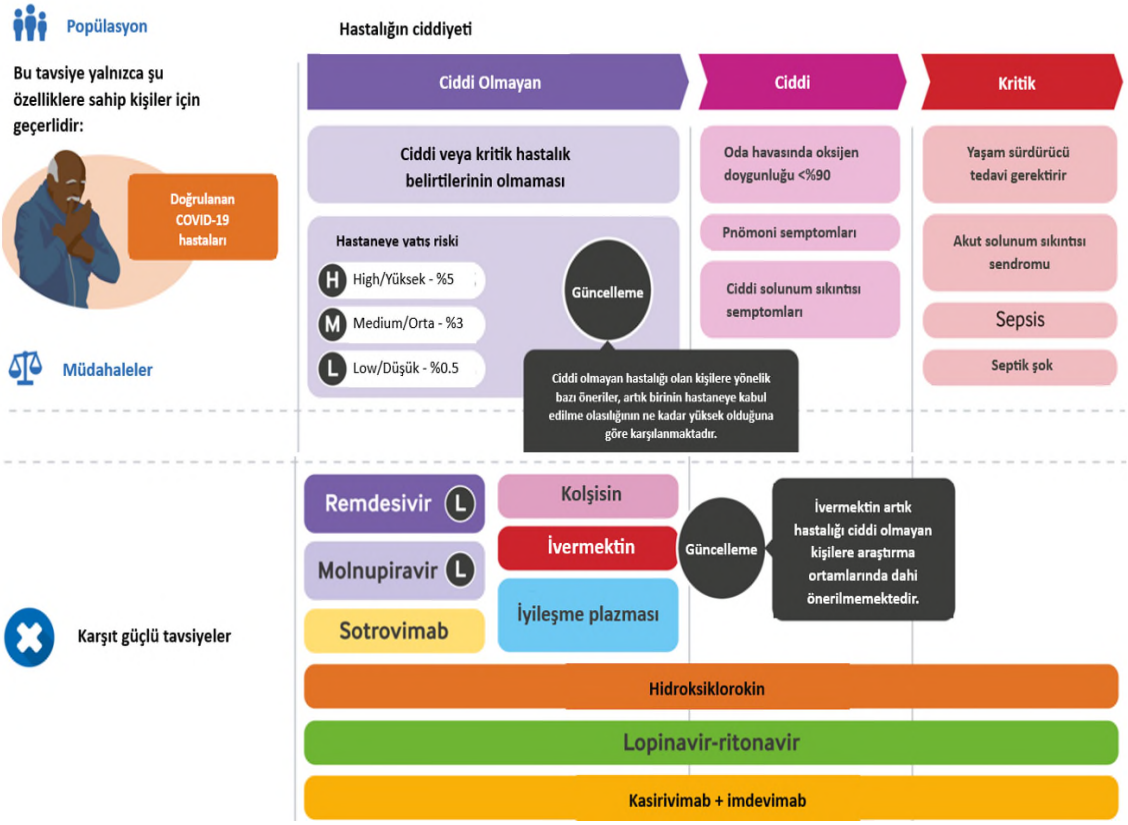
COVID-19 tedavilerine yönelik kanıtlar, yakın zamanda tamamlanan ve devam eden çok sayıda randomize kontrollü çalışmayla gelişmektedir. SARS-CoV-2'nin yeni varyantları, tedavi ilaçlarının rolünü etkileyebilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yayınlanan "Terapötikler ve COVID-19: Yaşayan kılavuz"; dinamik olarak güncellenerek tedaviye yönelik en güncel kanıt ve tavsiyeler sunulmakta, aynı zamanda ülke düzeyinde tavsiyeler için de kolaylık sağlanmaktadır (Şekil 1, Şekil 2, Şekil 3). Son sürümü 10 Kasım 2023'te (14.güncelleme) yayınlanmıştır ve DSÖ websitesi aracılığıyla erişilebilmektedir. Bu güncel kılavuz, COVID-19 için tedavi ilaçlarına yönelik yeni ve mevcut kanıtları göz önünde bulundurarak yapılan araştırmalara dayanmakta olup, COVID-19 klinik yönetimi için daha geniş bir rehberle ilişkilidir. Ayrıca, COVID-19'u önlemeye yönelik tedavi kılavuzları ve ilaçlar, DSÖ websitesinde ayrı olarak yayınlanmaktadır (WHO, 2023).

COVID-19 için hayat kurtaran tedavilere ek olarak, hastalık yükünü azaltmak, hastaneye yatmayı ve ölümü önlemek ve SARS-CoV-2'nin bulaşmasını potansiyel olarak azaltmak için etkili antivirallere acil ihtiyaç duyulmuştur. Enfeksiyonun doğal seyri, viral yükte erken bir zirve (enfeksiyonun ilk 5 günü içinde) ile karakterize edildiğinden, herhangi bir antiviralin, enfeksiyonun seyrinde erken verildiğinde en fazla etkiyi göstermesi beklenmektedir (Khoo ve ark., 2021).

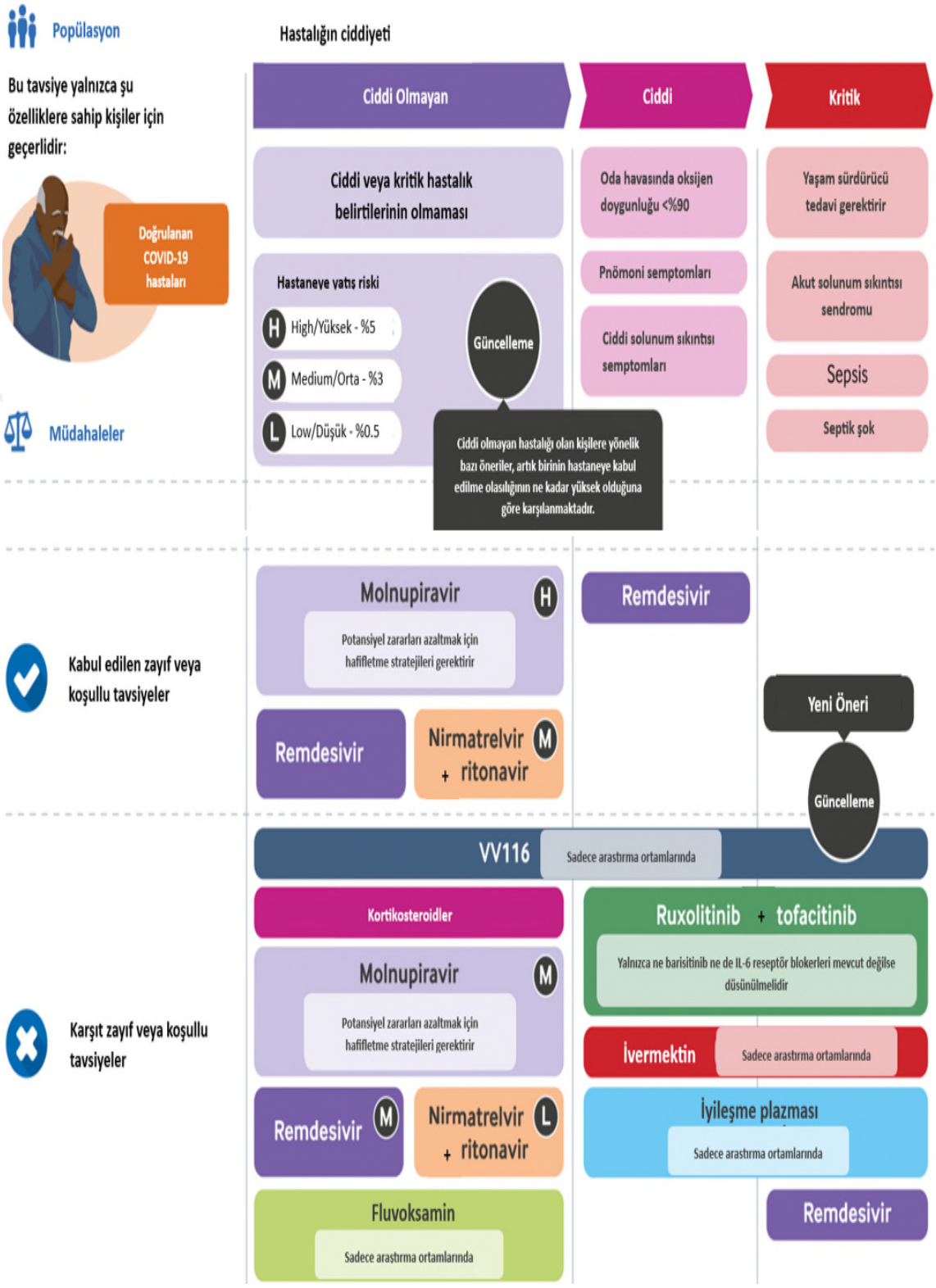
Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından yayınlanan COVID-19 Tedavi Rehberi'ne göre üç antiviral ilaç COVID-19 tedavisi için belirlenmiştir: remdesivir, ritonavir destekli nimatrelvir ve molnupiravir (National Institutes of Health, 2024).



Şekil 1. DSÖ 10 Kasım 2023 Tedavi Rehberine göre kabul edilen güçlü tavsiyeler (WHO, 2023)



Şekil 2. DSÖ 10 Kasım 2023 Tedavi Rehberine göre karşıt güçlü tavsiyeler (WHO, 2023)

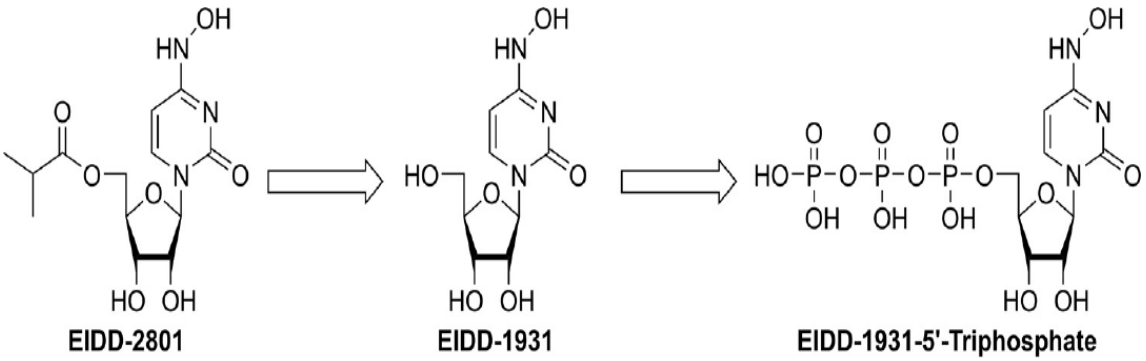


Şekil 3. DSÖ 10 Kasım 2023 Tedavi Rehberine göre kabul edilen ve karşıt zayıf veya koşullu tavsiyeler (WHO, 2023)

4.2.Molnupiravir

Molnupiravir (EIDD-2801), *in vitro* ve bazı klinik çalışmalarda SARS-CoV-2'ye karşı antiviral aktivite gösteren bir ribonükleosit olan beta-D-N4-hidroksisitidin'in (NHC; EIDD-1931) oral ön ilacıdır. Viral RNA'ya bağımlı ribonükleik asit (RNA) polimerazlar tarafından NHC alımı, viral mutasyonlara ve öldürücü mutageneze neden olur (National Institutes of Health, 2024).

Molnupiravir, klinik dışı modellerde yüksek derecede patojenik koronavirüsler ve influenza virüsleri ve Venezüella, Doğu ve Batı at ensefaliti virüsleri gibi ensefalitik alfa virüsleri dahil olmak üzere çoklu RNA virüslerinin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etme potansiyelini göstermiştir. Molnupiravir, plazmada hızlı bir şekilde EIDD-1931'e dönüşür ve bu, çeşitli dokulara dağıldıktan sonra konak kinazlar tarafından karşılık gelen 5'-trifosfata dönüştürülür (Şekil 4). EIDD-1931-5'-trifosfat, viral olarak kodlanmış RNA'ya bağımlı RNA polimeraz için rekabetçi bir alternatif substrattır ve yeni ortaya çıkan zincir viral RNA'ya dahil edilmesi üzerine, viral mutasyonun arttırılmasına dayanan bir kavram olan viral hata felaketi (*viral error catastrophe*) yoluyla bir antiviral etkiyi indükler. Viral hata felaketi, viral mutasyon oranının biyolojik olarak tolere edilebilir bir eşiğin üzerine çıkarılmasına dayanan, viral uygunluğun bozulmasına ve viral yok oluşa yol açan bir kavramdır (Painter ve ark., 2021).



Şekil 4. EIDD-2801, EIDD-1931 ve EIDD-1931-5'-trifosfat Kimyasal Yapısı (Painter ve ark., 2021)

Molnupiravir, nazofaringeal SARS-CoV-2 enfeksiyöz virüsünü ve viral RNA'yı azaltmada oldukça etkili ilk oral, doğrudan etkili antiviraldir ve uygun bir güvenlilik ve tolere edilebilirlik profiline sahip olduğu kabul edilmiştir (Fischer ve ark., 2021). Molnupiravir tedavisi, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun başlangıcında 5 gün boyunca oral olarak verilmektedir. Ruhsatlandırma öncesi erken faz denemelerinde, molnupiravir'in günde iki kez 400 ile 1600 mg'lık dozlarda

güvenli olduğu, advers olay oranlarının plasebodan daha yüksek olmadığı ve doza bağlı görünür toksisite olmadığı bildirilmiştir. Semptomların başlamasından sonraki 5 gün içinde başlatılan molnupiravir denemeleri, COVID-19'un klinik kötüleşmesinde %30 ile %50 azalma göstermiştir, öyle ki hastaneye yatış gerekmemiştir ve enfeksiyon ölümle sonuçlanmamıştır (National Library of Medicines, 2022).

İlk olarak, 23 Aralık 2021'de FDA, COVID-19 semptomlarının başlangıcından sonraki 5 gün içinde, ciddi hastalığa ilerleme riski yüksek olan ve alternatif antiviral tedavilerin erişilebilir olmadığı veya klinik olarak uygun olmayan hafif ile orta şiddette COVID-19 hastası yetişkinlerin tedavisinde molnupiravir için Acil Kullanım İzni (EUA) yayınlanmıştır (Tablo 5). FDA COVID-19 Tedavi Rehberi'ne göre; molnupiravirin Omicron varyantı ve alt varyantlarına karşı aktif olması beklenmektedir (National Institutes of Health, 2024).

Tablo 5. Molnupiravir uluslararası ruhsatlandırma durumu (TGA, 2022)

Bölge	Başvuru Tarihi	Durum	Onaylanan Endikasyon
Birleşik Krallık	30.06.2021	04.11.2021 (Onaylı)	SARS-CoV-2 tanı testi pozitif olan ve ciddi hastalık gelişimi için en az bir risk faktörüne sahip yetişkinlerde hafif ile orta şiddette koronavirüs hastalığı 2019'un (COVID-19) tedavisi
ABD	08.10.2021	23.12.2021 (EUA)	Direkt şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) viral testi pozitif sonuç veren ve şiddetli COVID-19'a ilerleme riski yüksek olan erişkinlerde (hastaneye kaldırılma veya ölüm de dahil olmak üzere ve FDA tarafından onaylanan alternatif COVID-19 tedavi seçeneklerine erişilemeyen veya klinik olarak uygun olmayan kişiler) hafif-orta şiddette COVID-19 tedavisi
Avrupa Birliği*	21.10.2021	Değerlendirmede	Değerlendirmede
Kanada**	13.08.2021	Değerlendirmede	Değerlendirmede
İsviçre***	13.08.2021	Değerlendirmede	Değerlendirmede

* 27 Haziran 2023 tarihinde Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından yapılan değerlendirmede; ürünün yarar-risk dengesinin kurulamaması ve mevcut verilerle klinik faydasının kanıtlanamaması sebebiyle başvurusunun iptaline karar verilmiştir (EMA,2023).

** 26 Nisan 2023 tarihinde ruhsat sahibi firmanın başvuruyu geri çekme talebi Health Canada tarafından onaylanmıştır (Health Canada, 2023).

*** 24 Şubat 2023 tarihinde Swissmedic resmi bildirimine göre ürünün ruhsat başvurusu geri çekilmiştir (Swissmedic, 2023).

Molnupiravir, COVID-19 tedavisinde ilk oral antiviral tedavisi olarak başta Dünya Sağlık Örgütü olmak üzere, ülkemiz de dahil birçok Sağlık Otoritesinin tedavi şemasında Acil Kullanım İzni ile yer almaktadır (WHO, 2023).
Ülkemizde ise molnupiravir 12 Nisan 2022 tarihinde COVID-19 Erişkin Hasta Tedavisi Kılavuzuna eklenmiştir (TC Sağlık Bakanlığı, 2022).

İzni verilmiş tedavi şemalarına göre uygulanması aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır:
"Molnupiravirin; tanısı PCR (Polymerase Chain Reaction- Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile doğrulanmış, hafif-orta seyirli, semptomlarının ilk 5 gününde olan ve ağır COVID-19'a ilerleme açısından yüksek riskli aşağıda verilmiş gruplarda yer alan erişkin (≥18 yaş) COVID-19 hastalarında, aşılama durumuna bakılmaksızın kullanılması önerilmektedir.
a. ≥65 yaş olanlar
b. Primer immün yetmezlikler
c. Son 1 yılda kemoterapi almış solid veya hematolojik kanser hastaları
d. Son 6 ayda radyoterapi almış kişiler
e. Solid organ nakli yapılmışlar
f. Kemik iliği nakli yapılmışlar
g. AIDS (CD4<200/mikrolitre olanlar)
h. Son bir yıl içerisinde Rituksimab tedavisi alan ve halen tedavisi devam eden kişiler
Molnupiravir'in kullanım dozu ve süresi, günde 2 kez 800mg olacak şekilde toplam 5 gündür. Molnupiravir gebelerde ve çocuklarda kullanılmamalıdır. Emzirenlerde molnupiravir kullanıldığı sürece ve son dozdan sonra dört gün boyunca emzirmeye ara verilmelidir. Molnupiravir <18 yaş olanlarda, hastaneye ağır COVID-19 hastalığı nedeniyle yatırılan hastaların tedavisinde, COVID-19'un önlenmesi için temas öncesi veya temas sonrası profilaksi amacıyla kullanılmamalıdır."
Molnupiravir kemik ve kıkırdak büyümesini etkileyebileceğinden, molnupiravirin 18 yaşından küçük hastalarda kullanımına izin verilmemiştir. Ayrıca; molnupiravirin, maruziyet öncesi veya sonrası COVID-19'u önleme veya COVID-19 nedeniyle hastaneye yatırılan hastalarda tedaviye başlama izni de mevcut değildir; çünkü COVID-19 nedeniyle hastaneye yatış sonrası tedaviye başlanan kişilerde tedavide fayda görülmemiştir. Ancak mevcut izin verilmiş tedavilere göre, oral kullanımı sebebiyle COVID-19 virüsüne karşı ek bir tedavi seçeneği sunduğu bildirilmiştir. Molnupiravir, COVID-19 için diğer onaylı tedavilerin erişilemediği veya klinik olarak uygun olmadığı durumlarla sınırlıdır ve hastaneye yatma veya ölüm riski yüksek olan bazı COVID-19 hastaları için yararlı bir tedavi seçeneği olacağı düşünülmektedir. Sağlık Otoritelerinin

mevcut bilimsel kanıtların bütününe ilişkin incelemesine göre; izin verilen alternatif COVID-19 tedavi seçeneklerinin erişilebilir veya klinik olarak uygun olmadığı durumlarda, molnupiravir'in bazı yetişkinlerde hafif ile orta şiddette COVID-19 tedavisinde etkili olabileceğine inanmanın makul olduğu değerlendirilmiştir. Ayrıca, molnupiravir'in bilinen ve potansiyel yararlarının, yetkilendirmenin hüküm ve koşullarına uygun olarak kullanıldığında, ürünün bilinen ve potansiyel risklerinden daha ağır bastığını belirlenmiştir. COVID-19 tedavisi için molnupiravirin yeterli, onaylanmış ve mevcut alternatifleri olmadığı bildirilmiştir. (WHO, 2022; FDA, 2021; MHRA, 2021; TC Sağlık Bakanlığı, 2022).

4.2.1. Farmakodinamiği

Birleşik Krallık sağlık otoritesi MHRA (UK Medicines And Healthcare Products Regulatory Agency) tarafından 13 Ekim 2023 tarihinde onaylanan kısa ürün bilgilerine göre molnupiravirin farmakodinamiği aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır (MHRA, 2023):

Farmakoterapötik grup: Sistemik kullanım için antiviraller, doğrudan etkili antiviraller, ATC kodu: J05AB18 (MHRA, 2023)

Etki mekanizması: Molnupiravir, farmakolojik olarak aktif ribonükleozid trifosfatı (NHC-TP) oluşturmak üzere fosforile edildiği hücrelere dağılan sitidin nükleozid analoğu, ribonükleozid analoğu N-hidroksisitidin'e (NHC) metabolize edilen bir ön ilaçtır. NHC-TP, viral hata felaketi olarak bilinen bir mekanizma ile etki eder. NHC-TP'nin viral RNA polimeraz tarafından viral RNA'ya dahil edilmesi, viral genomda hataların birikmesine ve replikasyonun inhibisyonuna yol açar (MHRA, 2023).

Antiviral aktivite: NHC, SARS-CoV-2'ye (ABD-WA1/2020 izolatı) karşı hücre kültürü analizlerinde, A-549 hücrelerinde 0,67 ila 2,66 µM ve Vero E6 hücrelerinde 0,32 ila 2,03 µM arasında değişen %50 etkili konsantrasyonlarla (EC_{50}) aktiftir. NHC, SARS-CoV-2 varyantları Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2), Lambda (C.37), Mu (B 1.621) ve Omicron (BA.1.1.529/BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.4 ve BA.5)'a karşı 0,55-2,95 µ M ortalama EC_{50} değerleri ile benzer antiviral aktiviteye sahiptir. NHC abakavir, emtrisitabin, hidroksiklorokin, lamivudin, nelfinavir, remdesivir, ribavirin, sofosbuvir veya tenofovir ile kombinasyon halinde test edildiğinde NHC'nin SARS-CoV-2'ye karşı *in vitro* antiviral aktivitesi üzerinde hiçbir etki gözlenmemiştir (MHRA, 2023).

Farmakodinamik etkiler: NHC ve hücre içi NHC-TP ile antiviral etkinlik arasındaki ilişki klinik olarak değerlendirilmemiştir (MHRA, 2023).

Rezistans: COVID-19 tedavisi için molnupiraviri değerlendiren Faz 2 klinik çalışmalarda SARS-CoV-2'de NHC direnciyle ilişkili hiçbir amino asit substitüsyonu tanımlanmamıştır. Hücre kültüründe SARS-CoV-2 ile NHC'ye direnç seçimini değerlendirmeye yönelik çalışmalar tamamlanmamıştır (MHRA, 2023).

Klinik etkinlik ve güvenlilik: Klinik veriler, Faz 3 MOVe-OUT çalışmasında 1433 randomize gönüllüden elde edilen verilere dayanmaktadır. MOVe-OUT, ciddi COVID-19'a ilerleme ve/veya hastaneye kaldırılma riski taşıyan, hastaneye yatırılmamış hafif ile orta dereceli COVID-19 hastalarının tedavisi için molnupiraviri inceleyen randomize, plasebo kontrollü, çift kör bir klinik çalışmadır. Uygun gönüllüler 18 yaş ve üzerinde ve hastalığın ilerlemesi için bir veya daha fazla önceden tanımlanmış risk faktörüne sahiptir: bunlar, 60 yaş veya üzeri olmak, diyabet, obezite (BMI >30), kronik böbrek hastalığı, ciddi kalp rahatsızlıkları, kronik obstrüktif akciğer hastalık veya aktif kanser olarak belirlenmiştir. Çalışma, SARS-CoV-2'ye karşı aşılanmamış, laboratuvarca doğrulanmış SARS-CoV-2 enfeksiyonu olan ve kayıttan sonraki 5 gün içinde belirtileri başlayan semptomatik kişileri içermektedir. Gönüllüler 5 gün boyunca günde iki kez 800 mg Lagevrio (molnupiravir) veya plasebo alacak şekilde 1:1 oranında randomize edilmiştir (MHRA, 2023).

Başlangıçta, randomize edilen tüm gönüllülerde ortalama yaş 43'tü (aralık: 18 ile 90 yıl); Gönüllülerin %17'si 60 yaş veya üzerinde, %3'ü ise 75 yaş üzerinde; %49'u erkek; %57'si Beyaz, %5'i Siyah veya Afro-Amerikan, %3'ü Asyalı; % 50'si Hispanik veya Latin kökenli olarak belirtilmiştir. Gönüllülerin çoğunluğu Latin Amerika (%46) ve Avrupa'daki (%33) bölgelerden kaydedilmiştir; %12'si Afrika'ya, %6'sı Kuzey Amerika'ya ve %3'ü Asya'ya kaydolmuştur (MHRA, 2023).

Gönüllülerin %48'i, COVID-19 semptomlarının başlamasından sonraki 3 gün içinde Lagevrio veya plasebo almıştır. En yaygın risk faktörleri obezite (%74), 60 yaş ve üzeri (%17) ve diyabet (%16) olarak bildirilmiştir. Başlangıç SARS-CoV-2 varyantı/klad tanımlama sonuçları mevcut olan 792 gönüllüden (toplam randomize popülasyonun %55'i) %58'i Delta (B.1.617.2 ve AY soyları), %20'si Mu (B) ile, %11'i Gamma (P.1) varyantları ile ve geri kalanı diğer varyantlar ile enfekte olmuştur. Genel olarak, başlangıçtaki demografik ve hastalık özellikleri tedavi kolları arasında iyi dengelenmiştir (MHRA, 2023).

Tablo 6'da birincil son noktanın sonuçları verilmektedir (herhangi bir nedenden dolayı 29. güne kadar hastaneye kaldırılan veya ölen kişilerin yüzdesi).

Tablo 6. MOVe-OUT çalışması birincil son nokta sonuçları (MHRA, 2023)

Ara Değerlendirme				
	Lagevrio (N=385) n (%)	**Plasebo (N=377) n (%)**	**Risk farkı* (95% GA)**	**p-değeri†**
29. güne kadar tüm nedenlere bağlı olarak hastaneye kaldırılma veya ölüm†	28 (%7.3)	53 (%14.1)	%-6.8 (%-11.3, %-2.4)	0.0012
Hastaneye yatış	28 (%7.3)	52 (%13.8)		
Ölüm	0 (%0)	8 (%2.1)		
Bilinmeyen	0 (%0)	1 (%0.3)		
Tüm Randomize Değerlendirme				
	Lagevrio (N=709) n (%)	**Plasebo (N=699) n (%)**	**Risk farkı* *(95% GA)***	
29. güne kadar tüm nedenlere bağlı olarak hastaneye kaldırılma veya ölüm†	48 (%6.8)	68 (%9.7)	%-3.0 (%-5.9, %-0.1)	
Hastaneye yatış‡	48 (%6.8)	67 (%9.6)		
Ölüm	1 (%0.1)	9 (%1.3)		
Bilinmeyen§	0 (%0)	1 (%0.1)		

*Miettinen ve Nurminen yöntemine dayalı molnupiravir-plasebo risk farkı, COVID-19 semptomlarının başlangıç zamanına göre sınıflandırılmıştır (≤ 3 gün vs. >3 [4-5] gün).

† 1 taraflı p-Değeri

‡ Bir hastanede veya akut bakım tesisinde (örn. acil servis) ≥ 24 saat akut bakım olarak tanımlanır.

§ 29. günde durumu bilinmeyen gönüllüler, etkinlik analizinde tüm nedenlere bağlı olarak hastaneye kaldırılma veya ölüm sonucuna sahip olarak sayılır.

Not: 29. güne kadar ölen tüm gönüllüler, ölümden önce hastaneye kaldırıldı.

Ara değerlendirme gönüllüleri için: Molnupiravirin plaseboya kıyasla göreceli risk azalması, Cochran-Mantel-Haenszel yöntemine göre, COVID-19 semptomlarının başlangıç zamanına (≤ 3 gün vs. >3 [4-5] gün) göre sınıflandırılan %48 (%95 GA: %20, %67)'dir.

Tüm randomize gönüllüler için: Molnupiravirin plaseboya kıyasla rölatif risk azalması, Cochran-Mantel-Haenszel yöntemine göre, COVID-19 semptomlarının başlangıç zamanına (≤ 3 güne karşı >3 [4-5] gün) göre sınıflandırılan %30 (%95 GA: %1, %51) 'dur.

Viral RNA Ribound: Faz 3 MOVe-OUT çalışmasındaki Lagevrio ve plasebo alıcılarının bir alt grubunda 10. gün, 15. gün ve/veya 29. günde nazofaringeal örneklerde SARS-CoV-2 RNA dökülme seviyelerinde (yani viral RNA ribaundunda) tedavi sonrası artışlar gözlemlendi. Hem Lagevrio hem de plasebo alıcılarının yaklaşık %1'inde nazofaringeal numunelerde viral RNA seviyelerinde bir toparlanma ile çakışan tekrarlayan COVID-19 semptomlarının kanıtı vardı (MHRA, 2023).

Tedavi sonrası viral RNA riboundu, 5 günlük tek Lagevrio tedavisi kürünü takiben 29. Güne kadar hastaneye yatış veya ölüm gibi birincil klinik sonuçla ilişkili değildi. Tedavi sonrası viral RNA ribound, nazofaringeal sürüntü örneklerinde hücre kültürü bulaşıcı virüsünün saptanması ile de ilişkili değildi (MHRA, 2023).

4.2.2. Farmakokinetiği

MHRA tarafından 13 Ekim 2023 tarihinde onaylanan kısa ürün bilgilerine göre molnupiravirin farmakokinetiği aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır (MHRA, 2023):

"Molnupiravir, sistemik dolaşıma ulaşmadan önce NHC'ye hidrolize olan 5'-izobütiratlı bir ön ilaçtır. NHC'nin farmakokinetiği sağlıklı bireylerde ve COVID-19 hastalarında benzerdir (MHRA, 2023).

Her 12 saatte bir 800 mg molnupiravir uygulanmasını takiben kararlı durumda NHC'nin farmakokinetiği Tablo 7'de verilmektedir (MHRA, 2023).

Tablo 7. Molnupiravirin farmakokinetik parametreleri (MHRA, 2023)

NHC Geometrik Ortalama (%CV)		
$EAA_{0\text{-}12sa}$ (ng× sa/mL)*	C_{max} (ng/mL) †	C_{12sa} (ng/mL)*
8260 (41.0)	2970 (16.8)	31.1 (124)

%CV: Geometrik varyasyon katsayısı.

* Değerler popülasyon PK analizinden elde edilmiştir.

† Değerler sağlıklı deneklerde yapılan Faz 1 çalışmasından elde edilmiştir.

Absorpsiyon: 800 mg molnupiravirin günde iki kez oral uygulanmasını takiben, plazma NHC konsantrasyonlarının doruğa ulaşması için geçen ortalama süre (T_{maks}) 1,5 saat olmuştur (MHRA, 2023).

Besinlerin oral absorpsiyon üzerindeki etkisi: Sağlıklı gönüllülerde, 200 mg'lık tek doz molnupiravirin yüksek yağlı bir yemekle birlikte uygulanması, NHC zirve konsantrasyonlarında (C_{maks}) %35'lik bir azalmayla sonuçlanmıştır, ancak eğri altında kalan alan (EAA) anlamlı düzeyde etkilenmemiştir. Molnupiravir yemekle birlikte veya yemeksiz alınabilir (MHRA, 2023).

Dağılım: NHC plazma proteinlerine bağlanmamaktadır (MHRA, 2023).

Metabolizma: Molnupiravir sistemik dolaşıma ulaşmadan önce NHC'ye hidrolize edilir. NHC'nin alımı ve metabolizması, endojen pirimidin metabolizmasında yer alan aynı yollarla aracılık eder. NHC, ilacı metabolize eden başlıca enzimlerin veya taşıyıcıların bir substratı değildir. Ne molnupiravir ne de NHC, başlıca ilaç metabolize eden enzimlerin veya taşıyıcıların inhibitörleri veya indükleyicileri değildir (MHRA, 2023).

Eliminasyon: NHC'nin etkin yarı ömrü yaklaşık 3,3 saattir. Sağlıklı katılımcılarda idrarla NHC olarak atılan dozun fraksiyonu ≤%3'tür (MHRA, 2023).

4.2.3. Molnupiravirin advers etkileri ve toksisitesi

MHRA tarafından 13 Ekim 2023 tarihinde onaylanan kısa ürün bilgilerine göre molnupiravirin advers etkileri aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır (MHRA, 2023):

Molnupiravir (n=710) ile tedavi edilen hafif ile orta dereceli COVID-19 hastaları üzerinde yapılan Faz 3 çalışmasından elde edilen verilerde, tedavi sırasında ve son dozdan sonraki 14 gün boyunca bildirilen en yaygın advers reaksiyonlar (gönüllülerin ≥%1'i) diyare (%2), bulantı (%1) ve baş dönmesidir (%1). Advers reaksiyonların hepsi Derece 1 (hafif) veya Derece 2 (orta)dir (MHRA, 2023).

Kısa ürün bilgisinde yer alan advers reaksiyonlar Tablo 8'de sistem organ sınıfına ve sıklığa göre listelenmektedir (MHRA, 2023).

Tablo 8. Kısa ürün bilgisinde yer alan advers reaksiyonların listesi (MHRA, 2023)

Sıklık	**Advers Reaksiyon**
Sinir sistemi hastalıkları	
Yaygın	baş dönmesi
Yaygın olmayan	baş ağrısı
Gastrointestinal hastalıklar	
Yaygın	diyare, bulantı
Yaygın olmayan	kusma
Deri ve deri altı doku hastalıkları	
Yaygın olmayan	döküntü, ürtiker

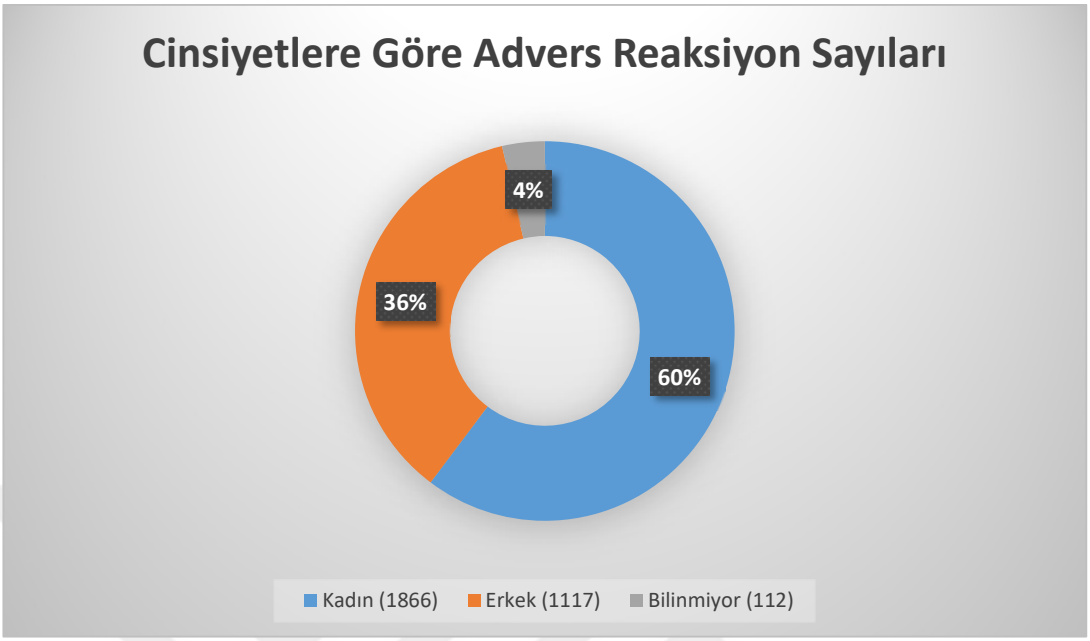
DSÖ tarafından VigiAccess veritabanında paylaşılan bilgilere göre, molnupiravir için, ürünün piyasaya çıktığı tarihten 01 Mayıs 2024'e kadar olan advers reaksiyon verileri Tablo 9'da ve Tablo 10'da ve Şekil 5-8'de gösterildiği üzere yayınlanmıştır (VigiAccess, 2024).

Tablo 9. DSÖ - Molnupiravir advers reaksiyon sayıları (VigiAccess, 2024)

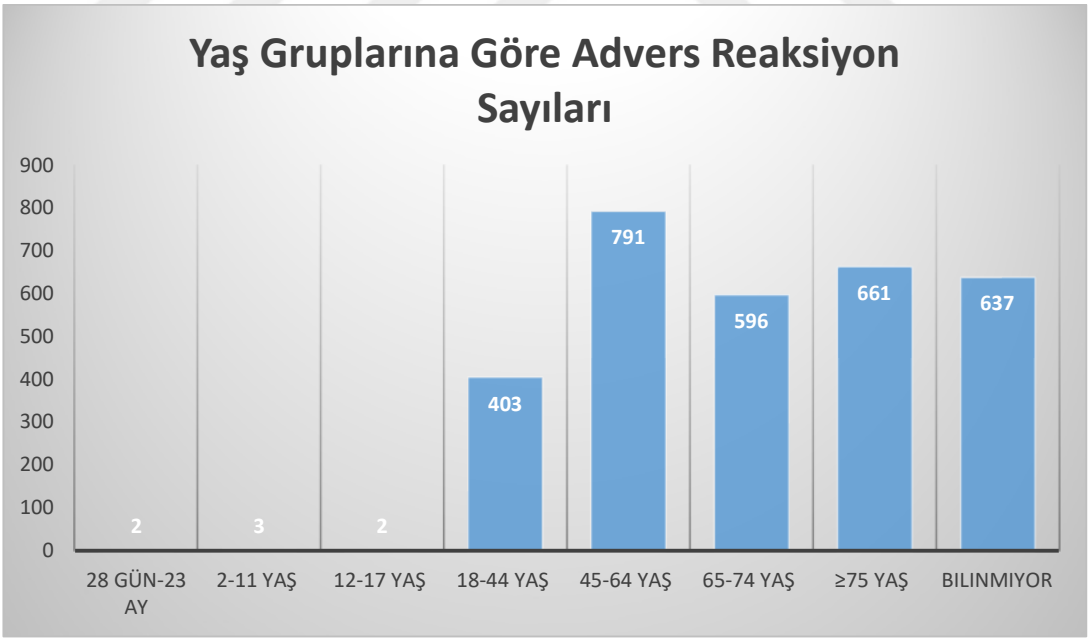
Sistem-Organ Sınıflandırması	Advers Reaksiyon Sayısı
Kan ve lenf sistemi hastalıkları	23
Kardiyak hastalıkları	72
Kulak ve iç kulak hastalıkları	57
Endokrin hastalıkları	1
Göz hastalıkları	71
Gastrointestinal hastalıkları	1086
Genel bozukluklar ve uygulama bölgesine ilişkin hastalıkları	546
Hepato-biliyer hastalıkları	15
Bağışıklık sistemi hastalıkları	29
Enfeksiyonlar ve enfestasyonlar	134
Yaralanma ve zehirlenme	283
Araştırmalar	161
Metabolizma ve beslenme hastalıkları	71
Kas-iskelet bozukluklar, bağ doku ve kemik hastalıkları	92
(Kist ve polipler de dahil olmak üzere) iyi huylu ve kötü huylu neoplazmalar	7
Sinir sistemi hastalıkları	662
Ürün kusurları	33
Psikiyatrik hastalıkları	138
Böbrek ve idrar hastalıkları	43
Üreme sistemi hastalıkları ve meme hastalıkları	15
Solunum, göğüs bozuklukları ve mediastinal hastalıkları	196
Deri ve deri altı doku hastalıkları	1035
Sosyal koşullar	7
Cerrahi ve tıbbi prosedürler	39
Vasküler hastalıkları	57
Toplam	**3095**

Tablo 10. DSÖ - Molnupiravir karaciğer ile ilgili advers reaksiyon sayıları (VigiAccess, 2024)

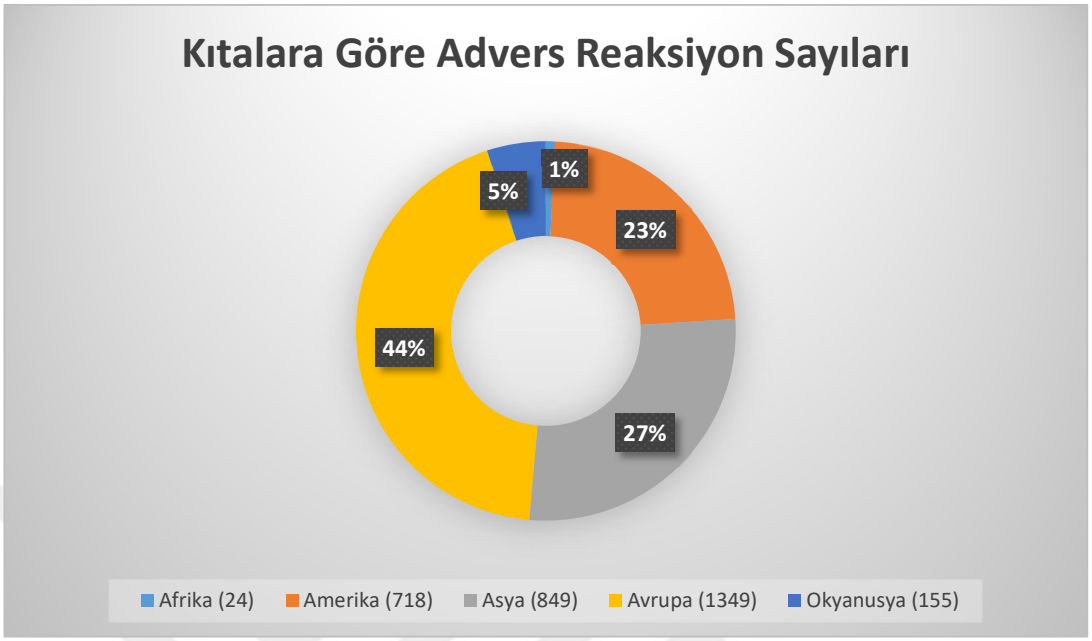
Sistem-Organ Sınıflandırması	Advers Reaksiyon Sayısı
Hepato-biliyer hastalıkları	**15**
Akut karaciğer yetmezliği	3
Hipertransaminazemi	3
Karaciğer hasarı	3
Anormal karaciğer fonksiyonu	2
Kolesistit	1
İlaca bağlı karaciğer hasarı	1
Hepatik siroz	1
Hepatik ağrı	1
Hepatomegali	1
Sarılık	1
Karaciğer bozukluğu	1
Araştırmalar	**161**
ALT artışı	4
AST artışı	3
Hepatik enzim artışı	3
Anormal hepatik fonksiyon testi	2
Hepatik fonksiyon testinde artış	2
Transaminaz artışı	2
Bilirubin artışı	1
Üre artışı	1



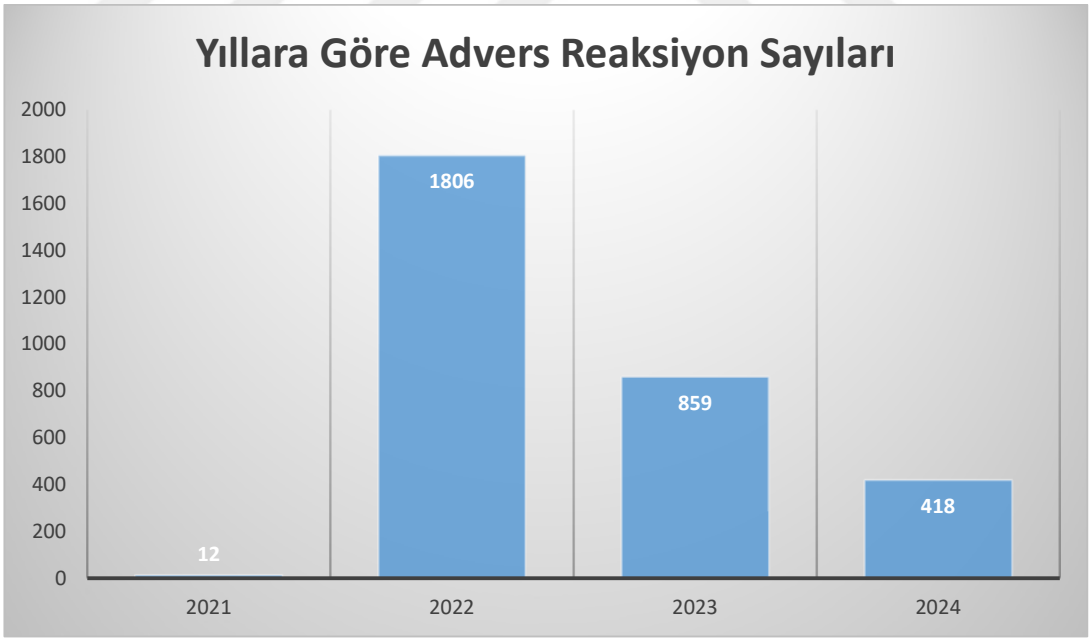
Şekil 5. DSÖ - Molnupiravir ilgili advers reaksiyon sayılarının cinsiyetlere göre dağılımı (VigiAccess, 2024)



Şekil 6. DSÖ - Molnupiravir ilgili advers reaksiyon sayılarının yaş gruplarına göre dağılımı (VigiAccess, 2024)



Şekil 7. DSÖ - Molnupiravir ilgili advers reaksiyon sayılarının kıtalara göre dağılımı (VigiAccess, 2024)



Şekil 8. DSÖ - Molnupiravir ilgili advers reaksiyon sayılarının yıllara göre dağılımı (VigiAccess, 2024)

MHRA tarafından 13 Ekim 2023 tarihinde onaylanan kısa ürün bilgilerine göre molnupiravirin toksisitesi ise aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır (MHRA, 2023):

"**Genel toksisite:** Köpeklerde ≥ 17 mg/kg/gün dozlarında (önerilen insan dozunda, insan NHC maruziyetinden daha az) tüm hematopoietik hücre dizilerini etkileyen geri dönüşümlü, doza bağlı kemik iliği toksisitesi gözlenmiştir. 7 günlük molnupiravir tedavisinden sonra periferik kan hücresi ve trombosit sayısında hafif düşüşler görüldüğü ve 14 günlük tedaviden sonra daha ciddi hematolojik değişikliklere ilerlediği görülmüştür. Farelerde 2.000 mg/kg/güne kadar (önerilen insan dozunda insan NHC maruziyetinin 19 katı) 1 aylık bir toksisite çalışmasında ve sıçanlarda 1.000 mg/kg/güne kadar (önerilen insan dozunda kadın ve erkek oranlarında sırasıyla insan NHC maruziyetinin 9 ve 15 katı) 3 aylık bir toksisite çalışmasında ne kemik iliği ne de hematolojik toksisite gözlenmediği bildirilmiştir (MHRA, 2023).

3 aylık bir toksisite çalışmasında, hızla büyüyen sıçanların femur ve kaval kemiğinde, ≥ 500 mg/kg/gün (önerilen insan dozunda insan NHC maruziyetinin 5 katı) dozunda yapılan bir toksisite çalışmasında, fizyal ve epifizyal büyüme kıkırdağının kalınlığında artış ve trabeküler kemikte azalmadan oluşan kemik ve kıkırdak toksisitesi gözlemlendiği bildirilmiştir. 500 mg/kg/gün'e kadar (dişi ve erkek sıçanlarda önerilen insan dozunda insan NHC maruziyetinin sırasıyla 4 ve 8 katı) hızlı büyüyen sıçanlarda yapılan 1 aylık bir toksisite çalışmasında, 14 gün boyunca 50 mg/kg/güne kadar doz uygulanan köpeklerde (önerilen insan dozunda insan NHC maruziyetinin 2 katı) veya 2.000 mg/kg/güne kadar (önerilen insan dozunda insan NHC maruziyetinin 19 katı) farelerde yapılan 1 aylık bir toksisite çalışmasında kemik veya kıkırdak toksisitesi görülmediği raporlanmıştır. Olgun iskeletlerde büyüme kıkırdağı mevcut değildir; bu nedenle kemik ve kıkırdak bulguları yetişkin insanlar için geçerli değildir. Bu bulguların pediyatrik hastalar için klinik önemi bilinmemektedir (MHRA, 2023).

Karsinojenez: Molnupiravir, RasH2 transgenik farelerde test edilen herhangi bir dozda (30, 100 veya 300 mg/kg/gün) yapılan 6 aylık oral karsinojenisite çalışmasında karsinojen olmadığı bildirilmiştir (MHRA, 2023).

Mutajenez: Molnupiravir ve NHC, metabolik aktivasyon olsun veya olmasın *in vitro* bakteriyel ters mutasyon testi (Ames testi) pozitif olduğu, 2 farklı *in vivo* kemirgen mutajenite modelinde (Pig-a mutajenite tahlili ve Big Blue® (cII Locus) transgenik kemirgen testi) molnupiravir, tedavi edilmemiş tarihsel kontrol hayvanlarına göre artan mutasyon oranlarına neden olmadığı ve bu nedenle *in vivo* mutajenik olmadığı bildirilmiştir. Molnupiravir, *in vitro* mikronükleus testi (metabolik aktivasyon olsun veya olmasın) ve *in vivo* sıçan mikronükleus

testlerinde kromozomal hasarın indüksiyonu açısından negatif olduğu bildirilmiştir. Genotoksisite verilerinin toplamına dayalı olarak molnupiravir, klinik kullanımda genotoksisite veya mutajenite açısından düşük risk taşıdığı bilgisi sunulmuştur (MHRA, 2023).

Fertilitenin azalması: Molnupiravirin dişi veya erkek sıçanlara önerilen insan dozundaki insan NHC maruziyetinin sırasıyla yaklaşık 2 ve 6 katı NHC maruziyetlerinde uygulandığında fertilite, çiftleşme performansı veya erken embriyonik gelişim üzerinde herhangi bir etki görülmediği raporlanmıştır (MHRA, 2023).

Gelişim: Sıçanlarda yapılan bir embriyofetal gelişim çalışmasında, molnupiravir hamile sıçanlara 6 ile 17. gebelik günlerinden itibaren 0, 100, 250 veya 500 mg/kg/gün dozlarında oral olarak uygulanmıştır. Molnupiravir ayrıca hamile sıçanlara bir ön embriyofetal gelişim çalışmasında gebeliğin 6. gününden 17. gününe kadar 1.000 mg/kg/gün doza kadar oral olarak uygulanmıştır. Gelişimsel toksisitelerde, 1.000 mg/kg/gün dozunda (önerilen insan dozunda insan NHC maruziyetinin 8 katı) implantasyon sonrası kayıplar, göz, böbrek ve eksenel iskelette malformasyonlar ve kaburga değişiklikleri olduğu ve ≥ 500 mg/kg/gün dozunda (önerilen insan dozunda insan NHC maruziyetinin 3 katı) fetal vücut ağırlığında azalma ve kemikleşmede gecikme mevcuttu. ≤ 250 mg/kg/gün dozunda (önerilen insan dozunda insan NHC maruziyetinden daha az) gelişimsel toksisite görülmediği bildirilmiştir. Maternal toksisiteler arasında, 1.000 mg/kg/gün dozunda bireysel hayvanların erken kurban edilmesinde gıda tüketiminin azalması ve vücut ağırlığı kaybı ve 500 mg/kg/gün dozunda vücut ağırlığı artışının azalması yer almaktadır (MHRA, 2023).

Tavşanlarda yapılan bir embriyofetal gelişim çalışmasında molnupiravir, gebe tavşanlara 7 ile 19. gebelik günlerinden itibaren 0, 125, 400 veya 750 mg/kg/gün dozlarında oral olarak uygulanmıştır. Gelişimsel toksisite, 750 mg/kg/gün dozunda (önerilen insan dozunda insan NHC maruziyetinin 18 katı) fetal vücut ağırlığının azalmasıyla sınırlıdır ve ≤ 400 mg/kg/gün dozunda (önerilen insan dozunda insan NHC maruziyetinin 7 katı) gelişimsel toksisite görülmediği raporlanmıştır. Maternal toksisiteler arasında 750 mg/kg/gün dozunda gıda tüketiminin azalması, vücut ağırlığı artışı ve anormal dışkı çıkışı yer almaktadır (MHRA, 2023).

Doğum öncesi ve sonrası gelişimsel bir çalışmada molnupiravir, dişi sıçanlara gebeliğin 6. gününden emzirmenin 6. gününe kadar 500 mg/kg/gün (önerilen insan dozunda insan NHC maruziyetinin 2 katı) dozunda oral olarak uygulanmıştır. Yavrularda herhangi bir etki gözlemlenmemiştir. Emziren sıçanlara ≥ 250 mg/kg/gün dozunda molnupiravir uygulandığında, emziren yavruların plazmasında NHC tespit edilmiştir (MHRA, 2023).

4.3.Karaciğer Hasarı

4.3.1. Apoptoz, Nekroz, Serbest Radikaller ve Biyokimyasal Parametreler

Apoptoz: Vücudumuzda hücrelerin çoğalması ve ölümüyle arasındaki kontrollü dengenin, herhangi bir inflamasyon oluşmadan programlı hücre ölüm mekanizmaları ile mümkün olduğu bilinmektedir. Organizmada homeostazı koruyan bu olay, hücrelerin kendilerini RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyarak yok ettikleri ve genlerle düzenlenen apoptozdur (Coşkun ve ark., 2011; Dağdeviren, 2021).

Apoptoz; hücre yenilenmesi, organizmanın gelişimi, çoğalması ve farklılaşması ve bağışıklık sisteminin işleyişi, embriyo gelişimi ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü gibi birçok hayati süreçte patolojik ve fizyolojik açıdan önemli role sahiptir. Apoptozun normalden az ya da fazla olduğu durumlarda ise nörodejeneratif hastalıklar, iskemik hasar, otoimmün hastalıklar ve kanser gibi hastalıkların oluşumu düşünülmektedir. Bu sebeple hücre siklus ve apoptoz kontrolü ile ilgili yolakların araştırılması devam etmektedir (Coşkun, 2011 ve ark.; Dağdeviren, 2021).

Apoptoz uyarısıyla birlikte hücre bulunduğu ortamdan uzaklaşarak diğer hücrelerle bağlantıyı koparır. Şekil olarak büzüşmeye başlar, kromatin yoğunlaşır, Deoksiribonükleik asit (DNA) nükleozomlarından kesilir. Bu sırada hücre organalleri yapılarını korumaktadır. Hücre zarındaki fosfotidil serin, hücre zarının iç yüzünden dışına yerleşir. Çekirdeğin küçülüp parçalara ayrılmasıyla, hücre zarla sarılı tomurcuklar halinde kopar ve bunlara apoptotik cisimcikler adı verilmektedir. Apopototik cisimcikler makrofajlarla fagosite olur, fakat enflamasyon görülmemektedir (Coşkun ve ark., 2011; Dağdeviren, 2021).

Apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, Bcl-2, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi pek çok molekül rol oynamaktadır (Gültekin ve ark., 2008):

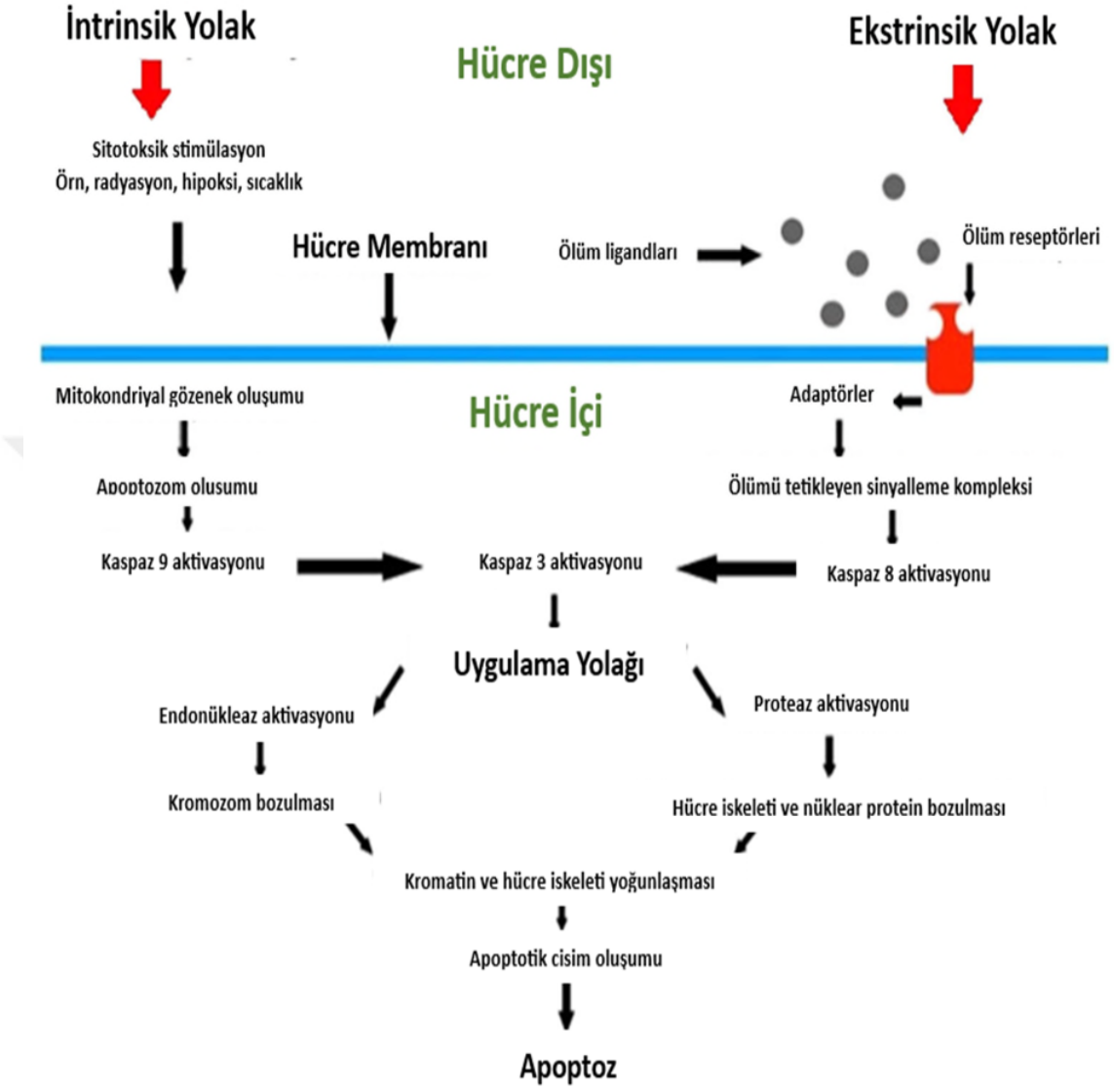
- **Bcl-2 Ailesi:** Hücrelerin apoptoza yatkınlığını belirler. Bu gen grubunda birbirine zıt iki grup vardır (Gültekin ve ark., 2008):
  - Proapoptotik proteinler (BAD, BAX, BAK, BIM, PUMA, NOXA): Sitokrom-c ve apoptoz indükleyici faktörün salınımını artırarak apoptozu indüklemektedir. Hücrede bu proteinler fazla ise, apoptoza eğilim vardır (Gültekin ve ark., 2008).

- Antiapoptotik proteinler (BCL-W,BCL-2, BCL-XL, MCL-1): Por oluşturarak iyon taşınımını düzenlemek ve apoptozu inhibe etmekle görevlidir. Hücrede bu proteinler fazla ise, apoptoza eğilim daha azdır (Gültekin ve ark., 2008).

- **p53:** DNA hasarına yanıt olarak apoptozu indüklemektedir ve bu sayede antiproliferatif etki sağlamaktadır. DNA hasarı oluştuğunda hücre döngüsünü G1 fazında durdurarak DNA tamiri için zaman tanımaktadır. Onarılamaz hasarlarda, apoptozu tetikleyen proteinlerin üretimini (Bax, Apaf-1 ve Fas) artırır. Bu etki sayesinde kanser oluşumunun da önlenmesi sağlanmaktadır (Gültekin ve ark., 2008).
- **Fas (CD95)**: Fas hücre reseptörlerinin sitotoksik T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler üzerinde bulunmasıyla birlikte bağışıklık sisteminde hücre ölümünü programlı olarak kontrol etmekte görev almaktadır (Gültekin ve ark., 2008).
- **Kaspaz Ailesi:** Kaspaz proteaz ailesinin üyeleri hücre içinde inaktif durumda bulunmakta ve birbirlerini aktive ederek apoptozun gerçekleştirilmesini sağlamaktadır. Apoptozun sinyalini veren başlatıcı kaspazlar, hangi hücrenin öleceğini belirler ancak hücrenin tamamen ölümünden sorumlu değildirler. Hücrenin tamamen ölümü effektör kaspazlar sayesinde gerçekleşmektedir (Gültekin ve ark., 2008).

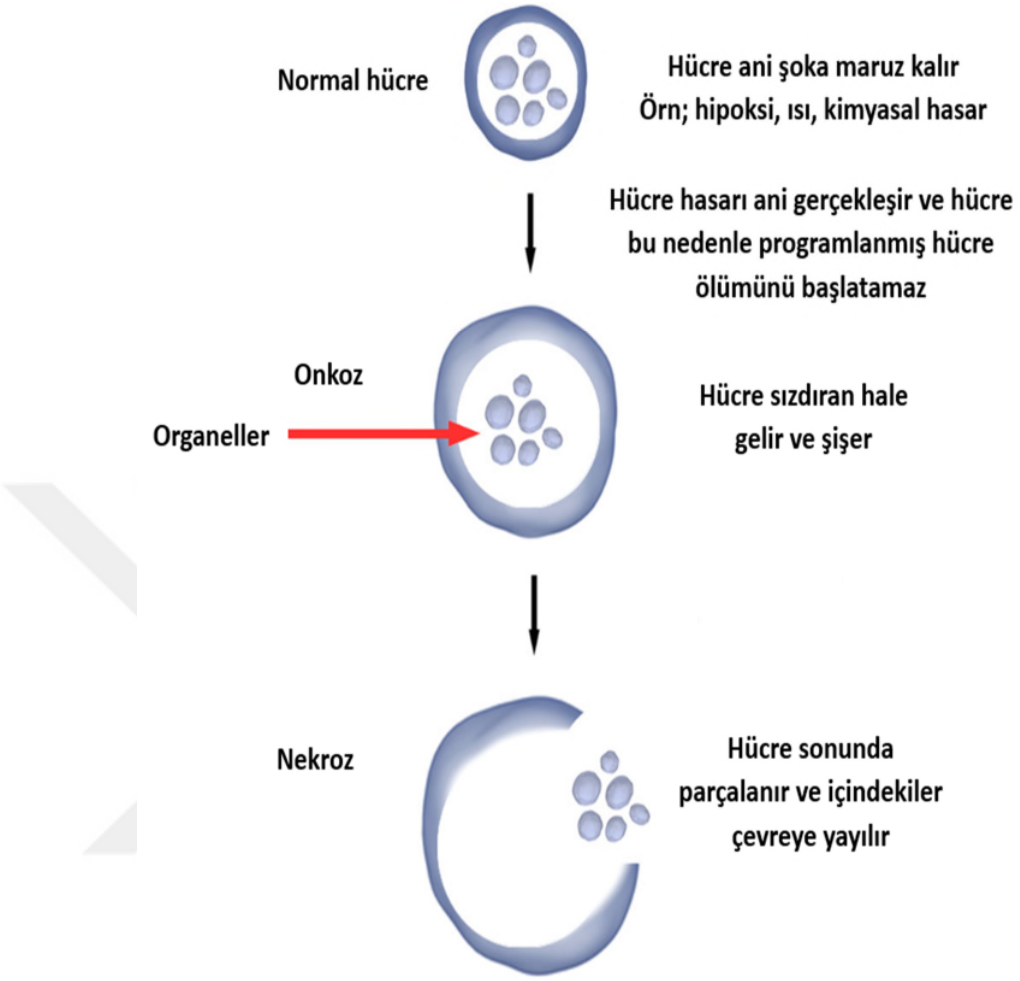
Apoptoz patolojik ve fizyolojik olarak farklı yolaklarla gerçekleşmektedir ve bunlardan en önemlileri; intrinsik ve ekstrinsik yolaklardır (Şekil 9) (Aktuğ, 2014; Darcy, 2019):

- **İntirinsik yolak:** Hücre içindeki sinyallerle (pH azalması, gen seviyesindeki toksik hasar, DNA hasarına bağlı hücre siklusu bozuklukları, endoplazmik retikulum stresi, mitokondriyal hasar gibi) başlayan yolak olarak tanımlanmaktadır (Aktuğ, 2014; Darcy, 2019).
- **Ekstrinsik yolak:** Hücre membranındaki ölüm reseptörlerine ölüm aktivatörlerinin (doğal öldürücü hücreler ve T hücreleri, makrofajlar gibi) bağlanmasıyla başlayan yolak olarak tanımlanmaktadır (Aktuğ, 2014; Darcy, 2019).



Şekil 9. Apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yolaklarının başlıca bileşenlerinin özeti (Darcy, 2019)

Nekroz: Nekroz, genler tarafından kontrol edilmeyen ve düzensiz gerçekleşen bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Fiziksel ve kimyasal dış etkenlerle (toksik maddeler, ağır metaller, ısı, yanma gibi) hücrenin iyon dengesi bozulmaktadır. Mitokondriyal reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi artmakta ve ATP üretiminin azalmasıyla hücre sıvı alarak organeller şişmektedir. Osmotik basıncın artmasıyla birlikte, hücre membran bütünlüğü bozularak patlar ve hücrenin içeriği hücrelerarası boşluğa yayılarak enflamasyona neden olmaktadır (Şekil 10) (Canpolat, 2016; Darcy, 2019).



Şekil 10. Normal bir hücrenin nekrotik hücreye dönüşümünün özeti (Darcy, 2019)

Apoptoz ve nekroz, hücre ölümünün iki temel yolu olup, biri kontrollü bir düzen sağlarken diğeri düzensiz bir yıkıma yol açmaktadır; bu süreçlerin mekanizmalarının anlaşılması, hastalıkların tedavisinde hedefe yönelik yaklaşımlar geliştirilmesi ve hücresel dengeyi korumaya yönelik stratejiler oluşturulması açısından hayati öneme sahip olduğu bilinmektedir (Tablo 11) (Celepli, 2020; Coşkun ve ark., 2011).

Tablo 11. Apoptoz ve nekroz farkları (Celepli, 2020; Coşkun ve ark., 2011)

Kriter	Apoptoz (Programlı Hücre Ölümü)	Nekroz (Patolojik Hücre Ölümü)
Yol Açan Nedenler	- **Fizyolojik:** Büyüme hormonu eksikliği, hücre yaşlanması - **Kimyasal:** Antineoplastik ilaçlar, yüksek glukokortikoid düzeyi - **Hafif Stres:** Ölüm reseptör aktivasyonu (Fas, TNF), sitotoksik T lenfositler	- **Travmatik:** İskemi, hipertermi, hipoksi - **Toksik:** Litik viral enfeksiyon, toksik maddeler, ağır metaller - **Şiddetli Stres:** Şiddetli oksidatif stres
Hücre Morfolojisi	- Hücre **küçülür**, zar yapısı korunur - Kromatin yoğunlaşır, organeller sağlam kalır - Apoptotik cisimcikler oluşur	- Hücre **şişer**, zar yapısı bozulur - Organeller parçalanır, hücre içeriği dışarı sızar - Büyük vakuoller ve hücre lizisi görülür
Enerji Kullanımı	- **ATP gerektirir:** Kontrollü ve enerjiye bağlı bir süreçtir	- **ATP gerektirmez:** Pasif ve düzensiz bir süreçtir
DNA Hasarı	- DNA, belirgin düzenli parçalara ayrılır (**jel elektroforezinde merdiven görünümü**)	- DNA, rastgele şekilde parçalanır (**jel elektroforezinde dağınık görünüm**)
Sonuçlar	- Hücreler tek tek veya az sayıda ölür - **Enflamasyon yok**, hücre kalıntıları makrofajlarca temizlenir	- Hücre gruplar halinde ölür - Çevrede lizozomal enzimler salınır, **enflamasyona neden olur**
Doğası	- **Fizyolojik** bir süreçtir; bazen belirli patolojik koşullarda da görülebilir	- **Tamamen patolojik** bir süreçtir

Serbest radikaller: Serbest radikaller dış orbitalinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan, yüksek enerjili atom veya moleküller olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller bulundurdukları eşlenmemiş elektron nedeniyle reaksiyona girebilmektedirler. Kararlı halde bulunan atomlar veya moleküller ise serbest radikaller kadar başka moleküller ile reaksiyonlara girme eğiliminde değildir. Serbest radikaller oksijen (reaktif oksijen türleri (ROS)) ve nitrojen (reaktif nitrojen türleri (RNS)) kaynaklı olabilir (Tablo 12) (Halliwell ve ark., 2015; Valko ve ark., 2007).

Tablo 12. Serbest radikal türleri (Halliwell ve ark., 2015; Valko ve ark., 2007)

Reaktif oksijen türleri (ROS)				**Reaktif nitrojen türleri (RNS)**			
Radikaller		**Nonradikaller**		**Radikaller**		**Nonradikaller**	
Süperoksit	O_2^-	Hidrojen peroksit	H_2O_2	Nitrik oksit	NO^-	Nitrik asit	HNO_2
Hidroksil	OH^-	Hipokloröz asit	HOCl	Nitrojen dioksit	NO_2^-	Nitrosil katyonu	NO^+
Peroksil	ROO^-	Hipobromöz asit	HOBr			Nitroksil anyonu	NO^-
Alkoksil	RO^-	Singlet oksijen	O_2			Dinitrojen tetroksid	N_2O_4
Hidroperoksil	HO_2^-	Ozon	O_3			Dinitrojen trioksid	N_2O_3
Lipid peroksil	LOO^-					Peroksinitrit	$ONOO^-$
						Peroksinitrik asit	ONOOH
						Nitronyum katyonu	NO_2^+
						Nitril klorid	NO_2Cl
						Alkil peroksinitrit	ROONO

Serbest radikaller endojen ve eksojen kaynaklar tarafından meydana getirilebilir, hücrede ve çevrede sürekli olarak üretilebilmektedir (Tablo 13) (Halliwell ve ark., 2015; Valko ve ark., 2007).

Tablo 13. Serbest radikal kaynakları (Halliwell ve ark., 2015; Valko ve ark., 2007)

Kaynak Türü	Kaynak	Açıklama
Endojen	Mitokondriyel Solunum	Elektron transport sistemi tarafından katalize edilen serbest radikal yan ürünlerinin oluşumu.
	Enflamasyon Süreci	Sitokinlerin serbest bırakılmasıyla nötrofiller ve makrofajların serbest radikal üretimi.
	Enzimatik Reaksiyonlar	Ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, sitokrom P450 sistemi gibi enzimlerin elektron kaçaklarıyla radikal üretimi.
	Stres Faktörleri	Zihinsel veya fiziksel stres sonucu toksik yan ürünlerin serbest radikal üretimine neden olması.
	Bağışıklık Yanıtı	Patojenlere karşı immün sistem hücrelerinin ROS ve oksijen radikalleri üretmesi.
Eksojen	UV ve Diğer Işınlar	UV, X-ışınları, gama ışınları ve mikrodalgaların serbest radikal üretimine yol açması.
	Yanma ve Doğal Olaylar	Pişirme, orman yangınları, volkanik faaliyetler sırasında serbest radikal oluşumu.
	Hava Kirleticiler	Asbest, benzen, karbonmonoksit, formaldehit gibi hava kirleticilerin serbest radikal üretimine katkısı.
	Kimyasal Maddeler	Temizlik ürünleri, boya, böcek ilaçları gibi kimyasalların serbest radikal üretmesi.
	Su Kirleticiler	Kloroform ve diğer trihalometanların su kirliliği yoluyla serbest radikal oluşumuna neden olması.
	Yaşam Tarzı Faktörleri	Alkol, sigara, egzoz dumanı gibi alışkanlık ve çevresel faktörlerin serbest radikal üretmesi.

ROS ve RNS'nin düşük yoğunlukta olduklarında; fagositozla enfeksiyonlara karşı savunma, sitokrom p450 tarafından ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, sitotoksik lenfositler ve makrofajlar tarafından kanser hücrelerini öldürme, mitokondride ATP üretimi gibi yararlı etkilerinden söz edilebilmektedir. Ancak serbest radikallerin birikimi arttıkça zararlı etkilerin de ortaya çıktığı bilinmektedir. Oksidan düzeyinin artmasıyla vücutta farklı mekanizmalarla; kardiyovasküler hastalıklar, solunum ve boşaltım bozuklukları, gastrointestinal hastalıklar,

diyabet, kanser, infertilite gibi birçok hastalığa neden olabilmektedir (Tablo 14) (Halliwell ve ark., 2015; Valko ve ark., 2007).

Tablo 14. Serbest radikallerin zararları (Halliwell ve ark., 2015; Valko ve ark., 2007)

Etkilenen Bileşen	Zarar Mekanizması	Sonuçları
Lipitler	- Lipit peroksidasyonu ile membran akışkanlığı ve geçirgenliği bozulur. - Karbon radikallerinin oluşumu ve lipit hidroperoksit üretimi.	Hücre membranına zarar vererek toksik yan ürünlerin oluşumuna ve hücre fonksiyonlarının bozulmasına neden olur.
Proteinler	- Sülfür içeren amino asitlerin oksidasyonu. - Protein hidroperoksitlerin ve diğer reaktif ürünlerin oluşumu.	Yapısal proteinler ve enzimler hasar görür, işlevselliği azalır ve oksitlenmiş proteinler birikerek yaşlanma ve hastalıkları tetikler.
DNA	- OH. radikali DNA şeker parçasından hidrojen atomlarının kaybına neden olur. - Pürin ve pirimidinlerde oksidatif hasar oluşturur.	DNA fragmantasyonu, programlanmış hücre ölümü ve NAD+ tükenmesi ile genetik bütünlük bozulur.
Karbonhidratlar	- Serbest radikallerin karbonhidrat molekülleri ile reaksiyonu. - Zincir kırılmalarına neden olan karbon merkezli radikallerin oluşumu.	Karbonhidrat moleküllerinde yapı bozuklukları meydana gelir, örneğin hyaluronik asit zincir kırılmaları.

Oksidatif stres, vücutta serbest radikallerin üretiminin, bu radikalleri nötralize eden antioksidan savunma mekanizmalarından daha fazla olduğu durumdur. Oksidatif stresin kontrolsüz bir şekilde devam etmesiyle, serbest radikallerin hücresel yapıların zarar görmesine yol açmasına oksidatif hasar denir. Serbest radikaller hücre membranında yağ asitlerinin oksidasyonuna ve lipit peroksidasyonuna neden olarak; hücre membranının iyon geçirgenliğini arttırabilir, membran akışkanlığında bozulmaya neden olabilmektedir. Enflamasyon meydana gelmiş hücrelerin akut ya da kronik olarak karaciğere göç etmesi sonucu hepatosit hasarı ve enflamasyon varlığında da hepatit oluşmaktadır. Enflamasyon ya da toksik hasara cevap olarak fibrotik doku birikimi sonucu oluşan fibroz, karaciğerin tamamına yayılmış bir etki göstererek mikrovasküler yapının yeniden organize olmasına sebep olmaktadır. Siroz ise; karaciğerde fibroz doku ve nodül oluşumu ve nekroz ile karakterize bir hastalıktır ve kronik viral hepatit B, hepatit C, ve hepatobiliyer hastalıklara sahip bireylerde görülebilmektedir. Siroz, hepatosellüler

karsinoma için ana risk faktörü olarak kabul edilmekte ve karsinomanın gelişiminde oksidatif stres ile ilişkiye dikkat çekilmektedir (Yılmaz, 2021).

Biyokimyasal parametreler: Hastalığın tespiti, tanısal çalışmaların yönlendirilmesi, ciddiyetin tahmin edilmesi ve tedavinin değerlendirilmesi için biyokimyasal parametreleri ölçen testlere ihtiyaç vardır. Karaciğerin fonksiyon testleri ile de ölçülen enzim serum seviyeleri, karaciğer fonksiyonlarının göstergesi değildir ancak enflamasyondan nekroza uzanan bir spektrumdaki hepatobiliyer hasarın göstergesi olarak kullanılmaktadır (Mukherjee ve ark., 2011).

Sarılığın tanısında serum alkalin fosfataz seviyesi ve serum transaminaz değerlerine bakılmaktadır. Serumda konjuge olmayan bilirubinde izole bir artış, Gilbert sendromunu veya hemolizi düşündürmektedir. Karaciğer hücre hasarının şiddeti, K vitamininden sonra serum toplam bilirubin, albümin, transaminaz ve protrombin zamanının seri ölçümüyle değerlendirilmektedir. Minimal hepato-hücre hasarının tanısı için, minimal olarak yükselmiş serum transaminaz değerleri ve bazen serum bilirubini göz önünde bulundurularak değerlendirilebilir. γ-glutamil transpeptidaz özellikle alkolik karaciğer hasarı ve sirozda değerlendirilebilmektedir. Hepatik kanserlerde, amiloid hastalığında veya retiküloz gibi hepatik infiltrasyonlarda, sarılık olmadan yükselmiş serum alkalin fosfataz değerleri ölçülmektedir (Tablo 15) (Mukherjee ve ark., 2011).

Tablo 15. Hepatobiliyer hastalıklarda temel serum değerleri (Mukherjee ve ark., 2011)

Test	Normal Aralık	Değer
Bilirubin		
- Toplam	5–17 µmol/l	Sarılık teşhisi; şiddeti değerlendirme
- Konjuge	<5 µmol/l	Gilbert sendromu, hemoliz
Alkalen fosfataz	35–130 IU/l	Kolestazis, hepatik infiltrasyon teşhisi
Aspartat transaminaz (AST)	5–40 IU/l	Hepatoselüler hastalığın erken teşhisi; ilerlemenin izlenmesi
Alanin transaminaz (ALT)	5–35 IU/l	Alkolizmde ALT, AST'den nispeten daha düşüktür
γ-glutamil transpeptidaz (γ-GT)	10–48 IU/l	Alkol kötüye kullanımı teşhisi, biliyer kolestaz belirteci
Albumin	35–50 g/l	Şiddeti değerlendirme
γ-globulin	5–15 g/l	Kronik hepatit ve siroz teşhisi; hastalığın seyrini izleme
Protrombin zamanı (PT)	12–16 s	Şiddeti değerlendirme

Aspartat transaminaz (AST) kalp, karaciğer, iskelet kası ve böbrekte büyük miktarlarda bulunan bir mitokondriyal enzimdir ve bu dokular akut olarak tahrip olduğunda hasarlı hücrelerden salınarak serum seviyesi artmaktadır. Alanin transaminaz (ALT) karaciğerde de bulunan bir sitosolik enzimdir. Daha az miktarlarda kalp ve iskelet kaslarında da bulunmaktadır. Bu sebeple, serumdaki artışı karaciğer hasarı tespiti için AST'ye göre daha spesifiktir. Yükselmiş aminotransferaz seviyeleri, genellikle obezite, diyabet, alkol kötüye kullanımı, hepatik ilaç reaksiyonu veya dolaşım yetmezliğinden kaynaklanmaktadır ve ayrıca kronik viral ve otoimmün hepatit ve hemokromatozis düşünülmektedir (Mukherjee ve ark., 2011).

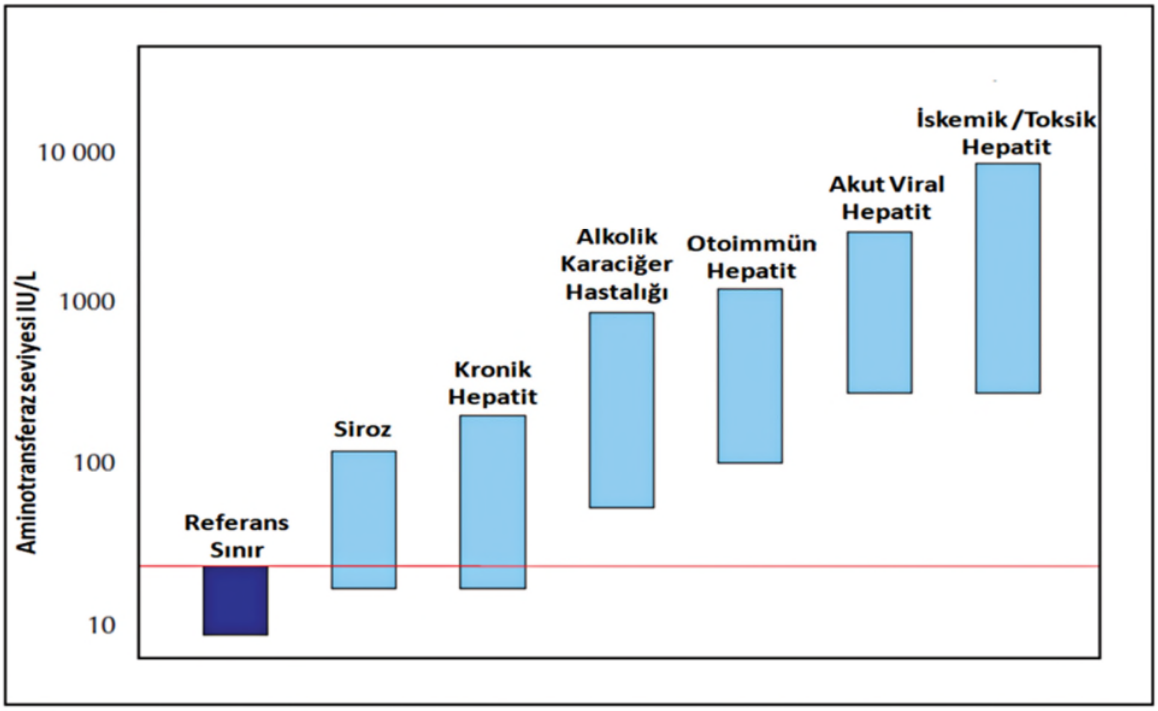
Bu enzimlerin kanda artışı karaciğer hasarı göstergesidir, karaciğer fonksiyonunu göstermemektedir. Normal ALT seviyeleri erkekler için 29–33 IU/L, kadınlar için 19–25 IU/L arasında değişmektedir (Tablo 16) (Bayraktar ve ark., 2019).

Tablo 16. Karaciğer enzim düzeylerindeki yüksekliğe göre derecelendirme (Bayraktar ve ark., 2019)

Enzim Derecesi	AST ve/veya ALT
Sınırda	<2xNÜS
Hafif	2-5xNÜS
Orta	5-15xNÜS
Ciddi	>15xNÜS
Masif	>10.000 IU/l

NÜS: Normalin üst sınır

Kesin bir sınır değer olmasa da, karaciğer enzimlerinin sık rastlanılan hastalıklardaki değerleri Şekil 11'de gösterilmektedir. Referans sınırlarını 10–20 kat aşan aminotransferaz düzeylerinin daha çok viral, toksik veya iskemik hepatitlerde görülebileceği, alkolik ve otoimmün hepatitlerde bu sınırın üzerinde veya altında değerlerin ölçülebileceği, kronik hepatitler veya sirozda da normali 1–5 kat aşan değerlerin görülebileceği raporlanmıştır (Bayraktar ve ark., 2019).



Şekil 11. Karaciğer enzimlerinin hastalıklardaki düzeyleri (Bayraktar ve ark., 2019)

Karaciğer enzimlerinin yüksekliğinin değerlendirilmesinde; De Ritis oranı yaygın olarak kullanılmaktadır. AST ve ALT seviyeleri arasındaki bu oran, bu iki enzim arasındaki ilişkinin her bir hastalığa özgü değerlendirilebilmesine olanak tanımaktadır (Tablo 17) (Bayraktar ve ark., 2019).

Tablo 17. De Ritis oranına göre bazı hastalıkların değerlendirilmesi (Bayraktar ve ark., 2019)

AST/ALT≤1	AST/ALT>1	AST/ALT>4
Akut karaciğer hastalıkları	Siroz	Fulminan karaciğer hastalığı
Nonalkolik steatohepatit	Alkolik hepatit	Wilson hastalığı
Kolestatik sarılık	İnfiltratif nedenler	
Hepatit C		

Karaciğer enzimlerinin değerlendirilmesinde enzim yüksekliğinin seyir hızı da hastalıkları değerlendirme konusunda dikkate alınması gerektiği bildirilmiştir. Hızlı ve kısa sürede enzimlerin yükselmesi daha çok vasküler ve toksik nedenleri düşündürürken; yavaş ve uzun sürede enzimlerin yükselmesiyse daha çok viral hepatitler ve metabolik nedenleri akla getirmektedir (Tablo 18) (Bayraktar ve ark., 2019).

Tablo 18. Aminotransferaz yüksekliği seyir hızlarına göre hastalıklar (Bayraktar ve ark., 2019)

Hızlı Seyir	Yavaş Seyir
İskemik hepatit	Viral hepatit
Akut biliyer obstrüksiyon	Metabolik hastalık
Fulminan hepatit	Otoimmün hepatit
Kısa yarı ömürlü ilaçlar	Uzun yarı ömürlü ilaçlar

Serum bilirubini hem kolestatik hem de hepato-hücresel hastalıkta artabilir ve buna karaciğer enzimlerinde artış eşlik edebilmektedir. Ayrıca idrarda ürobilinojen testi de karaciğer hastalıklarının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Mukherjee ve ark., 2011).

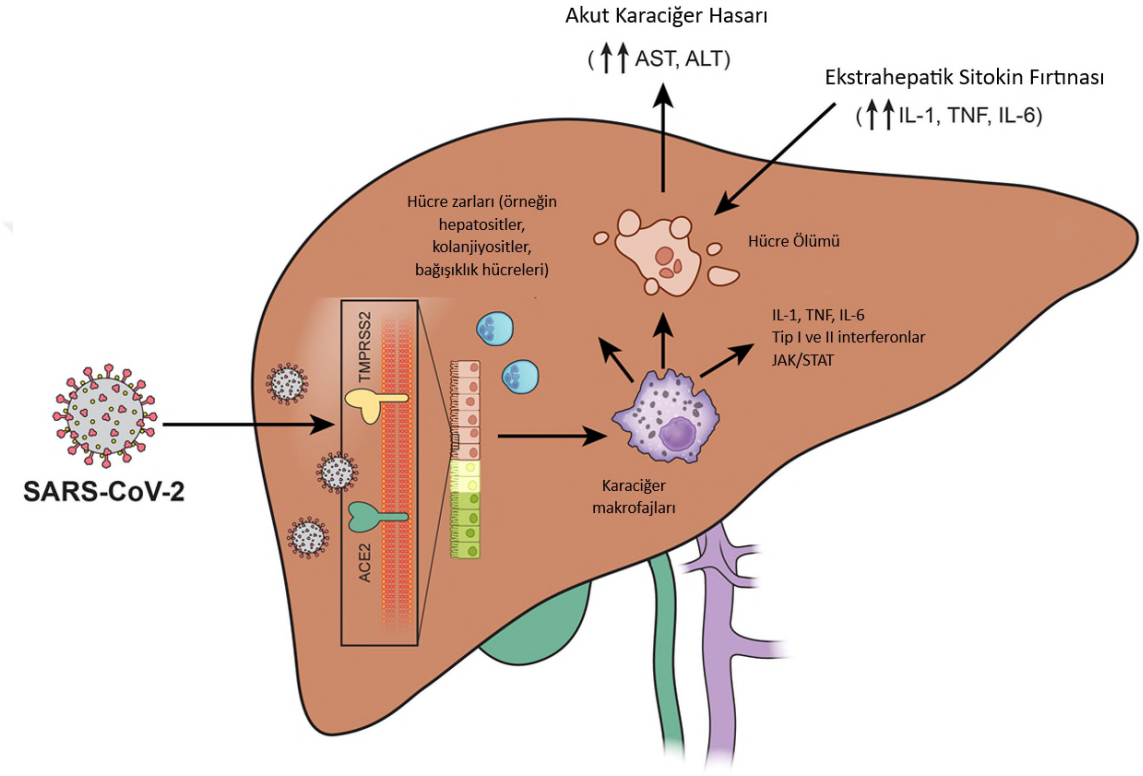
Üre ölçümü de karaciğer hastalıklarının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Kronik karaciğer hastalığında üre sentezinin belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. Düşük kan üre konsantrasyonu, şiddetli karaciğer yetmezliğinde görülen özelliklerden biridir. Kan amonyak seviyesindeki artış de Krebs üre döngüsünün başarısızlığını gösterebilmekte ve bu artış hepatik ensefalopati ile ilişkilendirilebilmektedir (Mukherjee ve ark., 2011).

4.3.2. COVID-19 ve karaciğer hasarı

SARS-CoV-2'nin neden olduğu Coronavirüs Hastalığı 2019 (COVID-19), başlangıçta öncelikle iki taraflı interstisyel pnömoniye ve potansiyel olarak ciddi solunum yetmezliğine yol açan bir akciğer hastalığı olarak ortaya çıktı. Bununla birlikte, COVID-19'un, özellikle de en şiddetli formunun, yalnızca akciğer hastalığından ziyade sistemik bir hastalık olduğu ortaya çıktı ve çeşitli çalışmalar, karaciğer ve safra yolları da dahil olmak üzere birçok organ ve sistemin etkilenebileceğini gösterdi (Casalini ve ark., 2022).

COVID-19'da karaciğer tutulumu muhtemelen en az üç mekanizmanın sonucudur:

- SARS-CoV-2'nin hepatositlere ve kolanjiyositlere neden olduğu doğrudan hasar
- Inflamasyonun neden olduğu vasküler ve hücresel hasar
- İlaca bağlı karaciğer hasarı (DILI) (Casalini ve ark., 2022).



Şekil 12. SARS-CoV-2 karaciğer enfeksiyonunun patofizyolojik kavramları (Dufour ve ark., 2022)

SARS-CoV-2 enfeksiyonu sıklıkla önceden karaciğer hastalığı olmayan veya önceden karaciğer hastalığı olan hastalarda artan transaminazlarla kanıtlanan akut karaciğer hasarı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. ACE2 reseptörü ve SARS-CoV-2 ko-reseptör transmembran serin proteaz 2 (TMPRSS2) gibi bu virüs için anahtar konakçı reseptörler; hepatositler, kolanjiyositler, bağışıklık hücreleri veya karaciğer progenitör hücreleri gibi çeşitli karaciğer hücrelerinde eksprese edildiği ve akut karaciğer hasarının; IL-1 (interlökin), TNF (tümör nekroz faktörü) veya IL-6 gibi hepatik ve sistemik sitokin üretiminin artmasıyla ilişkili olduğu bilinmektedir (Şekil 12). Ayrıca şiddetli SARS-CoV-2 enfeksiyonu, hepatik tip I ve II interferon yanıtının ve ilişkili JAK (Janus Kinaz) -STAT (sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü) sinyallemesinin yukarı regülasyonu (upregülasyonu) ile karakterize edilmektedir. Monositler ve makrofajlar, SARS-CoV-2 enfeksiyonunda sıklıkla gözlemlenen "sitokin

fırtınasında" başlıca sitokin üreticileri olarak kabul edilmektedir. Büyük sitokin üretiminin karaciğer hücresi ölümüne neden olduğu düşünülmektedir (Dufour ve ark., 2022).

COVID- 19'daki karaciğer hasarının şiddet spektrumu, aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) ve bilirubin düzeylerinde (hastaların %50'sine kadar) hafif/orta ve geri dönüşümlü artıştan nadir görülen akut karaciğer yetmezliği olgularına kadar geniş olduğu bildirilmiştir. Önceden var olan bir karaciğer hastalığının, COVID-19'dan daha kötü sonuçlarla ilişkili olduğu ve altta yatan karaciğer hastalığının şiddeti ne kadar yüksekse, ölüm riskinin de o kadar yüksek olduğu belirtilmiştir (Casalini ve ark., 2022).

Ocak 2020'ye kadar Çin'deki 552 hastanede COVID-19 nedeniyle hastaneye yatırılan 1099 hasta arasında yapılan araştırma sonucunda; hastaların çoğunda yüksek düzeyde C-reaktif protein; daha az yaygın olarak da alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, kreatin kinaz ve d-dimer düzeylerinde yükselme bulunmuştur (Guan ve ark., 2020).

Aralık 2019-Ocak 2020 tarihleri arasında Çin'in Wuhan kentinde hastaneye kaldırılan 41 COVID-19 pnömonisi hastasının %37'sinde, proinflamatuar sitokinlerde (IL1B, IL6, IL2, IFN gama) eş zamanlı yükselmelerle birlikte, serum AST yükselmeleri (yoğun bakım ünitesindekilerin %62'si ve olmayanların %25'i) görülmüştür ve bu hastaların %15'inde ölüm meydana gelmiştir (Huang ve ark., 2020).

Ayrıca ilk olarak, dekompanse sirozu olan 56 yaşındaki kadın hastanın COVID-19 sebebiyle hastaneye başvurusunda sarılık ve karaciğer fonksiyonunda kötüleşme (bilirubin 9,4'ten 17,8 mg/dL'ye, ALT 94'ten 275 U/L'ye, AST 184'ten 880 U/L'ye, Alk P 128'den 195 U/L'ye, INR 1,92'den 2,6'ya yükselmiştir) görülmüştür ve COVID-19'un tedavi edilmesiyle karaciğer fonksiyonları başlangıç seviyesine geri döndüğü tespit edilmiştir. Kronik zeminde akut karaciğer yetmezliği görülen bu ilk olguyla birlikte, siroz gibi önceden mevcut ilerlemiş karaciğer hastalığı olan hastalarda hepatik hasara daha fazla dikkat edilmesi gerektiği ve COVID-19 enfeksiyonunun neden olduğu karaciğer yetmezliği riskinin izlenmesi gerektiği vurgulanmıştır (Qui ve ark., 2020).

ABD'de COVID-19 sebebiyle hastaneye yatırılan 1827 hastayı kapsayan retrospektif kohort çalışmasında yaygın olarak karaciğer testlerinde anormali gözlenmiştir. Çalışma sonucunda anormal karaciğer testleri ile COVID-19 arasında ilişki kurulsa da, eş zamanlı olarak COVID-19 tedavisinde kullanılan ilaçlar da (lopinavir/ritonavir, hidroksiklorokin, remdesivir ve

tosilizumab) karaciğer transaminazlarında normalin üst sınırının 5 katından fazla yükselmelerle ilişkilendirilmiştir (Hundt ve ark., 2020).

Pandeminin başlangıcından bu yana birçok aday ilaç (örn. remdesivir, lopinavir/ritonavir, tosilizumab, interferon veya deksametazon) COVID-19 hastalarında test edilmiştir ve bunların çoğu daha önce başka hastalıkları tedavi etmek için kullanılmıştır ve hepatotoksik potansiyelleri zaten bilinmektedir. Aday ilaçları COVID-19 hastalarında test etmek için yapılan araştırmaların ise, farklı derecelerde bir dizi hepatik/safra advers olayı bildirilmiş, ancak çalışma ilacı ile nedensellik ilişkisinin her zaman net olmadığı raporlanmıştır (Casalini ve ark., 2022).

Bilindiği üzere; karaciğere ilaç alımı, metabolizma ve son atılım sürecinin tamamı, geniş protein aileleri tarafından kontrol edilmektedir. İlaçlar hepatositlere pasif olarak veya çözünen taşıyıcılar (SLC'ler), organik anyon taşıyan polipeptitler (OATP'ler), organik anyon taşıyıcı (OAT) ailesi ve organik katyon taşıyıcıların (OCT'ler) üyeleri dahil olmak üzere bazolateral plazma zarında bulunan bir dizi taşıyıcı tarafından alınmaktadır. İlaçlar, alındıktan sonra faz I ve faz II enzimatik reaksiyonlarla metabolize edilmektedir. Faz I metabolizması, öncelikle reaktif metabolitler oluşturmak için ilaçların sitokrom P450 (CYP450) tarafından oksidasyonu ve indirgenmesiyle ilgilenirken, faz II metabolizması, ilaçların veya faz I metabolitlerinin endojen moleküllere bağlanmasıyla ilgilidir. ATP Bağlayıcı Kaset (ABC) taşıyıcıları daha sonra ilacın ve metabolitlerinin hepatositlerden safraya veya müteakip renal atılım için tekrar kan sinüzoidlerine akışına aracılık etmektedir. Hepatositlerin artan hücresel strese maruziyetinin, DILI gelişimindeki ilk adım olduğu varsayılmaktadır. İlk hücre hasarı, ilaçlar ve/veya bunların reaktif metabolitleri tarafından kovalent bağlanma veya mitokondriye doğrudan hasar yoluyla indüklenir, bu da oksidatif strese ve stres algılayan sinyal yolaklarının aktivasyonuna, mitokondriyal fonksiyonun bozulmasına ve endoplazmik retikulum (ER) stresine yol açmaktadır. İlaç metabolizması sırasında reaktif metabolitlerin üretimi, hücrelere ve dokulara daha fazla zarar veren reaktif oksijen türlerinin (ROS) şiddetlenmesiyle mitokondriyal oksidatif streste büyük bir artışa neden olmaktadır. Yaralı/hasarlı hepatositlerden reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, genel oksidatif stresi arttırmakta ve hasarla ilişkili moleküler modellerin (DAMP) salınması, doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini aktive ederek apoptotik ve nekrotik yolların aktivasyonuna neden olmaktadır. Açıklanan bu ilaç metabolizması sürecine göre, karaciğere antiviral ilaç girişi, bu iki yolla metabolize edilen ilaçların redoks ve atılımını etkileyebilecek CYP enzimlerinin ve taşıyıcı proteinlerin aktivitesini inhibe etmektedir. Bu da, sırayla DILI'ye neden olan bir homeostaz dengesizliğine yol açabilmektedir. Yapılan bir araştırmada; COVID- 19 hastaları arasında kümülatif akut

karaciğer hasarı prevalansı %23,7 (%16,1-%33,1) olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle, antiviral ilaçların CYP enzimlerini ve karaciğer taşıma proteinlerini inhibe ederek COVID-19 hastalarında DILI'ye neden olabileceğini varsayılmıştır. Bu varsayımdan yola çıkarak yapılan derleme çalışmasına göre; favipiravir ile bağlantılı karaciğer fonksiyon anormalliklerinin insidansı %6,8 ile %44, remdesivir %1,7 ile %46,2, lopinavir-ritonavir %1,1 ile %63,4 ve hidroksiklorokin %1,6 ile %10,7 arasında değiştiği raporlanmıştır. Antiviral ilaçların, bu yüksek insidanslardan sorumlu olabilecek CYP enzimleri ve karaciğer taşıma proteinleri üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu ve CYP enzimlerini ve hepatik taşıyıcı proteinleri inhibe ederek, bir biyokimyasal stres reaksiyonları dizisini başlatan ve sonunda hepatosit nekrozu ve apoptoz ile sonuçlanan reaktif kimyasalların birikmesine neden olduğu sonucuna varıldığı bildirilmiştir. Mevcut çalışmaya molnupiravir verilerinin dahil edilmemesine rağmen; sonuç değerlendirmesinde, COVID-19 salgını süresince güncellenen çeşitli kılavuzlardan yola çıkarak; hidroksiklorokin ve lopinavir/ritonavir önerilmediği ve remdesivir yalnızca ciddi hastalarda şartlı kullanım için önerildiği; öte yandan molnupiravirin şiddetli olmayan COVID-19'lu hastalarda hastaneye yatış riski en yüksek olan hastalarda kullanılması için koşullu önerisi olduğu ve advers olay insidansını artırmadan COVID-19 hastalarında mortalite ve hastaneye yatış oranlarını azaltmada etkili olduğunu ve böylece iyi bir genel güvenlilik profili sergilediğini düşünülmektedir. Ancak yine de, bu bulguları doğrulamak için ek araştırmalara ihtiyaç olduğu vurgulanmıştır (Li ve ark., 2022).

Yine COVID-19 tedavisinde kullanılan ilaçların farmakokinetiği üzerine yapılan bir araştırmada; ilaçların metabolik enzim ve taşıyıcı aracılı etkileşimlerine bakıldığında, molnupiravir için sadece dengeleyici nükleosid taşıyıcıları olan ENT1 ve ENT2 listelenmiştir (Nwabufo ve ark., 2022). Yine COVID-19 tedavisinde kullanılan ilaçların ilaç-ilaç etkileşim potansiyeli üzerine yapılan bir araştırmada; molnupiravir için mevcut veri olmadığı gözükmektedir ve molnupiravir tedavisinde daha iyi doz rejimi için ilaç-ilaç etkileşimlerinin bilinmesi gerektiği değerlendirilmiştir (Kumar ve ark., 2021). İmmünomodülasyonun, ilaç metabolizmasını ve farmakokinetiğini değiştirerek COVID-19 ilaçlarının etkinliğini gösteren bir araştırmada ise; molnupiravir için taşıyıcı aracılı ilaç-ilaç etkileşimi mekanizmasının belirsiz olduğu gösterilmiştir (Kumar ve ark., 2022).

4.3.3. İlaca bağlı karaciğer hasarı (DILI)

İlaca bağlı karaciğer hasarı (DILI), gastroenterologlar tarafından görülen akut karaciğer hasarı olgularının <%1'ini oluşturmaktadır, ancak ABD ve Avrupa'da akut karaciğer yetmezliğinin en yaygın nedeni olduğu değerlendirilmiştir. Fransa ve İzlanda'daki anketlere göre DILI, 100.000 kişi başına yıllık yaklaşık 14-19 oranında görülmüştür. DILI'nin aynı zamanda ilaç geliştirmede bileşiklerin yıpranmasının önde gelen nedenlerinden biri olduğu ve ilacın geri çekilmesi, kısıtlamalar ve proje sonlandırmalarının en yaygın iki nedeninden biri olduğu belirtilmiştir. 1969 ile 2002 yılları arasında piyasadan çekilen 76 ilaçtan 12'si karaciğer hasarına bağlanmıştır. İlaçların onayı sırasında tespitten kaçan karaciğer sinyalleri, pazarlama sonrası kısıtlamalarla sonuçlanırken (örn., 2013'te pazopanib, temozolomid ve flupirtin), yanlış pozitif DILI kararı riski de, gereksiz yıpranmaya yol açarak DILI ile ilişkili önemli ekonomik sorunlara olumsuz yönde katkıda bulunabildiği belirtilmiştir (Kullak-Ublick ve ark., 2017).

Başka bir araştırmada ise; DILI'nin çok önemli bir tehdit oluşturduğu ve en sık rapor edilen spesifik toksisite hedefi olduğundan, yeni kimyasal maddelerin güvenlilik testlerinde birincil endişe kaynağı olduğu belirtilmiştir. DILI'nin ilaç geliştirmede ortaya çıkması, yüksek zaiyat oranlarına ve hatta piyasaya arz sonrası ilacın geri çekilmesine neden olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, iyi *in vitro* metodolojiler; ilaç geliştirme sürecinin başlarında potansiyel hepatotoksik bileşiklerin belirlenmesine, sağlık tehlikelerinin azaltılmasına ve endüstri için maliyet etkinliğinin iyileştirilmesine yardımcı olmaktadır (Cuykx ve ark., 2018). Yapılan bir araştırmada; 1953 ile 2013 yılları arasında 462 tıbbi ürünün piyasadan çekilmesinde en yaygın olan nedenin hepatotoksisite olduğu raporlanmıştır (81 olgu; %18) (Onakpoya ve ark., 2016).

DILI'nin klinik belirtilerinde, şiddetinde ve sonuçlarında yüksek bir heterojenite gözlendiği belirtilmiştir. Toksik karaciğer hasarı, karaciğer enzimlerinin serum seviyelerinde asemptomatik ve geçici yükselmelerden fulminan karaciğer yetmezliğine kadar değişen geniş bir klinik spektruma sahip olduğu ve klinik uygulamada, hepatotoksisite paternini hepatoselüler, kolestatik ve karışık olarak sınıflandırmak için alanin aminotransferaz ve alkalin fosfataz aktivite seviyelerine ve bunların nispi oranlarına dayanan konsensüs kriterlerinin kullanıldığı raporlanmıştır (Donato ve ark., 2022).

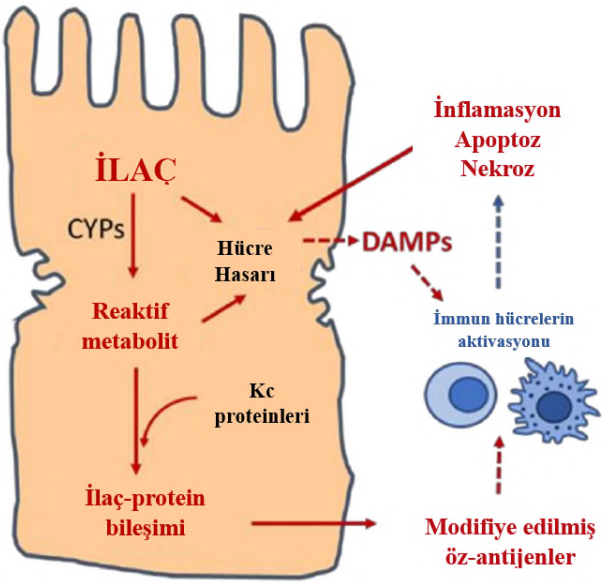
DILI hastalarının uzun vadeli sonuçlarını belirlemek için yapılan sınırlı sayıda çalışma nedeniyle, kronik hepatotoksisitenin küresel sıklığı hakkında veri olmadığı belirtilmiştir. Çeşitli ulusal prospektif çalışmalar, DILI tanısı olan hastalarda kronikliğin coğrafi insidansında büyük bir değişkenlik bildirmiştir (DILI hastalarının %5,7 ila %18,8'i). İlk tanım, DILI başlangıcından sonra 3 aydan daha uzun süre karaciğer testlerinde kalıcı anormallik olgularını içermektedir.

Daha sonra, kolestatik/mikst hasar için 6 ayın üzerindeki değişiklikler düşünülmüştür ve daha yakın zamanda, kronik DILI için en iyi tanı zamanlaması olarak 1 yıl önerilmiştir. Yaşlı hastalar, başlangıçtaki karaciğer hasarının şiddeti, DILI tanısından önce uzun süreli ilaç tedavisi veya ilaca yeniden maruz kalma, kronikleşmeye katkıda bulunabilecek ek faktörlerdir. Ayrıca; kronik DILI'nin fenotipik alt tiplerinin listesi, otoimmün benzeri DILI, steatoz, steatohepatit, fosfolipidoz, hafif kolestaz, kaybolan safra kanalı sendromu, sinüzoidal obstrüksiyon sendromu, nodüler rejeneratif hiperplazi, peliosis hepatit, hepatoportal skleroz, granülomatöz hepatit ve hepatik neoplazmaları içermektedir (Donatove ark., 2022).

2020'deki sistematik bir inceleme ve meta-analiz, COVID-19 hastalarında toplu DILI insidansının %25,4 olduğunu göstermiştir [%95 Güven Aralığı (GA), 14,2–41,4]. Remdesivir ile tedavi edilen 208 hastada DILI insidansı %15,2 (%95 GA, 6,4-32) ve lopinavir/ritonavir ile tedavi edilen 775 hastada DILI insidansı %37,2 (%95 GA, 22,7-54,6) olarak daha yüksek gözlemlenmiştir. Yine bu çalışmada hiperbilirubineminin, lopinavir/ritonavir tedavisinin en sık görülen advers etkisi olduğu ve bunu takiben aminotransferazlardaki artış görüldüğü raporlanmıştır. Ayrıca remdesivir tedavisinin sıklıkla aminotransferazların yükselmesine yol açtığı görülmüştür (Kulkarni ve ark., 2020).

Dört ana tip DILI mekanizması mevcuttur; 1) Otoimmun benzeri DILI, 2) İlaç Kaynaklı Steatoz, 3) İlaç Kaynaklı Fosfolipidoz, 4) İlaç Kaynaklı Kolestaz (Donato ve ark., 2022).

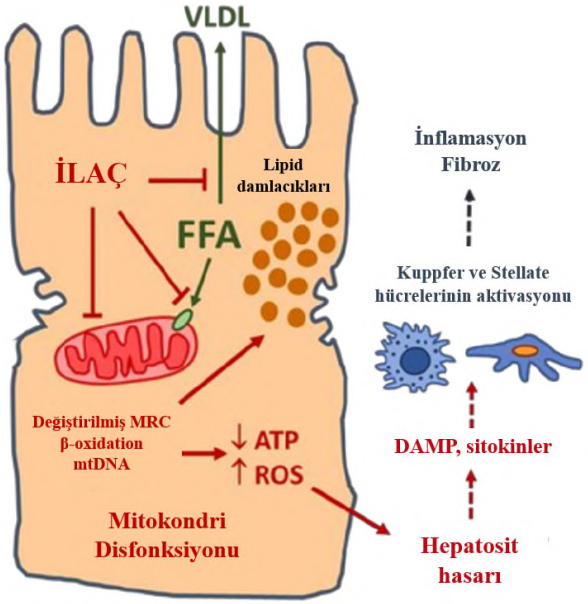
- **Otoimmun benzeri DILI:** CYP'ler ve diğer ilaç metabolize edici enzimler tarafından üretilen reaktif metabolitler, karaciğer proteinlerine kovalent olarak bağlayabilir ve kendi kendine bağışıklık hücreleri tarafından tanınan ilaçla modifiye edilmiş antijenler oluşturabilir (Şekil 13). Ana ilaç veya bunların reaktif metabolitleri tarafından indüklenen hepatosit stresinden kaynaklanan hasarla ilişkili moleküler yapıların (DAMP'ler) salınması da bağışıklık hücrelerinin aktivasyonuna katkıda bulunabilir (Donato ve ark., 2022).



Şekil 13. Otoimmun benzeri DILI mekanizması (Donato ve ark., 2022)

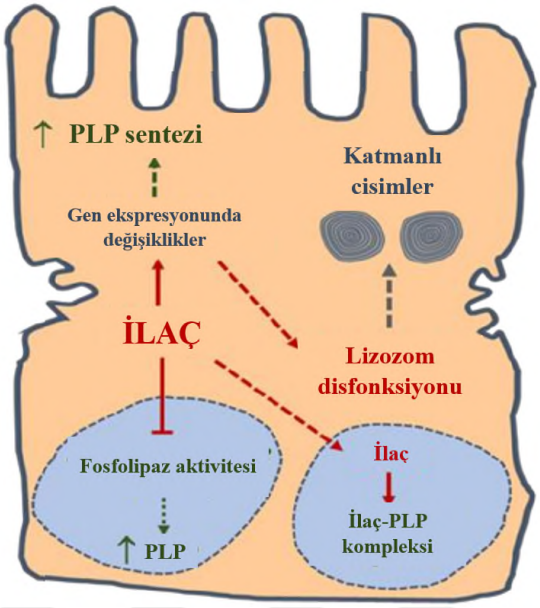
- **İlaç kaynaklı steatoz:** İlaçlar, karaciğerdeki yağ asidi (FFA) homeostazını, çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL) olarak FFA dışa aktarımındaki azalma, mitokondride FFA girişinin bozulması, mitokondriyal oksidasyon enzimlerinin doğrudan inhibisyonu, mitokondriyal solunum zincirinin (MRC) bozulması veya mitokondriyal DNA'nın tükenmesi dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla değiştirebilir. Metabolize olmayan FFA, trigliseritler oluşturmak için esterleştirilir ve hepatositlerin sitoplazmasında lipit damlacıkları olarak birikir. İlaca bağlı mitokondriyal disfonksiyon, ATP tükenmesine ve artan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna ve ardından hepatosit hasarına neden olabilir. DAMP'ler ve/veya hasarlı hepatositler tarafından salınan sitokinler tarafından Kupffer ve stellat hücrelerinin daha fazla aktivasyonu, karaciğerde inflamatuar ve fibrotik tepkileri indükleyebilir ve steatozun steatohepatite veya fibroza ilerlemesine katkıda bulunabilir (Şekil 14). Bu tip karaciğer hasarı, altta yatan bir mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna sahip olabilecek birkaç hastada tetrasiklin, amiodaron, valproik asit veya antiviral ilaçlara (fialuridin ve nükleosid ters transkriptaz inhibitörleri) maruz kaldıktan sonra bildirilmiştir. Mitokondride ilaç hasarı, steatozun daha ciddi durumlara doğru olası ilerlemesinde de önemlidir. İlacın varlığıyla ilişkili mitokondriyal metabolizmadaki değişiklikler, ATP sentezini azaltmaya, aşırı reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artırmaya ve mitokondriyal işlev bozukluğunu şiddetlendirebilecek antioksidan savunma sistemlerini

serbest bırakmaya katkıda bulunabilir. Bu nedenle, hücre içi ATP seviyelerinin tükenmesi ve oksidatif stres, daha fazla hepatosit hasarına neden olabilir. Hepatik steatozun, özellikle Batı ülkelerinde oldukça yaygın bir karaciğer hastalığı olduğunu ve birden fazla mekanizma ve risk faktörünün (obezite, metabolik sendrom, tip 2 diyabet ve ilaçlar) bir sonucu olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda, bazı ilaçların (örn. tamoksifen, metotreksat ve valproik asit), altta yatan mitokondriyal bozukluğu olan veya önceden steatozu olan hastalarda ilaç dışı nedenlerle karaciğer hasarını şiddetlendirebileceği bildirilmiştir (Donato ve ark., 2022).



Şekil 14. İlaç kaynaklı steatoz mekanizması (Donato ve ark., 2022)

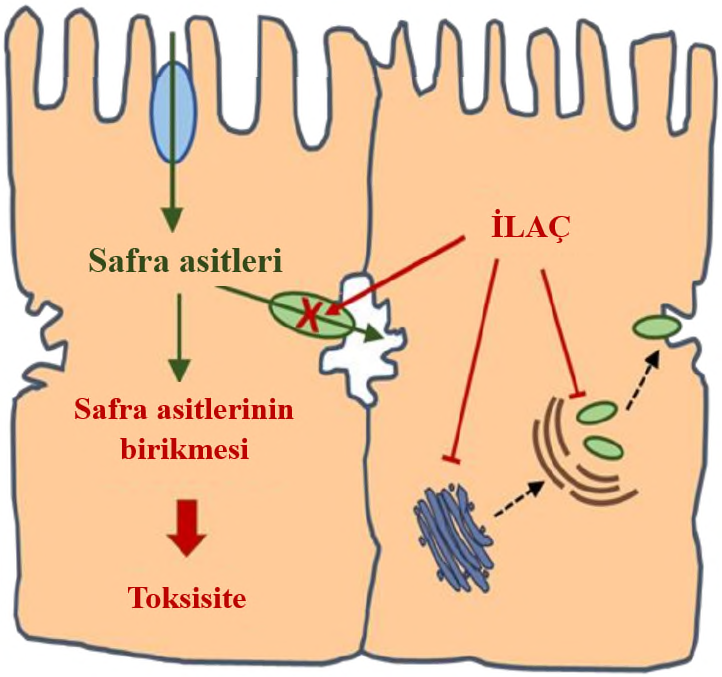
- **İlaç kaynaklı fosfolipidoz:** İlaçlar lizozomlarda birikebilir ve fosfolipazların doğrudan inhibisyonuyla veya bozunmaya dirençli ilaç-PLP kompleksleri oluşturarak fosfolipitlerin (PLP) bozunmasını azaltabilir. Enzimlerin salınmasına veya enzim sentezi veya taşınmasındaki değişikliklere bağlı olarak hidrolitik enzimlerin kaybıyla birlikte lizozomal fonksiyonda ilaca bağlı değişiklikler ve ayrıca PLP metabolizmasında yer alan genlerin ekspresyonundaki değişiklikler, PLP birikmesine ve katmanlı cisimlerin oluşumuna neden olabilir (Şekil 15) (Donato ve ark., 2022).



Şekil 15. İlaç kaynaklı fosfolipidoz mekanizması (Donato ve ark., 2022)

- **İlaç kaynaklı kolestaz:** İlaçlar, hepatositlerin sinüzoidal ve kanaliküler membranlarında bulunan hepatobiliyer taşıyıcıların doğrudan inhibisyonuyla veya taşıma proteinlerinin ekspresyonu ve/veya lokalizasyonunda yer alan anahtar süreçlerin değiştirilmesiyle karaciğerdeki safra asidi homeostazını bozabilir. Safra asitlerinin sitotoksik konsantrasyonlara kadar birikmesi parankimal karaciğer hücrelerinde ve safra kanallarında hasara neden olabilir (Şekil 16). Kolestatik patern sıklıkla DILI ile ilişkilidir ve DILI olgularının %50'ye kadarında görülebilir. Antimikrobiyaller, NSAID'ler, immünomodülatörler, antipsikotikler, hipoglisemik ilaçlar ve steroidler kolestatik etki ile en çok ilişkili olan terapötik gruplardır. Hepatobilier taşıma sistemlerinin fonksiyonel değişikliği, ilaca bağlı kolestazın ana mekanizması olarak kabul edilir. Safra asidinin kanaliküler akışından sorumlu ana taşıyıcı olan safra tuzu atım pompasının (BSEP) inhibisyonu, birçok kolestatik ilaç için aydınlatılmış bir mekanizmadır (örn., eritromisin, bosentan, siklosporin, itrakonazol ve etinil estradiol). İlaçların veya metabolitlerinin; çoklu ilaca dirençli protein 3 (MDR3) (örn. siklosporin, itrakonazol, haloperidol ve klorpromazin) ve çoklu ilaç direnci ile ilişkili proteinler 2, 3 ve 4 (MRP) (örn. eritromisin, bosentan, siklosporin ve etinil estradiol) gibi diğer akış taşıyıcıları veya kandan safra asidinin ana alım sistemi olan sodyuma bağımlı taurokolat birlikte taşınan polipeptit (NTCP) (örn., siklosporin ve klorpromazin) ile etkileşimi de bildirilmiştir. Hepatobilier taşıma sistemlerinin doğrudan inhibisyonuna ek olarak, hepatositlerin zarlarındaki taşıyıcıların

ekspresyonundaki veya lokalizasyonundaki değişiklikler, hepatosit polaritesinin bozulması ve pulsatil safra akışının bozulmasıyla hücre iskeleti değişikliklerinin de DILI'nin kolestatik sonuçlarını açıkladığı öne sürülmüştür. BSEP, MDR3 ve MRP2'nin kanaliküler ekspresyonu, kolestatik DILI'li hastalarda bozulur ve model kolestatik ilaçların (siklosporin, klorpromazin, bosentan, azatioprin ve gliburit) temel bazolateral ve apikal biliyer taşıyıcının ekspresyonunu değiştirme yeteneği, bir *in vitro* çalışmada gösterilmiştir (Donato ve ark., 2022).



Şekil 16. İlaç kaynaklı kolestaz mekanizması (Donato ve ark., 2022)

4.3.3.1. Molnupiravir çalışmalarında karaciğer ile ilgili raporlanan bulgular

Molnupiravir ile toplam klinik deneyimin sınırlı olduğu ve güvenliliğinin tam olarak tanımlanmadığı belirtilmiştir. Ruhsatlandırma öncesi klinik çalışmalarda, serum aminotransferaz seviyelerinde yükselme görülme sıklığı yaygın olmayan ve şiddeti hafif olarak bulunmuş ve bu sonuçların plasebodan daha sık olmadığı bildirilmiştir. Ayrıca, ruhsat öncesi çalışmalarda, 5 gün boyunca molnupiravir (günde iki kez 800 mg) ile tedavi edilen 900'den fazla hasta arasında klinik olarak belirgin karaciğer hasarı olgusu bildirilmemiştir. Serum aminotransferaz yükselmelerinin semptomatik SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında yaygın olması, ciddi hastalığı olan hastaların %70'inde mevcut olması ve erkek cinsiyet, ileri yaş, daha yüksek vücut kitle indeksi ve diyabet gibi COVID-19 şiddeti için bilinen risk faktörlerine sahip

olanlarda daha sık görülmesinin bu durumun kafa karıştırıcı yanı olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, molnupiravirin karaciğer hasarına neden olduğu gösterilememiş, ancak kullanımına ilişkin toplam klinik deneyimin de sınırlı olduğu bildirilmiştir (National Library of Medicines, 2022).

Mevcut randomize klinik çalışmalar sonucunda molnupiravir kullanımı ile karaciğer test anomalileri açısından sonuçlar da şu şekildedir:

- Molnupiravir ilk olarak sağlıklı gönüllülerin katıldığı faz 1 randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada (NCT04392219) değerlendirilmiştir. Molnupiravirin tek ve çoklu dozlarının iyi tolere edildiği, karaciğerle ilişkili advers etkilerin bildirilmediği ve sadece bir hastanın deri döküntüsü nedeniyle tedaviyi bıraktığı bildirilmiştir (Painter ve ark., 2021).
- Birleşik Krallık'ta, erken semptomatik enfeksiyonu olan hastalarda molnupiravirin güvenliliğini ve optimal dozunu değerlendirmek amacıyla AGILE (NCT04746183) çalışması gerçekleştirilmiştir. Faz Ib, açık etiketli, doz artırıcı, randomize kontrollü çalışmada, molnupiravir dozdan bağımsız olarak iyi tolere edilmiş ve tüm advers etkiler derece 1 veya 2 olmuştur. Günde iki kez 600 mg ile tedavi edilen dört hasta arasında, bir hastada günde iki kez 800 mg veya 300 mg doz alan hastalarda gözlenmeyen ALT ve gama glutamil transferaz (GGT) yükselmeleri görülmüştür. Ancak, ALT veya GGT yükselmesinin derece 1 mi yoksa 2 mi olduğu belirtilmemiş ve nedensellik değerlendirme analizi yapılmamıştır (Khoo ve ark., 2021).
- COVID-19 teşhisi konmuş hastaneye yatırılmamış erişkinlerde molnupiravirin bir faz 2a randomize, çift kör, plasebo kontrollü çalışmasında (NCT04405570), katılımcılar 5 gün boyunca günde iki kez 1:1 ile 200 mg molnupiravir veya plasebo veya 3:1 molnupiravir (400 veya 800 mg) veya plasebo ile randomize edilmiştir. Günde iki kez 800 mg dozunda AST ve ALT artışı yaygın olmadığı (55 hastadan 2'si, 3.6 %) ve alkalen fosfataz artışının sadece bir hastada (%1.8) gözlendiği raporlanmıştır (Fischer ve ark., 2022).
- Çin'de gerçekleştirilen, Omicron varyantı ile enfekte olmuş, hastanede yatan, hafif veya orta şiddette COVID-19 hastaları içeren randomize, plasebo kontrollü bir çalışmada (ChiCTR2200056817), molnupiravir kolunda üç advers etki bildirilmiştir: iki olguda (%2,6) ALT seviyelerinde <3 dereceli bir yükselme olmuştur. Bununla birlikte, taburculuk sırasındaki medyan ALT ve AST değerleri, molnupiravir ve plasebo kolundaki hastalar arasında önemli ölçüde farklı olmadığı belirtilmiştir (Zou ve ark., 2022).
- Molnupiravir, ticari nedenlerle erken durdurulan randomize, plasebo kontrollü bir çalışmada (NCT04575584) da değerlendirilmiştir. Çalışmanın ilk bölümünde (doz aralıklı

faz 2 çalışması), günde iki kez 800 mg kolundaki sekiz hastada (%11,1) AST ve ALT artışı gözlenmiştir ve bir olguda aminotransferaz artışı ciddi bir advers etki olarak bildirilmiştir. Başlangıç sirozu/son dönem karaciğer hastalığı veya aminotransferazlarında artış olan hastaların bu çalışmada hariç tutulduğu dikkat çekmektedir (Casalini ve ark., 2022).

- MOVe-OUT (NCT04575597), şiddetli COVID-19'a ilerleme riski yüksek olan ve semptomların başlangıcından sonraki 5 gün içinde kaydolan, hafif ile orta şiddette COVID-19 hastası, hastaneye yatırılmamış, aşılanmamış yetişkinlerde molnupiravir kullanımını değerlendiren bir Faz 3 çalışmasıdır. Hastalar 5 gün boyunca oral olarak her 12 saatte bir 800 mg molnupiravir veya plasebo almak üzere randomize edilmiştir. MOVe-OUT çalışmasına yüksek riskli, aşılanmamış, hastaneye yatırılmamış 1433 yetişkin hasta dahil edilmiş ve molnupiravirin bu hastalar arasında hastaneye kaldırılma veya ölüm oranını plaseboya kıyasla %31 oranında azalttığı bildirilmiştir. Çalışma sırasında hastaneye yatırılması gereken hastaların ikincil analizi olarak, molnupiravir alanlarda plasebo alanlara kıyasla solunum müdahalelerine olan ihtiyacın azaldığı bulunmuştur. 29. gün itibariyle, molnupiravir kolundaki 709 hastanın 48'i (%6,8) ve plasebo kolundaki 699 hastanın 68'i (%9,7) hastaneye kaldırılma veya ölüm yaşamıştır. Molnupiravir kolunda 1 ölüm ve plasebo kolunda 9 ölüm meydana gelmiştir. Advers olay yaşayan hastaların oranları açısından kollar arasında anlamlı bir fark yoktur. Bununla birlikte, karaciğer enzimlerinde önceden belirlenmiş değişikliklere göre potansiyel ilaca bağlı karaciğer hasarı açısından değerlendirilmiş ancak karaciğer enzimlerinin yükselmesi ile ilgili veriler spesifik olarak bildirilmemiştir (Jayk Bernal ve ark., 2021).
- PANORAMIC, Birleşik Krallık'ta gerçekleştirilen ve ciddi COVID-19'a ilerleme riski yüksek olan, hastaneye yatırılmamış yetişkinlerde molnupiravir kullanımını değerlendiren çok merkezli, açık etiketli, uyarlanabilir bir platform çalışmasıdır. Bu çalışma, Omicron varyantının baskın olduğu dönemde gerçekleştirilmiş ve 25708 hasta dahil edilmiştir. Hastaların yüzde 94'üne en az 3 doz COVID-19 aşısı yapılmıştır. Hastalar, 5 gün boyunca günde iki kez 800 mg oral olarak molnupiravirle birlikte mevcut tedavi veya yalnızca mevcut tedavi almak üzere randomize edilmiştir. Çalışmanın molnupiravir kolunda 103 hastaneye yatış ve 3 ölüm, yalnızca mevcut tedavi alımı kolundaysa 96 hastaneye yatış ve 5 ölüm bildirilmiştir. Molnupiravir alan kişiler arasında bildirilen ilk iyileşme süresi (ortalama 9 gün), yalnızca mevcut tedavi alanlara (ortalama 15 gün) göre daha kısa bulunmuştur. Molnupiravir ile ilgili hiçbir ciddi advers olay görülmemiştir; 145 hasta (%1,1) molnupiravirle ilişkili advers olaylar nedeniyle çalışmayı bırakmıştır; ancak

karaciğer ile ilgili advers olaylara ilişkin herhangi bir spesifik bilgi verilmemiştir (Butler ve ark., 2022).

- Faz 1, randomize olmayan, açık etiketli NCT05386589 çalışmasında, orta şiddette karaciğer yetmezliği olan ve sağlıklı hastaların günde tek doz 800 mg molnupiravir kullanımı sonucu karşılaştırılarak ilacın advers etki oranı ve farmakokinetiği değerlendirilmiştir. Çalışma protokolünde ALT, AST, üre ve bilirubin seviyelerinin takip edilmesi hedeflense de; çalışmaya katılan hastalarda herhangi bir hepatobiliyer advers olay ya da mevcut karaciğer yetmezliğinin kötüleşmesi görülmemiştir (National Library of Medicine Clinical Trials, 2024).
- Molnupiravir'in güvenliliği ve SARS-CoV-2'nin viral yayılımı üzerindeki etkisini araştıran END-COVID (NCT04405739) çalışmasında molnupiravir 400 mg uygulanan 1 hastada, molnupiravir 800 mg uygulanan 1 hastada ve plasebo kolundaki 1 hastada ALT artışı; molnupiravir 400 mg uygulanan 1 hastada ve plasebo kolundaki 1 hastada AST artışı raporlanmıştır (National Library of Medicine Clinical Trials, 2023).

Molnupiravirin klinik deneme ortamlarında gözlenen olumlu bir hepatik güvenlilik profiline rağmen, gerçek dünya ortamında ilaca bağlı karaciğer hasarı (DILI) riskleri belirsiz olduğu bildirilmiştir. COVID-19 için 2 yeni oral antiviral ajanın (molnupiravir ve ritonavir ile güçlendirilmiş nirmatrelvir) gerçek dünyadaki hepatik güvenlilik profilini açıklayan ilk çalışmalardan birinde; 183.041 hastanın (13.041 molnupiravir kullanıcısı) verileri analiz edilmiştir. Hastaların çoğunun başlangıçta karaciğer biyokimyalarının normal olduğu; 20.797 COVID-19 hastasında COVID-19 sırasındaki seri karaciğer biyokimyaları kontrol edildiği ve Molnupiravir kullananların %23,6'sında anormal ALT düzeyi görüldüğü (%8,4'ünün tepe ALT değeri ≥2xULN ve %2,2'sinin tepe ALT değeri ≥5xULN) raporlanmıştır. Anormal alkalin fosfataz (ALP) düzeyi de (%12.9-%19.0) gözlenmiştir. Molnupiravir kullananlarda (%12,9) kullanmayanlara göre daha yüksek bir tepe toplam bilirubin oranı mevcut bulunmuştur. Çalışma sonucunda DILI riski düşük oranda (1%) bulunmuş ve mevcut verilerle molnupiravir ve ritonavir ile güçlendirilmiş nirmatrelvirin olumlu hepatik güvenlilik profiline sahip oldukları kabul edilmiştir (Wong ve ark., 2023).

Kronik karaciğer hastalığı olanlarda hastalarda COVID-19 tedavisi ile ilişkili gastrointestinal ve hepatik advers etkilerin incelendiği çalışmada, molnupiravirin alanin aminotransferazı yükselttiği ve hepatik disfonksiyon konusunda şüpheli olduğu değerlendirilmiştir. Karaciğer yetmezliği COVID-19'lu hastalar arasında yaygın bir gözlem olduğundan, COVID-19 ve karaciğer yetmezliği olan tüm hastaların, özellikle HBV'nin yaygın olduğu bölgelerde viral

hepatit serolojisi dahil olmak üzere potansiyel karaciğer hastalığı nedenleri için araştırmalara tabi tutulması önerilmektedir. Ayrıca, artan karaciğer fonksiyon bozukluğu oranları COVID-19'un ciddiyeti ile ilişkilendirilmiştir. Bu durumda hepatotoksik ilaç etkilerinin saptanması zor olabileceğinden, yüksek bir şüphe endeksinin korunması gerektiği belirtilmiştir (Law ve ark., 2021).

8 Ocak - 24 Nisan 2022 tarihleri arasında Orta İtalya, Abruzzo'daki Chieti Üniversite Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniğindeki Covid Polikliniğine başvuran COVID-19 hastalarda yapılan retrospektif, tek merkezli kohort çalışması sonuçlarına göre, molnupiravirin karaciğerde güvenli ve toksik olmadığı görülmüştür. Bu hasta popülasyonunda, başlangıçta SARS-CoV-2 enfeksiyonunun neden olduğu artışa rağmen, tedaviden sonra transaminazlarda önemli bir düşüş görüldüğü bildirilmiştir (Pontolillo ve ark., 2022).

Ayrıca yine İtalya'da yapılan çalışmada; 5 Ocak - 5 Mart 2022 tarihleri arasında 45 hastanın tıbbi kayıtları Coracle kayıt çalışmasından çıkarılmıştır; 44'ü hastane içi takip ve mortaliteye ilişkin eksiksiz verilere sahipti ve mevcut analize dahil edilmiştir. Bu çalışmada, molnupiravir tedavisi alan 4 hastada karaciğer yetmezliği sebebiyle hastaneye yatış görülmüştür, 1 hastada ise artan asit bulguları ile kronik hepatik yetmezliği görülmüştür. Sonuç değerlendirmesinde; molnupiravir tedavisinin güvenli ve iyi tolere edildiği değerlendirilmiştir (Lupia ve ark., 2022).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

ALT kiti	Abcam (ab234578)
Antibiyotik çözeltisi	Multicell
Apoptoz kiti	Thermofisher (BMS500FI)
AST kiti	Abcam (ab263881)
Bilirubin kiti	Cellbiolabs (MET-5010)
DMEM	Multicell
DMSO	Merck
EMEM	Sigma-Aldrich
Fosfat tampon çözeltisi (PBS) (pH 7,4; 10X)	Sigma-Aldrich
Fötal sığır serum (FBS)	Sigma-Aldrich
Molnupiravir	Cayman
MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür)	Biotek (Epoch)
ROS kiti	Abcam (ab113851)
Tripsin (1: 250)	Merck
Üre kiti	Abcam (ab83362)

5.2.Kullanılan Alet ve Cihazlar

Ayarlanabilir otomatik pipet	Eppendorf, Isolab
Buzdolabı (+4 °C)	Hotpoint
Derin dondurucu (-20 ºC)	Hotpoint
Derin dondurucu (-80 °C)	Arctiko
Akış sitometri	Novocyte
Hassas terazi	Shimadzu
Mikroskop	Soptop
Karbondioksitli inkübatör	Thermo Scientific
Laminar akımlı kabin	Esco Scientific
Mikroplaka çalkalayıcı	Biosan
Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre	Biotek (Epoch)
Santrifüj	Hettich
Su banyosu	Memmert
Vorteks	Janke Kunkel

5.3.Kullanılan Sarf Malzemeler

96 kuyucuklu plaka	Nest
Falkon tüp (15 mL, 50 mL)	Isolab
Hücre kültür kabı (Flask) (25 ve 75 cm^2'lik)	Nest
Lateks eldiven	Dolphin
Serolojik pipet (cam, 5 mL, 10mL)	Nest
Pipet uçları	Isolab
Filtreli pipet uçları	Nest
Vial (kapaklı)	Eppendorf

5.4.Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü, canlılara ait hücrelerin kontrollü şartlarda büyütülmesi ve çoğaltılması süreci olarak tanımlanmıştır. Böylelikle *in vivo* yerine *in vitro* olarak; hücre fonksiyon süreçlerinin anlaşılması, hastalık modellerinde tanı ve tedavi için gerekli mekanizmaların aydınlatılması gibi pek çok çalışmanın yapılması sağlanmaktadır (Küçüksayan ve ark., 2020). Hücre kültürü çalışmalarında sıcaklık, oksijen ve karbondioksit yoğunluğu, pH ve osmotik basınç gibi fizikokimyasal koşulların sabit tutulabilmesi en büyük avantaj olarak bildirilmiştir. Ayrıca, kültür ortamında diğer dış etkenlerden (eş zamanlı ilaç kullanımı ya da hastalıklar gibi) bağımsız araştırma yapılabilmesi, pratik ve ekonomik olmasından dolayı da avantajlı deneysel bir model olarak değerlendirilmiştir. Bunun yanı sıra çalışma esnasında kontaminasyon riski de hücrelerin gelişmesini ve çoğalmasını etkilediğinden; uygun steril bir ortamda çalışmanın gerçekleştirilmesi gerektiği de vurgulanmıştır (Koçaklı ve ark., 2015). HepG2 hücreleri, hepatosellüler karsinoma tanısı konulmuş bir hastadan izole edilmiş olan bir hücre dizisidir (İsan ve ark., 2016).

İnsan HepG2 hücreleri (karaciğer kanseri hücre dizisi, HB-8065; Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu), 25 cm^2'lik flaskta %10'luk FCS, %1'lik antibiyotik (100 U/mL penisilin; 100 µg/mL streptomisin) içeren Eagle's Minimum Essential Medium'da besiyeri içerisinde %5 CO_2, 37 °C'de inkübe edilmiştir.

Stok ve standart molnupiravirin hazırlanması için çözücü olarak dimetilsülfoksit (DMSO) kullanılmış ve hücrelere uygulanırken final konsantrasyonun %1 DMSO değerini geçmeyecek şekilde hesaplanmıştır.

Hücre dizisinin açılması ve çoğaltılması

-80°C'de muhafaza edilen HepG2 hücrelerinin viali, 1-2 dk süre ile 37 °C su banyosunda bekletilerek çözünmeleri sağlanmıştır. Hücreler 15 mL'lik falkona alınarak 5 mL besiyeri ilave edilmiştir. Hücre süspansiyonu 10 dk boyunca 400 g'de santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelletine 5 mL/13 mL besiyeri eklenerek resüspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonu 25 cm^2'lik / 75 cm^2'lik flasklara medyum içinde ekilerek 37 °C sıcaklık, %5 CO_2'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücre yoğunluğu düzenli olarak kontrol edilmiş ve %70 yoğunluğa ulaşan hücre kültürü devamlılığının sağlanması adına hücreler pasajlanmış ya da deneylerde kullanılmıştır. Hücreler pasajlanmak için yeterli seviyeye ulaşmamışlarsa ancak besiyeri rengi değişmiş ise mevcut besiyeri alınarak yerine oda sıcaklığına getirilmiş yeni besiyeri eklenmiştir.

Hücrenin pasajlanması

37 °C sıcaklık, %5 CO_2'li inkübatörde inkübe edilen flasklardaki hücreler kontrol edilerek %70 yoğunluğa ulaşan hücrenin pasajlanması gerçekleştirilmiştir. Hücre üzerindeki medyum pipetle uzaklaştırılmış ve %0.05 tripsin EDTA eklenmiştir. Tripsin ilavesiyle, flask yüzerinden ayrılan hücreler 15 mL'lik falkona alınarak 5 mL besiyeri ilave edilmiştir. Hücre süspansiyonu 10 dk boyunca 400 g'de santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelletine 5mL besiyeri eklenerek resüspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonu $1x10^6$ hücre olacak şekilde 25 cm^2'lik flaske $2x10^6$ hücre olacak şekilde 75 cm^2'lik flaske medyum içinde ekilerek 37 °C sıcaklık, %5 CO_2'li inkübatörde inkübe edilmiştir.

Hücre sayımı

Canlı hücreler tripanı hücre içine almazken, ölü hücreler bozulmuş hücre membranlarından tripanı hücre içerisine alarak maviye boyanmaktadır. Bu sebeple hücre sayımı için tripan mavisi kullanılmış ve ışık mikroskobunda, sadece ölü hücrelerin membranları mavi renkli gözlenmiştir.

Hücre sayımı, 4x16 küçük kareden oluşan özel sayım lamı (hemositometre) kullanılarak ışık mikroskobunda gerçekleştirilmiş ve aşağıdaki formül kullanılmıştır:

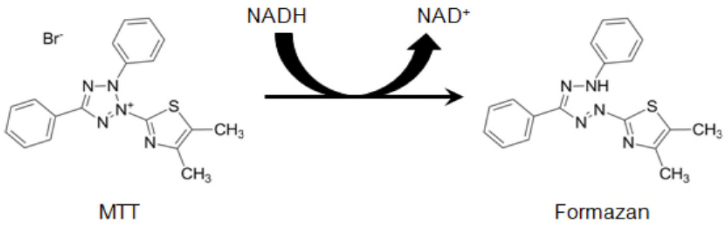
Toplam hücre sayısı/mL = Sayım sonucu x 10^4 x 2

5.5.Hücre Canlılığı Analizi ve Dozların Belirlenmesi

5.5.1. MTT testi

Sitotoksisitenin değerlendirmesi amacıyla kolorimetrik MTT (3-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolium bromid) testi uygulanmıştır. MTT yöntemi sağlam mitokondrilerin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Doza bağımlı sitotoksisite eğrisinden hücre fonksiyonunun %50'sinin inhibe olduğu, dolayısıyla hücre canlılığının tespit edildiği, konsantrasyon (IC_{50}) hesaplanmıştır. Sitotoksisite değerlendirmesi için, hücreler her bir kuyucuğa $1x10^4$ hücre süspansiyonu gelecek şekilde tabanı düz olan 96 kuyucuklu plakaya ekilip, hücrelerin yüzeye tutunması için 24 saat %5 CO_2, 37 ºC'de inkübe edilmiştir.

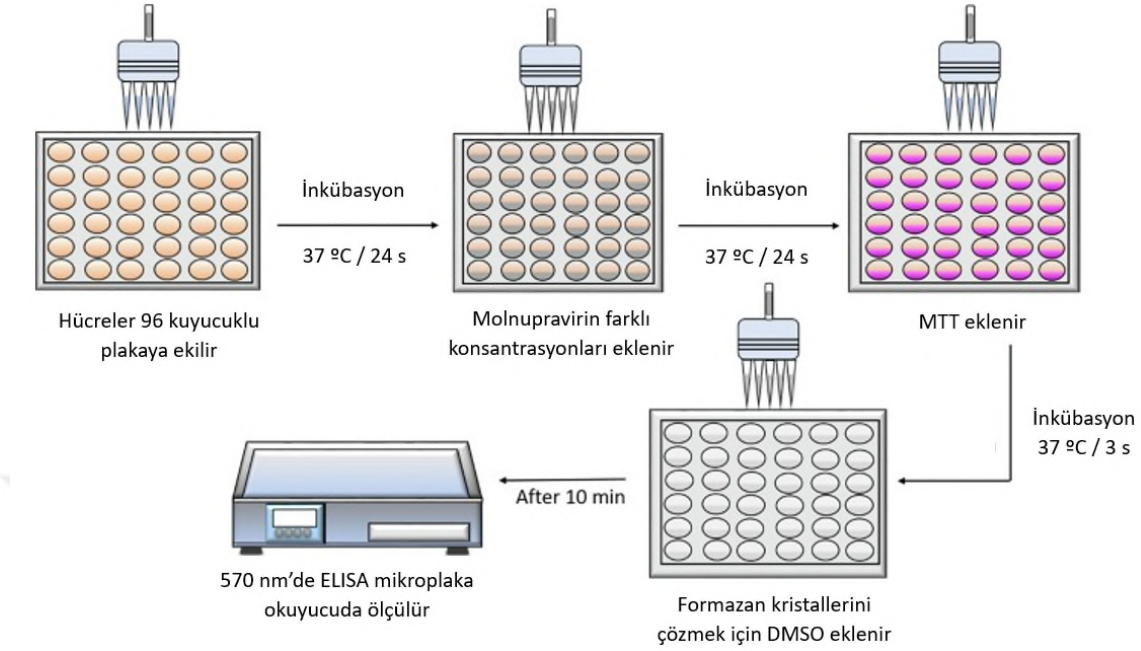
Bu sürenin sonunda doz-cevap eğrisinin oluşturulması ve IC_{50} değerinin hesaplanması için besiyeri uzaklaştırılarak hücreler, molnupravirin farklı konsantrasyonları ile (insan plazma maksimum konsantrasyonu (Cmax) olan 2970 ng/mL'nin 1, 10, 30 ve 100 katı olacak şekilde; 3, 30, 100 ve 300 µg/mL bir seri final konsantrasyonda) 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Kültür besiyeri negatif kontrol; %10'luk dimetil sülfoksit (DMSO) içeren besiyeri ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Her bir konsantrasyon 3 kez, kontroller ise 6 kez tekrar edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda ekstraksiyon çözeltileri uzaklaştırılarak hücre canlılığı, canlı hücrelerde mitokondriyal dehidrogenaz enzimi ile tetrazolyum tuzunun formazan boyaya dönüşmesi prensibine dayanan MTT testi ile hesaplanmıştır (Şekil 17).



Şekil 17. MTT'nin formazana dönüşmesi (Riss ve ark., 2013)

Hücreler, 100 µL MTT içeren besiyeri (1 mg/mL) içerisinde 37 ºC'de 4 saat inkübe edilip oluşan formazan kristalleri 100 µL DMSO içinde çözülmüştür. Çözünen kristallerin absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda ELISA mikroplaka okuyucuda ölçülerek rölatif hücre canlılığı (%) hesaplanmıştır (Şekil 18).

Stok ve standart molnupiravirin hazırlanması için çözücü olarak dimetilsülfoksit (DMSO) kullanılmış ve hücrelere uygulanırken final konsantrasyonun %1 DMSO değerini geçmeyecek şekilde hesaplanmıştır.



Şekil 18. MTT mekanizması (Madhubala ve ark., 2023)

5.6.Reaktif Oksijen Türlerinin Ölçülmesi

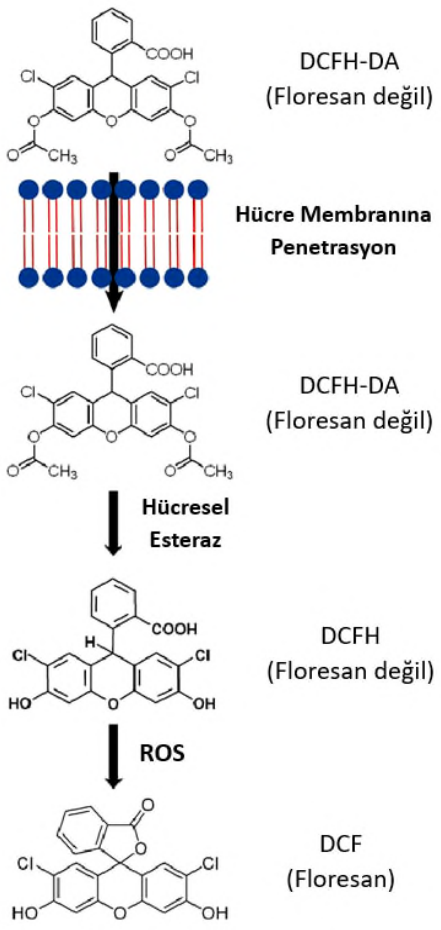
Süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, singlet oksijen ve hidroksil radikali dahil olmak üzere bir dizi farklı reaktif oksijen türü (ROS), oksidatif metabolizmanın normal yan ürünleridir ancak yüksek konsantrasyonlarda organizmalar için son derece zararlı olabilir. ROS; proteinleri, lipitleri ve nükleik asitleri oksitleyebilir ve sıklıkla hücre yapısında değişikliklere ve mutageneze yol açabilir (Bhattacharya, 2012).

Reaktif oksijen türleri (ROS)'un değerlendirilmesinde 2,7-diklorodihidrofluorescein diasetat (DCFH-DA) yöntemi kullanılmıştır.

5.6.1. DCF testi

DCFH-DA fluoresans özellik göstermemektedir, hücre membranını geçerek hücre esterazlarıyla deasetilasyon sonucunda hidrofilik alkol olan dihidrodiklorofluoressein (DCFH) molekülünü oluşturmakta ve ROS varlığında bu molekülün oksitlenmesiyle floresan özellik gösteren DCF'ye dönüşmektedir (Şekil 21). Son olarak da oluşan ürünler floresan özellik göstermelerinden faydalanılarak floresan mikroplaka okuyucusunda ölçülmektedir. Floresan yoğunluğu hücre sitosolündeki ROS seviyeleriyle orantılıdır (Wang ve ark., 1999).

96 kuyucuklu mikroplakaya yaklaşık 2,5 x 10^4/kuyucuk olacak şekilde ekilen hücreler 37°C sıcaklıkta %5 CO_2'li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası ortamdan süpernatant uzaklaştırılarak, kuyucuklar 1 mL PBS (1X) ile yıkanmıştır. Molnupiravir çözeltileri final konsantrasyonları yaklaşık C_{max}'ın 3 katı (10 µg/mL) ve Cmax'ın 10 katı (30 µg/mL) olacak şekilde 96 kuyucuklu mikroplakaya uygulanmıştır ve inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, seyreltilmiş DCFDA çözeltisinde hücreler yeniden süspanse edilerek karanlıkta 45 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda mikroplaka kuyucuklarından DCFDA çözeltisi uzaklaştırılıp, mikroplakanın her bir kuyucuğuna mikroplakanın her bir kuyucuğuna fenol kırmızısı içermeyen EMEM (%10 FBS, %1 antibiyotik) çözeltisi ilave edilmiştir. Ölçümler 485 nm eksitasyon ve 535 nm emisyon dalga boylarında floresan mikroplaka okuyucusunda gerçekleştirilmiştir. Deneyde pozitif kontrol olarak 50 µM ve 100 µM tert-butil hidroperokside (TBHP) çözeltileri ve 10 mM asetaminofen (APAP) çözeltisi ve solvent kontrol olarak %1 final konsantrasyonda DMSO kullanılmıştır. Her konsantrasyon için 3 tekrar yapılmıştır (Abcam, 2024).



Şekil 19. DCF testi mekanizması (Bhattacharya, 2012)

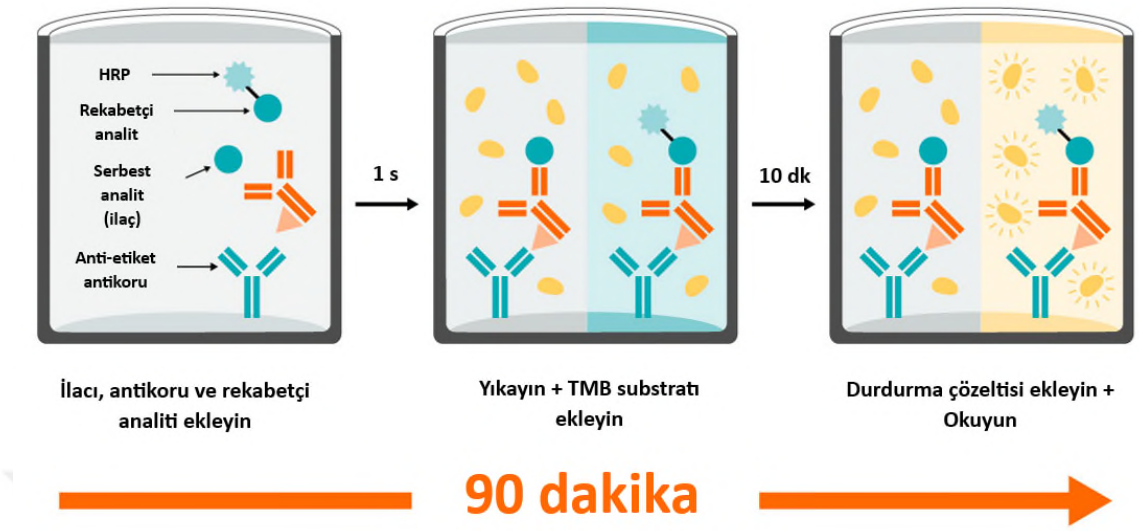
5.7.Biyokimyasal Analiz

Molnupiravir çözeltileri final konsantrasyonları yaklaşık C_{max}'ın 3 katı (10 µg/mL) ve Cmax'ın 10 katı (30 µg/mL) olacak şekilde uygulanarak inkübasyon sonunda toplanan besiyerlerinde kit prosedürüne uygun olarak AST, ALT, total bilurubin ve üre seviyeleri belirlenmiştir.

5.7.1. AST ve ALT ölçümü

Sitoplazmik aspartat aminotransaminaz (AST), glutamat seviyelerinin düzenlenmesinde önemli bir enzimdir. Aspartat ve glutamat arasında bir a-amino grubunun geri dönüşümlü transferini katalize eder. Amino asit metabolizmasındaki merkezi rolü göz önüne alındığında, birçok biyolojik işlevde kritik bir rol oynar. Klinik bir bağlamda, serumdaki AST seviyeleri karaciğer sağlığı için bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Alanin Aminotransferaz (ALT), serum glutamik-pirüvik transaminaz olarak da bilinir, bir amino grubunun alaninden α-ketoglutarata geri dönüşümlü transferini katalize eden piridoksal-fosfata bağımlı bir enzimdir ve pirüvat ve glutamat üretir. ALT, öncelikle karaciğer ve serumda bulunur, ancak diğer dokularda da görülür. Hepatosit hasarı genellikle serum ALT seviyelerinde artışa neden olur ve serum ALT seviyeleri karaciğer hasarı için bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Abcam, 2024).

AST ve ALT kitlerinde, hücre kültüründe AST ve ALT proteinlerinin kantitatif ölçümünü sağlamaktadır. Bir afinite etiketli yakalama antikoru ve bir raportör konjugeli dedektör antikoru kullanılmaktadır ve bunlar çözeltideki örnek analiti immüno-yakalamaktatır. Bu kompleksin tamamı (antikor karışımı: yakalama antikoru/analit/dedektör antikoru) daha sonra 96 kuyucuklu mikroplakadaki kuyuyu kaplayan bir anti-etiket antikorunun immünoafinitesi yoluyla hareketsizleştirilir. Testi gerçekleştirmek için, mikroplakaya ilaç ve standartlar eklenmiştir, ardından antikor karışımı eklenmiştir. İnkübasyondan sonra, mikroplaka bağlanmamış materyali çıkarmak için yıkanmıştır. TMB geliştirme çözeltisi eklenmiş ve inkübasyon sırasında HRP tarafından katalize edilmiştir. Böylece mavi renklenme oluşturulmuştur. Bu reaksiyon daha sonra durdurma çözeltisi eklenerek durdurulmuş ve mavi renkten sarıya bir renk değişimi tamamlanmıştır. Sinyal, bağlı analit miktarına orantılı olarak oluşturulmuş ve optik yoğunluk 450 nm'de ölçülmüştür (Şekil 20) (Abcam, 2024).



Şekil 20. AST ve ALT kitleri çalışma prensibi (Abcam, 2024)

AST ve ALT ölçümü için iki ayrı 96 kuyucuklu mikroplakaya yaklaşık 2,5 x 10^6/kuyucuk olacak şekilde ekilen hücreler 37 °C sıcaklıkta %5 CO_2'li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası ortamdan süpernatant uzaklaştırılarak, kuyucuklar 1 mL PBS (1X) ile yıkanmıştır. Molnupiravir çözeltileri final konsantrasyonları yaklaşık C_{max}'ın 3 katı (10 µg/mL) ve Cmax'ın 10 katı (30 µg/mL) olacak şekilde her iki 96 kuyucuklu mikroplakaya da uygulanmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, hem AST hem ALT ölçümü hem hücre ekstraktında hem süpernatantında çalışılmıştır. Hücre ekstraktında ölçüm için, 96 kuyucuklu mikroplakaların hücre ekstraktı için seçilmiş kuyucuklarından medyum uzaklaştırılmış ve kitteki tampon çözeltisi ile her kuyucuk yıkanmıştır. Kuyucuklar kazınarak hücreler kaldırılmış ve her bir kuyucuktaki çözelti ayrı ayrı tüplere numaralandırılarak alınmıştır. 4 °C sıcaklıkta 18000 g santrifüjde 18 dakika santrifüj sonrasında süpernatantlar temiz tüplere aktarılmıştır. Her tüpten 50 µL çözelti kit içinde bulunan 96 kuyucuklu mikroplakanın uygun kuyucuklarına sırasıyla eklenmiştir. Hücre süpernatant ölçümü içinse, 96 kuyucuklu mikroplakaların süpernatant için seçilmiş kuyucuklarından 110 µL medyum alınarak ayrı ayrı tüplere numaralandırılarak alınmıştır. 2000 g santrifüjde 10 dakika santrifüj sonrasında 50 µL kit içinde bulunan 96 kuyucuklu mikroplakanın uygun kuyucuklarına sırasıyla eklenmiştir. Tüm kuyucuklara 50 µL antikor karışımı eklendikten sonra 37 °C sıcaklıkta 1 saat süre ile mikroplaka çalkalayacısında bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası kit içindeki tampon çözeltisiyle uygun şekilde kuyucuklar yıkanmış ve TMB geliştirme çözeltisi eklenerek mikroplaka karanlıkta 37 °C sıcaklıkta 10 dakika süre ile mikroplaka çalkalayacısında bekletilmiştir. Oluşan mavi renklendirmenin akabinde, reaksiyon durdurma

çözeltisi eklenerek durdurulmuş ve mavi renkten sarıya bir renk değişimi tamamlanmıştır. Son olarak mikroplaka okuyucuda 450 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Molnupiravir konsantrasyonlarının sonuçlarını kıyaslamak amacıyla, kitte yer alan AST ve ALT standart çözeltileri de 8 farklı konsantrasyonda hazırlanarak kuyucuklara eklenmiştir. Deneyde pozitif kontrol olarak 10 mM asetaminofen (APAP) çözeltisi ve solvent kontrol olarak %1 final konsantrasyonda DMSO kullanılmıştır. Her konsantrasyon için 3 tekrar yapılmıştır (Abcam, 2024).

5.7.2. Bilirubin ölçümü

Hem parçalanmasının bir yan ürünü olan bilirubin, glukuronik aside konjuge (doğrudan) ve konjuge olmayan (dolaylı) olarak bulunabilir. Konjuge olmayan form, kanda albumine bağlı olarak bulunur ve karaciğere taşınır. Bilirubin, karaciğerde glukuronik aside konjuge olur, bu da onu daha çözünür hale getirir ve safraya atılmasını sağlar. Yüksek bilirubin seviyeleri sarılık ve Gilbert sendromu ile ilişkilendirilirken, düşük seviyeler kardiyovasküler hastalık ve diabetes mellitus ile ilişkilendirilmiştir. Bilirubin testi kiti, hücrelerin içindeki toplam bilirubini ölçmektedir. Test, diazotize edilmiş sülfanilik asidin bilirubinle reaksiyona girerek azobilirubin oluşturduğu Jendrassik-Grof yöntemine dayanmaktadır ve azobilirubin, 540 nm'de tespit edilebilmektedir. Konjuge olmayan bilirubin ve albümine bağlı bilirubin çok yavaş reaksiyona girdiğinden, total bilirubin ölçümüne olanak sağlamak için reaksiyona bir hızlandırıcı eklenir (Cellbiolabs, 2024).

Diazotize Sülfanilik Asit + Total Bilirubin + Hızlandırıcı → Azobilirubin (540 nm)

96 kuyucuklu mikroplakaya yaklaşık 2,5 x 10^4/kuyucuk olacak şekilde ekilen hücreler 37 °C sıcaklıkta %5 CO_2'li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası ortamdan süpernatant uzaklaştırılarak, kuyucuklar 1 mL PBS (1X) ile yıkanmıştır. Molnupiravir çözeltileri final yaklaşık C_{max}'ın 3 katı (10 µg/mL) ve Cmax'ın 10 katı (30 µg/mL) olacak şekilde 96 kuyucuklu mikroplakaya uygulanmıştır ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, mikroplakadaki kuyucuklardan medyum uzaklaştırılmış ve soğuk PBS ile yıkanmıştır. Her kuyucuğa 100 µL soğuk PBS eklenmiş ve hücreler soğuk sonikatörde homojenize edilmiştir. Kuyucuk içerikleri eppendorflara alınarak santrifüjlenmiş ve süpernatantları toplanarak yeni bir 96 kuyucuklu mikroplakaya aktarılmıştır. Molnupiravir konsantrasyonlarının sonuçlarını kıyaslamak amacıyla, kitte yer alan bilirubin standart çözeltisi de 8 farklı konsantrasyonda hazırlanarak kuyucuklara eklenmiştir. Kuyucuklara hızlandırıcı,

diazo reaktifi (negatif kontrol kuyucularına diazo reaktifi yerine negatif kontrol reaktifi) ve analiz reaktifleri ilave edilerek mikroplaka okuyucuda 540 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçüm yapılmıştır. Deneyde pozitif kontrol olarak 10 mM asetaminofen (APAP) çözeltisi ve solvent kontrol olarak %1 final konsantrasyonda DMSO kullanılmıştır. Her konsantrasyon için 3 tekrar yapılmıştır (Cellbiolabs, 2024).

5.7.3. Üre ölçümü

Üre, çoğu hayvanda azot metabolizmasının ana son ürünüdür ve karaciğerde üre döngüsü adı verilen bir dizi reaksiyonda üretilmektedir. Üre döngüsünde, amonyak üreye dönüştürülür ve üre kan yoluyla vücuttan atılmak üzere böbreklere taşınmaktadır. Kanda yüksek üre seviyeleri böbrek yetmezliğini gösterebilir. Üre seviyeleri ayrıca kortikosteroidler gibi bazı ilaçlarla tedaviye yanıt olarak veya dehidratasyon veya konjestif kalp yetmezliği nedeniyle böbrek filtrasyonunun azalmasına yanıt olarak da yükselebilir. Azalmış kan üre seviyeleri karaciğer hastalığına veya yetersiz beslenmeye yanıt olarak ortaya çıkabilir. Üre test kitiyle birlikte, üre konsantrasyonu, mevcut üre ile orantılı bir kolorimetrik (570 nm) ürünle sonuçlanan bir eşleştirilmiş enzim reaksiyonu ile belirlenmiştir (Abcam, 2024).

96 kuyucuklu mikroplakaya yaklaşık 2,5 x 10^4/kuyucuk olacak şekilde ekilen hücreler 37 °C sıcaklıkta %5 CO_2'li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası ortamdan süpernatant uzaklaştırılarak, kuyucuklar 1 mL PBS (1X) ile yıkanmıştır. Molnupiravir çözeltileri final konsantrasyonları yaklaşık C_{max}'ın 3 katı (10 µg/mL) ve Cmax'ın 10 katı (30 µg/mL) olacak şekilde 96 kuyucuklu mikroplakaya uygulanmıştır ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, mikroplakadaki kuyucuklardan medyum uzaklaştırılmış ve soğuk PBS ile yıkanmıştır. Üre kitindeki tampon çözeltisi her bir kuyucuğa 50 µL olarak eklenmiş ve hücreler soğuk sonikatörde homojenize edilmiştir. Kuyucuk içerikleri eppendorflara alınarak santrifüjlenmiş ve süpernatantları toplanarak yeni bir 96 kuyucuklu mikroplakaya aktarılmıştır. Molnupiravir konsantrasyonlarının sonuçlarını kıyaslamak amacıyla, kitte yer alan üre standart çözeltisi de 6 farklı konsantrasyonda hazırlanarak kuyucuklara eklenmiştir. İlaç ve üre standart kuyucuklarına üre kitinde yer alan reaksiyon karışımı ilave edilmiştir. Arka planda numunelerde oluşan amonyum iyonu, NAD+/NADP+ ya da piruvat değerlerini ölçüme dahil etmemek amasıyla da arka plan kontrol kuyucukları belirlenmiş ve bu kuyucuklara da arka plan reaksiyon karışımı eklenmiştir. Böylece reaksiyon karışımı uygulanan kuyucuklardaki sonuçlardan arka plan reaksiyon

karışımı uygulanan kuyucuklardaki sonuçlar çıkarılmıştır. Reaksiyon ve arka plan reaksiyon karışımı eklenen 96 kuyucuklu mikroplaka karanlıkta 37 °C sıcaklıkta 1 saat süre ile mikroplaka çalkalayıcısında bekletilmiştir. Ölçüm 570 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucusunda gerçekleştirilmiştir. Deneyde pozitif kontrol olarak 10 mM asetaminofen (APAP) çözeltisi ve solvent kontrol olarak %1 final konsantrasyonda DMSO kullanılmıştır. Her konsantrasyon için 3 tekrar yapılmıştır (Abcam, 2024).

5.8. Apoptoz Ölçümü

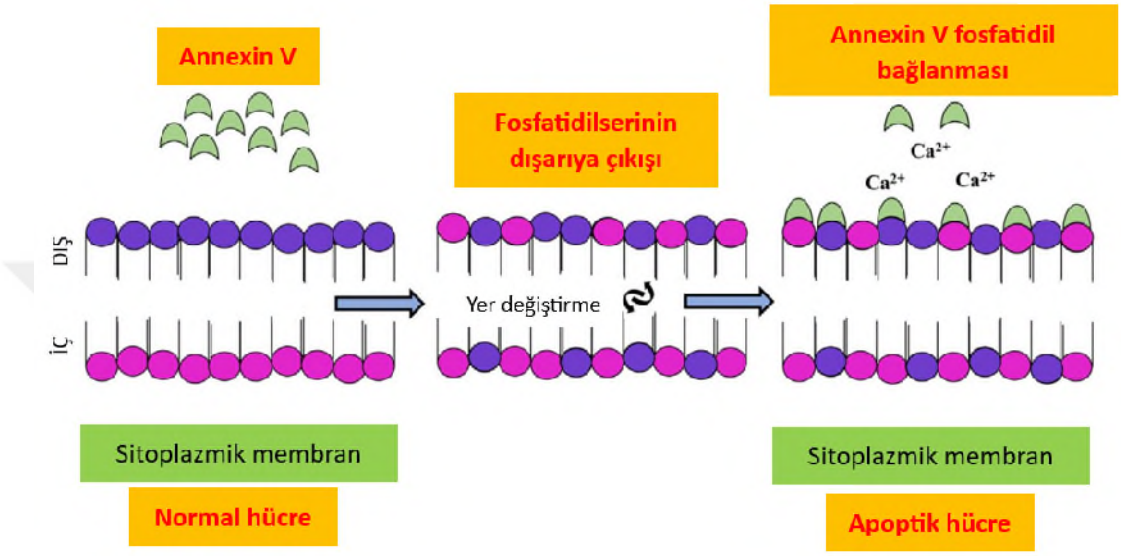
Molnupiravirin belirlenen konsantrasyonlarda hücre dizisine uygulanması ve inkübe edilmesi sonrasında apoptotik durum, Annexin V yöntemi ile FITC Annexin V-PI apoptosis kit" (eBioscience, Cat# BMS500FI) kullanılarak, akım sitometri cihazında değerlendirilmiştir.

Anneksinler, kalsiyum bağımlı fosfolipit bağlayıcı proteinlerin bir ailesidir. Sinyal iletiminde yer alan yaygın sitoplazmik proteinler ailesine ait ökaryotik organizmalarda bol miktarda bulunurlar. Anneksin V, prokoagülan fosfolipitlere yüksek afiniteyle bağlanır. Anneksin V'in tercih edilen bağlanma ortağı fosfatidilserindir. Hücre apoptoz uyarısı alırsa hücre membranının sitoplazmik yüzeyindeki lipid sırasında bulunan fosfatidilserin hücre membranının dış lipid tabakasına geçmektedir. Bu mekanizma apoptozun erken döneminde aktive edilir (Şekil 19). Anneksin V fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, bu protein floresan bir madde ile (FITC) işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilmektedir. Apoptoz kit çalışma prensibine göre, dış membranda fosfatidilserin varlığını belirlemek için FITC (floresan izotiyosiyanat) ile konjuge edilen Anneksin V (FITCAnneksin V), membran bütünlüğünü ölçmek için de kırmızı renkli vital boya propidyum iyodür (PI) kullanılmıştır. Nekrotik hücrelerde de anneksin bağlanması görülebileceği için boya olarak PI kullanılmıştır. Canlı hücrelerin, hücre membranları sağlam olduğundan PI ile boyanmamaktadır. Bu bağlanma oranları akış sitometri cihazı ile ölçülmüştür. Bağlanma değerlendirilmesi aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

- Canlı hücreler: FITC- Anneksin V ve PI negatif olan hücreler
- Erken apoptotik hücreler: FITC-Anneksin V pozitif ve PI negatif olan apoptoz sürecine girmiş ancak henüz membran bütünlüğü bozulmamış hücreler
- Geç apoptotik hücreler: FITC-Anneksin V ve PI pozitif olan apoptoz sürecine girmiş ve membran bütünlüğü bozulmuş hücreler

- Nekrotik hücreler: FITC-Anneksin V negatif PI pozitif olan hücreler (Kntayya ve ark., 2018).

Apoptoz analizi, 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 21. Anneksin V'nin hücre membranındaki fosfatidilserin ile bağlanma mekanizması (Jamwal ve ark., 2020)

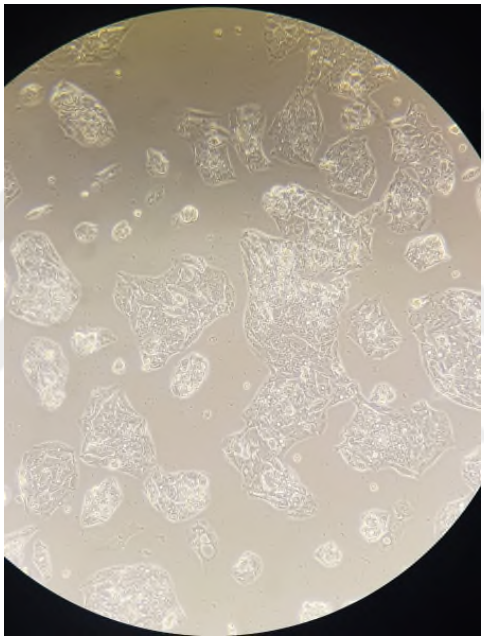
24 kuyucuklu mikroplakaya hücreler her bir kuyucuğa $2x10^5$ hücre süspansiyonu gelecek şekilde ekilmiş ve 37°C sıcaklıkta %5 CO_2'li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası ortamdan süpernatant uzaklaştırılarak, kuyucuklar 1 mL PBS (1X) ile yıkanmıştır. Molnupiravir çözeltileri final konsantrasyonları yaklaşık C_{max}'ın 3 katı (10 µg/mL) ve Cmax'ın 10 katı (30 µg/mL) olacak şekilde 24 kuyucuklu mikroplakaya uygulanmıştır ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, kuyucuklar PBS ile yıkanmıştır ve 100 µL bağlayıcı tampon (1X) ile yeniden süspanse edilerek eppendorflara aktarılmıştır. 97,5 µL hücre süspansiyonunun üzerine 2,5 µL Annexin V-FTC eklenmiştir ve 10 dk süre ile karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 100 µL bağlayıcı tampon (1X) ile hücre pelleti yıkanmış ve ardından 95 µL bağlayıcı tampon (1X) ile süspanse edilmiştir. Üzerine 5 µL PI eklenmiştir. Akış sitometri cihazında Annexin V-FTIC için Ex/Em: 494/518 nm, PI için Ex/Em: 535/617 nm dalga boylarında ölçüm gerçekleştirilmiştir. Deneyde pozitif kontrol olarak 10 mM asetaminofen (APAP) çözeltisi ve solvent kontrol olarak %1 final konsantrasyonda DMSO kullanılmıştır. Her konsantrasyon için 3 tekrar yapılmıştır (Ebioscience, 2024).

5.9.İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada tekrarlılığın kontrolü için her uygulama protokolü 3'er defa tekrarlanmıştır. Ayrıca her test için negatif kontrol, pozitif kontrol ve solvent kontrolü yapılmıştır. Test sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde dağılımın normalliği Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Sonra dağılım normal ise; farklı konsantrasyonlardaki 3 tekrar (n=3) uygulamadan elde edilen sonuçların ortalamalarının kıyaslanması için; uygulamalar kontrol ile karşılaştırılırken "bağımsız gruplarda t testi", uygulamaların hepsi birbiriyle karşılaştırırken "tek yönlü ANOVA testi" yapılmıştır. Normal dağılıma uymayan gruplara ikili grupların kıyaslamasında Mann-Whitney U testi ile ikiden fazla grubun kıyaslamasında ise Kruskal Wallis Varyans analizi ile değerlendirme gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel değerlendirme sonunda. $p<0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

6. BULGULAR

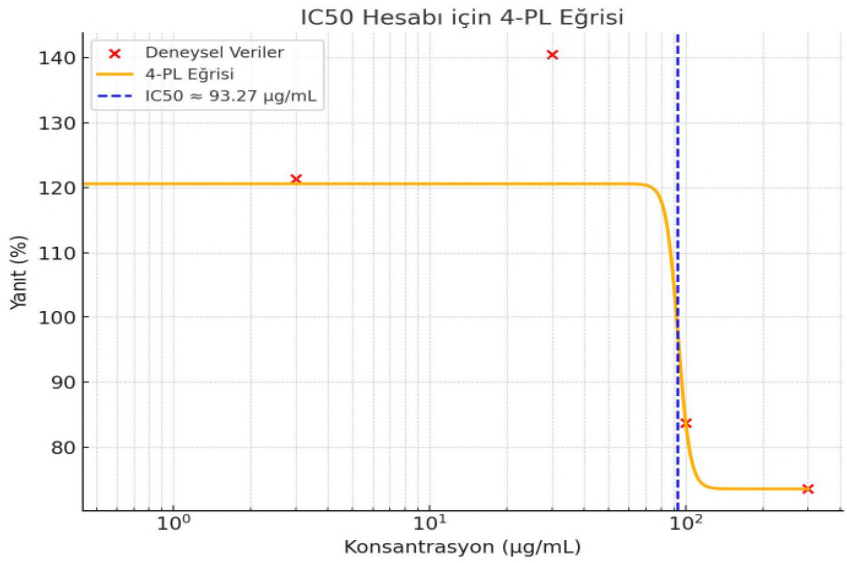
Molnupiravirin hepatotoksisite oluşturma potansiyelini değerlendirmek amacıyla; çalışma bulgularının elde edilebilmesi için HepG2 hücre dizisinde (Şekil 22) sitotoksisite ölçümü için MTT testi, oksidatif stresin ölçümü için DCF testi, apoptik/nekrotik hücre ölümü ölçümü için Anneksin testi ve hepatik hasarın biyokimyasal göstergeleri olan AST, ALT, üre ve bilirubin seviyelerinin ölçümü testi uygulanmıştır.



Şekil 22. HepG2 hücre dizisinin mikroskobik görüntüsü

6.1.Sitotoksisite Bulguları

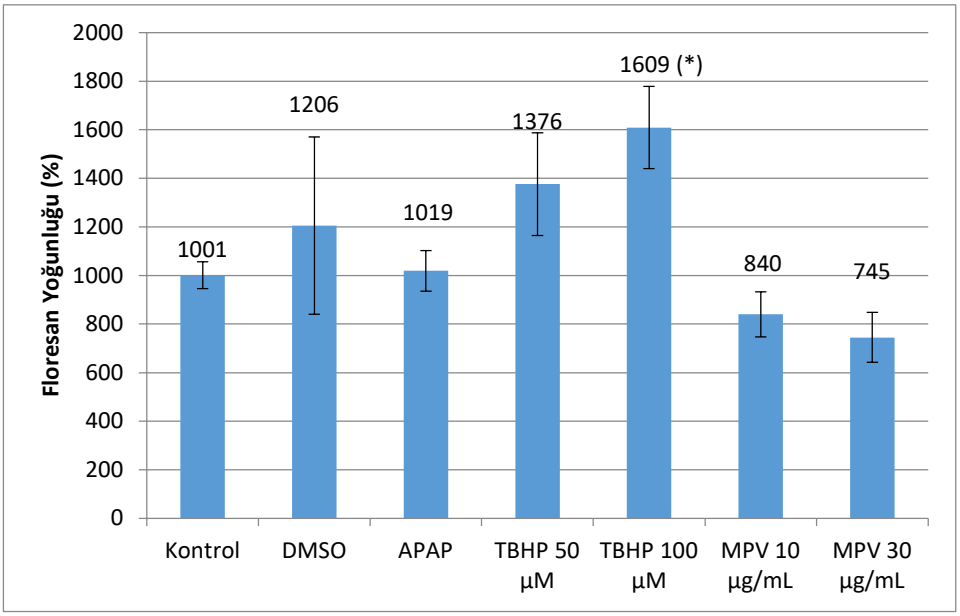
Bölüm 5.5.1.de anlatıldığı üzere, molnupiravirin sitotoksik dozunu ve IC_{50} değerlerini belirlemek için MTT testi yapılmıştır. 2,9, 29 ve 290 µg/mL konsantrasyonlarındaki molnupiravir uygulanan HepG2 hücre dizisinde sitotoksisite testleri 24 saatlik maruziyet süresi için değerlendirilmiştir. HepG2 hücre hattında IC_{50} değeri (molnupiravirin hücre canlılığını %50'sini inhibe eden konsantrasyonu) 93,27 µg/mL (C_{max} değerinin yaklaşık 30 katı) olarak belirlenmiştir (Şekil 23).



Şekil 23. Molnupiravirin HepG2 hücre dizisinde sitotoksik etkisinin MTT testi sonucu

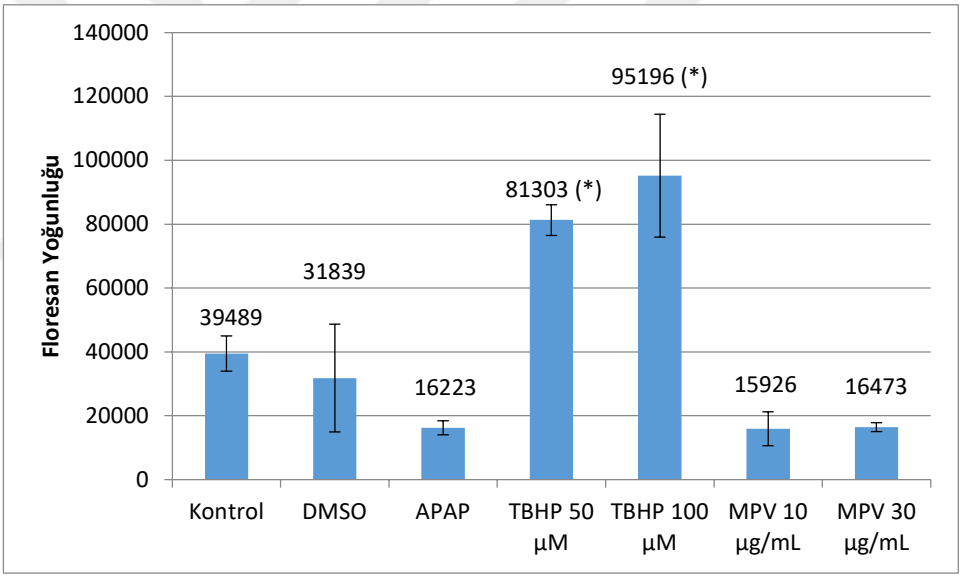
6.2.Oksidatif Hasar Bulguları

Bölüm 5.8'de anlatıldığı üzere; molnupiravirin HepG2 hücre dizisinde ROS oluşturma potansiyeli 24 saat süreyle maruziyet sonrası floresan mikroplaka okuyucu ile ölçülmüştür. Molnupiravir uygulaması sonucu ölçülen floresan yoğunluğu Şekil 24'de gösterilmiştir.



Şekil 24. Molnupiravirin HepG2 hücre dizisinde 24 saatlik maruziyet sonrası floresan yoğunluğu ölçümü

24 saatlik maruziyet sonucu hücre içindeki ROS üretimiyle orantılı olarak ölçülen floresan yoğunlukları değerlendirildiğinde; kontrole (%100) kıyasla DMSO (%29), 50 µM TBHP (%25) ve 100 µM TBHP (%51) ölçümlerinde artış ve 10 mM APAP (%9), 10 µg/mL molnupiravir (%19) ve 30 µg/mL (%33) molnupiravir ölçümlerinde düşüş gözlemlenmiştir. 100 µM TBHP uygulaması için ölçülen floresan yoğunluğunun kontrol grubuna oranla artışı istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). APAP ve molnupiravir ölçümlerindeki floresan yoğunluğunun kontrol grubuna oranla düşüş göstermesi ise, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05). İlaç maruziyeti 24 saatten 4 saate düşürülerek DCF testi tekrarlanmıştır. Molnupiravirin HepG2 hücre dizisinde ROS oluşturma potansiyeli 4 saat süreyle maruziyet sonrası floresan yoğunluğu ölçülmüştür. Molnupiravir uygulaması sonucu ölçülen floresan yoğunluğu Şekil 25'te gösterilmiştir.



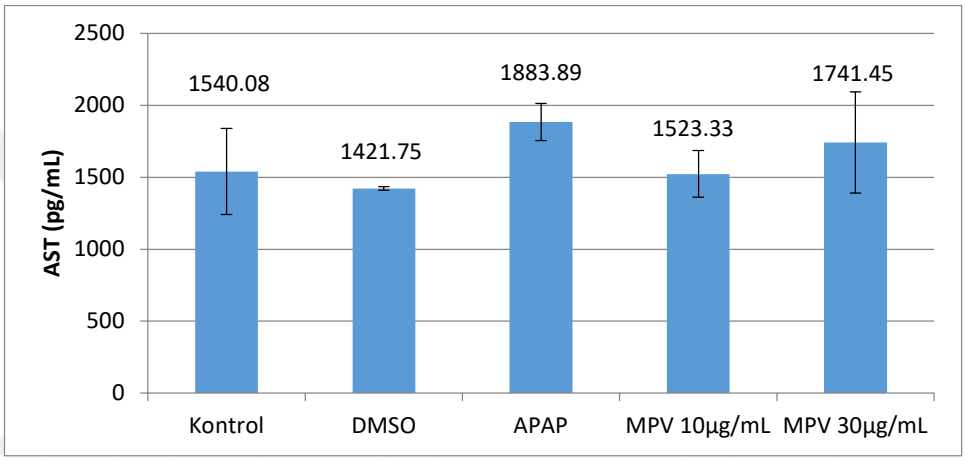
Şekil 25. Molnupiravirin HepG2 hücre dizisinde 4 saatlik maruziyet sonrası floresan yoğunluğu ölçümü

4 saatlik maruziyet sonucu hücre içindeki ROS üretimiyle orantılı olarak ölçülen floresan yoğunlukları değerlendirildiğinde; kontrole kıyasla 50 µM TBHP (%88) ve 100 µM TBHP (%149) ölçümlerinde artış ve DMSO (%12), 10 mM APAP (%63), 10 µg/mL molnupiravir (%29) ve 30 µg/mL (%61) molnupiravir ölçümlerinde düşüş gözlemlenmiştir. 50 µM TBHP ve 100 µM TBHP uygulaması için ölçülen floresan yoğunluğunun kontrol grubuna oranla artışı istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). APAP ve molnupiravir ölçümlerindeki floresan yoğunluğunun kontrol grubuna oranla düşüş göstermesi ise; istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05).

6.3.Biyokimyasal Analiz Bulguları

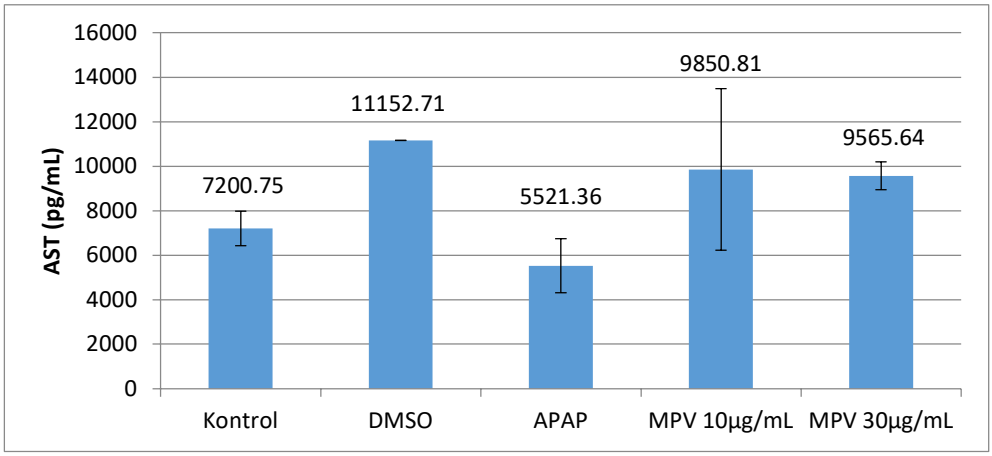
AST Bulguları

10 µg/mL ve 30 µg/mL molnupiravir ve pozitif kontrol olarak 10 mM asetaminofen (APAP) uygulaması sonucu HepG2 hücre süpernatantında AST seviyesi için yapılan ölçüm sonucunda; kontrol grubuna (1540.08 ± 299.46 pg/mL) oranla molnupiravir 30 µg/mL (1741.45± 350.90 pg/mL) ve APAP (1883.89 ± 128.18 pg/mL) uygulanan kuyucuklarda AST seviyeleri artış göstermiştir ancak istatiksel anlamlı bulunmamıştır (p>0.05) (Şekil 26).



Şekil 26. HepG2 hücre süpernatantında AST seviyeleri değerlendirilmesi

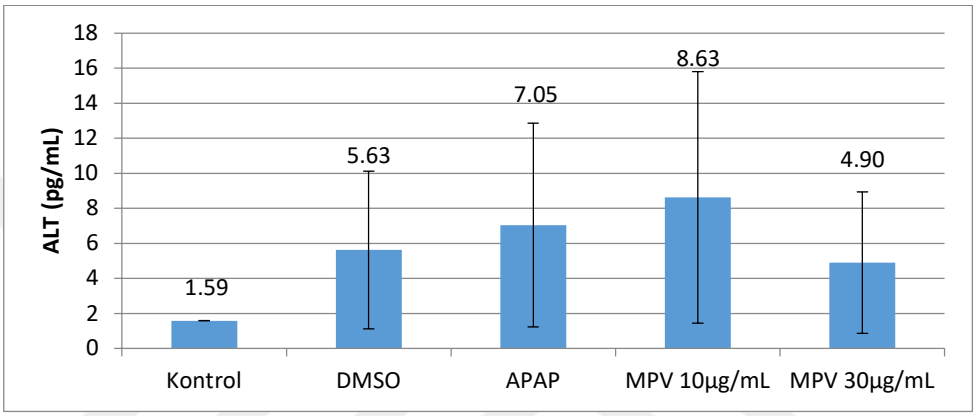
10 µg/mL ve 30 µg/mL molnupiravir ve pozitif kontrol olarak 10 mM asetaminofen (APAP) uygulaması sonucu HepG2 hücre ekstraktında AST seviyesi için yapılan ölçüm sonucunda; kontrol grubuna (7200.75 ± 775.99 pg/mL) oranla molnupiravirin her iki konsantrasyonunda (9850.81 ± 3632.28 pg/mL ve 9565.64 ± 621.24 pg/mL) AST seviyeleri artış göstermiştir ancak istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05) (Şekil 27).



Şekil 27. HepG2 hücre ekstraktında AST seviyeleri değerlendirilmesi

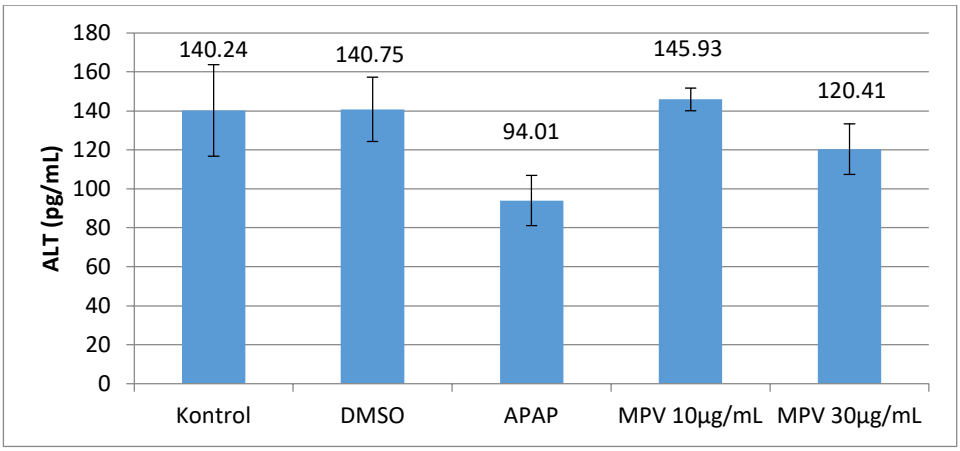
ALT Bulguları

10 µg/mL ve 30 µg/mL molnupiravir ve pozitif kontrol olarak 10 mM asetaminofen (APAP) uygulaması sonucu HepG2 hücre süpernatantında ALT seviyesi için yapılan ölçüm sonucunda; kontrol grubuna oranla (1.59 ± 0 pg/mL) molnupiravirin her iki konsantrasyonunda (8.63 ± 7.17 pg/mL ve 4.90 ± 4.03 pg/mL) ve APAP uygulanan hücrelerde (7.05 ± 5.81 pg/mL) ALT seviyeleri artış göstermiştir ancak istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05) (Şekil 28).



Şekil 28. HepG2 hücre süpernatantında ALT seviyeleri değerlendirilmesi

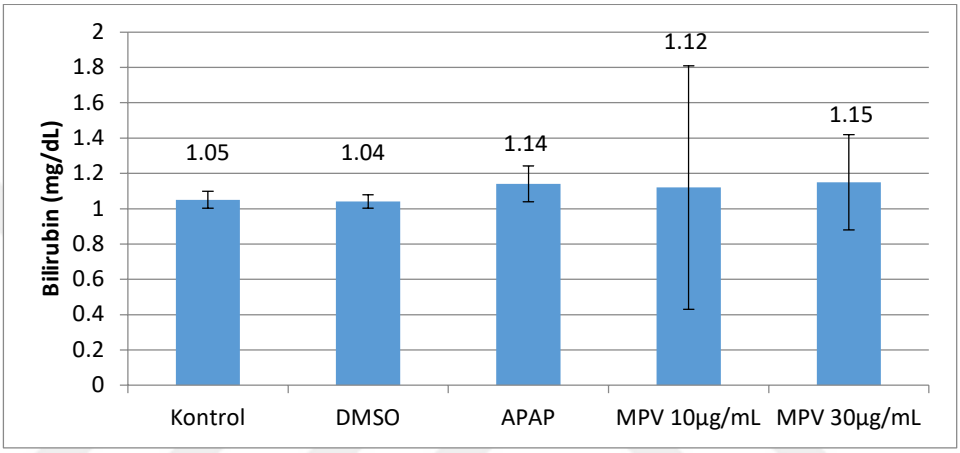
10 µg/mL ve 30 µg/mL molnupiravir ve pozitif kontrol olarak 10 mM asetaminofen (APAP) uygulaması sonucu HepG2 hücre ekstraktında ALT seviyesi için yapılan ölçüm sonucunda; kontrol grubuna oranla (140.24 ± 23.43 pg/mL) 10 µg/mL molnupiravir uygulanan kuyucuklarda (145.93 ± 5.85 pg/mL) ALT seviyeleri artış göstermiştir ancak istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05). Kontrol grubuna oranla APAP uygulanan kuyucuklarda (94.01 ± 12.92 pg/mL) ise ALT seviyelerinin istatiksel olarak anlamlı azalmış bulunmuştur (p<0.05) (Şekil 29).



Şekil 29. HepG2 hücre ekstraktında ALT seviyeleri değerlendirilmesi

Bilirubin Bulguları

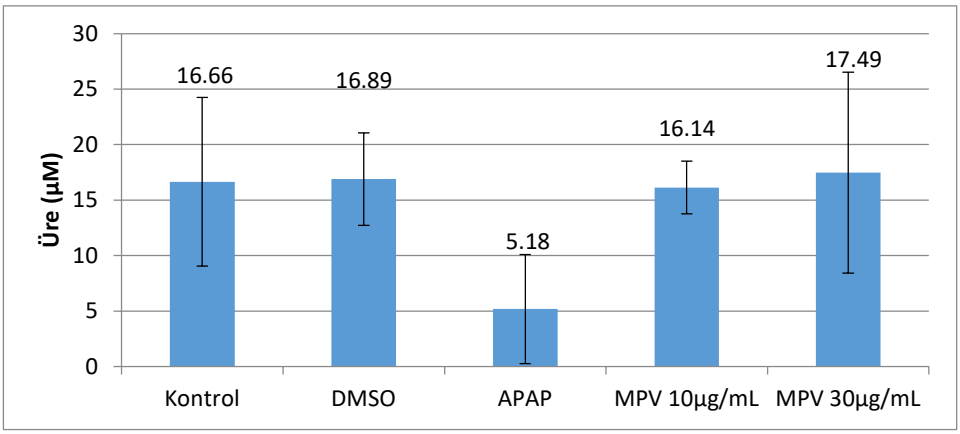
10 µg/mL ve 30 µg/mL molnupiravir ve pozitif kontrol olarak 10 mM asetaminofen (APAP) uygulaması sonucu HepG2 hücre dizisinde bilirubin seviyesi için yapılan ölçüm sonucunda; kontrol grubuna (1.05 ± 0.05 mg/dL) oranla molnupiravir (1.12 ± 0.69 mg/dL ve 1.15 ± 0.27 mg/dL) ve APAP uygulanan kuyucuklarda (1.14 ± 0.10 mg/dL) bilirubin seviyeleri artış göstermiştir ancak istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05) (Şekil 30).



Şekil 30. HepG2 hücre dizisinde billirubin seviyeleri değerlendirilmesi

Üre Bulguları

Pozitif kontrol olarak 10 mM asetaminofen (APAP) uygulaması sonucu (5.18 ± 4.92 µM) HepG2 hücre dizisinde üre seviyesi için yapılan ölçüm sonucunda kontrol grubuna (16.66 ± 7.59 µM) oranla düşmüştür, ancak istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05). 10 µg/mL ve 30 µg/mL molnupiravir uygulaması sonucu (16.14 ± 2.37 µM ve 17.49 ± 9.05 µM) kontrole kıyasla istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır (p>0.05). (Şekil 31).



Şekil 31. HepG2 hücre dizisinde üre seviyeleri değerlendirilmesi

10 µg/mL ve 30 µg/mL molnupiravir ve pozitif kontrol olarak 10 mM asetaminofen (APAP) uygulaması sonucu HepG2 hücre dizisinde ölçülen AST, ALT, bilirubin ve üre seviyeleri Tablo 19'da gösterilmiştir.

Tablo 19. HepG2 hücre dizisinde ölçülen AST, ALT, bilirubin ve üre seviyeleri

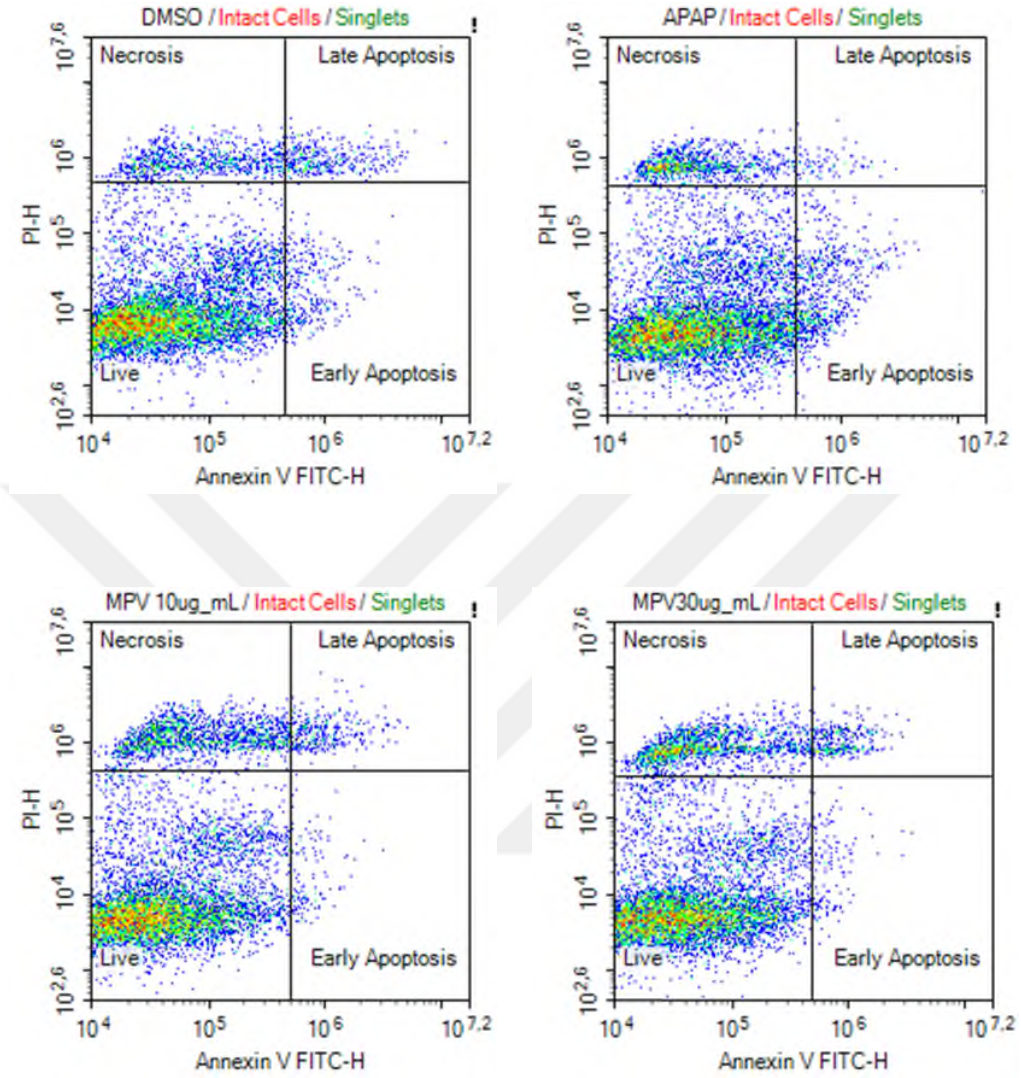
	Kontrol (Ortalama ± Standart Sapma)	**APAP** (Ortalama ± Standart Sapma)	**MPV 10µg/mL** (Ortalama ± Standart Sapma)	**MPV 30µg/mL** (Ortalama ± Standart Sapma)
AST (pg/mL) (Süpernatant)*	1540.08 ± 299.46	1883.89 ± 128.18	1523.33 ± 162.97	1741.45 ± 350.90
AST (pg/mL) (Hücre Ekstraktı)**	7200.75 ± 775.99	5521.36 ± 1213.47	9850.81 ± 3632.28	9565.64 ± 621.24
ALT (pg/mL) (Süpernatant)*	1.59 ± 0	7.05 ± 5.81	8.63 ± 7.17	4.9 ± 4.03
ALT (pg/mL) (Hücre Ekstraktı)**	140.24 ± 23.43	94.01 ± 12.92 (*)	145.93 ± 5.85	120.41 ± 12.98
Üre (µM)	16.66 ± 7.59	5.18 ± 4.92	16.14 ± 2.37	17.49 ± 9.05
Bilirubin (mg/dL)	1.05 ± 0.05	1.14 ± 0.10	1.12 ± 0.69	1.15 ± 0.27

*Hücre süpernatantında yapılan ölçüm

**Hücre ekstratında yapılan ölçüm

6.4.Apoptoz Bulguları

10 µg/mL ve 30 µg/mL molnupiravir ve pozitif kontrol olarak 10 mM asetaminofen (APAP) uygulaması sonucu HepG2 hücre dizisinde apoptotik etki potansiyelleri için akış sitometrik ölçüm yapılmıştır. Molnupiravirin akış sitometrik analizi Şekil 32'de sunulmuştur.



Şekil 32. HepG2 hücre dizisinde molnupiravirin akış sitometrik analizi

Canlı hücreler: FITC- Anneksin V ve PI negatif olan hücreler

Erken apoptotik hücreler: FITC-Anneksin V pozitif ve PI negatif olan apoptoz sürecine girmiş ancak henüz membran bütünlüğü bozulmamış hücreler

Geç apoptotik hücreler: FITC-Anneksin V ve PI pozitif olan apoptoz sürecine girmiş ve membran bütünlüğü bozulmuş hücreler

Nekrotik hücreler: FITC-Anneksin V negatif PI pozitif olan hücreler

Akış sitometrik ölçüm sonucunda; molnupiravir uygulanan hücrelerde canlı/apoptotik/nekrotik hücre oranları Tablo 20'de gösterilmiştir.

Tablo 20. Molnupiravir uygulanan hücrelerde canlı/apoptotik/nekrotik hücre oranı

	Hücre Oranı (%)			
	Canlı (Ortalama ± Standart Sapma)	**Erken apoptotik** (Ortalama ± Standart Sapma)	**Geç apoptotik** (Ortalama ± Standart Sapma)	**Nekrotik** (Ortalama ± Standart Sapma)
DMSO	84.76 ± 3.59	2.65 ± 0.44	2.34 ± 1.36	10.24 ± 3.72
APAP	77.31 ± 2.80	8.99 ± 3.38(*)	1.26 ± 0.53	12.43 ± 4.27
MPV 10µg/mL	78.92 ± 2.73	1.93 ± 0.86	3.48 ± 0.87	15.66 ± 2.74
MPV 30µg/mL	78.75 ± 3.81	1.36 ± 0.51	3.15 ± 0.28	16.74 ± 4.09

10 µg/mL molnupiravir uygulaması için apoptotik hücre popülasyonu %5.41 ve nekrotik hücre popülasyonu %15.66 olarak ölçülmüştür. Geç apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonu kontrol grubuna oranla artmış ancak istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

30 µg/mL molnupiravir uygulaması için apoptotik hücre popülasyonu %4.51 ve nekrotik hücre popülasyonu %16.74 olarak ölçülmüştür. Geç apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonu kontrol grubuna oranla artmış ancak istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

10 mM APAP uygulaması için apoptotik hücre popülasyonu %10,25 ve nekrotik hücre popülasyonu %12,43 olarak ölçülmüştür. Nekrotik hücre popülasyonu kontrol grubuna oranla artmış ancak istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Erken apoptotik hücre popülasyonunun kontrol grubuna oranla artışı istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

COVID-19'un ilk ortaya çıkışı, temel olarak solunum yolu hastalığı olarak algılansa da, zamanla tüm vücut sistemlerini etkileyebilen, çok organlı bir hastalık haline gelmiştir. Özellikle COVID-19'un karaciğer üzerindeki etkileri, pandeminin erken dönemlerinden itibaren çeşitli araştırmalarla ele alınmış ve SARS-CoV-2 enfeksiyonunun karaciğer fonksiyonları üzerinde anlamlı etkiler yarattığı gözlemlenmiştir (Casalini ve ark., 2022). COVID-19 hastalarında karaciğer enzimlerinde yükselme, klinikte sıklıkla yansıyan bulgulardan biridir. Çeşitli çalışmalar, COVID-19'un karaciğer üzerindeki etkisinin, mevcut karaciğer hastalığı olan bireylerde daha belirgin ve şiddetli olduğunu raporlamaktadır (Dufour ve ark., 2022). Özellikle, virüsün bağışıklık yanıtını tetikleyerek sitokin fırtınasına yol açması, karaciğer hücrelerine zarar verebilir ve hepatik disfonksiyonun gelişmesine yol açabilir (Dufour ve ark., 2022).

Bu bağlamda, COVID-19'un tedavisinde kullanılan ilaçların potansiyel hepatotoksik etkileri de önemli bir araştırma konusu olmuştur. Çalışmalar, COVID-19 tedavisinde kullanılan bazı ilaçların (örneğin, lopinavir/ritonavir, hidroksiklorokin, remdesivir, tosilizumab) karaciğer enzimlerinde yükselmelere yol açabileceğini göstermektedir (Hundt ve ark., 2020). Benzer şekilde, bu ilaçların COVID-19 tedavisinde yaygın olarak kullanılması, hepatotoksik etkilerinin izlenmesi gerekliliğini doğurmuştur. Molnupiravir, bu tedavi seçeneklerinden biri olarak, potansiyel hepatotoksisite açısından incelenmiştir.

COVID-19 da dahil olmak üzere MERS-CoV, influenza (H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N9), solunum sinsitiyal virüsü, Chikungunya virüsü, Ebola virüs, Marburg virüsü, Norovirüs, Hepatit C virüsü gibi pek çok viral hastalığın tedavisi için etkinliği araştırılan molnupiravirin; klinik öncesi ve klinik çalışmalarda güvenli ve iyi tolere edilebilir olduğu değerlendirilmiştir (Fischer ve ark., 2021; Santani ve ark. 2022; Tian ve ark., 2022). Genel olarak güvenli ve iyi tolere edilebilir olarak değerlendirilse de toplam klinik deneyimin sınırlı olduğu ve güvenliliğinin tam olarak tanımlanmadığı bilinmektedir.

Bu tez çalışmasında, molnupiravirin HepG2 hücrelerindeki hepatotoksisite potansiyelinin araştırılması amaçlanmış ve bu amaçla gerçekleştirilen MTT testi sonucu molnupiravirin IC_{50} 93,27 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Yapılan bir *in vitro* çalışmada, 48 saat boyunca CRFK hücrelerinde 63 µM (16,33 µg/mL) molnupiravir uygulaması sonucu, hücre canlılığı ölçümü için gerçekleştirilen MTT testi sonucu yüksek konsantrasyonlarda minimum sitotoksisite ile güvenli bir şekilde kullanılabileceğini gösterilmiş ve yarı-maksimum sitotoksik konsantrasyon

(CC_{50}) değeri 235,4 µM (61,01 µg/mL) olarak ölçülmüştür. Bu değerlerle toksik olmayan bir profil sergilediği değerlendirilen molnupiravir için etkinlik ve güvenlilik profilini tam olarak anlamak için daha fazla deneyim ve araştırmaya ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır (Barua ve ark., 2023). Literatürde molnupiravir için farklı hücre tiplerinde sitotoksisite değerlendirmeleri mevcuttur.

Hücre içi ROS artışı oksidatif strese neden olmaktadır ve buna bağlı olarak hücresel hasara neden olduğu bilinmektedir. Yapılan tez çalışmasında; oksidatif hasar değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen DCF testi sonucu, 24 saatlik maruziyette hücre içindeki ROS üretimiyle orantılı olarak ölçülen floresan yoğunlukları kontrole (%100) kıyasla 50 µM TBHP (%25) ve 100 µM TBHP (%51) ölçümlerinde artış ve 10 mM APAP (%9), 10 µg/mL molnupiravir (%19) ve 30 µg/mL (%33) molnupiravir ölçümlerinde düşüş gözlemlenmiştir. 100 µM TBHP uygulaması için ölçülen floresan yoğunluğu kontrol grubuna oranla istatiksel olarak anlamlı artmışken ($p<0.05$), APAP ve molnupiravir ölçümlerindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). İlaç maruziyeti süresinin 4 saate düşürülmesi ile tekrarlanan DCF testi sonucunda ise; ölçülen floresan yoğunlukları kontrole kıyasla 50 µM TBHP (%88) ve 100 µM TBHP (%149) ölçümlerinde istatistiksel artış ($p<0.05$) ve 10 mM APAP (%63), 10 µg/mL molnupiravir (%29) ve 30 µg/mL (%61) molnupiravir ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan ($p>0.05$) düşüş gözlemlenmiştir. Çalışmamızda ROS düzeyinin düşüşünün nekrotik ve geç apoptotik sürece giren hücre artışıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Literatürde benzer koşullarda gerçekleştirilen başka bir çalışma bulunamamıştır. Bu sebeple molnupiravirin hücresel hasar potansiyelinin ileri çalışmalarda araştırılması gerekmektedir.

Molnupiravire ait klinik çalışma ve pazarlama sonrası gerçek yaşam verilerinde biyokimyasal parametreler de değerlendirilmiştir. MOVe-OUT (NCT04575597) çalışmasında, potansiyel ilaca bağlı karaciğer hasarı açısından hastaların karaciğer enzimleri önceden belirlenmiş parametreler (AST veya ALT düzeylerinin normal üst sınırın üç katı veya daha yüksek olması; bilirubin düzeyinin, normal üst sınırın iki katı veya daha yüksek olması) doğrultusunda değerlendirilmiş; ancak karaciğer enzimlerinin yükselmesi ile ilgili veriler spesifik olarak bildirilmemiştir (Caraco ve ark., 2022; Jayk Bernal ve ark., 2021). NCT05386589 çalışmasında, orta şiddette karaciğer yetmezliği olan ve sağlıklı hastaların günde tek doz 800 mg molnupiravir kullanımı sonucu karşılaştırılarak ilacın advers etki oranı ve farmakokinetiği değerlendirilmiş ve çalışma protokolünde ALT, AST, üre ve bilirubin seviyelerinin takip edilmesi hedeflense de; çalışmaya katılan hastalarda herhangi bir hepatobiliyer advers olay ya da mevcut karaciğer yetmezliğinin kötüleşmesi görülmemiştir (National Library of Medicine Clinical Trials, 2024).

Benzer şekilde bazı klinik araştırmalarda da, molnupiravir tedavisi sırasında karaciğer fonksiyonlarında belirgin bir bozulma gözlemlenmemiştir (Butler ve ark., 2022; Painter ve ark., 2021).

Ancak bazı çalışmalarda nedensellik değerlendirmesi yapılmasa da AST, ALT ve bilirubin artışı görülmüştür (Casalini ve ark., 2022; Fischer ve ark., 2022; Khoo ve ark., 2021; Wong ve ark., 2023; Zou ve ark., 2022). Molnupiravir ile ilgili klinik veriler, çoğu çalışmada, bu ilacın karaciğer üzerindeki etkilerinin genellikle geçici ve geri dönüşümlü olduğunu göstermektedir. Bir çalışma sonucunda DILI riski düşük oranda (%1) bulunmuştur (Wong ve ark., 2023). Molnupiravir'in END-COVID (NCT04405739) çalışmasında ise molnupiravir 400 mg uygulanan 1 hastada, molnupiravir 800 mg uygulanan 1 hastada ve plasebo kolunda 1 hastada ALT artışı; molnupiravir 400 mg uygulanan 1 hastada ve plasebo kolundaki 1 hastada AST artışı raporlanmıştır (National Library of Medicine Clinical Trials, 2023). Özellikle serum aminotransferaz yükselmelerinin semptomatik SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında yaygın olması, ciddi hastalığı olan hastaların %70'inde mevcut olması ve erkek cinsiyet, ileri yaş, daha yüksek vücut kitle indeksi ve diyabet gibi COVID-19 için bilinen risk faktörlerine sahip olan hastalarda daha sık görülmesi sebebiyle de; molnupiravir de dahil COVID-19 tedavisinde kullanılan ilaçların potansiyel karaciğer hasarı değerlendirmesinin yapılmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, molnupiravirin karaciğer hasarına neden olduğu net bir şekilde gösterilmese de hepatotoksik etkilerin izlenmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Law ve ark., 2021; National Library of Medicines, 2022).

Bu tez çalışmasında molnupiravir uygulaması sonrası kontrol grubuna kıyasla biyokimyasal parametrelerdeki değişim değerlendirilmiştir. Hücre süpernatantında AST seviyesi için yapılan ölçüm sonucunda; kontrol grubuna (1540.08 ± 299.46 pg/mL) oranla molnupiravir 30 µg/mL (1741.45 ± 350.90 pg/mL) ve APAP (1883.89 ± 128.18 pg/mL) uygulanan kuyucuklarda AST seviyeleri artış göstermiştir ancak istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05). Hücre ekstraktında ise; kontrol grubuna (7200.75 ± 775.99 pg/mL) oranla molnupiravirin her iki konsantrasyonunda (9850.81 ± 3632.28 pg/mL ve 9565.64 ± 621.24 pg/mL) AST seviyeleri artış göstermiştir ancak istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05). Hücre süpernatantında ALT seviyesi için yapılan ölçüm sonucunda; kontrol grubuna oranla (1.59 ± 0 pg/mL) molnupiravirin her iki konsantrasyonunda (8.63 ± 7.17 pg/mL ve 4.90 ± 4.03 pg/mL) ALT seviyeleri artış göstermiştir ancak istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05). Hücre ekstraktında ise; kontrol grubuna oranla (140.24 ± 23.43 pg/mL) 10 µg/mL molnupiravir uygulanan kuyucuklarda (145.93 ± 5.85 pg/mL) ALT seviyeleri artış göstermiştir ancak

istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05). HepG2 hücre dizisinde bilirubin seviyesi için yapılan ölçüm sonucunda; kontrol grubuna (1.05 ± 0.05 mg/dL) oranla molnupiravir (1.12 ± 0.69 mg/dL ve 1.15 ± 0.27 mg/dL) ve APAP uygulanan kuyucuklarda (1.14 ± 0.10 mg/dL) bilirubin seviyeleri artış göstermiştir ancak istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05). HepG2 hücre dizisinde üre seviyesi için yapılan ölçüm sonucunda; 10 µg/mL ve 30 µg/mL molnupiravir uygulaması sonucu (16.14 ± 2.37 µM ve 17.49 ± 9.05 µM) kontrole kıyasla istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır (p>0.05). Literatürde benzer koşullarda gerçekleştirilen başka bir çalışma bulunamamıştır. Ancak istatistiksel anlamlı olmasa da; molnupiravir uygulanan kuyucuklarda kontrol grubuna kıyasla AST, ALT ve bilirubin seviyelerindeki artış; ilacın klinik öncesi, klinik ve klinik sonrası çalışmalardaki verileri ile tutarlı olarak değerlendirilmiştir. İlacın potansiyel karaciğer hasarı değerlendirmesinin yapılabilmesi için biyokimyasal parametrelerdeki değişimin ileri çalışmalarda araştırılması gerekmektedir.

Literatürde molnupiravirin apoptoz/nekroz süreçleri ile ilişkisinin incelendiği başka bir çalışma bulunamamıştır. Çalışmamızda, 24 saatlik 10 µg/mL ve 30 µg/mL molnupiravir uygulaması sonucu da geç apoptotik (sırasıyla %3.48 ve %3.15) hücre popülasyonu kontrol grubuna (%2.34) oranla artmış ve nekrotik (sırasıyla %15.66 ve %16.74) hücre popülasyonu da kontrol grubuna (%10.24) oranla artmış ancak istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05).

FDA Advers Olay Raporlama Sistemi'nde pazarlama sonrası verilerin değerlendirilmesi için yapılan çalışmalarda molnupiravir kullanımı sonrası görülen advers olaylar incelenmiştir. COVID-19 tedavisinde görülen 116576 advers olayın 2285'i molnupiravir ile ilişkili olup; hepatobiliyer bozukluklar en sık görülen advers olaylar olarak değerlendirilmese de özellikle 65 yaş ve üzeri hastalarda yüksek risk olarak tanımlanmıştır. Araştırma değerlendirmesi sonucunda; mevcut klinik çalışmalar ve sistematik incelemeler molnupiravir'in genel olarak olumlu bir güvenlilik profiline sahip olduğunu gösterse de, çalışmalardaki sonuçların kısa dönem (yaklaşık 28 gün) verisini kapsaması, gerçek yaşam ve pazarlama sonrası verilerin eksikliği gibi nedenler sebebiyle, ilacın güvenlilik profilinin sürekli olarak değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmıştır. Özellikle riskli popülasyonda hepatotoksisite riskinin daha fazla gözlemlenmesi gerekliliği bildirilmiştir (Kim ve ark., 2024; Liang ve ark., 2023).

Sonuç olarak, bu tez çalışmasıyla birlikte COVID-19 tedavisinde kullanılan antiviral tedavilerinden biri olarak molnupiravirin potansiyel hepatotoksisitesi incelenmiştir. Tüm bu incelemede, molnupiravir uygulaması sonrası ROS düzeyinin düşüşü, ilaç uygulamalarındaki nekrotik ve geç apoptotik hücre artışıyla orantılı olarak açıklanmaktadır. Genel olarak

bakıldığında molnupiravirin Cmax'ın 3 (10 μg/mL) ve 10 katında (30 μg/mL) HepG2 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da; nekrotik ve geç apoptotik hücre yüzdesini ve ALT, AST ve bilirubin gibi biyokimyasal parametreleri arttırdığı bulunmuştur. Çalışmamızın sonuçları klinik araştırmalarda raporlanan advers olaylarla tutarlı olarak değerlendirilmiştir. Molnupiravirin tek sefer 24 saat uygulanmasında karaciğer hasarı ile ilgili parametrelerdeki artış, molnupiravirin karaciğer hasarı açısından potansiyelinin gözardı edilmemesi gerektiğini düşündürmektedir. Altta yatan toksik etki mekanizmalarının henüz aydınlatılamamış olması ve literatürdeki mevcut verilerde ilacın hepatik advers olaylarını göz ardı etmemek amacıyla ilacın daha güvenli kullanımına katkı sağlamak için kapsamlı çalışmalar yapılması ve hatta *in vivo* çalışmaların yapılmasıyla bu mekanizmaların aydınlatılmasına gerek duyulmaktadır. Ayrıca, ilaçla ilgili potansiyel hepatotoksik etkilerin klinik gözlemlerle uyumlu hale getirilmesi, bu tedavi seçeneğinin etkinliğini artırmak için kritik bir adım olacaktır.

8. KAYNAKLAR

Abcam (2024). *AST, ALT, Urea, Cellular ROS Assay Kit Protocol Booklets.* https://www.abcam.com/en-tr

Aktuğ, H. (2014). Apoptozis ve hücre döngüsü. *Ege Tıp Dergisi, 53*(1), 60-64. https://doi.org/10.19161/etd.344045

Bayraktar, V., & Coşar, A. M. (2019). Karaciğer Enzim Yüksekliklerine Yaklaşım. *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*, 23(1), 41-47.

Bhattacharya, P. (2012). *Environmental Implications and Applications of Nanomaterials. All Dissertations.* 970. https://open.clemson.edu/all_dissertations/970

Butler, C. C., Hobbs, F. R. D., Gbinigie, O. A., Rahman, N. M., Hayward, G., Richards, D. B., Dorward, J., Lowe, D. M., Standing, J. F., Breuer, J., Khoo, S., Petrou, S., Hood, K., Nguyen-Van-Tam, J. S., Patel, M. G., Saville, B. R., Marion, J., Ogburn, E., Allen, J., Rutter, H., Francis, N., Thomas, N. P. B., Evans, P., Dobson, M., Madden, T. A., Holmes, J., Harris, V., Png, M. E., Lown, M., van Hecke, O., Detry, M. A., Saunders, C. T., Fitzgerald, M., Berry, N. S., Mwandigha, L., Galal, U., Mort, S., Jani, B. D., Hart, N. D., Ahmed, H., Butler, D., McKenna, M., Chalk, J., Lavallee, L., Hadley, E., Cureton, L., Benysek, M., Andersson, M., Coates, M., Barrett, S., Bateman, C., Davies, J. C., Raymundo-Wood, I., Ustianowski, A., Carson-Stevens, A., Yu, L. M., Little, P. (2023). Molnupiravir plus usual care versus usual care alone as early treatment for adults with COVID-19 at increased risk of adverse outcomes (PANORAMIC): An open-label, platform-adaptive randomised controlled trial. *Lancet, 401*(10373), 281-293. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02597-1

Canpolat, F. (2016). Hücre siklüsü ve apoptoz. *Güncel Dermatoloji Dergisi, 1*(1), 11-17.

Caraco, Y., Crofoot, G. E., Moncada, P. A., Galustyan, A. N., Musungaie, D. B., Payne, B., Kovalchuk, E., Gonzalez, A., Brown, M. L., Williams-Diaz, A., Gao, W., Strizki, J. M., Grobler, J., Du, J., Assaid, C. A., Paschke, A., Butterton, J. R., Johnson, M. G., & De Anda, C. (2022). Phase 2/3 trial of molnupiravir for treatment of COVID-19 in nonhospitalized adults. *NEJM Evidence, 1*(2), EVIDoa2100043. https://doi.org/10.1056/EVIDoa2100043

Casalini, G., Giacomelli, A., & Antinori, S. (2022). Liver tests abnormalities with licensed antiviral drugs for COVID-19: A narrative review. *Expert Opinion on Drug Safety, 21*(12), 1483-1494. https://doi.org/10.1080/14740338.2022.2160446

Celepli, S., Bigat, İ., Celepli, P., & Karagin, P. H. (2020). Apoptoz ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi. *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*, 24(3), 103-111.

Cellbiolabs. 2024. *Bilirubin Assay Kit Product Manual MET-5010.* https://www.cellbiolabs.com/bilirubin-assay-kit

Chamod, P., Sangsiri, S., Tangjittham, K., Liu, P., Mongkhonsakunrit, P., Pakotiprapha, J., Rimdusit, T., Prajuabjinda, O., & Poomirat, S. (2023). Molnupiravir metabolite—N4-hydroxycytidine causes cytotoxicity and DNA damage in mammalian cells in vitro. *Asian Medical Journal and Alternative Medicine, 23*(3), 53-63. https://asianmedjam.com/index.php/amjam/article/view/1448

Coşkun, G., & Özgür, H. (2011). Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Aktüel Tıp Dergisi, 20*(3), 145-158.

Cuykx, M., Rodrigues, R. M., Laukens, K., Vanhaecke, T., & Covaci, A. (2018). In vitro assessment of hepatotoxicity by metabolomics: A review. *Archives of Toxicology, 92*(10), 3007-3029. https://doi.org/10.1007/s00204-018-2286-9

Dağdeviren, T. (2021). Programlı hücre ölümü: Apoptoz. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 13*(3), 120-135.

D'Arcy M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, *43*(6), 582–592. https://doi.org/10.1002/cbin.11137

Donato, M. T., Gallego-Ferrer, G., & Tolosa, L. (2022). In vitro models for studying chronic drug-induced liver injury. *International Journal of Molecular Sciences, 23*(19), 11428. https://doi.org/10.3390/ijms231911428

Donato, M. T., Tolosa, L., & Gómez-Lechón, M. J. (2015). Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1250, pp. 77-93). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_5

Dufour, J. F., Marjot, T., Becchetti, C., & Tilg, H. (2022). COVID-19 and liver disease. *Gut*, 71(11), 2350–2362. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-326792

EBioscience. 2024. *Annexin V-FITC Apoptoz Kiti BMS500FI Product Manual*. https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/88-8102-72?SID=srch-srp-88-8102-72

European Medicines Agency (2023, Haziran). *Withdrawal of application for the marketing authorisation of Lagevrio (molnupiravir).* https://www.ema.europa.eu/en/documents/medicine-qa/questions-and-answers-withdrawal-application-marketing-authorisation-lagevrio-molnupiravir_en.pdf

Fischer, W., Eron, J. J., Holman, W., Cohen, M. S., Fang, L., Szewczyk, L. J., Sheahan, T. P., Baric, R., Mollan, K. R., Wolfe, C. R., Duke, E. R., Azizad, M. M., Borroto-Esoda, K., Wohl, D. A., Loftis, A. J., Alabanza, P., Lipansky, F., & Painter, W. P. (2021). Molnupiravir, an oral antiviral treatment for COVID-19. *MedRxiv*. https://doi.org/10.1101/2021.06.17.21258639

Fischer, W., Eron, J. J., Holman, W., Cohen, M. S., Fang, L., Szewczyk, L. J., Sheahan, T. P., Baric, R., Mollan, K. R., Wolfe, C. R., Duke, E. R., Azizad, M. M., Borroto-Esoda, K., Wohl, D. A., Coombs, R. W., Loftis, A. J., Alabanza, P., Lipansky, F., & Painter, W. P. (2022). A phase 2a clinical trial of molnupiravir in patients with COVID-19 shows

accelerated SARS-CoV-2 RNA clearance and elimination of infectious virus. *Science Translational Medicine, 14*(628), eabl7430. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abl7430

Food and Drug Administration. (2021, December). *Coronavirus (COVID-19) update: FDA authorizes additional oral antiviral for treatment of COVID-19 in certain adults.* https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-additional-oral-antiviral-treatment-covid-19-certain

Guan, W. J., Ni, Z. Y., Hu, Y., Liang, W. H., Ou, C. Q., He, J. X., Liu, L., Shan, H., Lei, C. L., Hui, D. S. C., Du, B., Li, L. J., Zeng, G., Yuen, K. Y., Chen, R. C., Tang, C. L., Wang, T., Chen, P. Y., Xiang, J., Li, S. Y., Wang, J. L., Liang, Z. J., Peng, Y. X., Wei, L., Liu, Y., Hu, Y. H., Peng, P., Wang, J. M., Liu, J. Y., Chen, Z., Li, G., Zheng, Z. J., Qiu, S. Q., Luo, J., Ye, C. J., Zhu, S. Y., & Zhong, N. S.; China Medical Treatment Expert Group for COVID-19. (2020). Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine, 382*(18), 1708–1720. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032

Gültekin, N., Karaoğlu, K., & Küçükateş, E. (2008). New discoveries in the mechanisms of apoptosis and cell survival and novel potential therapeutic strategies. *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi, 36*(2), 120–130.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine* (5th ed.). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001

Health Canada. (2023, April). Summary of cancellation for Molnupiravir (*Lagevrio*). *Health Canada*. https://dhpp.hpfb-dgpsa.ca/review-documents/resource/RDS1683828447298

Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Xiao, Y., Gao, H., Guo, L., Xie, J., Wang, G., Jiang, R., Gao, Z., Jin, Q., Wang, J., & Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet, 395*(10223), 497–506. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5

Hundt, M. A., Deng, Y., Ciarleglio, M. M., Nathanson, M. H., & Lim, J. K. (2020). Abnormal liver tests in COVID-19: A retrospective observational cohort study of 1,827 patients in a major U.S. hospital network. *Hepatology, 72*(4), 1169–1176. https://doi.org/10.1002/hep.31487

İsan, H., Tombuş, A. C., Doğru, H. O., Şanlı, G., & Aktaş, R. G. (2016). Karaciğer kanser hücrelerinin sitoplazmik özellikleri ile kültür süreci ilişkisi: Konfokal mikroskopik karşılaştırmalı kantitatif bir çalışma. *Maltepe Tıp Dergisi, 8*(3), 18–23.

Jamwal, S., Kumar, P., Kakkar, V., Kumari, P., & Chahal, S. (2020). Protocols in apoptosis identification and affirmation. In *Protocols in apoptosis identification and affirmation* (pp. 127–152). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815762-6.00005-6

Jayk Bernal, A., Gomes da Silva, M. M., Musungaie, D. B., Kovalchuk, E., Gonzalez, A., Delos Reyes, V., Martín-Quirós, A., Caraco, Y., Williams-Diaz, A., Brown, M. L., Du, J.,

Pedley, A., Assaid, C., Strizki, J., Grobler, J. A., Shamsuddin, H. H., Tipping, R., Wan, H., Paschke, A., Butterton, J. R., Johnson, M. G., & De Anda, C.; MOVe-OUT Study Group. (2022). Molnupiravir for oral treatment of COVID-19 in nonhospitalized patients. *The New England Journal of Medicine, 386*(6), 509–520. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2116044

Khoo, S. H., Fitzgerald, R., Fletcher, T., Ewings, S., Jaki, T., Lyon, R., Downs, N., Walker, L., Tansley-Hancock, O., Greenhalf, W., Woods, C., Reynolds, H., Marwood, E., Mozgunov, P., Adams, E., Bullock, K., Holman, W., Bula, M. D., Gibney, J. L., Saunders, G., Corkhill, A., Hale, C., Thorne, K., Chiong, J., Condie, S., Pertinez, H., Painter, W., Wrixon, E., Johnson, L., Yeats, S., Mallard, K., Radford, M., Fines, K., Shaw, V., Owen, A., Lalloo, D. G., Jacobs, M., & Griffiths. (2021). Optimal dose and safety of molnupiravir in patients with early SARS-CoV-2: A phase I, open-label, dose-escalating, randomized controlled study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 76*, 3286–3295. https://doi.org/10.1093/jac/dkab318

Kim, H. J., Yoon, J. H., & Lee, K. H. (2024). Investigating the safety profile of fast-track COVID-19 drugs using the FDA Adverse Event Reporting System database: A comparative observational study. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety, 33(11)*, e70043. https://doi.org/10.1002/pds.70043

Kntayya, S. B., Ibrahim, M. D., Mohd Ain, N., Iori, R., Ioannides, C., & Abdull Razis, A. F. (2018). Induction of apoptosis and cytotoxicity by isothiocyanate sulforaphene in human hepatocarcinoma HepG2 cells. *Nutrients, 10*(6), 718. https://doi.org/10.3390/nu10060718

Koçaklı, Z. G., Akıllıoğlu, K., & Doğan, A. (2015). Vasküler düz kas hücrelerinin izolasyonu ve kültürü. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 24*(3), 390–401.

Kulkarni, A. V., Kumar, P., Tevethia, H. V., Premkumar, M., Arab, J. P., Candia, R., Talukdar, R., Sharma, M., Qi, X., Rao, P. N., & Reddy, D. N. (2020). Systematic review with meta-analysis: Liver manifestations and outcomes in COVID-19. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 52*(4), 584–599. https://doi.org/10.1111/apt.15916

Kullak-Ublick, G. A., Andrade, R. J., Merz, M., End, P., Benesic, A., Gerbes, A. L., & Aithal, G. P. (2017). Drug-induced liver injury: Recent advances in diagnosis and risk assessment. *Gut, 66*(6), 1154–1164. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313369

Kumar, D., & Trivedi, N. (2021). Disease-drug and drug-drug interaction in COVID-19: Risk and assessment. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 139*, 111642. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111642

Kumar, D., Trivedi, N., & Verma, A. (2022). Immunomodulation may affect the efficacy of COVID-19 medication by changing drug metabolism and pharmacokinetics. *21st Century Pathology, 2*(1), 111.

Küçüksayan, A. S., & Küçüksayan, E. (2020). Geri yansıma spektroskopisi ile hücre kültürü çalışmalarında hücre sayısının belirlenmesi için yeni bir metot. *Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 11*(2), 231–235.

Law, M. F., Ho, R., Law, K. W. T., Cheung, C. K. M. (2021). Gastrointestinal and hepatic side effects of potential treatment for COVID-19 and vaccination in patients with chronic liver diseases. *World Journal of Hepatology, 13*(12), 1850–1874. https://doi.org/10.4254/wjh.v13.i12.1850

Li, X., Wang, W., Yan, S., Zhao, W., Xiong, H., Bao, C., Chen, J., Yue, Y., Su, Y., & Zhang, C. (2022). Drug-induced liver injury in COVID-19 treatment: Incidence, mechanisms and clinical management. *Frontiers in Pharmacology, 13*, 1019487. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1019487

Liang, Y., Ma, L., Wang, Y., Zheng, J., Su, L., & Lyu, J. (2023). Adverse events associated with molnupiravir: A real-world disproportionality analysis in the Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System. *Frontiers in Pharmacology, 14*, 1253799. https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1253799

Lupia, T., Corcione, S., Shbaklo, N., Boglione, L., Torresan, S., Pinna, S. M., Rizzello, B., Bosio, R., Fornari, V., Brusa, M. T., Borrè, S., & De Rosa, F. G. (2022). Real-life experience of molnupiravir in hospitalized patients who developed SARS-CoV-2 infection: Preliminary results from the CORACLE registry. *Antibiotics (Basel), 11*(11), 1541. https://doi.org/10.3390/antibiotics11111541

Madhubala, V., Nagarajan, C., Baskaran, P., Raguraman, V., & Kalaivani, T. (2023). Formulation of magnetic core-shell nanostructured Fe3O4@TiO2 for cytotoxic activity against Huh-7 cells. *Inorganic Chemistry Communications, 149*, 110430. https://doi.org/10.1016/j.inoche.2023.110430

Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA) (2021, November). *First oral antiviral for COVID-19, Lagevrio (molnupiravir), approved by MHRA.* https://www.gov.uk/government/news/first-oral-antiviral-for-covid-19-lagevrio-molnupiravir-approved-by-mhra

Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA) (2023, Ekim) *Lagevrio Summary of Product Characteristics.* https://products.mhra.gov.uk/product/?product=LAGEVRIO%20200%20MG%20HARD%20CAPSULES

Mukherjee, S., & Gollan, J. L. (2011). Assessment of liver function. In J. S. Dooley, A. S. F. Lok, A. K. Burroughs, E. J. Heathcote (Eds.), *Sherlock's diseases of the liver and biliary system* (12th ed., Chapter 2). Wiley. https://doi.org/10.1002/9781444341294.ch2

National Institutes of Health. (2024, Mayıs). *COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) treatment guidelines.* https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/

National Library of Medicine Clinical Trials. (2023, Mayıs). *The Safety of Molnupiravir (EIDD-2801) and Its Effect on Viral Shedding of SARS-CoV-2 (END-COVID).* https://clinicaltrials.gov/study/NCT04405739?tab=results#adverse-events

National Library of Medicine Clinical Trials. (2024, Mayıs). *Efficacy and Safety of Molnupiravir (MK-4482) in Non-Hospitalized Adult Participants With COVID-19 (MK-4482-002).* https://clinicaltrials.gov/study/NCT04575597

National Library of Medicines. (2022, January). *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver.* https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK577814/

Nwabufo, C. K., & Bendayan, R. (2022). Pharmacokinetic considerations to optimize clinical outcomes for COVID-19 drugs. *Trends in Pharmacological Sciences, 43*(12), 1041–1054. https://doi.org/10.1016/j.tips.2022.09.005

Onakpoya, I. J., Heneghan, C. J., & Aronson, J. K. (2016). Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: A systematic review of the world literature. *BMC Medicine, 14*, 10. https://doi.org/10.1186/s12916-016-0553-2

Painter, W. P., Holman, W., Bush, J. A., Almazedi, F., Malik, H., Eraut, N. C. J. E., Morin, M. J., Szewczyk, L. J., & Painter, G. R. (2021). Human safety, tolerability, and pharmacokinetics of molnupiravir, a novel broad-spectrum oral antiviral agent with activity against SARS-CoV-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *65*(5), e02428-20. https://doi.org/10.1128/AAC.02428-20

Pontolillo, M., Ucciferri, C., Borrelli, P., Di Nicola, M., Vecchiet, J., & Falasca, K. (2022). Molnupiravir as an early treatment for COVID-19: A real-life study. *Pathogens*, *11*(10), 1121. https://doi.org/10.3390/pathogens11101121

Qiu, H., Wander, P., Bernstein, D., & Satapathy, S. K. (2020). Acute on chronic liver failure from novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Liver International*, *40*(7), 1590–1593. https://doi.org/10.1111/liv.14506

Richter, L. H. J., Flockerzi, V., Maurer, H. H., & Meyer, M. R. (2017). Pooled human liver preparations, HepaRG, or HepG2 cell lines for metabolism studies of new psychoactive substances? A study using MDMA, MDBD, butylone, MDPPP, MDPV, MDPB, 5-MAPB, and 5-API as examples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *143*, 32–42. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.028

Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., Minor, L., Markossian, S., Grossman, A., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Baell, J., Brimacombe, K., Chung, T. D. Y., Coussens, N. P., Dahlin, J. L., Devanarayan, V., Foley, T. L., Glicksman, M., Gorshkov, K., Haas, J. V., Hall, M. D., Hoare, S., Inglese, J., Iversen, P. W., Lal-Nag, M., Li, Z., Manro, J. R., McGee, J., McManus, O., Pearson, M., Riss, T., Saradjian, P., Sittampalam, G. S., Tarselli, M., Trask, O. J. Jr., Weidner, J. R., Wildey, M. J., Wilson, K., Xia, M., & Xu, X. (2013, May 1; updated 2016 Jul 1). Cell viability assays. In *Assay guidance manual* [Internet]. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/

Santani, B. G., LeBlanc, B. W., & Thakare, R. P. (2022). Molnupiravir for the treatment of COVID-19. *Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998), 58*(7), 335–350. https://doi.org/10.1358/dot.2022.58.7.3419558

Swissmedic. (2023, February). *Current status of authorisations for combating COVID-19.* https://www.swissmedic.ch/swissmedic/en/home/news/coronavirus-covid-19/stand-zl-bekaempfung-covid-19.html

T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. (2020, Aralık). *COVID-19 COVID-19 Epidemiyoloji ve Tanı rehberi* https://covid19.saglik.gov.tr/eklenti/39551/0/covid-19rehberigenelbilgilerepidemiyolojivetanipdf.pdf

T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. (2022, Nisan). *COVID-19 (SARS-CoV-2 Enfeksiyonu) Erişkin Hasta Tedavisi* https://covid19.saglik.gov.tr/Eklenti/43095/0/covid-19rehberieriskinhastayonetimivetedavi-12042022pdf.pdf

TGA (2022, February). *Australian Public Assesment Report for Molnupiravir.* https://www.tga.gov.au/sites/default/files/auspar-molnupiravir-220207.pdf

Tian, L., Pang, Z., Li, M., Lou, F., An, X., Zhu, S., Song, L., Tong, Y., Fan, H., & Fan, J. (2022). Molnupiravir and its antiviral activity against COVID-19. *Frontiers in Immunology*, *13*, 855496. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.855496

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *39*(1), 44–84. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001

Wang, H., & Joseph, J. A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine, 27*(5–6), 612–616. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00107-0

Wong, G. L., Hui, V. W., Yip, T. C., Lui, G. C., Hui, D. S., & Wong, V. W. (2023). Minimal risk of drug-induced liver injury with molnupiravir and ritonavir-boosted nirmatrelvir. *Gastroenterology*, *164*(1), 151–153. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.09.008

World Health Organization. (2020). *Novel coronavirus (2019-nCoV) situation report 1. World Health Organization, Geneva, Switzerland.* https://iris.who.int/handle/10665/330760

World Health Organization. (2022, August). *Administration of Molnupiravir for COVID-19.* https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Therapeutics-Molnupiravir-Poster_B-2022.1

World Health Organization. (2023, Kasım). *Therapeutics and COVID-19.* https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-therapeutics-2023.2

World Health Organization. (2024, Mayıs). *COVID-19 Epidemiological Updates and Monthly Operational Updates.* https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports

World Health Organization. (2024, Mayıs). *VigiAccess.* https://www.vigiaccess.org/

World Health Organization. (2024, Nisan). *COVID-19 dashboard* https://data.who.int/dashboards/covid19/cases

Yılmaz, O. F. (2021). Oksidatif stres ve karaciğer hastalıkları. *Muş Alparslan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 1*(1), 8–15.

Zou, R., Peng, L., Shu, D., Zhao, L., Lan, J., Tan, G., Peng, J., Yang, X., Liu, M., Zhang, C., Yuan, J., Wang, H., Li, S., Lu, H., Zhong, W., & Liu, Y. (2022). Antiviral efficacy and safety of molnupiravir against Omicron variant infection: A randomized controlled clinical trial. *Frontiers in Pharmacology, 13*, 939573. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.939573

9. BİLİMSEL FAALİYETLER

Karakaş, T., Yeşil, T. & Karslı, S. *In vitro* effects of molnupiravir on liver: preliminary study. Fifteenth International Academic Studies Conference, 26-27 December 2024, İstanbul, Türkiye. (*Poster Sunumu*)

Yeşil, T, Karakaş, T., Hıdıroğlu, M. & Karslı, S. (2025). Hepato(Geno)toxicity Assessment of Different Bromelain Food Supplements in HepG2 Cell Line Model by the Comet Assay. Pharmedicine Journal. Article in press.