MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AML12 HEPATOSİT HÜCRE SOYUNDA KLOPİDOGREL'İN MİTOKONDRİYAL AKTİVİTEYE OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

MİRAY CAHİDE KARABAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ

İSTANBUL,2019

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AML12 HEPATOSİT HÜCRE SOYUNDA KLOPİDOGREL'İN MİTOKONDRİYAL AKTİVİTEYE OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

MİRAY CAHİDE KARABAY
(520116010)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ

İSTANBUL,2019

MARMARA UNIVERSITY

INSTITUDE OF PURE AND APPLIED SCIENCES

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CLOPIDOGREL IN AML12 HEPATOCYTE CELL LINE OVER MITOCHONDRIAL ACTIVITY

MİRAY CAHİDE KARABAY
(520116010)

MASTER THESIS

Department of Biology

THESIS SUPERVISOR

Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ

ISTANBUL,2019

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

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

Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Belgin SÜSLEYİCİ (Danışman)

Marmara Üniversitesi

Dr.Öğr. Üyesi Güler DARTAN (Üye)

Marmara Üniversitesi

Doç.Dr. Duygu GEZEN AK (Üye)

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20/02/2019 tarih ve 2019.0502.sayılı kararı ile Miray Cahide KARABAY'ın Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Bülent EKİCİ

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimim süresince kendisini örnek aldığım Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ'ye, lisansüstü eğitimimde de danışmanlığımı üstlendiği, akademik geleceğime ışık tuttuğu, kendi yaşantımdaki sorunlarda da benden desteğini esirgemediği ve bana güvenini hep hissettirdiği için kendisine teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım süresince deneyim ve desteğiyle hep yanımda olan Uzm. Bio. Mehtap ÇEVİK'e teşekkür ederim.

Çalışmalarımda ve yaşantımda, destek ve yardımlarını esirgemeyen çok kıymetli arkadaşlarım Didem KUTLU, Ece ÇARPAR ve Melike ÜLKER'e teşekkürlerimi sunarım.

Bugüne dek kazandığım her yeti ve başarıda üzerimde büyük emekleri olan, beni akademik kariyer konusunda şevklendiren, bana hep güvenen ve desteklerini benden esirgemeyen, her zaman beni sevgi ve güvenle kucaklayan çok değerli annem; Gökçen Gülçin KARABAY ve çok değerli babam; Rıfat KARABAY'a sonsuz teşekkür ederim. Yaşadığım iyi-kötü her günde olduğu gibi yüksek lisans sürecimde de sevgi ve destekleriyle yanımda olan, attığım her adımda varlıklarından onur duyduğum çok değerli arkadaşlarıma ve bizzat sevgili Haşim Çağatay ALTAY'a da teşekkür ederim.

Mevcut çalışma ve tezimi, yüksek lisansa başlamamı ve akademik kariyerimde ilerlememi çok isteyen rahmetli annem; Gökçen Gülçin KARABAY'a ithaf ediyorum.

Miray Cahide KARABAY

Ocak 2019

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

TEŞEKKÜR i
ÖZET iv
ABSTRACT v
SEMBOLLER vi
KISALTMALAR vii
ŞEKİL LİSTESİ x
TABLO LİSTESİ xi
1. GİRİŞ 1
1.1. Karaciğer Dokusu ve Hepatositin Görevleri 1
1.1.1. Hepatosit toksisitesi 3
1.1.1.2. Mitokondriyal disfonksiyon kaynaklı hepatotoksisite 6
1.1.2. P450 enzim sistemi 6
1.1.2.1. P450 enziminin ilaç metabolizmasındaki rolü 7
1.1.2.2. P450 enzim sistemi ve toksisite ilişkisi 7
1.1.3. Trombositler 7
1.1.4. Klopidogrel 10
1.1.4.1. Klopidogrel kullanımı ve çalışma mekanizması 12
1.1.5. Klopidogrelin hücre etkileşimi 13
1.1.5.1. Klopidogrel tedavisinde hepatotoksisite 13
1.1.6. Mitokondri yapı ve fonksiyonları 14
1.1.6.1. Mitokondri ve mitokondrinin ilaç kaynaklı karaciğer hasarındaki rolü . 16
1.1.6.2. Mitokondri fonksiyonlarının doğrudan inhibisyonu 17
1.1.6.3. Reaktif metabolit kaynaklı MMD 17
1.1.6.4. Klopidogrel kaynaklı hücre ölümü 18
2. MATERYAL VE YÖNTEM 21
2.1. Materyaller 21
2.2. Yöntem 23
2.2.1. Sitotoksisite testi 23
2.2.2. XTT test prensibi 23
2.2.3. XTT ve MTT testleri arasındaki farklılıklar 24
2.2.4. XTT - mitokondriyal aktivite tayini 26
2.2.4.1. Hepatosit hücre kültürü 26

2.2.4.2. Hücre sayımı 26
2.2.4.3. Hepatositlerin 96 kuyucuklu mikroplakalarda alt kültürü 27
2.2.4.4. Mikroplakalardaki hücre kültürünün klopirogrel'e maruz bırakılması .. 28
2.2.4.5. XTT' nin maruziyet plakalarına uygulanması ve spektrofotometrik ölçüm yapılması 31
2.2.5. Sonuçların değerlendirilmesi 33
3. BULGULAR VE TARTIŞMA 34
3.1. Bulgular 34
3.2. Tartışma 37
4.SONUÇLAR 41
5. KAYNAKÇA 43
ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

AML12 HEPATOSİT HÜCRE SOYUNDA KLOPİDOGREL'İN MİTOKONDRİYAL AKTİVİTEYE OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Klopidogrel güçlü bir antitrombotik olup, trombosit agregasyonunu inhibe eden tienopiridin türevidir vetrombotik olayların önlenmesinde kullanılır. Klopidogrel, diğer kardiyovasküler ilaçlara nazarantedavide daha başarılı sonuçlar verdiğinden, destek ilaçlara olan ihtiyacın indirgendiği ve yan etkilerin de azaldığı ortaya çıkmıştır.

Gastrointestinal bozukluklar, kanama, kızarıklık ve ishal gibi rahatsızlıklar Klopidogrel'in yan etkileridir, fakat hepatotoksisite, trombotik trombositopenik purpura, pansitopeni, sistemik inflamatuar yanıt sendromu gibi komplikasyonlar da gözlemlenmiştir. Ancak literatürde Klopidogrel kaynaklı hepatotoksisite netliğe kavuşmamıştır. Buna bağlı olarak çalışmamız; mevcut çalışmalarda uygulanan Klopidogrel dozlarının alt, üst ve ara dozlarından faydalanarak sitotoksisite ve mitokondriyal hasarın ne ölçüde olduğunu belirlemeyi amaçlamaktadır.

Mevcut çalışmada *Mus musculus* kökenli AML12 hepatositleri25, 50, 150, 200, 250, 300, 400 μMKlopidogrel dozlarına maruz bırakılarak XTT testi uygulandı. Deneyin doğrulanması ve daha fazla doz uygulayabilmekiçin test, iki ayrı mikroplakada çalışıldı. Birinci mikroplakadaki hepatositlere 400, 300, 200 ve 25 μM Klopidogrel dozları uygulandı ve elde edilen sonuçlar*GraphPad Prism 8*programıyla inhibisyon konsanstrasyon değeri 97.39, logaritmik inhibisyon konsanstrasyon değeri ise 1.989 bulundu. İkinci mikroplakaya ise 400, 250, 150, 50 μM Klopidogrel dozları uygulanarak inhibisyon konsanstrasyon değeri 171.3, logaritmik inhibisyon konsanstrasyon değeri ise 2.234 bulundu.

Çalışma sonuçlarından yola çıkılarak 25 μM Klopidogrel dozunun sitotoksisiteye neden olmadığı,50 μM konsantrasyonunda ise sitotoksisitede ciddi bir artış gözlemlendi. 150, 200, 250, 300, 400 μM Klopidogrel dozlarında ise sitotoksisitenin %100'e kadar arttığı ve özellikle 300 ve 400 μM dozlarda sitotoksisitenin stabilkaldığı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler : XTT, sitotoksisite, hepatosit, AML12, hepatotoksisite, hücre kültürü, mitokondri, Klopidogrel

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CLOPIDOGREL IN AML12 HEPATOCYTE CELL LINE OVER MITOCHONDRIAL ACTIVITY

Clopidogrel is a potent antithrombotic drug and is a thienopyridine derivative which inhibits platelet agregation. Clopidogrel is used in the prevention and intervention of thrombotic events in high-risk patients. Clopidogrelhas been shownto be more successful than other cardiovascular drugs, the need for supportive drugs and also side effects are decreased.

Gastrointestinal disorders, bleeding, redness and diarrhea are side effects of Clopidogrel but complications such as hepatotoxicity, thrombotic thrombocytopenic purpura, pancytopenia, systemic inflammatory response syndrome were also observed. However, in the literature, clopidogrel-induced hepatotoxicity has not been clarified. The aim of this study, was to determine the extent of cytotoxicity and mitochondrial damage by using lower, upper and intermediate doses of Clopidogrel doses.

In this study, AML12 hepatocytes of *Mus musculus* were exposed to 25, 50, 150, 200, 250, 300, 400 μM Clopidogrel doses and XTT test was applied. The test was run on two separate microplates to ensure the accuracy of the assay and to apply for more doses.400, 300, 200 and 25 μM Clopidogrel doses were applied to the hepatocytes in the first microplate. The results showed that the concentration of inhibition was 97.39 and the logarithmic inhibition concentration was 1.989 by *GraphPad Prism 8* program. Clopidogrel doses of 400, 250, 150, 50 μM were applied to the second microplate and inhibition concentration value was found as 171.3 and logarithmic inhibition value was found 2.234.

Based on the results of this study, we observed that 25 μM Clopidogrel did not have any effect on cytotoxicity but a significant increase in cytotoxicity was observed at 50 μM concentration. At doses of 150, 200, 250, 300, 400 μM Clopidogrel, cytotoxicity was increased to almost 100% and cytotoxicity was found to be more stable especially at 300 and 400 μM doses.

Key Words : XTT, cytotoxicity, hepatocyte, AML12, hepatotoxicity, cell culture, mitochondria, Clopidogrel

SEMBOLLER

α : Alfa

β : Beta

% : Yüzde

cm : Santimetre

°C : Santigrat derece

Dk : Dakika

L : Litre

M : Molar

ml : Mililitre

rpm : Dakikada dönme hızı

m^2 : Metrekare

K^+ : Potasyum

µL : Mikrolitre

µM : Mikromolar

µm : Mikrometre

nm : Nanometre

g : Gram

mg : Miligram

LOG : Logaritma

KISALTMALAR

ADP : Adenozin Difosfat

ADPaz : Adenozin Difosfataz

ALP : Alkalin Fosfataz

ALT : Alanin Aminotransferaz

ANT : *Adenine Nucleotide Translocator*

APAF-1 : Apoptotik Proteaz Activasyon Faktorü-1

ATP : Adenozin Trifosfat

ATPaz : Adenozin Trifosfataz

B : *Blank*

Bax : *Bcl-2 Associated X*

Bcl-2 : *B-Cell Lymphoma 2*

Bim : *Bcl-2 Interacting Mediator*

Ca^{2+} : Kalsiyum

cAMP : Siklik Adenozin Monofosfat

cGMP : Siklik Guanidin Monofosfat

CoA : Koenzim A

CPT : Karnitin Palmitoil Transferaz

CYP : Sitokrom P450 Enzim Sistemi

dATP : Deoksiadenozin Trifosfat

DEM : Diethyl maleate

DILI : *Drug-Induced Liver Injury*

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO : Dimetil Sülfoksit

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

EDTA : Etilendiamin Tetraasetik Asit

ER : Endoplazmik Retikulum

ETC : *Electron Transport Chain*

FAD : Flavin Adenin Dinükleotid

FDA : *Food and Drug Administration*

GP : Glikoprotein

GC : *Growth Control*

GSH : Glutatyon

GSSH : Okside Olmuş Glutatyon

GST : Glutatyon S-transferaz

GTP : Guanidin trifosfat

H : Hidrojen

H_2O : Dihidrojen Monooksit

H_2O_2 : Hidrojen Peroksit

IC50 : *The half maximal inhibitory concentration*

IMM : *Inner mitochondrial membrane*

IMS : *Intermembrane Space*

İNH : İnhibisyon

JNK : *c-Jun N-terminal kinase*

K : Potasyum

LCFA-CoA : Uzun zincirli yağ açil Koenzim A

LDH : Laktat Dihidrogenaz

Mg : Magnezyum

MMD : *Mitochondrial membrane disruption*

MMP : *Mitochondrial membrane permeabilization*

MPT : *Mitochondrial permeability transition*

mtDNA : Mitokondriyal DNA

Na : Sodyum

NAD : Nikotinamid Adenin Dinükleotid

NEFA : *Non-Esterified Fatty Acid*

NO : Nitrik Oksit

NOXA : Vücuda zarar verici herhangi bir etken

O : Oksijen

OMM : *Outer mitochondrial membrane*

OXPHOS : Oksidatif fosforilasyon

P2Y1 : Yüksek afiniteli purinerjik reseptör

PAF : Plazminojen Aktivatör Faktör

PBS : *Phosphate buffered saline*

PDH : Piruvat dehidrogenaz

PG : Prostaglandin

PIDD : *P53-Induced Protein with a Death Domain*

PLA2 : *Phospholipase A2*

PLC : *Programmable Logic Controller*

PO_4 :Fosfat

PUMA : *P53-Upregulated Modulator of Apoptosis*

RIP : *Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase*

RNA : Ribo Nükleik asit

ROS : *Reactive Oxygen Species*

SC : *Solvent Control*

TCA : Trikarboksilik asit döngüsü

TGF β : Transforme edici büyüme faktörü β (*Tumor necrosis factor beta)*

TNF α : Tümör Nekroz Faktörü alfa (*Tumor necrosis factor alpha)*

TNP : Tek nükleotid polimorfizmi

TRAIL : *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

TXA2 : Tromboksan A

vWF : von Willebrand Faktörü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. : Karaciğer hücresinin ince yapısı 2
Şekil 1.2. : Arteriyel Ateroskleroz ve Tromboz Oluşumu ile Kan Akışının Engellenmesi 10
Şekil 1.3. : Klopidogrelin Kimyasal Yapısı..... 11
Şekil 1.4. : Klopidogrel' in Kimyasal Yapısı 12
Şekil 1.5. : Klopidogrel çalışma mekanizması 13
Şekil 1.6. : Mitokondri Yapı ve Fonksiyonları..... 16
Şekil 1.7. : Reaktif metabolit kaynaklı MMD oluşumu 18
Şekil 1.8. : Nekroz ve Apoptoz Olaylarının Gelişmesi 20
Şekil 2.1. : XTT testi ve MTT testlerinin kıyaslanması amacıyla bir örnek çalışma 25
Şekil 2.2. : Flasklara ekimi yapılan hepatositlerin invert mikroskop altında elde edilen görüntüsü (40X)..... 26
Şekil 2.3. : 96 kuyucuklu mikroplakaya hücre ekimi düzeni 27
Şekil 2.4. : 96 kuyucuklu mikroplakalara hücre ekimi..... 28
Şekil 2.5. : 96 kuyucuklu mikroplakadaki çalışma düzeni..... 29
Şekil 2.6. : 1. mikroplakaya uygulanan test bileşikleri ve dozları..... 30
Şekil 2.7. : 2. Mikroplakaya Uygulanan Test Bileşiği ve Dozları..... 31
Şekil 2.8. : Mikroplakalara Test Bileşiklerinin Uygulanmış Hali 32
Şekil 2.9. : 1. mikroplakanın XTT maruziyeti ve inkübasyonu sonundaki görüntüsü... 33
Şekil 2.10. : 2. mikroplakanın XTT maruziyeti ve inkübasyonu sonundaki görüntüsü . 33
Şekil 3.1. : 25, 200, 300, 400 μM dozları için elde edilen inhibisyon grafiği 36
Şekil 3.2. : 50, 150, 250, 400 μM dozları için elde edilen inhibisyon grafiği 38

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. : Hepatotoksisiteye Neden Olan Ajanlar 4
Tablo 1.2. : Karaciğer Hasarına Yol Açan İlaçlar ve Enzim Seviyelerine Göre Hasar Tipleri 5
Tablo 3.1. : 1. Mikroplakanın 480 ve 690 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm sonuçları 35
Tablo 3.2. : Spektrofotometrik sonuçlara dayanarak elde edilen canlılık ve inhibisyon değerleri 35
Tablo 3.3. : 2. Mikroplakanın 480 ve 690 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm sonuçları 37
Tablo 3.4. : Spektrofotometrik sonuçlara dayanarak elde edilen canlılık ve inhibisyon değerleri 37

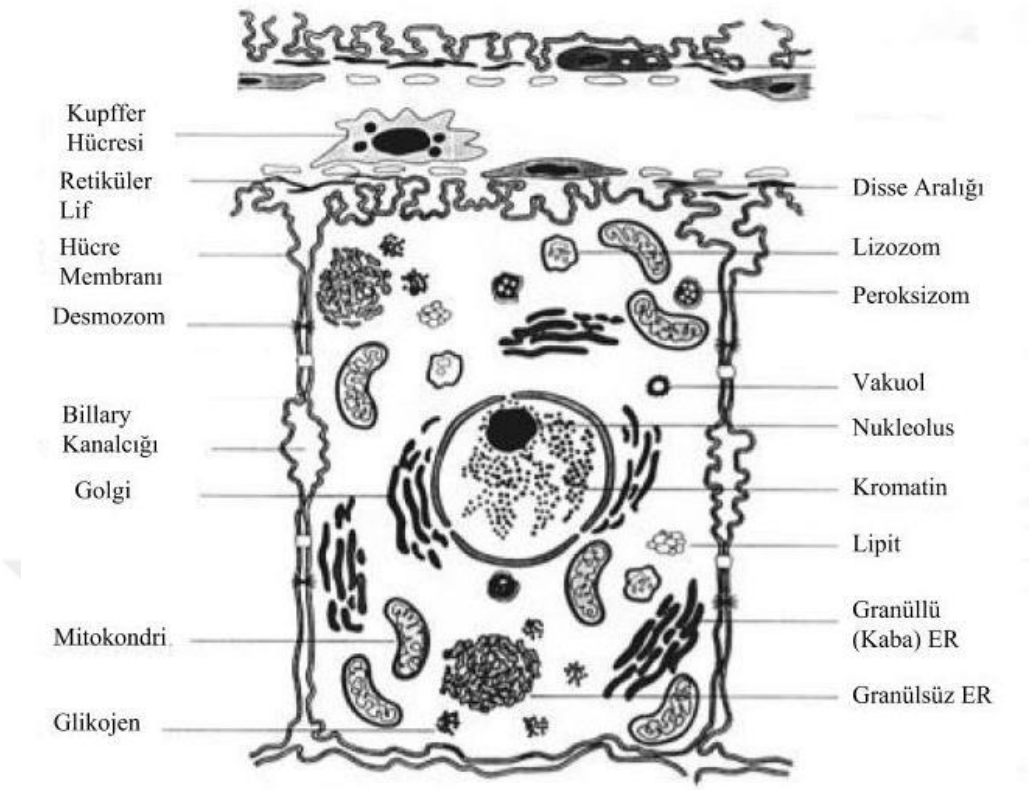
1. GİRİŞ

1.1. Karaciğer Dokusu ve Hepatositin Görevleri

Karaciğer, vücudun deriden sonra en büyük organlarındandır ve en büyük bezidir. Karaciğer, sindirim kanalından emilen besinlerin işlendiği ve vücudun diğer kısımları tarafından kullanılmak üzere depolandığı; sindirim sistemi ve kan arasındaki geçişi sağlayan bir organdır.

Karaciğerin dolaşım sistemindeki önemi, metabolitlerin bir araya getirilmesi, dönüştürülmesi, biriktirilmesi ve toksik maddelerin etkisizleştirilmesi ile birlikte elenmesi açısından büyüktür. Bu eleme, karaciğerin lipit metabolizması için önemli olan safrada gerçekleşir.

Karaciğerin temel yapı elemanı hepatosit'tir. Bu epitelyal hücreler birbirleriyle bağlantılı plaklar halinde gruplaşmış olup ve ışınsal olarak dizili halde yer alırlar [1].



Şekil1.1. Karaciğer hücresinin ince yapısı [2]

Hepatositler polihedral, 6 ya da daha fazla yüzeyli ve 20-30 μm çapındadır. Çok sayıda mitokondri ile birlikte düz yüzlü ve granüllü endoplazmik retikulum bulundurmalarından dolayı hepatositlerin sitoplazması eozinofiliktir. Hepatosit sitoplazmasında bulunan granüllü endoplazmik retikulum yapısındaki poliribozomlarda bir kaç tip protein (örneğin; albumin, fibrinojen) sentezi yapılır. Düz yüzlü endoplazmik retikulumda ise çeşitli maddelerin vücuttan atılmadan önce etkisizleştirilmesi ya da zehirlenmeyi önlemek amacıyla gereken oksidasyon, metilasyon ve konjugasyon işlemleri gerçekleştirilmektedir. Her bir hepatositte yaklaşık 2000 adet mitokondri bulunur. Karaciğer glikojeni, glikoz için bir depodur ve kandaki glikoz seviyesini düzenlemekle görevlidir. Bu şekilde hepatositler enerji kaynaklarından biri olan kan glikozunu sabit bir seviyede tutar.

Her bir hepatositin yüzeyi, kendisine komşu olan diğer hepatositlerin yüzeyleri ile birlikte Disse aralığı boyunca sinüzoidlerin duvarlarıyla temas halindedir. Hepatositler arası bağlantılara *Gap Junction* denir ve bu temas aralığı, hücrelerin fizyolojik işlevlerinin ayarlanması adına önemli olan hücreler arası iletişim bölgeleridir.

Hepatositlerin işlevsel olarak birçok görevi vardır. Hepatositler proteinleri depolamaz, kan dolaşımına verir. Karaciğer tarafından dışarıya verilen proteinlerin yaklaşık %5'i Kupffer hücreleri tarafından üretilir, geri kalan büyük bölüm ise hepatositlerde sentezlenir. Ayrıca hepatositler, kandaki maddelerin alınıp, dönüştürülüp, safra kanaliküllerine salgılanmaları adına da büyük bir işleve sahiptir. Hepatositlerde lipit ve aminoasitlerin glikoneogenez adlı olay ile glikoza çevrilmesinden de sorumludur.

Glukuronik asidi bilirubine birleştirilen bir enzim olan glukuronil transferaz, steroidler, barbitüratlar, antihistaminikler ve antikonvülzanlar gibi başka bileşiklerin de beraberliğini sağlar. Karaciğerde etkisizleştirilen ilaçlar hepatositte bulunan granülsüz endoplazmik retikulumunda artışa yol açarak organın zehirlenmesini engeller [3].

İzole edilmiş hepatositlerin süspansiyonları, biyokimyasal araştırmalarda kullanılmak üzere, sitokrom P450 enzim sistemi ile ilişkili ilaç metabolizması ve ilgili süreçlerde kullanılmaktadır. Glikoneogenez, glikoliz, protein, lipid, yağ asidi ve üre sentezleri, keton vücut üretimi, protein metabolizması, etanol oksidasyonu, membran taşınması ve hormonlara yanıt gibi çalışmalarda kullanılmaktadır. Son zamanlarda hepatositlerden, ilaç metabolizması ve toksisite çalışmalarında faydalanılmış ve bu alanın daha ayrıntılı aydınlatılması için değerli oldukları ispatlanmıştır [3].

1.1.1. Hepatosit toksisitesi

İlaç kullanımından zarar gören organların başında karaciğer gelmektedir. Dolayısıyla hepatositler, ilaçlardan kaynaklanan toksik etkiden fazlasıyla etkilenir. İlaç kaynaklı hepatotoksisite; hastaları, sağlık hizmeti veren kurum ve kuruluşları, ilaç endüstrisini ilgilendiren ve bu alanda çalışmaların ön plana çıktığı geniş kapsamlı ve ciddi bir sağlık sorunudur.

Doza bağlı ya da ilaca bağlı karaciğer hasarı, akut karaciğer yetmezliğinin en yaygın nedenlerinden biridir [4-7]. Bir ilacın kullanımının milyonlarca insan tarafından tüketimi sonrası büyük ölçüde hepatotoksisite oluşması durumunda, söz konusu ilaç klinik kullanımdan kaldırılır. İlacın az sayıda hastada dahi hepatotoksik etki oluşturması da, ilacın piyasadan Gıda ve İlaç İdaresi Başkanlığı (*Food and Drug Administration*, FDA) ile düzenlemeye gidilerek kaldırılmasında rol alır. Tıbbi ajanlar içerisinde

belirtilen 900'den fazla ilaç, hepatotoksisiteye neden olmaktadır ve sonuç olarak birçok ilaç, karaciğer hasarı ile ilişkilidir (Tablo1.1) [6].

Tablo 1.1. Hepatotoksisiteye Neden Olan Ajanlar

1) İnorganik Ajanlar:
1.a.) Metal ve Metal Benzeri: Arsenik, Antimuan, Berilyum, Bizmut, Bor, Kadmiyum, Krom, Kobalt, Bakır, Demir, Kurşun, Mangan, Civa, Altın, Fosfor, Selenyum, Telluryum, Talyum, Çinko 1.b.) Hidrazin Türevleri 1.c.) İyodürler
2) Organik Ajanlar:
2.a.) Doğal Kaynaklar I. Bitkisel Toksinler: Sikas, İkterojenik, İndospisin, Lantana, Muskat (Küçük Hindistan Cevizi), Pirolizidinler, Safrol, Tanik Asit II. Mikotoksin (Mantar Zehiri): Aflatoksin, Sikloklorotin, Etanol, Luteosikrin, Okratoksin, Rubratoksin, Sterigmatosistin, Griseofulvin, Sporidesmin, Tetrasiklin ve diğer antibiyotikler III. Bakteriyal Toksinler IV. Ekzotoksinler: *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinus*, *Streptococcus hemolyticus*, Cyanobacteria, *Bacillus cereus*, bazı *Escherichia coli* türleri V. Endotoksinler 2.b.) Sentetik Kaynaklar I. Tıbbi Olmayan Ajanlar: Haloalkanlar ve Haloolefinler, Nitroalkanlar, Kloroaromatik Bileşikler, Nitroaromatik Bileşikler, Organik Aminler, Azot Bileşikler, Fenol ve türevleri, diğer organik bileşikler II. Tıbbi Ajanlar: Teşhis ve tedavide kullanılan 900' den fazla ilacı kapsamaktadır.

Karaciğer hasarı, serum alanin aminotransferaz (ALT) veya konjuge bilirubin seviyelerinde normal aralığın üst sınırının iki katından fazla bir artış veya aspartat aminotransferaz, alkalin fosfataz (ALP) ve toplam bilirubinin karışık halde bulunduklarında bunlardan birinin normal aralığın üst sınırının iki katından fazla olması durumunda görülür [6]. Bu değerlere göre karaciğer hasarı hepatoselüler, kolestatik veya karışık şeklinde olabilir (Tablo1.2) [4].

Tablo 1.2. Karaciğer Hasarına Yol Açan İlaçlar ve Enzim Seviyelerine Göre Hasar Tipleri [6]

HEPATOSELLÜLER YÜKSEK ALT	KARIŞIK YÜKSEK ALP + YÜKSEK ALT	KOLESTATİK YÜKSEK ALP + TBL
Akarboz	Amitriptilin	Amoksisilin-Klavulanik Asit
Asetaminofen	Kaptopril	Anabolik Steroidler
Allopurinol	Karbamazepin	Klorpromazin
Amiodaron	Klindamisin	Klopidogrel
Baklofen	Siproheptadin	Oral Kontraseptifler
Bupropiyon	Enalapril	Eritromisinler
Fluoksetin	Flutamid	Östrojenler
HAART İlaçları	Nitrofurantoin	İrbesartan
Kava Bitkisi	Fenobarbital	Mirtazapin
Mahmut Otu Bitkisi	Fenitoin	Fenotiazinler
İzoniazid	Sulfonamidler	Terbinafin
Ketokonazol	Trazodon	Trisiklikler
Lisinopril	Trimetoprim-Sulfametoksazol	
Losartan	Verapamil	
Metotreksat		
NSAID Grubu İlaçlar		
Omeprazol		
Paroksetin		
Pirazinamid		
Rifampisin		
Risperidon		
Sertralin		
Statinler		
Tetrasiklinler		
Trazodon		
Trovafloksasin		
Valpronik asit		

İlaçların çoğu gerekli emilimi sağlayabilmek ve bazı ilaçlar da aktive olmak için biyotransformasyona uğramalıdır [8]. Bir ilacın biyotransformasyonu için gerekli reaksiyonlar, Faz 1 ve Faz 2 olmak üzere iki gruptur. Faz 1 evresinde yükseltgenme, indirgenme, hidrolizis reaksiyonlarıyla substrata aktif bölge eklenmesi sürecidir. Faz 2 evresinde ise konjugasyon reaksiyonları gerçekleşir ve ara metabolitin polaritesi

arttırılarak böbrek veya gastrointestinal sistemden atım gerçekleşir. Bu fazlardaki enzimler, ilaçlardan da etkilenebilir [9-11].

Sitokrom P450 Faz 1 reaksiyonları içinde en önemli enzim grubudur ve CYP şeklinde simgelenir [12].

İlaçların biyotransformasyonu, metabolizmadan sorumlu enzimlerin indüksiyonu ve inhibisyonu ile değişir. İndüksiyon sonucu ilacın metabolizması artar, kan düzeyi düşer. İnhibisyonda ilacın metabolizması düştüğünden, kan düzeyi yükselir. İndüksiyon, enzim sentezinde artış oluşturacağından, enzimle metabolize olan ilacın biyotransformasyonu artar. Enzim indüksiyonun tersine, inhibisyon çok hızlı gelişir ve ilaç kan düzeyi hızla yükseldiğinden farmakolojik etkileri de artar.

1.1.1.2. Mitokondriyal disfonksiyon kaynaklı hepatotoksisite

Mitokondriyal disfonksiyon; yağ asitlerinin beta-oksidasyonunun inhibisyonu, solunum zincirlerinin inhibisyonu veya mitokondriyal DNA' ya doğrudan etki kaynaklı gerçekleşebilir. Bu olaylardan dolayı hücrede enerji eksikliği görülür. Mikrovesiküler steatosis, steatohepatitis ve sitolitik hepatitis gerçekleşir ve buna bağlı olarak anaerobik metabolizma sonucu trigliserid birikimi oluşur. Bu oluşum hücre içindeki mikrovesiküler yağ birikimidir. Mikrovesiküler yağ birikimi ardından non-alkolik steatohepatit olarak bilinen hücre dışı yağ birikimi görülür. Sonrasında gözlenen Mallory cisimciği oluşumu, polimorfonükleer hücre inflamasyonu, fibrozis ve siroz olayları dizisi ile hücre ölümü gerçekleşir [13].

1.1.2. P450 enzim sistemi

P450 enzimleri; toksikoloji, ilaç metabolizması ve farmakoloji alanlarında çalışan bilim insanları için önemli bir yer tutan ve kimyasalların oksidasyonunda büyük rol oynayan katalizörlerdir. Bu oksidasyonların etkileri düşük ilaç biyoyararlanımı ve advers ilaç etkileşimleri, kanser yatkınlığı ve doğum kusurları dahil olmak üzere çeşitli akut ve kronik toksisitelerde ortaya çıkabilir. P450 enzimleri, çoğunlukla karaciğerde bulunur ve hidroksilasyon, dealkilasyon, deaminasyon, N-oksidasyon ve sulfoksidasyon gibi oksidatif tepkimeleri katalize ederler. Metabolize edilen maddeler, daha polar hidrofilik bileşiklere dönüştürülürler ve vücuttan atılmaları olanaklı hale gelir. Şimdiye kadar

saptanmış 12 adet P450 gen ailesi rapor edilmiş olup ilaç metabolizması ile ilişkilendirilmiştir [14].

1.1.2.1. P450 enziminin ilaç metabolizmasındaki rolü

İlaç metabolizmasında P450 ile ilgili en önemli husus biyoyararlanımdır. P450 katalizörü, bir ilacın plazma konsantrasyonunu düşüreceğinden ilacın hedef bölgedeki konsantrasyonu da azalacaktır.

İlaç metabolizması konusundaki P450'lerin ikinci fakat daha az yaygın olan diğer rolü, ilaçların aktif formlarına P450 ile katalize edilen oksidasyonudur. Bu işlem, bir ön ilacın aktif bir forma dönüştürülmesidir [14].

1.1.2.2. P450 enzim sistemi ve toksisite ilişkisi

Toksik etkiye sahip bir ilaç (veya bir reseptör üzerinden toksisiteye neden oluyorsa), P450 sistemi ile oluşan ürünün toksisitesi düşükse, kimyasalın oluşturduğu metabolik etki, oluşan toksisiteyi azaltabilir.

İlaç metabolizmasına dayalı olarak oluşan inaktivasyonda, modifiye P450 enzimlerinin kendileri toksisiteye neden olabilir. Kovalent olarak kimyasallarla modifiye edilmiş olan P450 enzimleri, antijen gibi davranabileceğinden oto-immün yanıtları indükleyebilir. Bu oto-immün yanıtın, hepatit ile bağlantılı oluşu kanıtlanmamış olsa da bazı hepatit türleri ile ilişkilendirilir [14].

1.1.3. Trombositler

Trombositler; yaralı bir bölgenin tanınması, uyarılmış trombositlerin hücre içi sinyal iletişimi, birbirlerine yapışmaları ve hemostatik bir tıkaç oluşturmak için koagülasyon kaskadı ile etkileşimi gibi hemostatik işlemlerde görevlidir. Trombosit aktivasyonu ve trombüs oluşumu, ateroskleroz ve trombozda etkilidir. Ateroskleroz ve trombozun önlenmesi ve destekleyici tedavilerinde arteriyal trombotik hasarın engellenmesi ve tromboz oluşumunun durdurulması için antiplatelet (antitrombotik) ilaçlar ve tedaviler kullanılmaktadır.

Trombositler, megakaryosit olarak bilinen büyük kemik iliği türevli hücrelerin parçalarıdır. Bir megakaryositin olgunlaşması sırasında sitoplazması parçalara ayrılır ve

plazma zarı yırtılır. Her bir parça ile ilişkili zarlar daha sonra yaklaşık 7-10 günlük bir ömre sahip olan, nükleot olarak anılan nukleusdan yoksun formda, disk şekilli trombosit hücrelerini oluşturmak için yoğunlaşırlar [15, 16].

Trombositlerin başlıca işlevi hemostazın sağlanmasıdır. Hemostaz olayında; dinlenme halindeki trombositler, diğer hücrelerden aktivasyon sinyalleri almadan kan damarlarında dolaşırlar. Damarda oluşan bir travmaya yanıt olarak trombositler, damar bütünlüğünün bozulması ve endotel tabakasının zedelenmesi ile açığa çıkan subendotelyal kollajene von Willebrand faktör (vWF) aracılığı ile yapışırlar ve böylece hücrenin kollajene bağlanması sağlanmış olur. vWF, kollajen ve trombosit membranında bulunan glikoprotein (GP) VI ve GPIb/V/IX spesifik reseptörlerine bağlanarak ikisi arasında köprü oluşturur. GPIb, aktive edilmemiş trombositlerin yüzeyinde bulunur ve trombosit yapışması için temel reseptördür. Bu adezyon hareketi, hücreyi aktive ederek bir seri reaksiyonu tetikler [17-19] .

Aktif trombositlerden salınan tromboksan A2 (TxA2) ve adenozin difosfat (ADP) reaksiyonları; trombin gibi hasar sırasında oluşan maddeler, epinefrin, vazopressin gibi hormonlar, kollajen, laminin, fibronektin matriks komponentleri gibi çeşitli agonistler tarafından aktive edilir. Böylece trombositlerin şekilleri değişmiş (diskoid formdan sferik forma dönüşüm) ve depolama keseciklerinin içeriği serbest bırakılmış olur. Membran yüzeyindeki fibrinojen reseptörü de, fibrinojenin bağlanmasına uygun hale gelir. Trombositler birbirlerine fibrinojen köprüleri ile bağlanarak bir araya gelirler. Bu aşamada trombosit agregasyonu geri dönüşümlüdür ve primer agregasyon olarak adlandırılır. Trombosit agonistleri, membran yüzeyinde uygun bölgelere bağlanarak trombositleri uyarır. Agonist-reseptör kompleksinin aktive ettiği guanidintrifosfat (GTP) bağımlı regülatuar proteinler (G proteinler) ile sinyal, membran boyunca iletilir [19-21].

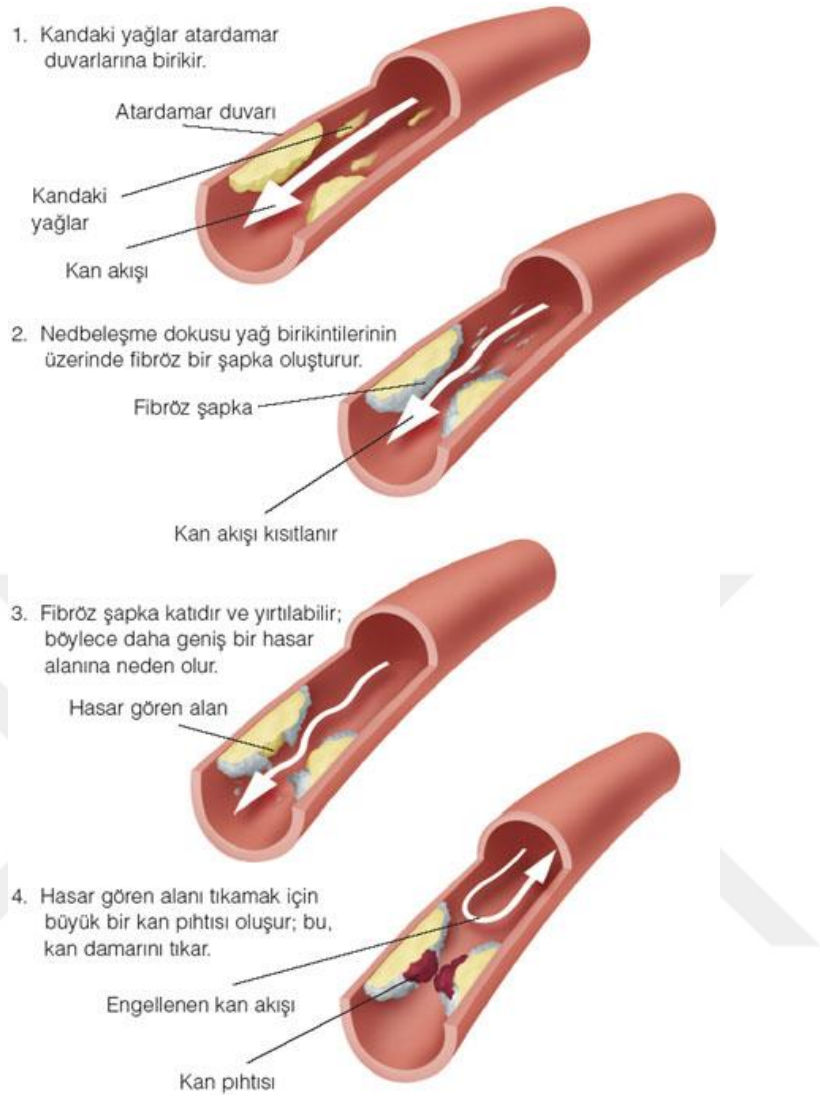
G proteinler, hücre içi ikincil habercilerin oluşumunda rol oynayan bazı enzimlerin aktivasyonuna yol açar. G proteinler, hücrede reseptör ile ikinci habercilerin oluşumuna yol açan enzim arasında etkileşimi sağlar. Bu proteinler tarafından regüle edilen enzimler arasında PLC, PLA2, adenil siklaz, c-GMP fosfodiesteraz sayılabilir. Ayrıca Na, K, Ca iyon kanallarının aktiviteleri de G proteinler tarafından düzenlenmektedir [22].

TxA2, trombosit membranındaki reseptöre bağlanarak trombosit aktivasyonuna yol açar.

Hücrede yer alan ikincil haberciler olan; siklik adenozin monofosfat (c-AMP) ve siklik guanidin monofosfat (c-GMP), trombosit fonksiyonlarını baskılamakla görevlidir.

Trombositler, Ca^{2+} ile regüle edilen uyarılabilir hücreler olarak tanımlanırlar. Hücre içi ve dışı Ca^{2+} konsantrasyonu, trombosit aktivasyonu bakımından önem taşır. $Ca^{2+,}$ trombosit fonksiyonlarının gerçekleşmesinde temel rol oynar. Fibrinojenin reseptörüne bağlanması için Ca^{2+} veya Mg^{2+} gerekmektedir. Hücre dışı Ca^{2+}, yüzeye bağlı Ca^{2+} ile denge içindedir. Hücre zarında bulunan glikoprotein llb/llla kompleksi (GPIIb/llla) üzerinde Ca^{2+} için yüksek affiniteli bağlanma bölgelerine bağlanan Ca^{2+}, fibrinojenin bu glikoproteine bağlanması için uygun ortam oluşturur [23].

Trombosit agregasyonu, aktive edilmiş trombositlerin yüzeyi üzerindeki GPIIb / IIIa reseptör bağlantısıyla başlattığı sinyal kaskadının bir sonucudur. Trombosit aktivasyonuna, GPIIb / IIIa reseptörünün fibrinojen için afinitesini arttıran konformasyonel değişiklikler eşlik eder. Trombosit agregasyonunda yer alan birincil polipeptit olan fibrinojen, bitişik trombositlerin çapraz bağlanmasını teşvik eder ve platelet açısından zengin olan trombüs oluşumunu sağlamış olur (Şekil1.2) [16, 18].



Şekil 1.2. Arteriyel Ateroskleroz ve Tromboz Oluşumu ile Kan Akışının Engellenmesi [24]

1.1.4. Klopidogrel

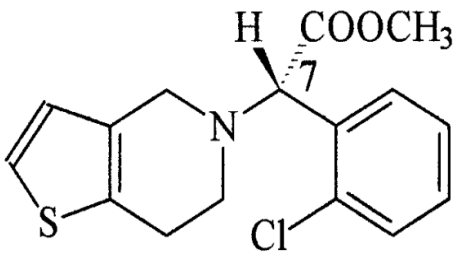
Klopidogrel güçlü bir antitrombotik ilaçtır. Bu ilaç, yüksek riskli hastalarda trombotik olayların önlenmesi için kullanılan, diğer kardiyovasküler ilaçlar ile karşılaştırıldığında ve başarılı bir klinik değerlendirmenin sonunda üstün etkinliğinin ortaya çıkmasıyla pazardaki yerini almıştır [25].

Klopidogrel; ADP, düşük trombin konsantrasyonları veya kollajenden kaynaklanan ex vivo trombosit agregasyonunu inhibe eder. Klopidogrel' in spesifik farmakolojik hedefi, ADP' nin indüklediği trombosit aktivasyon işlemi olup, trombosit reseptörlerine

bağlanan 2-metil-S-ADP' nin spesifik ve geri dönüşümsüz bir inhibitörü olarak tanımlanmaktadır [25]. Sonuç olarak Klopidogrel, bir ADP reseptörü antagonistidir [26].

Klopidogrel, in vitro olarak aktif olmadığından antiagregasyon aktivitesi için karaciğerde biyotransforme edilir [25].

Klopidogrel' in 7. karbonunda bir sülfür konfigürasyonu bulunmaktadır. Buna karşılık gelen R enantiyomerinin anti agregasyon aktivitesinden tamamen yoksun olmasından dolayı, bu asimetrik karbon konfigürasyonu biyolojik aktivite için önemlidir (Şekil 1.3) [25, 27].



Şekil 1.3. Klopidogrelin Kimyasal Yapısı [25]

Trombositler; adenozin difosfat (ADP), kollajen, plazminojen aktivatör faktör (PAF), prostaglandinler (PG-G2 ve PG-H2), trombin, serotonin, adrenalin ve vazopressin gibi maddelerle membran üzerindeki reseptörler aracılığı ile aktif olup agregasyon ve sekresyon fonksiyonlarını gerçekleştirirler [28]. ADP, trombosit oluşumu için önemlidir. ADP, trombositer granüllerde yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve bu granüllerin salgılanmasının ardından agregasyonu başlatıp güçlendirebilir [26]. ADP bağlanmasının ardından trombosit membranındaki glikoprotein (Gp-IIb ve Gp-IIIa) tipi fibrinojen reseptörlerini aktive ederek fibrinojenin bağlanmasına ve yakındaki trombositlerle birleşerek agregasyona yol açarlar [29]. ADP' nin platelet agregasyon etkilerini antagonize eden yararlı antiplatelet (antitrombotik) ajanlar bulunmaktadır. Klopidogrel, ADP ile indüklenen trombosit agregasyonunu seçici ve geri dönüşümsüz olarak bloke eden bir antiplatelet ajandır [30, 31].

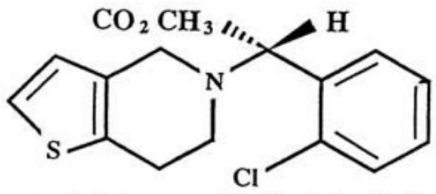
Tromboz, hassas bireylerde stabil olmayan anjina, miyokard enfarktüsü veya inmeye neden olabilir. Normal damarların endoteli ile etkileşmeyen trombositler, hasarlı

damarlardaki subendotelyal yapılara yapışarak trombozda etkili olur. Bu trombosit aktivasyonu, diğer trombositlerin göç ve yapışma döngüsünü tetikleyerek trombosit yüzeyindeki fibrinojen reseptörlerinin ekspresyonunu ve birleşmesini sağlarlar. Fibrinojen reseptörü; trombosit glikoprotein (GP) IIb / IIIa reseptörü olup, trombosit agregasyonlarını oluşturmak amacıyla bivalent fibrinojen moleküllerine bağlanan nihai bir yolaktır [26, 32].

Klopidogrel, hepatik sitokrom P450 (CYP) enzimleri aracılığıyla aktive edildiğinden in vitro olarak aktif değildir [33].

1.1.4.1. Klopidogrel kullanımı ve çalışma mekanizması

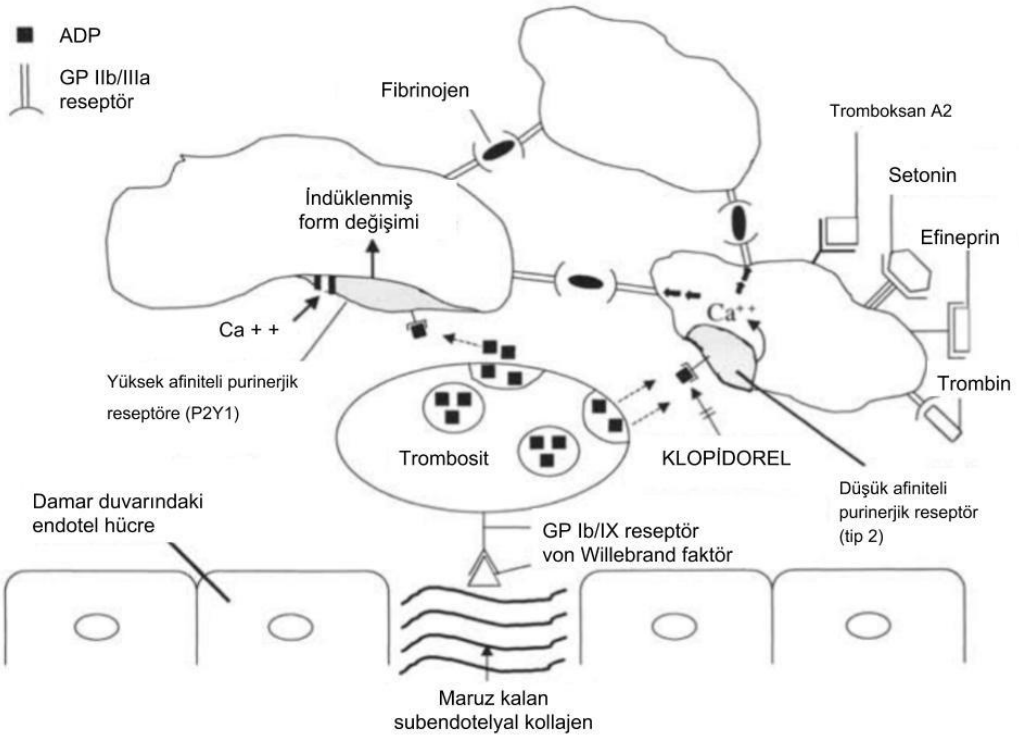
Klopidogrel, trombosit agregasyonunu inhibe eden tienopiridin türevidir. Bir karboksimetil yan grubuna sahip oluşuyla diğer tienopiridin türevi ilaçlardan yapısal olarak farklılık gösterir (Şekil 1.4) [30, 31].



Şekil 1.4. Klopidogrel' in Kimyasal Yapısı [30]

Klopidogrel oral yolla vücuda alınır, yemeklerden sonra alındıklarında maksimum biyoyararlanım meydana gelir. Aktiviteye ulaşmak için karaciğerde parçalanarak oluşan aktif metabolit veya metabolitler, renal olarak atılır [31, 33].

Klopidogrel, adenosin 5'-difosfat 'ın (ADP) trombosit reseptörüne bağlanmasını inhibe eder [34-38]. Bu ADP reseptörü engeli, fibrinojenin Glikoprotein IIb / IIIa kompleksinebağlanmasını doğrudan inhibe eder. Glikoprotein IIb / IIIakompleksinin aktivasyonunun engellenmesi ve daha sonra da trombosit agregasyonunun önlenmesi ile Klopidogrel, antitrombosit etkilerini gerçekleştirmiş olur (Şekil1.5) [39].



Şekil 1.5. Klopidogrel çalışma mekanizması [30]

1.1.5. Klopidogrelin hücre etkileşimi

1.1.5.1. Klopidogrel tedavisinde hepatotoksisite

İlaç kaynaklı karaciğer hastalığı yaklaşık olarak, her 1000 hastadan 1'inde, terapötik dozlarda ise her 10.000 hastanın 1'inde görülür. Bu hastalar genellikle birden fazla ilaca maruz kaldıkları için sorumlu ilacın etkilerini belirlemek zordur [9].

Hepatik hasar; hücre için gerekli kalsiyum konsantrasyonunun bozulması, sitokrom P450 enzim sisteminin ilaçtan ötürü veya ilaca karşı çok yönlü bağışıklık tepkisi oluşturması gibi çeşitli mekanizmalarla birçok ilaçtan kaynaklanarak meydana gelebilir [9].

Klopidogrel ile görülen yaygın yan etkiler arasında gastrointestinal bozukluklar (hazımsızlık, bulantı, kusma), kanama, kızarıklık ve ishal bulunmaktadır. Fakat son yıllarda hepatotoksisite, trombotik trombositopenik purpura, pansitopeni, sistemik inflamatuar yanıt sendromu gibi nadir ve ciddi komplikasyonlar da bildirilmiştir [40, 41]. Ancak literatürde Klopidogrel kaynaklı hepatotoksisite konusu hala netliğe

kavuşmamıştır. Aşırı duyarlılık ve doğrudan toksisite potansiyelli mekanizmalar ileri sürülmüştür. Yapılan klinik ve patolojik gözlemlere dayanarak, klopidogrelin hem dozdan bağımsız olarak, kişinin özel durumundan kaynaklı hem de doza bağımlı olarak toksik bir reaksiyon tetiklemesi olası görülmektedir [42, 43].

1.1.6. Mitokondri yapı ve fonksiyonları

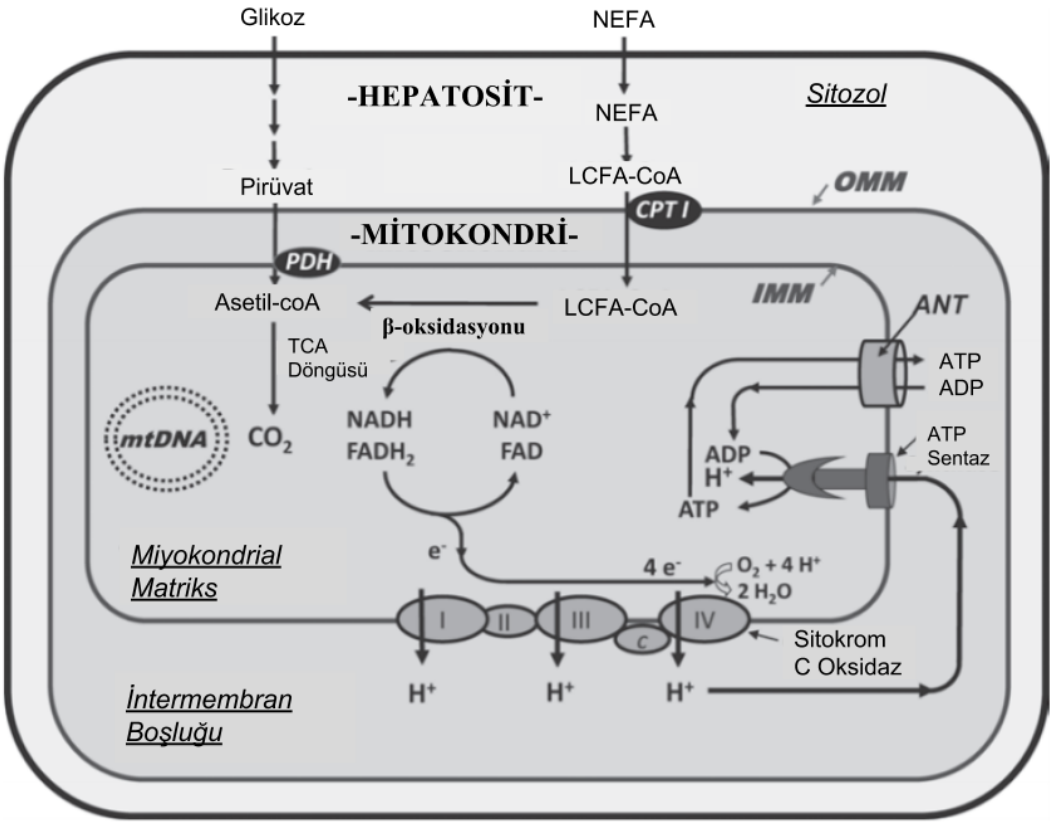
Mitokondri, sitoplazmada yer alan bir organellerdir. İntermembran boşluğunu çevreleyen bir dış mitokondriyal membran (*Outer Mitochondrial Membrane*, OMM) ve mitokondriyal matrisi sınırlayan bir katlanmış iç mitokondriyal membrana (*Inner Mitochondrial Membrane*, IMM) sahip, çift membranlı bir yapıdadır. Matriksde bulunan bir dairesel DNA'a (mtDNA) ve oksidatif fosforilasyon sistemine ait 13 proteini de kodlayan mitokondriyal transkriptlerine sahiptir. Bu transkriptler, mtDNA'nın kodladığı RNA' daki mitokondriyal ribozomları proteinlere çevirir. Diğer tüm mitokondriyal proteinler, sitoplazmada sentezlenip mitokondriye yollanan proteinlerdir ve nüklear DNA tarafından kodlanır [44].

Oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) aracılı ATP üretimi mitokondrinin en bilinen görevidir. İnsan mtDNA' sı, OXPHOS sisteminde 13 polipeptit kodlayan, 22 tRNA ve polipeptit sentezi için gerekli 2 rRNA olmak üzere 37 gen bulundurur. Mitokondriyal piruvat dehidrogenaz (PDH), glikozdan gelen piruvatı asetil-CoA' ya dönüştürür. Karnitin palmitoil-transferaz I (CPT I), karnitin yolağını başlatarak, mitokondri içerisinde uzun zincirli yağ açil-CoA (LCFA-CoA) sentezine izin verir. LCFA-CoA'nın β-oksidasyonu ve matriks içinde, trikarboksilik asit döngüsü (TCA) enzimleri IMM'de lokalize olan elektron transport zincir reaksiyonuna (ETC) elektron veren elektron taşıyıcılarını (NADH-FADH2) üretir. Bu indirgenmiş kofaktörler daha sonra elektronlarını mitokondriyal solunum zincirine aktarır, diğer yakıt oksidasyon döngüleri için gerekli olan NAD ve FAD'yi yeniden üretir. NADH veya FADH2 tarafından solunum zincire bağışlanan elektronlar, bu zincir boyunca sitokrom c oksidaza doğru göç eder; burada dört elektron, oksijen ve protonlarla reaksiyona girerek, bu bölgede ROS salımı olmadan, güvenli bir şekilde su oluşturur.

ETC; matriksten iç membran boşluğu (*Intermembrane Space*, IMS) içerisine proton pompalamak için konformasyonel değişime maruz kalan ardışık redoks reaksiyonları

boyunca 4 protein kompleksini içerir. Bu solunum zinciri kompleksleri I, II, III ve IV ve ATP sentaz' ın bir kısmı IMM' ye gömülür. Mitokondriyal kompleksler I, III ve IV' teki elektronların akışı, IMM boyunca büyük bir elektrokimyasal potansiyel oluşturur. ATP üretimi altında, OXPHOS tarafından oluşturulan bu iç membran elektrokimyasal potansiyel, organeller için önemlidir. Membran potansiyeli ayrıca mitokondri işlemleri ve mitokondri disfonksiyonuna cevapta mitokondriyal hareketi değiştiren moleküler düzeydeki oluşan farklılıklarda gereklidir. Bunun yanında ADP kaynaklı proton geçişi, mitokondriyal membran potansiyelini azaltır, böylece solunum zincirindeki elektron akışı serbest kalır ve protonların intermembran boşluğuna geçişini sağlar. Buna karşılık, hücre ATP'si bol olduğunda, protonların matrikse girişi azalır ve yüksek mitokondriyal membran potansiyeli, solunum zincirindeki elektronların akışını engeller. Dolayısıyla ATP oluşumu membran potansiyeli için çok önemlidir ve ADP, adenin nükleotid taşıyıcısı (*Adenine Nucleotide Translocator*, ANT) sayesinde matrikse girer ve ADP'den ATP oluşturmak amacıyla ATP sentaz ile protonların matrise yeniden girişini uyarır. Böylece mitokondriyal solunumun yavaşlatılmasını sağlar.

Solunum zinciri komplekslerinden I ve III; hücrelere, lipidlere, nükleik asitlere ve proteinlere zarar verebilecek oksijen radikalleri (ROS) ve hidrojen peroksit dahil reaktif oksijen türlerini oluşturur. ROS; nörodejenerasyon dahil mitokondriyal disfonksiyonuna ilişkin hastalıkların oluşmasına neden olur. Birçok deneysel kanıt; mitokondriyal ROS'un aynı zamanda hipoksi gibi adaptif stres sinyal yolaklarına katkıda bulunduğunu, hücre farklılaşması ve hücre kontrolü için homeostatik sinyal yolaklarını etkilediğini göstermiştir. Aynı zamanda hücrelere ve işlevsel yapılara zarar vererek erken yaşlanmaya ve somatik kök hücre fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır (Şekil 1.6) [44, 45].



Şekil 1.6. Mitokondri Yapı ve Fonksiyonları [46].

1.1.6.1. Mitokondri ve mitokondrinin ilaç kaynaklı karaciğer hasarındaki rolü

Mitokondri; yağ asidi oksidasyonu, piruvat oksidasyonu ve oksidatif fosforilasyon sisteminde adenosin trifosfat (ATP) oluşumu yoluyla hücre enerjisi oluşumunda önemli bir role sahiptir. Ayrıca birçok ölüm şekli, mitokondri membranının geçirgenliği (*Mitochondrial Membrane Permeabilization*, MMP) ve/veya mitokondriyal geçirgenliğin değişmesi (*Mitochondrial Permeability Transition*, MPT) sebebiyle mitokondri membran bütünlüğünün bozulmasıyla (*Mitochondrial Membrane Disruption*, MMD) uyarılır. Hücrenin yaşam döngüsünde aktif ve önemli bir rolü olan mitokondri, ilaç kaynaklı karaciğer hasarında (*Drug-Induced Liver Injury*, DILI) öncelikli bir role sahiptir. Hepatotoksik ilaçlar, çeşitli mekanizmalarla mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna neden olurlar. Bazı ilaçlar, mitokondriyal solunumu ve/veya mitokondriyal β-oksidasyonunu doğrudan inhibe ederken; bazıları ise öncelikle mitokondriyal DNA (mtDNA), mitokondriyal transkriptler veya mitokondriyal protein sentezini etkileyerek mitokondriyal solunumu bozar.

En sık görülen DILI mekanizması, toksik olmayan ana ilacın kimyasal olarak reaktif bir metabolite dönüşmesidir. Bu kararsız ara ürün, glutatyon (GSH) ile konjuge edilerek detoksifiye edilebilir veya hepatik makromoleküller, toksik ve/veya immün olayların MMD'i tetiklemesinden dolayı hepatite neden olarak hücre ölümüne yol açar [46].

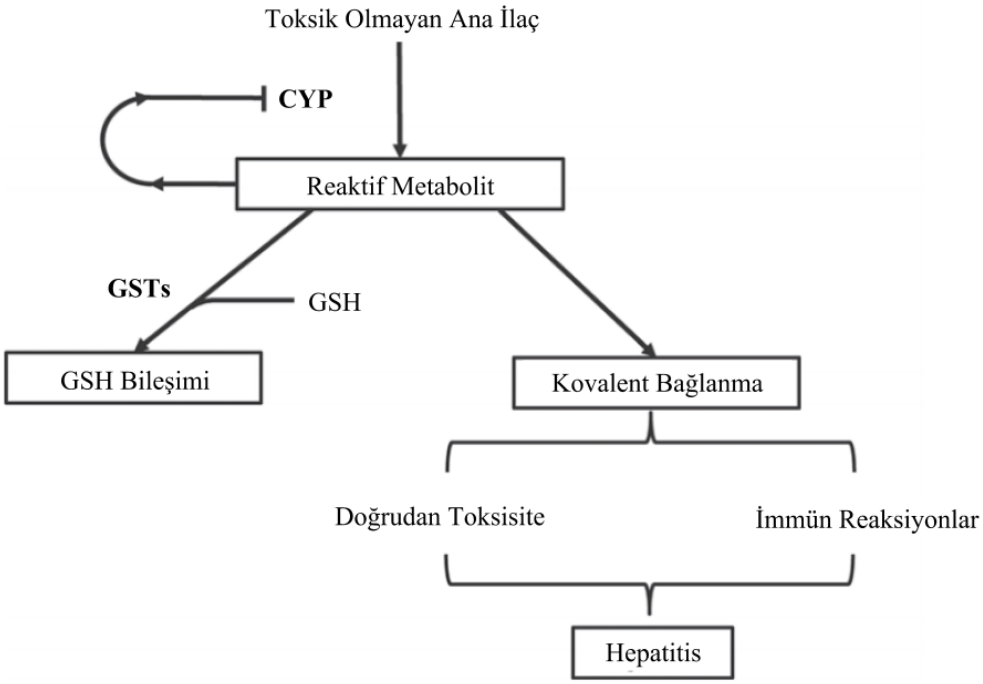
1.1.6.2. Mitokondri fonksiyonlarının doğrudan inhibisyonu

Mitokondri fonksiyonlarını inhibe eden birçok mekanizma bulunmaktadır. İlaçlar doğrudan mitokondriyal solunumu, yağ asitlerinin mitokondriyal β-oksidasyonunu veya hem β-oksidasyonunu hem de solunumun inhibisyonuna yol açarak etki ederler.

İlaçların oluşturduğu ilk hasar genellikle solunuma yönelik olup, devamında β-oksidasyonunu inhibe ederek gerçekleşir [47-50].

1.1.6.3. Reaktif metabolit kaynaklı MMD

Metabolik aktivasyon genellikle sitokrom P450 enzim sistemi tarafından, bir ana bileşikten; bir veya birçok kimyasal reaktif metabolite dönüşmek üzere karaciğerde gerçekleşir [51]. Bu reaktif metabolitlerin toksisitesi, birçok koruma mekanizmasıyla sınırlandırılır. Metabolitler, sitokrom P450 enzimlerine saldırarak kendi oluşumlarını da korurlar. GSH S-transferazlar (GST'ler), GSH ile birleşerek elektrofilik metabolitin büyük bir kısmını inaktive edebilirler ve toksik olmayan bir GSH konjügatı oluşumunu sağlarlar. Ama bu koruma mekanizmalarına rağmen, bu oluşmuş reaktif metabolitin küçük bir kısmı kovalent bağlarıyla, hepatik makromoleküller ile kimyasal reaksiyonlara girebilir. Bu moleküler lezyonlar, doğrudan toksisite ve immün reaksiyon olaylarının kombinasyonuyla hepatitise sebep olabilir (Şekil 1.7) [52, 53].



Şekil 1.7. Reaktif metabolit kaynaklı MMD oluşumu [46]

Kimyasal olarak reaktif metabolitlere dönüşen hepatotoksik ilaçlar, diğer hepatotoksik ilaç sayısına göre daha fazladır [46]. Bu ilaçlar için yapılan deneylerden özellikle iki tanesi, metabolik aktivasyonun DILI' de görülen yaygın bir mekanizma olduğunu da desteklemektedir [54].

1.1.6.4. Klopidogrel kaynaklı hücre ölümü

CYP' in hidrofobik aktif bölgesinde oluşturulmuş olan reaktif bir ara ürün doğrudan CYP' ye saldırabilir ve onu yok edebilir. Bu bir çok şekilde gerçekleşebilmektedir [51].

Reaktif metabolit, CYP proteininin bir amino asidine veya hem (proteinsiz, demir içeren -heme-) 'in nitrojenine kovalent olarak bağlanabilir. Daha sonra bu serbest radikaller, hemin bir vinil grubu ile CYP proteinine kovalent olarak bağlanarak , dengesiz bir eklenti oluşturabilir [55].

CYP' in oluşturduğu reaktif metabolitlerin eklentilerle birlikte geniş bir oluşumu, mitokondriye zarar verebilir ve çeşitli mekanizmalarla hücre ölümünü tetikleyebilir.

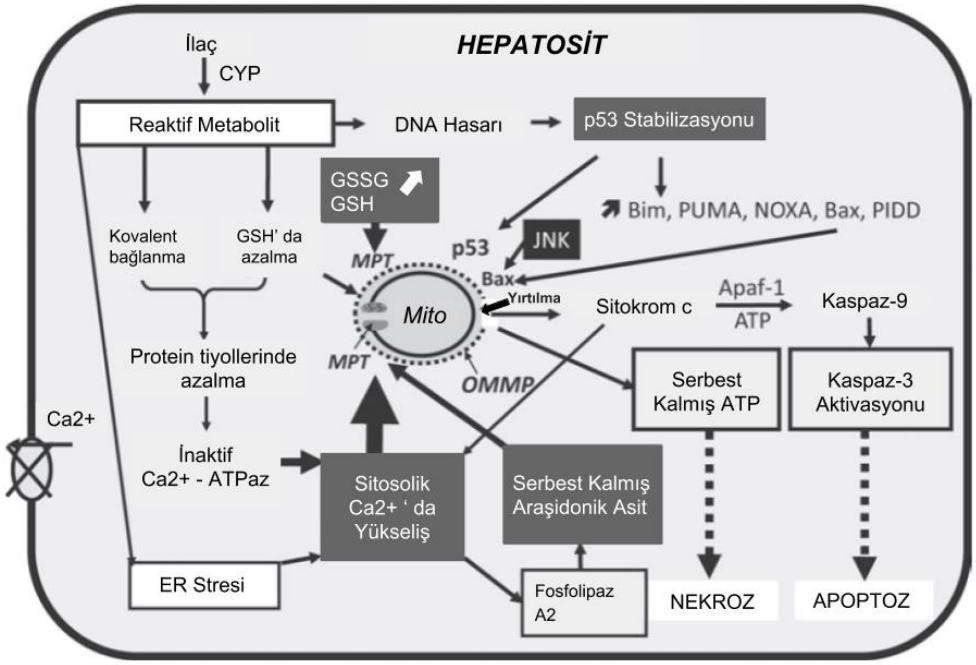
Elektrofilik metabolitler DNA'ya zarar verebilir ve p53 enzim sistemini stabilize edebilir [55].

Artan p53, apoptozun tetiklenmesine sebebiyet verir. Bunun yanında p53, mitokondride translokasyon yapar ve mitokondri membranının geçirgenliğini bozar.

Reaktif metabolitler aynı zamanda proteinlere ve GSH' ye kovalent olarak bağlanır. Bu bağlanma GSH' yi tüketir ve MPT gözenek yapısı içinde gözenek oluşturan disülfid köprülerinin oluşumuna yol açabilen GSSG / GSH oranını arttırır.

Protein tiyollerinde azalma, plazma membranında bulunan Ca^{2+}-ATPaz'ın inaktivasyonu ile ilişkilidir, böylece sitosolik Ca^{2+}konsantrasyonu artar. Mitokondri tarafından salınan sitokrom c' nin etkileşiminden ve reaktif metabolit aracılığıyla ER stresinden dolayı, sitosolik kalsiyumun ER'den salınımı artar. Artmış sitosolik kalsiyum, MPT' yi tetiklemek için mitokondriyal matrikse girer ve ayrıca Fosfolipaz A2' yi aktive eder. Böylece araşidonik asit salınımı gerçekleşir. MPT, MMP'nin çökmesine neden olur ve böylece mitokondri kaynaklı ATP sentezini önlenir. ATP azalması apoptozu önler, ancak nekroza neden olur [46].

Ayrıca MPT, mitokondriyal şişmeye ve OMM' de yırtılmaya neden olur. Bu geçirgenlik ve yırtılma durumu, mitokondriyal iç membrandan sitozole doğru sitokrom c'nin çıkışına neden olur [56, 57]. DATP veya ATP varlığında sitosolik sitokrom c, apoptoz proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1) ile kaspazları aktive etmek ve apoptozu tetiklemek için etkileşir (Şekil 1.8) [46].



Şekil 1.8. Nekroz ve Apoptoz Olaylarının Gelişmesi [46]

MPT gözenek açıklığı, yüksek dozda ATP tükenmesini etkiler. ATP tükenmesine bağlı olarak hücre nekrozu veya kaspaz aktivasyonu görülür. Bu olaylar dizisi, apoptozu tetikleyebilir. Dolayısıyla reaktif metabolitlerin doğrudan toksisitesi; nekroza, apoptoza veya karaciğer lezyonunda bu her iki durumun da görülmesine yol açabilir [46].

Klopidogrel tedavisi sonrasında zamana ve konsantrasyona bağlı olarak ROS birikimi görülmüştür. Mitokondri ilişkili apoptozda en önemli olaylardan biri olan hücresel ROS birikimi, MPT' de por açılmasını tetikleyerek, sitokrom c' nin sitoplazmaya salınmasına neden olur [56, 57]. Yapılan boyama ve mikroskobik incelemelerde, mitokondriyal yapısal hasar ve sitokrom c sızıntısı gözlemlenerek, Klopidogrel toksisitesinin bu apoptotik yolla ilerlediğini göstermektedir. Dolayısıyla Klopidogrel, mitokondriyal hasarı arttırmakta ve sitokrom c' nin sitoplazmaya salınımına sebep olmaktadır [58].

Mitokondriyal hasar ve sonrasında gelen sitokrom c salınımı olayları, hücre hasarıyla sonuçlanır. Bu durum; erken apoptoz, geç apoptoz veya nekroz yoluyla olabilmektedir [56-58].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyaller

Test için kültürü yapılmış hepatosit hücreleri

Klopidogrel Hidrojen Sülfat (419.891 g/mol)

Kültür medyumu

Distile su

Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) (1X).0067M (PO_4) (*Thermo Scientific™*)

Dmem Ham's F-12 besiyeri (1:1) (*Merck Biochrom*)

Selenyum (*Aldrich*)

Deksametazon (*Sigma*)

Transferin (*Nalgene*)

İnsülin (*Sigma*)

Etanol (*Merck*)

Fetal sığır serumu (*Biosera*)

Penisilin (*Biosera*)

Amfoterisin (*Fisher Scientific*)

Tripsin/EDTA (*PAN Biotech*)

Flask (*TPL LIFE SCIENCE*) (40 ml'lik)

Falkon (*TPP TubeSpin Biorector*) (50 ml'lik)

Pipetler (*Thermo Scientific™*)

DMSO (*Thermo Scientific™*)

Tripan mavisi (*Rhex-ID*)

Neubauer lamı (*MARIENFELD*)

96 kuyucuklu mikroplaka (*NEST*)

0,2 µ filtre (*Sartorius*)

Steril edilmiş rezervuarlar

XTT I substrat (66 ml) (PAN I 96.1200 Kit Ürünü) (*Xenometrix*)

XTT II tampon (0,66 ml) (PAN I 96.1200 Kit Ürünü)

3-18KH soğutmalı döndürücü (*Sigma*)

Multiscan FC mikroplaka okuyucu (*Thermo Scientific*™)

-80^{0}C derin dondurucu (*Thermo Scientific*™)

-150^{0}C derin dondurucu (*Thermo Scientific*™ *Cryogenic Storage Chest Freezer*)

Otoklav (*Alp*)

Ultraviyole Kabin

Su Banyosu (*Stuart*)

Forma Steri CyclerCO_2 inkübatör (*Thermo Scientific*™)

Invert faz-kontrast mikroskobu (*Euromex*)

Buzdolabı (2 adet -20^{0}C, 1 adet +4^{0}C)

Kimyasal Dolabı

Hassas tartı (*Radwag*)

Bilgisayar (2 Adet)

Option-Q ultra saf su cihazı (*Elga*)

Vortex (*Grant Bio*)

Manyetik karıştırıcı (*Stuart*)

Çeker ocak (*SETLAB* ®)

2.2. Yöntem

2.2.1. Sitotoksisite testi

Sitotoksisite, hücresel aktivitenin geri dönüşümsüz olarak durdurulması ve hücresel yapının onarılamaz hale gelmesidir. Deney hayvanlarına, ilaçların veya bir başka test maddesinin, hücrenin büyüme oranına ve morfolojik özelliklerine etkisinin negatif ve pozitif kontrol grupları kullanılarak değerlendirme yapılması amacıyla, alternatif yöntemlerden biri olan in vitro sitotoksisite testleri uygulanmaktadır.

İn vitro sitotoksisite testlerinin avantajları olarak; hücre metabolizmasındaki spesifik bir fonksiyonun değerlendirilebilmesi, çok sayıda örneğin kısa zamanda ve daha ekonomik olarak incelenebilmesi ve kantitatif veriler elde edilebilmesi sayılabilir.

Sitotoksik etki potansiyelinin değerlendirilmesinde kullanılan metabolizma testlerinde mikroplakalara yerleştirilmiş hücrelerin canlılıkları mikroplaka okuyuculu spektrofotometre ile kolorimetrik olarak tespit edilmektedir.

2.2.2. XTT test prensibi

Hücre canlılığı için, mitokondri membranı ve mitokondriyal solunum zinciri önem taşımaktadır. Toksik ajanlar, canlı hücrelerden mitokondriyal dehidrogenazlar kullanılarak tanımlanmaktadır.

XTT (2,3-bis [2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil] -2H-tetrazolyum-5-karboksanilid iç tuzu), yalnızca canlı hücrelerde aktif olan ve mitokondriyal solunum zincirine ait süksinat dehidojenaz sistemi ile formazana ayrılan bir tetrazolyum tuzudur. Mitokondriyal süksinat dehidrojenaz, bir elektron eşleme reaktifinin varlığında sarı tetrazolyum tuzunu çözünür turuncu renkli formazana indirger.

MTT' nin çözünmeyen formazan tuzu kristallerinin aksine; XTT, spektrofotometrik ölçüm öncesinde bir çözündürmeye ihtiyaç duymadan, suda çözünür bir formazan ürününe dönüşür.

2.2.3. XTT ve MTT testleri arasındaki farklılıklar

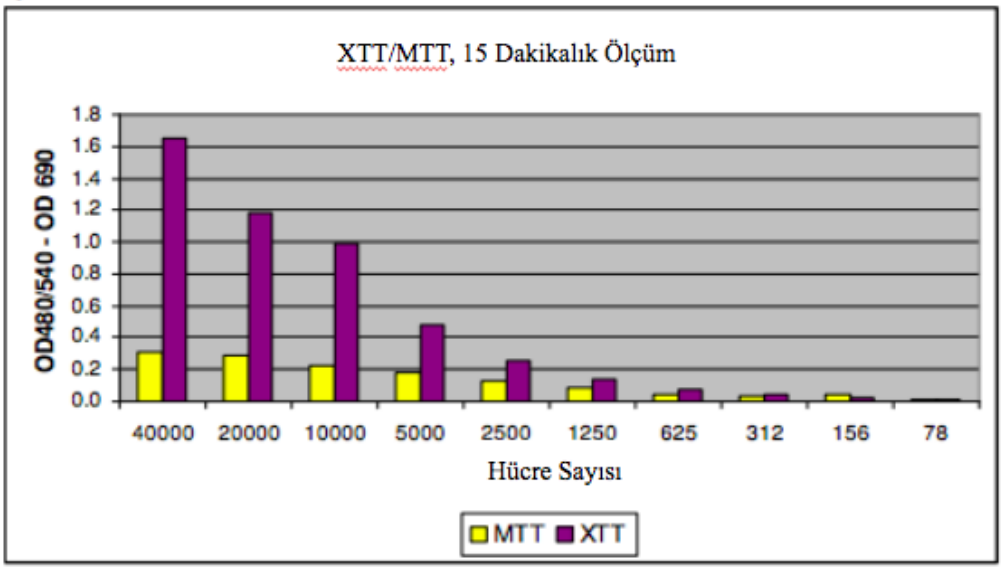
XTT testinin kullanımı, MTT' e göre kıyasla daha avantajlıdır. Bu avantajlardan birkaçından bahsetmek gerekirse;

XTT testi, daha fazla duyarlılığa sahiptir ve daha aktif bir yayılım sahası oluşturur.

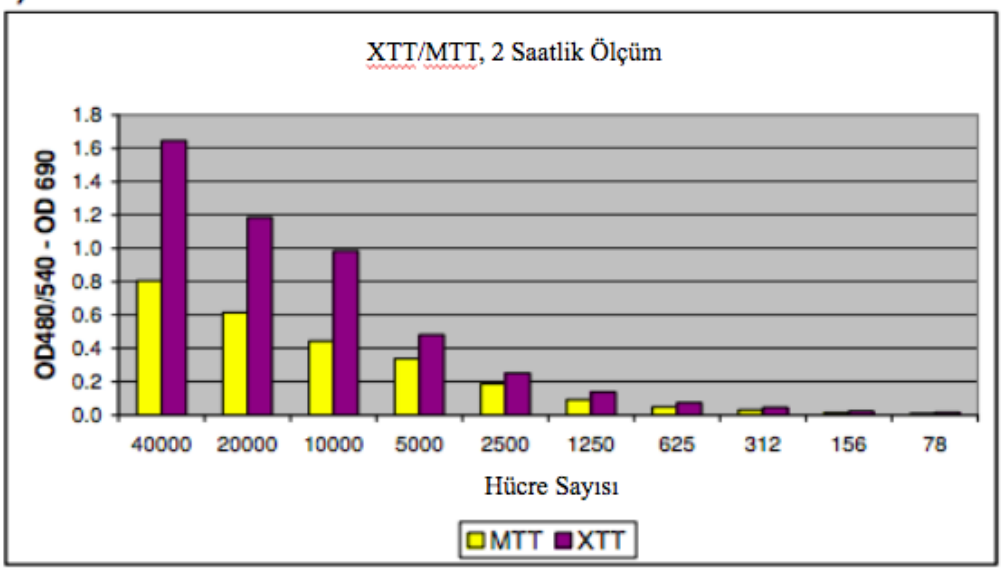
MTT'nin aksine XTT reaksiyonundan elde edilen sonuç, formazan adındaki çözülebilir bir boya ile tanımlanır. Dolayısıyla nihai bir çözündürme adımı ortadan kalkmış olur. Bunlara bağlı olarak daha az manipülasyon ve bu da daha düşük hata riski anlamına gelir.

MTT'de genellikle okuma yapılmadan önce çökelti oluşmaması adına uzun bir inkübasyona ihtiyaç duyulurken; XTT'de kısa bir inkübasyon sonrası OD okumaları yapılabilir [59].

A)



B)



Şekil 2.1. XTT testi ve MTT testlerinin kıyaslanması amacıyla bir örnek çalışma [59]

Örneğe ait deney şartları;

L929 hücreleri; XTT ve MTT ile 3 saatlik inkübasyon.

OD_{480} (XTT) or OD_{540} (MTT) okuma, OD_{690} referansı ile.

XTT inkübasyondan hemen sonra hızlıca okunabilmektedir.

MTT 10% Triton X-100 içinde Isopropanol / 0.1 N HCl karışımı ile çözünme yapıldıktan sonra okuma yapılabilmektedir. 15 dakika (A) ve 2 saat sonra, 37°C' de (B) (Şekil2.1).

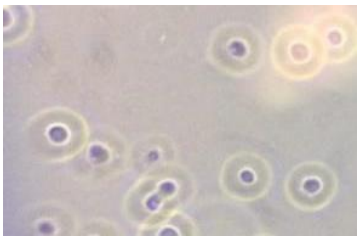
2.2.4. XTT - mitokondriyal aktivite tayini

2.2.4.1. Hepatosit hücre kültürü

Çalışmada kullanılan fare (*mus musculus*) karaciğerine ait AML12 (*ATCC® CRL2254™*) ATCC'den (CRL2254) temin edildi.

Sıvı azot tankından çıkarılan donmuş haldeki hücreler önce -80 ^{0}C ve sonrasında -20 ^{0}C 'de bekletildi. Ardından 37 ^{0}C'lik su banyosunda 1-2 dakika, hücrelerin çözünmesi için bekletildi. Çözünen hücreler, 15 ml'lik falkon tüpe alınarak hazırlanmış olan besiyerinde süspanse edildi. 5000 rpm, 25 ^{0}C' de, 7 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Çöken hücrelere besiyeri eklenerek yavaşça pipetaj yapılarak hücrelerin süspanse edilmesi sağlandı. Besiyeri eklenilerek hazır hale getirilmiş olan flasklara, hücre-besiyeri karışımından 1 ml alındı ve pipetaj yapılarak, hücreler flaska eklendi. Hazırlanan flasklar 37 ^{0}C' de %5 CO_2'li inkübasyona bırakıldı.

Her iki günde bir olmak üzere beslenen hücrelerin yoğunluğu incelenerek pasajlama yapıldı. (Şekil 2.2)



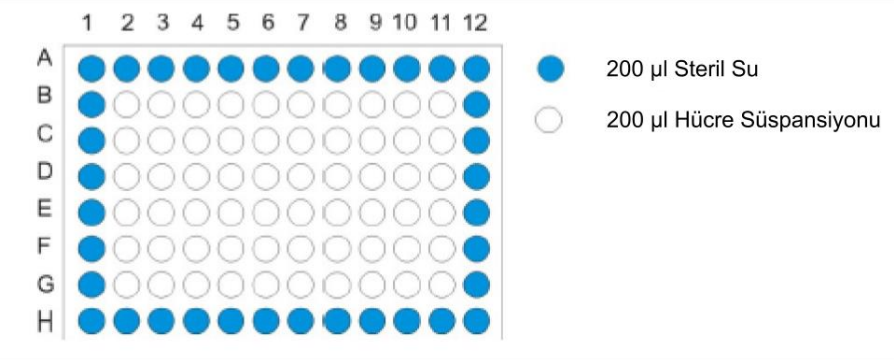
Şekil 2.2. Flasklara ekimi yapılan hepatositlerin invert mikroskop altında elde edilen görüntüsü (40X)

2.2.4.2. Hücre sayımı

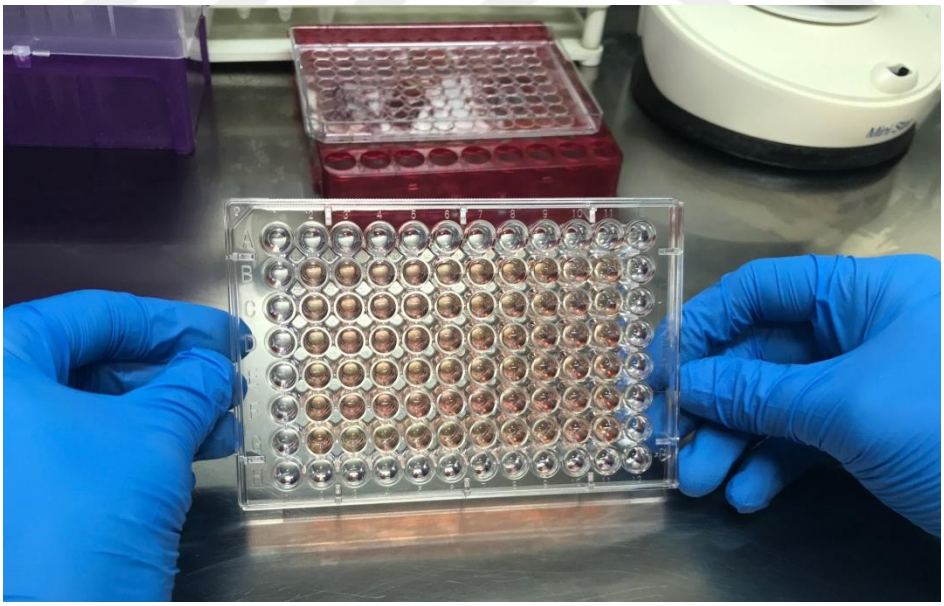
Hücre süspansiyonu ve tripan mavisi çözeltisi 1:1 oranında karıştırılarak, Neubauer lamına eklendi. Işık mikroskobunda sayım yapıldı.

2.2.4.3. Hepatositlerin 96 kuyucuklu mikroplakalarda alt kültürü

- 96 kuyucuklu mikroplakaların A ve H sıraları ile 1. ve 12. sütunlarındaki her bir kuyucuğa 200 µl steril su dağıtıldı (Şekil2.3, Şekil 2.4).
- Steril su eklenen kuyucuklar haricinde kalan boş kuyucukların her birine, hazırlanan hücre süspansiyonundan 200 µl eklendi (Şekil2.3, Şekil 2.4).



Şekil 2.3. 96 kuyucuklu mikroplakaya hücre ekimi düzeni

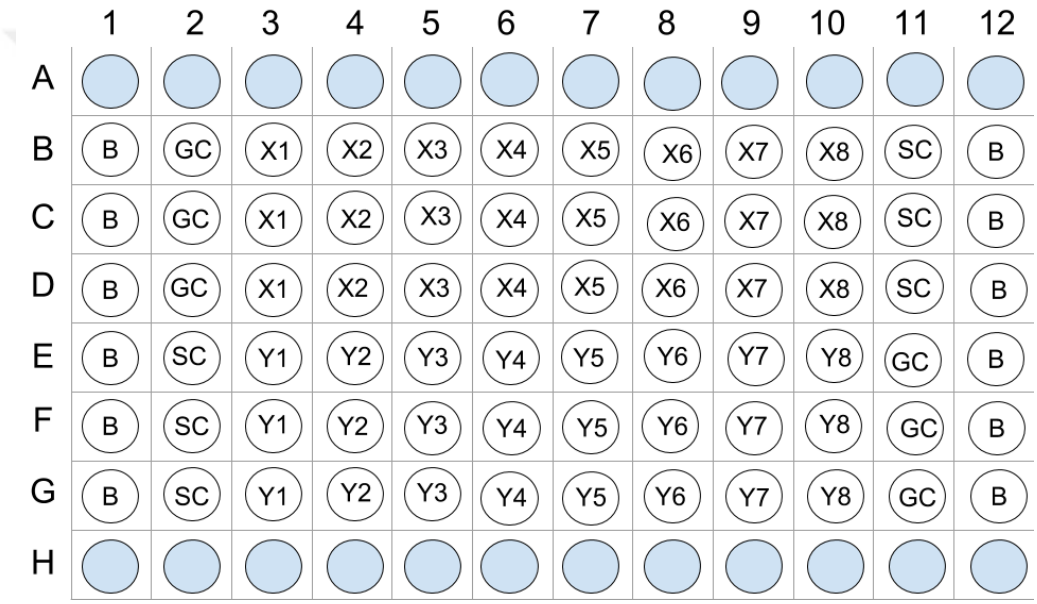


Şekil 2.4. 96 kuyucuklu mikroplakalara hücre ekimi

- 96 kuyucuklu mikroplakalar, 37 ^{0}C' de %5 CO_2'li inkübatörde 24 saat bekletildi.

2.2.4.4. Mikroplakalardaki hücre kültürünün klopirogrel'e maruz bırakılması

- 24 Saatlik inkübasyon sonrası mikroplakalar inkübatörden alındı. Mikroplakalardaki hücrelerin üzerine 25, 50, 150, 200, 250, 300 ve 400 µM Klopidogrel dozları eklendi. (Şekil2.5,Şekil 2.6, Şekil 2.7, Şekil 2.8)
- A ve H sırası hariç, mikroplakalardaki kalan kuyucuklardan çok kanallı pipet ile kültür besiyerleri uzaklaştırıldı.
- Bu kuyucuklar, 50 µl PBS ile yıkandı.
- Her bir kuyucuğa 200 µl taze besiyer eklendi.



A + H sıraları: Steril bidistile su

B (Kör, *Blank*): Kültür besiyeri + hücresiz + çözücü (%2'lik DMSO)

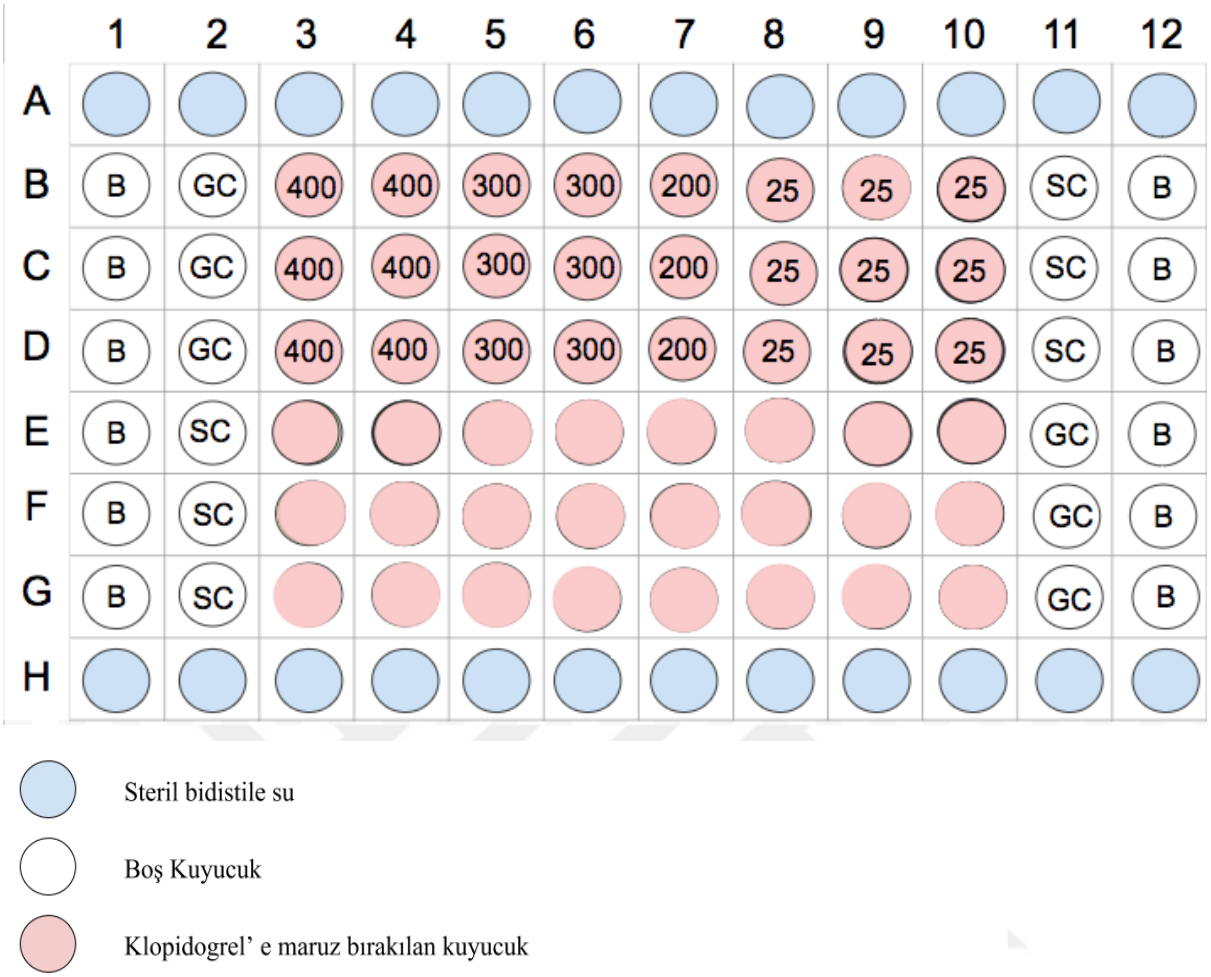
GC (Büyüme Kontrolü, *Growth Control*): Kültür besiyeri + hücreler

SC (Çözücü Kontrolü, *Solvent Control*): Kültür besiyeri + hücreler + çözücü (%2'lik DMSO)

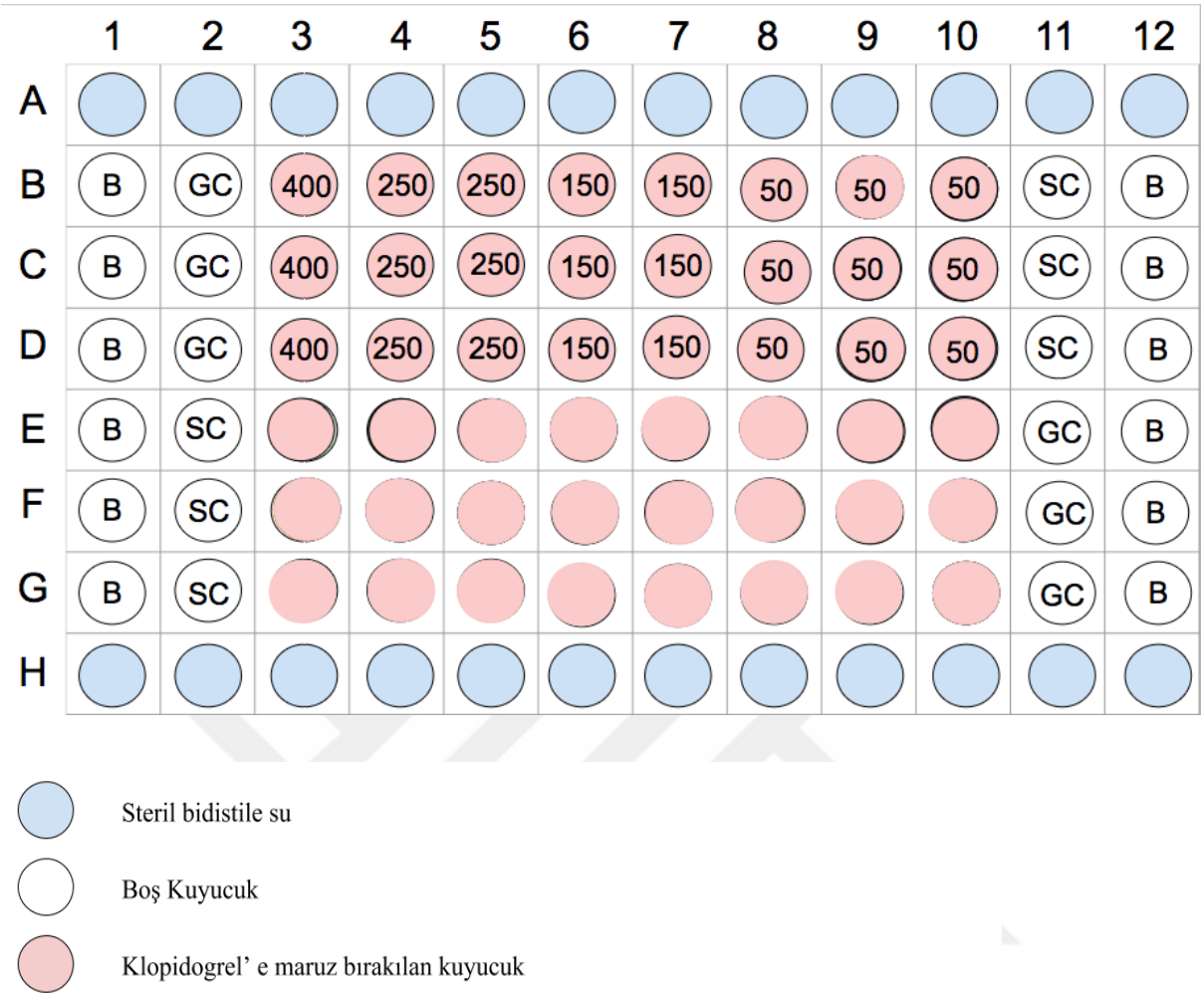
X1, X2, …, X8: Kültür besiyeri + hücreler + X bileşiğinin 8 farklı konsantrasyonu

Y1, Y2, …, Y8: Kültür besiyeri + hücreler + Y bileşiğinin 8 farklı konsantrasyonu

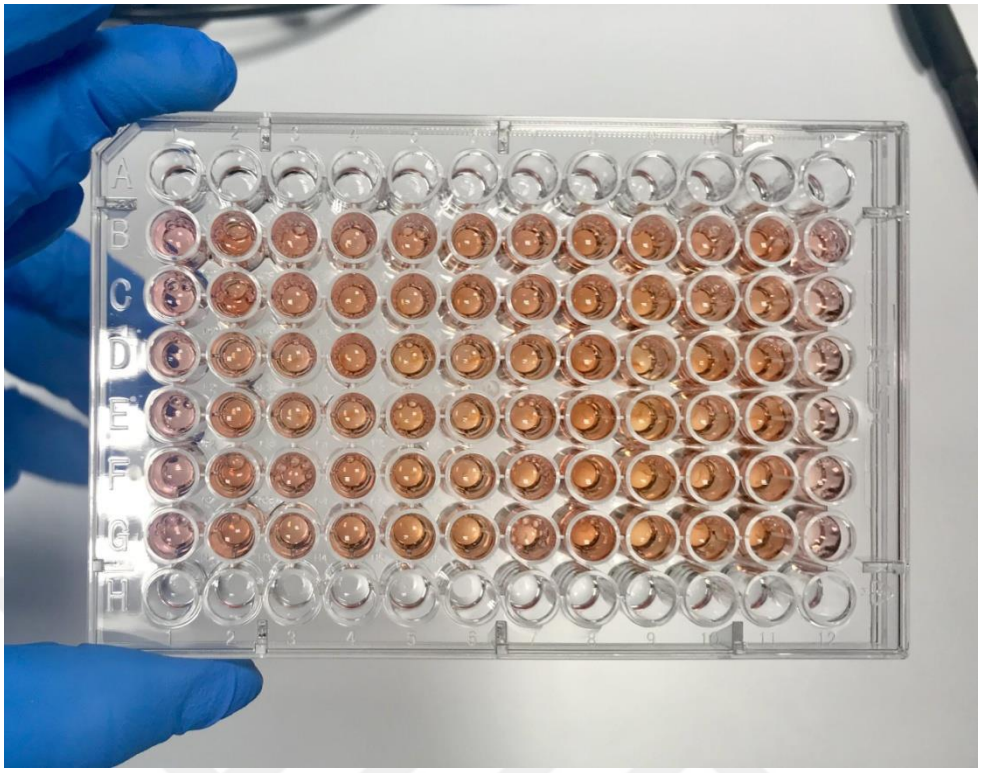
Şekil 2.5. 96 kuyucuklu mikroplakadaki çalışma düzeni



Şekil 2.6. 1. mikroplakaya uygulanan test bileşikleri ve dozları (Dozlar, µM olarak verilmiştir.)



Şekil 2.7. 2. Mikroplakaya Uygulanan Test Bileşiği ve Dozları (Dozlar, µM olarak verilmiştir.)



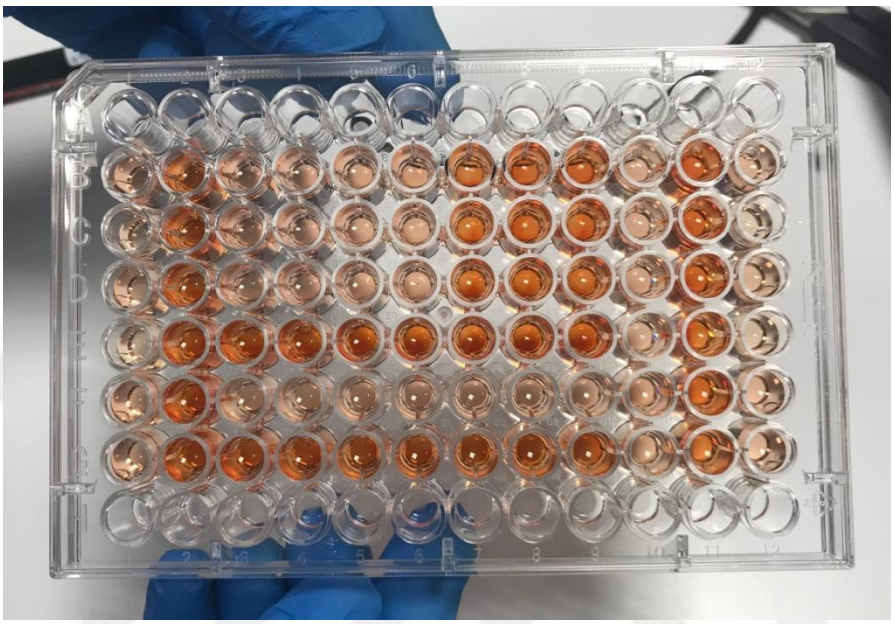
Şekil 2.8. Mikroplakalara Test Bileşiklerinin Uygulanmış Hali

- Bu iki 96 kuyucuklu mikroplaka, 37 ^{0}C' de %5 CO_2'li inkübatörde 24 saat bekletildi.

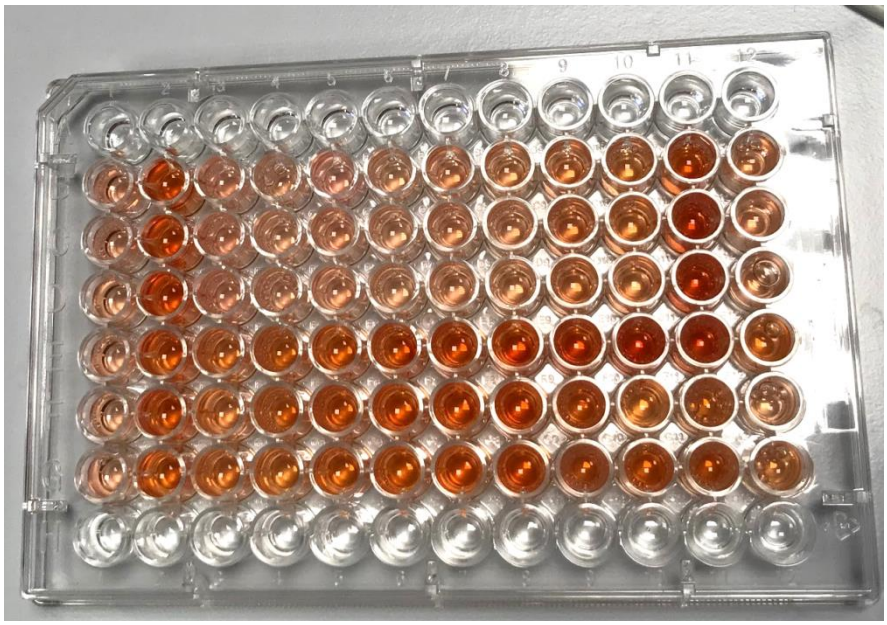
2.2.4.5. XTT' nin maruziyet plakalarına uygulanması ve spektrofotometrik ölçüm yapılması

- XTT solüsyonları berrak hale gelene kadar 37 ^{0}C' deki su banyosunda bekletildi.
- 96 kuyucuklu mikroplakalar inkübatörden alındı.
- Hücreler PBS ile yıkandı ve her bir kuyucuk için 200 µl olacak şekilde yeni besiyer eklendi.
- XTT solüsyonu mikroplakalara uygulanmadan önce, bir mikroplaka için, 1:100 oranında olacak şekilde; XTT I'den 4 ml ve XTT II'den 40 µl alınarak karıştırıldı.
- Blanklerde dahil olmak üzere her bir kuyucuğa bu XTT karışım solüsyonundan 50 µl konuldu.
- Bu iki 96 kuyucuklu mikroplaka, 37 ^{0}C' de %5 CO_2'li inkübatörde 3 saat inkübe edildi (Şekil 2.9, Şekil 2.10).

- İnkübasyon sonunda mikroplakalar inkübatörden alınarak 1. mikroplaka, 690 nm' lik referans dalga boyu uzunluğu ile 450 nm' de ve 480 nm' de OD ölçümü yapıldı. 2. mikroplaka, 690 nm' lik referans dalga boyu uzunluğu ile 480 nm'de OD ölçümü yapıldı.



Şekil 2.9. 1. mikroplakanın XTT maruziyeti ve inkübasyonu sonundaki görüntüsü



Şekil 2.10. 2. mikroplakanın XTT maruziyeti ve inkübasyonu sonundaki görüntüsü

2.2.5. Sonuçların değerlendirilmesi

Test maddesinin çözündürüldüğü çözeltiyi içeren kuyucukların (solvent kontrol) absorbans değerleri %100 canlılığı ifade eder. Solvent kontrol ile kıyaslama yapılarak % canlılık hesaplandı.

Çözücü kontrollerinin (SC) 96 kuyucuklu mikroplakanın sağ ve sol kenarında bulunması sistematik hataların belirlenmesini sağlar. Testin anlamlı olabilmesi için, sağ ve sol taraftaki çözücü kontrollerin ortalamaları ile tüm çözücü kontrollerin ortalamaları arasında %15'ten fazla fark olmaması gerekir.

Hücre büyüme kontrolleri (GC) çözücünün etkisini belirlemeyi sağlar. Eğer çözücü kontrollerin değerleri hücre büyüme kontrolleri ile belirgin bir fark gösterirse, test bileşiklerinin inhibisyon değerleri dikkatle yorumlanmalı, mümkünse farklı bir çözücü seçilmelidir.

Her çözücü kontrol (SC) ve örnek absorbanslarından blank absorbansı çıkarılarak düzeltilmiş absorbans değerleri elde edildi.

Düzeltilmiş çözücü kontrol (düzeltilmiş OD_{SC}) ve düzeltilmiş örnek (düzeltilmiş $OD_{Örnek}$) absorbans değerlerinin ortalaması alındı.

% Relatif inhibisyon (hücre ölümü) hesabı için aşağıdaki formül uygulandı;

% Relatif inhibisyon = 100 - (düzeltilmiş ort. ODÖrnek x 100 / düzeltilmiş ort. ODSC)

İlaç dozu konsantrasyonu ve % relatif inhibisyon (% hücre ölümü) gösterilecek şekilde, konsantrasyona karşı % inhibisyon (% hücre ölümü) eğrisi çizildi.

Eğriden %50 inhibisyona (hücre ölümüne) karşılık gelen konsantrasyon hesaplanarak çalışılan maddelerin IC_{50} (%50 oranında hücre ölümüne sebep olan konsantrasyon) değeri belirlendi.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Bulgular

Şekil2.5‘te gösterildiği gibi 400, 300, 200 ve 25 µM Klopidogrel dozları uygulandığı AML12 hepatositlerinin 690 nm dalga boyu referansında 480 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapılarak XTT test sonuçları elde edildi (Tablo 3.1) .

Tablo 3.1. 1. Mikroplakanın 480 ve 690 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm sonuçları

480 nm Dalga Boyunda Test Sonuçları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	0,055	0,059	0,098	0,044	0,051	0,043	0,174	0,119	0,166	0,062	0,064	0,053
Klopidogrel	0,385	1,016	0,415	0,415	0,443	0,442	0,53	1,275	1,276	1,275	1,743	0,408
Klopidogrel	0,245	1,562	0,39	0,38	0,438	0,438	0,428	1,813	1,812	1,812	1,718	0,252
Klopidogrel	0,358	1,724	0,408	0,408	0,45	0,46	0,441	1,215	1,214	1,215	1,822	0,379
		1,957									1,205	
		2,002									1,591	
		1,636									1,244	
	0,054	0,173	0,059	0,057	0,057	0,075	0,081	0,079	0,076	0,058	0,14	0,169

690 nm Dalga Boyunda Test Sonuçları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	0,045	0,042	0,057	0,037	0,041	0,036	0,11	0,071	0,109	0,044	0,047	0,044
Klopidogrel	0,073	0,086	0,074	0,074	0,075	0,076	0,074	0,085	0,084	0,085	0,093	0,074
Klopidogrel	0,057	0,083	0,074	0,073	0,077	0,077	0,071	0,092	0,091	0,092	0,09	0,06
Klopidogrel	0,07	0,092	0,077	0,078	0,077	0,077	0,07	0,077	0,078	0,078	0,093	0,067
		0,093									0,094	
		0,104									0,098	
		0,09									0,095	
	0,042	0,113	0,045	0,043	0,043	0,049	0,05	0,053	0,049	0,046	0,088	0,105

	Su
	Kör
	Çözücü Kontrolü
	Büyüme Kontrolü
	Klopidogrel

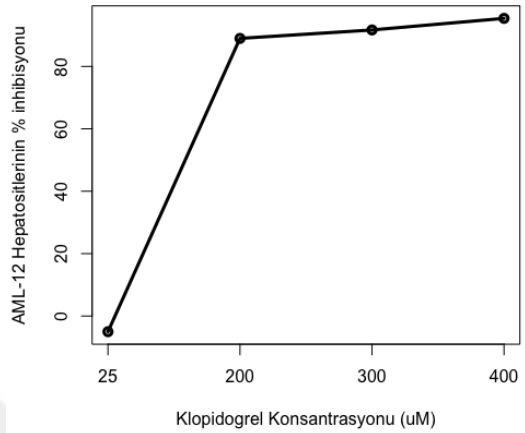
Tablo 3.1’den alınan OD değerleri ile gerekli hesaplama ve formülasyonlar uygulanarak, canlılık ve inhibisyon değerleri elde edildi(Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Spektrofotometrik sonuçlara dayanarak elde edilen canlılık ve inhibisyon değerleri

KLOPİDOGREL / 480-690 nm için

	Büyüme Kontrolü	Çözücü Kontrolü	25 µM Klopidogrel	200 µM Klopidogrel	300 µM Klopidogrel	400 µM Klopidogrel
Düzeltilmiş OD	1,4367	1,0165	0,07783	0,112	1,4	1,2575
%İnhibisyon			-5,02	88,98	91,687	95,4
%Canlılık			5,42	7,795643	97,4455	87,53
%İNH/(100%-%İNH)			-0,047800419	8,074410163	11,02935162	20,73913043
LOG(%İNH/(100%-%İNH))			-0,047800419	0,907110807	1,042549982	1,316790543

Tablo 3.2‘den alınan veriler kullanılarak hücre ölümünün grafiksel anlatımı yapıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. 25, 200, 300, 400 µM dozları için elde edilen inhibisyon grafiği

Yapılan çalışma sonucunda AML12 Hepatositlerine uygulanmış olan 400, 300, 200µM Klopidogrel dozlarının toksisiteye sebep olduğu ve doz arttıkça toksisitenin de doğru orantılı olarak arttığı gözlemlenmiştir.25 µM Klopidogrel dozunun neredeyse sitotoksisiteye sebep olmadığı, ancak 200 µM ve üzerine çıkıldıkça sitotoksisitenin şiddetini arttırdığı tespit edilmiştir.

Bu dozlardan elde edilen veriler, *GraphPad Prism 8*programı kullanılarak değerlendirilmiş; inhibisyon konsanstrasyon değeri (IC_{50}) 97.39 , logaritmik inhibisyon konsanstrasyon değeri ($Log\ IC_{50}$) ise 1.989 olarak bulunmuştur.

Şekil 2.6 ‘da gösterilen 2. mikroplakaya uygulanan 400, 250, 150 ve 50 µM Klopidogrel dozlarına maruz bırakıldığı AML12 hepatositlerinin 690 nm dalga boyu referansında 480 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapılarak XTT test sonuçları elde edildi (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. 2. Mikroplakanın 480 ve 690 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm sonuçları

480 nm Dalga Boyunda Test Sonuçları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	0,045	0,044	0,051	0,043	0,056	0,043	0,053	0,041	0,045	0,043	0,041	0,043
Klopidogrel	0,35	1,231	0,335	0,316	0,317	0,404	0,404	0,487	0,487	0,486	1,319	0,435
Klopidogrel	0,333	1,244	0,3	0,364	0,365	0,415	0,414	0,548	0,55	0,548	1,643	0,395
Klopidogrel	0,329	1,068	0,302	0,336	0,334	0,331	0,331	0,38	0,379	0,379	1,568	0,974
		1,017									1,534	
		1,02									0,7	
		0,888									0,954	
	0,057	0,058	0,049	0,053	0,046	0,087	0,052	0,057	0,101	0,162	0,085	0,087

690 nm Dalga Boyunda Test Sonuçları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	0,04	0,039	0,043	0,038	0,05	0,038	0,047	0,038	0,04	0,038	0,038	0,038
Klopidogrel	0,062	0,12	0,057	0,062	0,062	0,069	0,069	0,07	0,071	0,071	0,121	0,071
Klopidogrel	0,058	0,117	0,06	0,115	0,114	0,111	0,11	0,103	0,102	0,102	0,123	0,07
Klopidogrel	0,069	0,126	0,063	0,097	0,097	0,06	0,06	0,065	0,065	0,065	0,121	1,075
		0,116									0,122	
		0,125									0,104	
		0,111									0,116	
	0,047	0,049	0,041	0,045	0,04	0,075	0,045	0,049	0,082	0,146	0,078	0,076

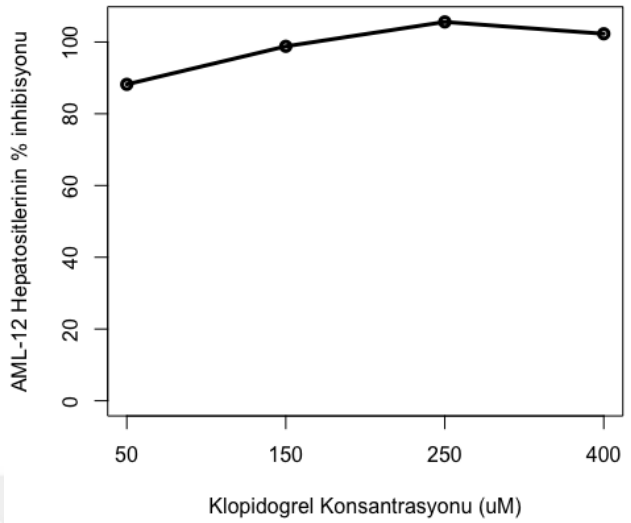
	Su
	Kör
	Çözücü Kontrolü
	Büyüme Kontrolü
	Klopidogrel

Tablo 3.3'den alınan OD değerleri ile gerekli hesaplama ve formülasyonlar uygulanarak, canlılık ve inhibisyon değerleri elde edildi (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Spektrofotometrik sonuçlara dayanarak elde edilen canlılık ve inhibisyon değerleri

KLOPİDOGREL / 480-690 nm için						
	Büyüme Kontrolü	Çözücü Kontrolü	50 µM Klopidogrel	150 µM Klopidogrel	250 µM Klopidogrel	400 µM Klopidogrel
Düzeltilmiş OD	0,710333333	0,829	-0,019	-0,012333	0,027	0,132
%İnhibisyon			88,2	98,8	105,6	105,066
%Canlılık			-2,675	-1,73623	3,801	18,583
%İNH/(100%-%İNH)			7,474576271	82,33333333	-18,85714286	-20,7394394
LOG(%İNH/(100%-%İNH))			0,873586578	1,915575699	-18,85714286	-20,7394394

Tablo 3.4 'den alınan veriler kullanılarak hücre ölümünün grafiksel anlatımı yapıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. 50, 150, 250, 400 µM dozları için elde edilen inhibisyon grafiği

Deneyin doğruluğunu desteklemek ve birinci Mikroplakaya uygulanmış olan dozların ara dozlarını da denemek amaçlı ikinci mikroplakaya uygulanmış olan; 400, 250, 150 ve 50 µM Klopidogrel dozlarının da toksisiteye sebep olduğunu ve doz arttıkça toksisitenin de doğru orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir.

Bu dozlardan elde edilen veriler, *GraphPad Prism 8*programı kullanılarak değerlendirilmiş; inhibisyon konsanstrasyon değeri (IC_{50}) 171.3 , logaritmik inhibisyon konsanstrasyon değeri ($Log\ IC_{50}$) ise 2.234 olarak bulunmuştur.

Bu çalışma sayesinde iki mikroplakadan elde edilen sonuçlar göstermektedir ki; 25 µM Klopidogrel dozu sitotoksisite için risk oluşturmazken, 50 µM'dan itibaren 150, 200, 250, 300 ve 400 µM dozları, etkili bir şekilde sitotoksisiteye sebep olmaktadır.

3.2. Tartışma

Kardiyovasküler hastalıklarda ön plana çıkantrombosit agregasyonundan kaynaklanan tromboz oluşumunu engellemek amaçlı kullanılan Klopidogrel, trombosit agregasyonunu engelleyen bir antitrombotik ilaçtır.

Kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde Tiklopidin veya Klopidogrel sıklıkla kullanılmaktadır. *DOUBLE-BLIND CLASSICS* çalışmasında Klopidogrel tolerasyonunun, Tiklopidin'e nazaran daha iyi olduğu tespit edilmiştir [60, 61].

Klopidogrel'e dair diğer öncü çalışmalardan olan *CAPRIE* ve *CURE*deneylerinde ise; sadece Klopidogrel veya Aspirin kullanımında Klopidogrel'in gastrointestinal tolerasyonunun Aspirin'e nazaran daha iyi olduğu gözlemlenmiş, Klopidogrel ile tedavi olan hastaların gastrointestinal kanama sıklığının Aspirin ile tedavi olan hastalara oranla daha düşük olduğu belirlenmiştir. Yine *CAPRIE* çalışmasında belirtildiği üzere; Klopidogrel, aterotrombotik hastalarda vasküler olayların önlenmesinde Aspirin'den daha etkili bir ilaçtır [62].

Aspirin, günümüzde Tiklopidin ve Klopidogrel'edestek tedavi olarak hastalara sunulmaktadır. Bu durumda; Klopidogrel - Aspirin eş zamanlı kullanımının, Tiklopidin - Aspirin kombinasyonuna göre daha etkili ve tolere edilebilirliğinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir [26].

Klopidogrel'in etkinliğini gösterebilmesi için aktif metabolitlere çevrilmesi gerekir. Bağırsak emilimi sonrası yaklaşık %90'ı aktif olmayan karboksilata ve %10'u merkapto grubu içeren aktif metabolitlere dönüştürülür. Bundan yola çıkarak Zahno ve arkadaşları, bu aktif olmayan karboksilat molekülünün toksisitesini araştırdıklarında, bu molekülün toksik olmadığı bilgisine ulaşmışlardır.

Zahno ve arkadaşlarıinsan HepG2 hücre soyunda hepatositlere 1, 10 ve 100 μM Klopidogrel dozlarını uygulayarak toksisiteyi gözlemlemişlerdir. Aynı araştırmacılar, CYP3A4 enziminin HepG2 hepatositlerine uygulanan bu dozlarda hepatotoksisiteye sebep olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda HepG2'lerin glutatyon tüketimine sebep olan DEM ile birlikte çalıştıklarında hücresel glutatyon seviyesinin %20'e kadar azaldığını gözlemlemişlerdir. 200 μM DEM'in bu düşüşe sebep olmasına karşılık; Klopidogrel'in de hücresel glutatyon içeriğinde %20-50'e kadar azalmaya sebep olduğu anlaşılmıştır. Bu bilgilerden yola çıkılarak hücresel GSH seviyesindeki düşüşün Klopidogrel toksisitesi ile bağlantılı olduğunubulmuşlardır. İlacın reaktif metabolitlerinin dogrudan GSH'a bağlanmasından dolayı bu immün olaylardan MMD de etkilenmektedir. Hücre yaşam döngüsünde önemli rolü olan mitokondrinin membran

bütünlüğünün bozulması ile mitokondriyal toksisite ve buna bağlı olarak sitotoksisite, sonrasında da ilaç kaynaklı karaciğer hasarının (DILI) oluşmasısöz konusudur.

Bazı araştırmalarda da bu toksisitenin kısmi bir toksisite olabileceği ve glutatyon ile indüklendiğinde bunun önlenebileceği belirtilmiştir. Şöyleki; hücresel glutatyondaki düşüş, hücre içinde ROS birikimine sebep olabildiği için; Klopidogrel, bazı çalışmalarda tedavinin süresi ve konsantrasyonlarına bağlı olarak ROS birikimi ile ilişkilendirilmiştir. Hücresel ROS birikimi, MPT'de por açılmasını etkileyeceğinden, sitokrom c'nin sitoplazmaya sızıntısına sebep olacaktır. Ayrıca MPT'nin bozulması, mitokondriyal kaynaklı ATP sentezini de önlemektedir. Bu olaylar dizisi de yine hücre hasarı ile sonuçlanacaktır [56-58]. Zhai ve arkadaşlarının, primer fare hepatositlerini 100 ve 300 μM Klopidogrel ile muamele ettiklerinde hücre içi ROS birikiminin arttığını gözlemlemeleri, farklı dozlarda Klopidogrel uygulamalarının MPT bozunmasının nedenlerini açıklayan örnek bir çalışmadır.

Yine Zahno ve arkadaşları 100 μM'lık Klopidogrel dozunun hücresel ATP varlığını %15'e kadar azalttığını tespit etmeleri, ATP üretiminin mitokondri toksisitesine etkisini göstermektedir.

Mitokondriyal sitotoksisiteye dair literatürdeki veriler çok sınırlı sayıda olduğundan mevcutçalışmamız, bu konudaki eksikliğin giderilmesini ve desteklenmesini amaçlamaktadır.

Bahsedilen çalışmaların aksinebu deneyde, çalışılmış mevcut Klopidogrel dozları ve aynı zamanda alt ve üst dozlar da testedahil edilmiştir. Çalışmamızda, Klopidogrel dozlarına bağlı olarak mitokondriyal toksisite incelenmiştir. AML12 hepatosit hücre soyunda 25, 50, 150, 200, 250, 300 ve 400 μM Klopidogrel dozları uygulanarak inceleme yapılmıştır.

25 μM Klopidogrel dozunda sitotoksisite durumu risk yaratmazken; 50 μM'a çıkıldığında sitotoksisitede ciddi bir artış görülmektedir. Bu da 25 ve 50 μM arasındaki konsantrasyonlarda Klopidogrel'in, sitotoksisite ve ilerleyen evrelerde karaciğer hasarına yol açabileceğini kanıtlamaktadır. Daha yüksek konsantrasyonlardaki dozlarda ise (150, 200, 250, 300, 400 μM) sitotoksisitenin neredeyse %100'e kadar arttığı

gözlemlenmiştir. Bunun yanında 300 ve 400 μM dozlarında sitotoksisitenin devam ederek stabil hale geldiği tespit edilmiştir.

10 μM Klopidogrel konsantrasyonu, 75 mg'lik tedaviye karşılık gelmektedir [58]. Günümüzde de Klopidogrel kullanımı hastalara günlük 75 mg ve hastalık tipine göre değişebilen 300 mg'lik dozlar olarak sunulmaktadır. Yapılan çalışmalarda ve kaydedilen anketlerde, günlük 75 mg Klopidogrel ve buna destek olarak Aspirin kullanımının, intrakoroner stent yerleştirildikten 30 gün sonra günde iki kez 250 mg tiklopidin kullanımı ile benzer etkinlik gösterdiği görülmüştür. Böylece hastalar Klopidogrel'in toksik etkisinden minimum yararlanırken, Tiklopidin' e nazaran daha kolaylıklı bir tedavi süreci geçirebilmektedirler.

Angiolillo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada koroner stent takılan hastalarda 600 mg'lık doz kullanımının, 300 mg doza kıyasla daha hızlı ve daha etkili trombosit inhibisyon gözlemlemişlerdir. Buna ek olarak, rutinde kullanılan 300 mg Klopidogrel kullanımına nazaran, 600 mg doz kullanımında hastalardan daha anlamlı ve yüksek oranda olumlu cevap alınmıştır [45]. Ancak yaptığımız çalışmaya dayanarak, 300 mg 40 μM' a ve 600 mg'nin de 80 μM' a denk geleceği için bu konsantrasyondaki dozların hastalara toksik etki yapabileceği ve uzun vadede karaciğer hasarına dahi yola açabileceği düşüncesindeyiz. Çalışmamızın sonuçları ışığında, Klopidogrel'in yüksek dozlarının neden olabileceği toksik etkiye ek olarak Aspirin de destekleyici ilaç olarak kullanıldığı takdirde hastada var olan sitotoksik etkinin artabileceği düşüncesindeyiz.

4.SONUÇLAR

Mevcut çalışmada farklı konsantrasyonlarda Klopidogrel uygulanmış olan hepatositlere, XTT testi ile mitokondriyal aktivite tayini yapılmıştır. XTT testi sonuçları göz önüne alınarak Klopidogrel'in sebep olduğu mitokondriyal hasar ve buna bağlı olarak sitotoksisite incelenmiştir.

Deneyde hücre kültürü yapılan *Mus musculus* karaciğerine ait AML12 hücre soylu hepatositlere 25, 50, 150, 200, 250, 300 ve 400 μM Klopidogrel konsantrasyonlarının etkisi araştırılmıştır. Çalışma, iki ayrı mikroplakada uygulanmak üzere; birinci mikroplakadaki hepatositler 400, 300, 200 ve 25 μM Klopidogrel konsantrasyonlarına, ikinci mikroplakadaki hepatositler ise 400, 250, 150, 50 μM Klopidogrel konsantrasyonlarına tabi tutulmuştur. Mikroplakalarda XTT testi çalışıldığında elde edilen sonuçlar, *GraphPad Prism 8*programı ile tayin edilerek birinci mikroplaka için inhibisyon konsanstrasyon değeri 97.39, logaritmik inhibisyon konsanstrasyon değeri ise 1.989; ikinci mikroplaka için inhibisyon konsanstrasyon değeri 171.3, logaritmik inhibisyon konsanstrasyon değeri ise 2.234 bulunmuştur.

Mevcut çalışmadan elde edilen sonuçların ışığında 25 μM Klopidogrel dozunun sitotoksisiteye neden olmadığı tespit edilmiştir. Ancak Klopidogrel konsantrasyonu, 50 μM'a yükseldiğinde sitotoksisitede artış gözlemlenmiştir. 150, 200, 250, 300, 400 μM Klopidogrel konsantrasyonlarında sitotoksisitenin artarak devam ettiği görülerek, 250 μM konsantrasyonda sitotoksisitenin yaklaşık %100'e ulaştığı, 300 ve 400 μM dozlarda ise sitotoksisitenin stabil kalarak devam ettiği sonucuna varılmıştır.

Mevcut çalışma, Klopidogrel'in mitokondriyal hasara olan etkisini AML12 hepatositleri üzerindeki araştırdığı ve literatür bilgisine yenilikler kattığı için özgün bir çalışmadır.

Bilgilendirme

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

5. KAYNAKÇA

1. Felser, A., Lindinger, P. W., Schnell, D., Kratschmar, D. V., Odermatt, A., Mies, S., ... & Krähenbühl, S. (2014). Hepatocellular toxicity of benzbromarone: effects on mitochondrial function and structure. *Toxicology*, *324*, 136-146.

2. Sherlock S, Dooley J. Diseases of the Liver and Biliary System. 11th ed. Oxford: Blackwell Science Ltd. 2002 p 1-35

3. Ghabril, M., Chalasani, N., & Björnsson, E. (2010). Drug-induced liver injury: a clinical update. *Current opinion in gastroenterology*, *26*(3), 222.

4. Junqueira, L. C.,& Carneiro, J. (2005). *Basic histology text and atlas*. London: McGraw Hill, 2005.

5. Moldéus, P., Högberg, J., & Orrenius, S. (1978). [4] Isolation and use of liver cells. Methods in enzymology, 52, 60-71.

6. Navarro, V. J.,& Senior, J. R. (2006). Drug-related hepatotoxicity. *New England Journal of Medicine*, *354*(7), 731-739.

7. Ostapowicz, G., Fontana, R. J., Schiødt, F. V., Larson, A., Davern, T. J., Han, S. H., ... & Crippin, J. S. (2002). Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Annals of internal medicine*, *137*(12), 947-954.

8. Weinshilboum, R. (2003). Inheritance and drug response. *N Engl J Med*, *2003*(348), 529-537.

9. Lee, W. M. (2003). Drug-induced hepatotoxicity. *New England Journal of Medicine*, *349*(5), 474-485.

10. Guengerich, F. P. (2001). Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical research in toxicology*, *14*(6), 611-650.

11. Ikemoto, S., Imaoka, S., Hayahara, N., Maekawa, M., & Funae, Y. (1992). Expression of hepatic microsomal cytochrome P450s as altered by uremia. *Biochemical pharmacology*, *43*(11), 2407-2412.

12. Nelson, D. R., Kamataki, T., Waxman, D. J., Guengerich, F. P., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., ... & Okuda, K. (1993). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. DNA and cell biology, 12(1), 1-51.

13. Pessayre, D., Berson, A., Fromenty, B., & Mansouri, A. (2001). Mitochondria in steatohepatitis. In *Seminars in liver disease*(Vol. 21, No. 01, pp. 057-070). Copyright© 2001 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.

14. Guengerich, F. P. (2001). Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical research in toxicology*, *14*(6), 611-650.

15. Willoughby, S., Holmes, A., & Loscalzo, J. (2002). Platelets and cardiovascular disease. *European Journal of Cardiovascular Nursing*, *1*(4), 273-288.

16. Davì, G.,& Patrono, C. (2007). Platelet activation and atherothrombosis. *New England Journal of Medicine*, *357*(24), 2482-2494.

17. Vorchheimer, D. A.,& Becker, R. (2006, January). Platelets in atherothrombosis. In *Mayo Clinic Proceedings*(Vol. 81, No. 1, pp. 59-68). Elsevier.

18. Zeidner, J. F., Frishman, W. H., & Lerner, R. G. (2008). Investigational antiplatelet drugs for the treatment and prevention of coronary artery disease. *Cardiology in review*, *16*(5), 250-259.

19. Steen, V. M.,& Holmsen, H. (1987). Current aspects on human platelet activation and responses. *European journal of haematology*, *38*(5), 383-399.

20. Rao, G. H. (1993). Physiology of blood platelet activation. *Indian journal of physiology and pharmacology*, *37*(4), 263-275.

21. Packham, M. A. (1994). Role of platelets in thrombosis and hemostasis. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, *72*(3), 278-284.

22. Brass, L. F., Hoxie, J. A., & Manning, D. R. (1993). Signaling through G proteins and G protein-coupled receptors during platelet activation. *Thrombosis and haemostasis*, *70*(1), 217-223.

23. Authi, K. S. (1993). Ca 2+ Homeostasis and intracellular pools in human platelets. In *Mechanisms of platelet activation and control*(pp. 83-104). Springer, Boston, MA.

24. Hemostaz. Retrieved March 20, 2018 from http://www.tipacilar.com/hemostaz/

25. Tuffal, G., Roy, S., Lavisse, M., Brasseur, D., Schofield, J., Touchard, N. D., ... & Sultan, E. (2011). An improved method for specific and quantitative determination of the clopidogrel active metabolite isomers in human plasma. *Thrombosis and haemostasis*, *105*(4), 696-705.

26. Jarvis, B.,& Simpson, K. (2000). Clopidogrel. *Drugs*, *60*(2), 347-377.

27. Herbert, J. M., Savi, P., & Maffrand, J. P. (1999). Biochemical and pharmacological properties of clopidogrel: a new ADP receptor antagonist. *European heart journal supplements*, *1*(A), A31-A40.

28. BOLAYIR, E. (2003). Yeni Antiagreganlar: Tiklopidin ve Klopidogrel.

29. Thebault, J. J., Blatrix, C. E., Blanchard, J. F., & Panak, E. A. (1973). The interactions of ticlopidine and aspirin in normal subjects. *Journal of International Medical Research*, *1*(2), 405-411.

30. Sharis, P. J., Cannon, C. P., & Loscalzo, J. (1998). The antiplatelet effects of ticlopidine and clopidogrel. *Annals of Internal Medicine*, *129*(5), 394-405.

31. Schrör, K. (1993). The basic pharmacology of ticlopidine and clopidogrel. *Platelets*, *4*(5), 252-261.

32. Panning, C. A. (2000). Antithrombotic Therapy during and after Intracoronary Stenting. *Journal of Pharmacy Technology*, *16*(5), 185-196.

33. Herbert, J. M. (1994). Clopidogrel and antiplatelet therapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *3*(5), 449-455.

34. Mills, D. C., Puri, R., Hu, C. J., Minniti, C., Grana, G., Freedman, M. D., ... & Colman, R. W. (1992). Clopidogrel inhibits the binding of ADP analogues to the receptor mediating inhibition of platelet adenylate cyclase. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *12*(4), 430-436.

35. Schafer, A. I. (1996). Antiplatelet therapy. *The American journal of medicine*, *101*(2), 199-209.

36. David, J. L., Monfort, F., Herion, F., & Raskinet, R. (1979). Compared effects of three dose-levels of ticlopidine on platelet function in normal subjects. *Thrombosis research*, *14*(1), 35-49.

37. Herbert, J. M., Frehel, D., Vallee, E., Kieffer, G., Gouy, D., Berger, Y., ... & Maffrand, J. P. (1993). Clopidogrel, a novel antiplatelet and antithrombotic agent. *Cardiovascular Therapeutics*, *11*(2), 180-198.

38. Hardisty, R. M., Powling, M. J., & Nokes, T. J. (1990). The action of ticlopidine on human platelets. Studies on aggregation, secretion, calcium mobilization and membrane glycoproteins. *Thrombosis and haemostasis*, *64*(1), 150-155.

39. Gachet, C., Stierlé, A., Cazenave, J. P., Ohlmann, P., Lanza, F., Bouloux, C., & Maffrand, J. P. (1990). The thienopyridine PCR 4099 selectively inhibits ADP-induced platelet aggregation and fibrinogen binding without modifying the membrane glycoprotein IIb–IIIa complex in rat and in man. *Biochemical pharmacology*, *40*(2), 229-238.

40. Keshmiri, H., Behal, A., Shroff, S., & Berkelhammer, C. (2016). Clopidogrel-induced severe hepatitis: a case report and literature review. *Case reports in hepatology*, *2016*.

41. Campbell, K. L., Cohn, J. R., & Savage, M. P. (2010). Clopidogrel hypersensitivity: clinical challenges and options for management. *Expert review of clinical pharmacology*, *3*(4), 553-561.

42. Martinez Perez-Balsa A, De Arce A, Castiella A, Lopez P, Ruibal M, Ruiz-Martinez J, Lopez De Munain A, Marti Masso JF. Hepatotoxicity due to ticlopidine. The Annals of pharmacotherapy. Nov 1998;32(11):1250-1251.

43. Zeolla MM, Carson JJ. Successful use of clopidogrel for cerebrovascular accident in a patient with suspected ticlopidine-induced hepatotoxicity. The Annals of pharmacotherapy. Sep 1999;33(9):939-941.

44. Pessayre, D., Berson, A., & Fromenty, B. (2008). Features and mechanisms of drug-induced liver injury. *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction*, 141-202.

45. Ommati, M. M., Jamshidzadeh, A., Heidari, R., Sun, Z., Zamiri, M. J., Khodaei, F., ... & Yeganeh, B. S. (2019). Carnosine and histidine supplementation blunt lead-induced reproductive toxicity through antioxidative and mitochondria-dependent mechanisms. *Biological trace element research*, *187*(1), 151-162.

46. Pessayre, D., Fromenty, B., Berson, A., Robin, M. A., Lettéron, P., Moreau, R., & Mansouri, A. (2012). Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. *Drug metabolism reviews*, *44*(1), 34-87.

47. Deschamps, D. O. M. I. N. I. Q. U. E., Fisch, C. E. C. I. L. E., Fromenty, B. E. R. N. A. R. D., Berson, A. L. A. I. N., Degott, C. L. A. U. D. E., & Pessayre, D. (1991). Inhibition by salicylic acid of the activation and thus oxidation of long chain fatty acids. Possible role in the development of Reye's syndrome. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *259*(2), 894-904.

48. Trost, L. C.,& Lemasters, J. J. (1996). The mitochondrial permeability transition: a new pathophysiological mechanism for Reye's syndrome and toxic liver injury. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *278*(3), 1000-1005.

49. Oh, K. W., Qian, T., Brenner, D. A., & Lemasters, J. J. (2003). Salicylate enhances necrosis and apoptosis mediated by the mitochondrial permeability transition. *Toxicological Sciences*, *73*(1), 44-52.

50. Zimmerman, H. J. (1981). Effects of Aspirin and Acetaminophen. *Arch Intern Med*, *141*, 333-342.

51. Liebler, D. C., Meredith, M. J., & Guengerich, F. P. (1985). Formation of glutathione conjugates by reactive metabolites of vinylidene chloride in microsomes and isolated hepatocytes. *Cancer research*, *45*(1), 186-193.

52. Pessayre, D. (1995). Role of reactive metabolites in drug-induced hepatitis.

53. Robin, M. A., Le Roy, M., Descatoire, V., & Pessayre, D. (1997). Plasma membrane cytochromes P450 as neoantigens and autoimmune targets in drug-induced hepatitis. *Journal of hepatology*, *26*, 23-30.

54. Lammert, C., Bjornsson, E., Niklasson, A., & Chalasani, N. (2010). Oral medications with significant hepatic metabolism at higher risk for hepatic adverse events. *Hepatology*, *51*(2), 615-620.

55. Labbe, G. I. L. L. E. S., Descatoire, V. E. R. O. N. I. Q. U. E., Beaune, P., Letteron, P., Larrey, D., & Pessayre, D. (1989). Suicide inactivation of cytochrome P-450 by methoxsalen. Evidence for the covalent binding of a reactive intermediate to the protein moiety. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *250*(3), 1034-1042.

56. Kaufmann, P., Török, M., Hänni, A., Roberts, P., Gasser, R., & Krähenbühl, S. (2005). Mechanisms of benzarone and benzbromarone-induced hepatic toxicity. *Hepatology*, *41*(4), 925-935.

57. Lemasters, J. J., Qian, T., He, L., Kim, J. S., Elmore, S. P., Cascio, W. E., & Brenner, D. A. (2002). Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxidants and redox signaling*, *4*(5), 769-781.

58. Zahno, A., Bouitbir, J., Maseneni, S., Lindinger, P. W., Brecht, K., & Krähenbühl, S. (2013). Hepatocellular toxicity of clopidogrel: mechanisms and risk factors. *Free Radical Biology and Medicine*, *65*, 208-216.

59. Why Should I Use XTT Instead of MTT. Retrieved February 2, 2018 from http://www.aniara.com/pdf/literature/XTTvsMTT.pdf

60. Panak, E., Maffrand, J. P., Picard-Fraire, C., Vallee, E., Blanchard, J., & Roncucci, R. (1983). Ticlopidine: a promise for the prevention and treatment of thrombosis and its complications. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, *13*(Suppl. 1), 1-54.

61. Picard-Fraire, C. (1983). Ticlopidine hydrochloride: relationship between dose, kinetics, plasma concentration and effect on platelet function. *Thrombosis Research*, *29*, 119-128.

62. Creager, M. A. (1998). Results of the CAPRIE trial: efficacy and safety of clopidogrel. *Vascular Medicine*, *3*(3), 257-260.

ÖZGEÇMİŞ

AdıSoyadı : Miray Cahide KARABAY

Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul - 21.05.1993

YabancıDili : İngilizce

E-Posta : miraykarabay@gmail.com

Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite/Lise	Mezuniyet Yılı
Lise	Fen Bilimleri	Kazım İşmen Lisesi	2011
Lisans	Biyoloji Bölümü	Marmara Üniversitesi	2015
Lisans	İşletme Bölümü	Anadolu Üniversitesi	Halen

İş Tecrübeleri	Yıl
Farmasina Tıbbi ve Kimyevi Ürünler San. Tic. Ltd. Şti. - Medikal Satış Sorumlusu	07.2018 - Halen

Marmara Üniversitesi Çevre Sorunları Uyg. Ve Arş. Merkezi - Biyolog	01.2017 - 06.2018
Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Tic. A.Ş. - Stajyer	08.2016 - 09.2016
Marmara Üniversitesi International Office (ERASMUS Office) - Kısmi Zamanlı Görevli Öğrenci	10.2013 - 08.2014
Life Express Fitness Club – Yüzme ve Voleybol Antrenörü	06.2018 - 09.2012

Bilimsel Eserler

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

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

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