



Parasetamol İndüklü Hepatotoksisite Modelinde Kafeik Asit Fenil Ester' in İnflamasyon ve Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Araştırılması*

Nuket KAMIŞ^{1a}, Funda KARABAĞ ÇOBAN^{2b}✉

1. Uşak Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Uşak, TÜRKİYE.
2. Uşak Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Uşak, TÜRKİYE.
ORCID: 0000-0003-3624-347X^a, 0000-0002-1565-32101^b

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
11.04.2019	09.09.2019	25.12.2019

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Kamiş N, Karabağ Çoban F: Parasetamol İndüklü Hepatotoksisite Modelinde Kafeik Asit Fenil Ester' in İnflamasyon ve Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Araştırılması. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 14(3): 290-298, 2019. DOI: 10.17094/ataunivbd.552207.

Öz: Parasetamol ucuz olması, kolay bulunabilmesi bakımından sık kullanılan ağrı kesici, ateş düşürücü etkisi olan bir ilaçtır. Parasetamol, karaciğerde metabolize olmaktadır. Yüksek dozda parasetamol karaciğer hasarına (hepatotoksisite) neden olmaktadır. Kafeik Asit Fenil Ester (CAPE); antimikrobik, antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklere sahip bir bileşendir. Uzun aromatik ve alifatik yapıdaki karbonları olmasından dolayı hücre duvarından kolayca geçer ve etki edeceği bölgeye daha rahat ulaşır. Bu çalışmanın amacı ratlara parasetamol ile hepatotoksisite oluşturulup meydana gelebilecek oksidatif stres ve enflamasyon üzerine CAPE'nin koruyucu etkisini araştırmak için tasarlanmıştır. Sunulan çalışmada, 36 wistar erkek rat kullanıldı. Rastgele olacak şekilde altı gruba ayrıldı; kontrol grubu; sadece yem verildi, parasetamol grubu; 2 g/kg parasetamol, parasetamol+CAPE grubu; 2 g/kg parasetamol+ 10 µg/kg CAPE, parasetamol+NAC grubu; parasetamol 2 g/kg + NAC (140 mg/kg) ve 140 mg/kg N-Asetilsistein 1 saat sonrasında da 2g/kg dozunda, 2 ml parasetamol, CAPE grubu; 10 mikrogram/kg CAPE ve etanol grubu; CAPE'nin çözdürüldüğü oranda seyreltik etanol. Veriler istatistiksel olarak SPSS-18 ANOVA ile standart sapma olarak değerlendirilmiştir. P<0.05 anlamlı olarak kabul edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, parasetamol indüklü hepatotoksisite modelinde kontrol grubuna göre parasetamol grubunda oksidatif stres parametrelerinin ve sitokin seviyelerinin istatistiksel olarak arttığı (P<0.05), CAPE verilen grupla parasetamol grubu karşılaştırıldığında, CAPE'nin meydana gelen enflamasyon ve oksidatif strese karşı koruyucu bir etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

Keywords: CAPE, Hepatotoksisite, Oksidatif stres, Parasetamol, Rat.

Investigation of Caffeic Acid Phenethyl Ester Effect on Inflammation and Oxidative Stress in Paracetamol Induced Hepatotoxicity

Abstract: Paracetamol is a cheap, pain-relieving, fever-reducing medicine that can be easily found. Paracetamol is metabolized in the liver. At high doses, paracetamol causes liver damage which is called hepatotoxicity. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) has antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant properties. Due to its long aromatic and aliphatic carbon structure, it passes easily through the cell wall and reaches the region where it will act more easily. The aim of this study is to understand the CAPE protective effect to hepatotoxicity oxidative stress and inflammation during the application of paracetamol. In this study 36 wistar rat was used and they were divided into six groups randomly. Control: given only forage. Paracetamol; 2 g/kg dose of paracetamol. Paracetamol +CAPE; 2 g/kg dose of paracetamol + 10 µg/kg CAPE. Paracetamol + NAC; Paracetamol 2 g/kg + NAC (140 mg/kg); 140 mg/kg N-acetyl Sistein applied after one hour 2 g/kg dose of 2 ml paracetamol. CAPE:10 microgram/kg CAPE and ethanol group. The data is analyzed statistically SpSS-18 ANOVA standard variation. P<0.05 is accepted meaningful. According to the results obtained, it is seen that hepatotoxicity induced paracetamol model has more oxidative stress statistically than the control group (P<0.05). The groups which were given CAPE and paracetamol group when compared, CAPE has protective effect to the occurring inflammation.

Anahtar Kelimeler: CAPE, Hepatotoxicity, Oxidative stres, Paracetamol, Rat.

✉ Funda Karabağ Çoban

Uşak Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Uşak, TÜRKİYE.
e-mail: funda.karabag@usak.edu.tr

*Uşak Üniversitesi 2017/TP035 no'lu BAP tez projesi olarak onaylanmıştır.

GİRİŞ

Karaciğer, ilaçların ve diğer ksenobiyotiklerin metabolizma ve detoksifikasyonundan sorumlu ana organ olması nedeniyle özellikle ilaçların neden olduğu toksisitede başlıca hedef organdır. Sadece ilaçlar değil bitkisel ilaçlar ve gıda takviyeleri de karaciğer hasarına neden olabilir. Bu tip hepatotoksiste, akut karaciğer yetmezliğine kadar gidebilen ağır karaciğer hasarına ve sonuçta ciddi mortalite ve morbiditeye yol açabilir. İlaçların neden olduğu karaciğer hasarı tespit edilmesi zor, çoklu mekanizmalara sahiptir. Parasetamol 1950'den beri klinik olarak kullanılan, ucuz ve kolay ulaşılabilirliğiyle günümüzde ise dünyada en çok kullanılan analjeziktir. 2015 yılından itibaren Türkiye'de 300'den fazla ilaç içerisinde etken madde olarak bulunmaktadır (1).

Parasetamol, kontrollü klinik araştırmalara göre plaseboya benzer yüksek güvenilirliği, düşük yan etki insidansı, düşük ilaç etkileşimi ve reçetesiz temin edilebilmesi sebebi ile yaygın kullanılan bir ilaçtır. Uygun teröpatik dozlarda oldukça güvenli ve kolayca tolere edilebilirdir ancak yüksek tek doz alımlarında, parasetamol insanlarda ve hayvanlarda karaciğer, böbrek ve diğer organlara hasar verebilir (1).

Parasetamolün yüksek dozda kullanılmasına bağlı olarak gerçekleşen toksik olaylarda başlıca antidot olarak N-asetilsistein (NAC) kullanılmaktadır. Daha önceki yapılan çalışmalarda NAC'ın hepatotoksisteyi önlediği ve koruyucu etkisi olduğu kanıtlanmıştır (2,3). Fakat NAC'ın verilmesi halinde bile hepatotoksiste meydana gelebilmektedir (4).

Kafeik asit fenetil ester (CAPE) yapı olarak flavonoidler ile benzerliği ile dikkat çeken, bal arılarının bitki özütlerinden toplamış olduğu propolisin aktif bileşenidir (5). Propolis ise bal arıları tarafından üretilen, doğal bir ürün olan ve kovanlarda en bol bulunur, aynı zamanda antioksidan, antiinflamatuar, antimikrobiyal özelliklere sahiptir

(6,7,8). Sitokinler, immün cevabın başlangıcında görevli olan hücresel düzenleyici proteinlerdir. Literatürde CAPE'nin ve NAC'ın koruyucu etkisinin olduğu çeşitli çalışmalar ile bildirilmiştir. Daha önceki çalışmalarda, parasetamol hepatotoksikasyonu veya CAPE'nin oluşturulan karaciğer hasar modellerinde koruyucu etkisi üzerine yapılan veriler mevcut olsa da, bu çalışma ile deneysel olarak parasetamol hepatotoksitesi oluşturulan ratlarda, AST, ALT, total antioksidan kapasite (TAS), total oksidan kapasite (TOS), tümör nekroz faktör (TNF- α), interlökün 18 (IL-18), interlökün 1 beta (IL1 β), katalaz (CAT), Glutasyon (GSH) ve Malondialdehid (MDA) seviyeleri incelenerek oluşan hasar, inflamasyon ve oksidatif stres yönünden değerlendirilmiş, aynı zamanda CAPE'nin oluşan hasara olan etkisi NAC tedavisi ile karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle yapılan çalışma, ilgili konu ile yapılan araştırmalara ve araştırmacılara katkı sağlanması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Deney Hayvanları

Araştırma Uşak Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Teknolojik Araştırma Merkezi Laboratuvarı Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından bildirilen kurallar doğrultusunda, UŞAK HADYEK, 2017/02-02 no'lu karar ile etik kurulunun onayı ile yapıldı. Hayvanların bakımı AKÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirildi.

Çalışmada 2-3 aylık 180-200 gram ağırlığına sahip sağlıklı 36 adet '*Wistar-albino*' erkek rat kullanıldı. Araştırmadan 1 hafta önce gözlem altına alınan deney hayvanlarının deney ortamına adaptasyonu sağlandı. Denekler 12 saat karanlık ortamda, 12 saat aydınlık ortamda kalacak şekilde ve her bir kafeste 6 rat olacak şekilde ayrıldı. Çalışma

süresince tüm denekler eşit ortam koşullarında tutuldu. Deneklere çalışma süreleri boyunca standart rat yemi ve su 'ad libitum' olarak verildi. Yem verme işlemi iki kere olmak üzere 09.00 ile 19.00 saatlerinde yapıldı.

Kimyasalların Uygulanması

Çalışmada parasetamol, rat başına 2 g/kg dozu 2 ml'ye tekabül edecek şekilde Phosphate buffer saline'nin (PBS) %1'lik Karboksi Metil Selüloz (CMC) çözeltisinde süspanse edilerek hazırlandı. Hazırlanan süspanسیون gastrik gavaj yardımıyla oral yoldan uygulandı. Çalışmada uygulanan parasetamol dozları, ilgili literatüre göre belirlendi (9).

Çalışmada, %0.9'luk NaCl çözeltisinde hazırlanan, 600 mg tek tablet NAC (Mentopin, Hermesarzneimittel GmbH, Münih-Almanya) gavaj yardımıyla oral yoldan verildi.

CAPE, Sigma- Aldrich den temin edildi.

Çalışmada hayvanlara ötenazi için 65 mg/kg ketamin ve 7mg/kg Ksilazin intraperitoneal (ip) olarak verildi.

Deney Gruplarının Oluşturulması

Ratlar her bir grupta rastgele seçilmiş 6 adet rat bulunmak üzere 6 gruba ayrıldı. Ratlara aşağıda belirtilen deney protokolleri uygulandı.

Grup 1: Kontrol grubu (n=6): Çalışma süresince yalnızca standart yemle ve su ile beslenen ratlardan oluşturuldu.

Grup 2: Parasetamol grubu (n=6): 2g/kg dozunda, 2 ml gavaj ile parasetamol uygulaması yapıldı.

Grup 3: Parasetamol + CAPE (n=6): 2g/kg oral parasetamol uygulaması sonrasında, 10 mikrogram/kg ip. CAPE uygulaması yapıldı.

Grup 4: Parasetamol + NAC (n=6): 140 mg/kg N-AsetilSistein oral yoldan verildikten, 1 saat sonrası 2 g/kg dozunda, 2 ml parasetamol uygulaması yapıldı.

Grup 5: CAPE (n=6): Etanolle çözündürülüp tek başına i.p. 10 mikrogram/kg CAPE uygulaması yapıldı.

Grup 6: Etanol grubu (n=6): CAPE'nin çözündürüldüğü konsantrasyonda etanol ip. olarak uygulandı.

NAC, parasetamol verildikten bir saat ve 12 saat sonra tekrarlandı.

Karaciğer Dokusu Homojenizasyonu

Karaciğer doku örnekleri, deneyden 1 saat öncesinde -80 °C'den çıkartılıp oda sıcaklığında çözündürüldü. Çözünmesi gerçekleşen örnekler öncelikle hassas terazi ile tartıldı. Tartma işlemi bittikten sonra her bir karaciğer örneklerine 5 ml pH 7.4 olan fosfat tamponu eklenerek ultra turrax doku homojenizatörü ile homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi bittikten sonra deney tüplerine alındı. 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant toplanarak biyokimyasal çalışmalar gerçekleştirildi.

Biyokimyasal Analizler

Biyokimya tüpüne (jelli antikuaglanansız tüpler) alınan kanlar 4000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj (Nüve NF 800R, Türkiye) edildi ve elde edilen serum örneği analiz yapılana kadar -80 °C'de saklandı. Analiz saatinde çözündürülen numunelerden, Uşak Üniversitesi uygulama ve araştırma hastanesi biyokimya laboratuvarında Abbott C4100 markalı entegre otoanalizör biyokimya cihazında AST ve ALT enzim aktiviteleri ölçüldü.

Elde edilen karaciğer doku örneklerinden, Rat TNF- α Elisa Kiti (SunRed Biotechnology Company, Lot numarası 201709), Rat IL-1 β Elisa Kiti (SunRed Biotechnology Company, lot no: 201709), Rat IL-18 Elisa Kiti (SunRed Biotechnology Company, lot no: 201709) kullanılarak sitokin seviyeleri ölçüldü. Yapılan analizlerde kullanılan kitler, standart sandviç enzime bağlı immün-sorbent ölçüm teknolojisine dayanmaktadır. Standartlara ve ölçülecek olan numuneler 450 nm absorbansda okutulur, sonuçlar konsantrasyon olarak hesap edilir.

Ayrıca TAS seviyeleri Rel Assay Diagnostic/Konya, (lot no: DR16069A) ve TOS Rel Assay Diagnostic/Konya, (lot no: DR160800) kitleri ile ölçüldü. TAS ölçümünün prensibi, örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalini antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır. TOS ölçümünün prensibi, örneklerin içerdiği oksidan moleküllerin ferroz iyonu ferrik iyonla kümülatif olarak oksitlemesine dayanır.

Karaciğer MDA ölçümünde Sushil (10) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı. MDA lipid peroksidasyonunun sekonder bir ürünü olup lipitlere ait peroksidasyonun belirlenmesinde kullanılan önemli bir parametredir. MDA aerobik şartlarda pH 3.4 de tiyobarbitürik asit ile 95 °C'de inkübasyonu sonucu pembe renkli bir kompleks oluşturur. Bu kompleksin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile MDA miktarı saptanmış olur.

CAT enzim seviyeleri SunRed Biotechnology Company lot no: 201802 ELISA kiti kullanılarak yapıldı, sonuçlar ng/ml olarak verildi. GSH seviyeleri, SunRed Biotechnology Company lot no: 201802 ELISA kiti kullanılarak yapıldı sonuçlar ng/ml olarak verildi, SOD ölçümleri ise, SunRed Biotechnology Company lot no: 201802 ELISA kiti kullanılarak ölçüldü sonuçlar nmol/ml olarak verildi. SOD, GSH ve CAT ölçümleri için kullanılan kitler, sandviç enzim immunoassay yöntemi kullanarak in vitro kantitatif ölçüm yapan ELISA kitleridir.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences vers. 18.0, SPSS inc, Chicago illinois, USA) programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verildi. Grup içi ve gruplar arası karşılaştırmada ANOVA ve Duncan testi kullanıldı. P<0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

24 saatlik çalışma sonunda ratlardan elde edilen karaciğer doku örneklerinden, TNF- α , IL 1 β , IL 18, TOS, TAS, düzeyleri, MDA, SOD, GSH ve CAT doku seviyeleri, serum AST ve ALT analizleri yapılmıştır. Gruplar kendi aralarında aynı zamanda kontrol grubuyla karşılaştırıldı.

Serum AST ve ALT Aktiviteleri

Tablo 1. de serum AST ve ALT enzim aktiviteleri verilmiştir, parasetamol grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı (P<0.05) olarak AST ve ALT aktiviteleri yüksek bulundu.

CAPE+ parasetamol verilen gruplar, parasetamol grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı olarak (P<0.05) aktivitelerinin düştüğü gözlemlendi. Parasetamol +NAC verilen grup, parasetamol grubu ile karşılaştırıldığında da bu grupta parasetamol grubuna göre AST ve ALT aktiviteleri anlamlı (P<0.05) bir düşüş gözlemlendi. Gözlenen düşüşün CAPE+Parasetamol grubundan daha fazla olduğu dikkat çekti. CAPE ve etanol gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir fark görülmedi.

Tablo 1. Serum AST ve ALT aktiviteleri.

Table 1. Serum AST and ALT activitys.

Grup	AST (U/L)	ALT (U/L)
Kontrol	88.42 \pm 6.07 ^a	26.32 \pm 7.02 ^{a,b}
Parasetamol	400.28 \pm 5.87 ^d	170.61 \pm 21.64 ^d
Parasetamol+ CAPE	224.42 \pm 14.10 ^c	59.85 \pm 5.11 ^c
Parasetamol+ NAC	144.42 \pm 14.17 ^b	35.58 \pm 4.59 ^{a,b}
CAPE	86.28 \pm 2.92 ^a	22.01 \pm 4.92 ^a
Etanol	93.01 \pm 11.47 ^a	27.17 \pm 8.89 ^a

(AST: Aspartat Aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, CAPE: kafeik asit fenetil esterin, NAC: N-AsetilSistein)

a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası farklılık önemlidir (P<0.05).

Doku SOD, CAT, GSH Seviyeleri

Karaciğer dokusundan elde edilen seviyeler tablo 2'de verilmiştir. Bulgularımıza göre, parasetamol grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında antioksidan seviyeleri anlamlı olarak ($P<0.05$) düştüğü, CAPE+parasetamol

uygulamasının parasetamol grubuna göre ise anlamlı ($P<0.05$) olarak arttığını görüldü.

Parasetamol+NAC verilen grup parasetamol verilen grupla karşılaştırıldığında, antioksidan seviyeleri parasetamol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. CAPE, etanol grupları kontrol grubuna göre anlamlı bir fark göstermediler.

Tablo 2. Karaciğer dokusu SOD, CAT, GSH seviyeleri.**Table 2.** The levels of SOD, CAT and GSH liver tissue.

Grup	SOD (ng/ml)	CAT (ng/ml)	GSH (nmol/ml)
Kontrol	4.01±0.014 ^a	79.21±0.62 ^a	41.19±3.60 ^a
Parasetamol	2.01±0.007 ^b	58.44±0.54 ^b	1.427±1.42 ^e
Parasetamol+CAPE	4.02±0.016 ^a	78.26±0.52 ^a	40.69±2.56 ^d
Parasetamol+NAC	3.04±0.016 ^c	67.66±2.46 ^c	27.96±5.44 ^c
CAPE	4.05±0.011 ^d	79.09±0.77 ^a	36.37±4.43 ^{a,b}
Etanol	4.05±0.027 ^d	78.62±1.05 ^a	33.90±4.71 ^b

(SOD: Süperoksit Dismutaz, CAT: Katalaz, GSH: Glutatyon, CAPE: kafeik asit fenetil esterinin, NAC: N-AsetilSistein)
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası farklılık önemlidir ($P<0.05$).

Doku TAS, TOS, MDA Seviyeleri

Karaciğer TAS, TOS, MDA seviyeleri, tablo3. de gösterilmiştir. Bulgularımıza göre, parasetamol grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığı, TOS ve MDA seviyeleri anlamlı ($P<0.05$) olarak yüksek TAS seviyeleri anlamlı olarak ($P<0.05$) düşük bulunmuştur.

CAPE+parasetamol verilen grup parasetamol grubu ile karşılaştırıldığında, MDA ve TOS seviyelerinin düştüğü, TAS seviyesinin ise yükseldiği görülmüştür. Parasetamol+NAC verilen grup, parasetamol verilen grupla karşılaştırıldığında ise CAPE+parasetamol grubuna benzer sonuçlar alınmıştır. CAPE ve Etanol gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir fark görülmemiştir.

Tablo 3. Karaciğer dokusu TAS, TOS ve MDA seviyeleri.**Table 3.** The levels of TAS, TOS and MDA in liver tissue.

Grup	TAS (mmol Trolox Ekvivalent/L)	TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Ekvivalent/L)	MDA (nmol/mg protein)
Kontrol	6.19±0.39 ^a	3.66±0.47 ^a	0.15±.034 ^a
Parasetamol	1.35±0.07 ^b	10.67±0.17 ^e	0.74±.020 ^b
Parasetamol+CAPE	4.52±0.4 ^c	5.73±0.16 ^d	0.22±.020 ^c
Parasetamol+NAC	4.38±0.02 ^c	5.51±0.03 ^d	0.21±.011 ^c
CAPE	6.17±0.05 ^a	4.84±0.08 ^b	0.23±.033 ^c
Etanol	6.18±0.09 ^a	4.41±0.28 ^c	0.22±.036 ^c

(TAS: Total antioksidan durum, TOS: total oksidan durum, MDA: Malondialdehit, CAPE: kafeik asit fenetil esterinin, NAC: N-AsetilSistein)
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası farklılık önemlidir ($P<0.05$).

Doku TNF- α , IL 1 β , IL-18 Seviyeleri

Bulgularımıza göre, TNF- α , IL-1 β , IL-18 seviyeleri parasetamol grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($P<0.05$) yüksek, parasetamol+CAPE verilen

grupta ise anlamlı olarak ($P<0.05$) yüksek olduğu görülmüştür.

CAPE+NAC verilen gruba parasetamol grubu karşılaştırıldığında, sitokin seviyelerinin anlamlı olarak ($P<0.05$) düştüğü görülmüştür.

CAPE ve etanol grupları ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır.

Tablo 4. Karaciğer dokusu TNF- α , IL-1 β ve IL-18 seviyeleri.

Table 4. The levels of TNF- α , IL-1 β and IL-18 liver tissue.

Grup	TNF- α (ng/L)	IL-1 β (ng/L)	IL-18 (ng/L)
Kontrol	328.95 \pm 31.16 ^{a,e}	2.51 \pm 0.39 ^a	43.99 \pm 1.80 ^{a,e}
Parasetamol	430.63 \pm 16.17 ^b	2.39 \pm 0.34 ^a	71.78 \pm 3.55 ^b
Parasetamol+CAPE	313.47 \pm 64.27 ^c	2.02 \pm 0.24 ^b	33.80 \pm 3.481 ^c
Parasetamol+NAC	369.08 \pm 45.70 ^d	2.03 \pm 0.24 ^b	40.78 \pm 2.93 ^d
CAPE	335.88 \pm 33.22 ^e	2.13 \pm 0.14, ^c	44.63 \pm 1.82 ^e
Etanol	329.78 \pm 35.64 ^e	2.19 \pm 0.31 ^c	37.21 \pm 2.30 ^f

(TNF- α : Tümör Nekrozis Faktör-alfa, IL-1 β : Interleukin 1 beta, IL-18: Interleukin-18, CAPE: kafeik asit fenetil esterin, NAC: N-AsetilSistein)

a.b.c: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası farklılık önemlidir ($P<0.05$)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Parasetamol (Asetaminofen), dünyada en çok tüketilen analjezik-antipiretik ajanlardan biri olup, terapötik dozlarda kullanıldığında güvenli, yüksek dozda kullanıldığında ise karaciğer nekrozu, böbrek toksisitesi ve hatta ölüme neden olduğu deney hayvanları ve insanlarda yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (1).

Aynı zamanda, parasetamol toksisitesinde gerçek bir tedavi bulunmamaktadır. Bu sebeple literatüre baktığımız zaman pek çok deneysel veya klinik alternatif tedavi yöntemlerinin denendiği görülmektedir. Parasetamol zehirlenmesinin standart tedavisi NAC'dir. NAC, amino asit L-sistein ve GSH'nın her ikisinin asetilenmiş bir prekürsörüdür ve yıllardır parasetamol aşırı alımlarına bağlı toksisitenin önlenmesi için bir antidot olarak kullanılmıştır. Günümüzde hayvan ve insan çalışmalarıyla NAC'ın güçlü bir antioksidan olduğu gösterilmiş ve serbest radikaller ve oksidan hasarla karakterize çeşitli hastalıkların tedavisinde potansiyel terapötik ajan olarak kullanılmıştır (11).

Oksidatif stresin parasetamol toksisitesinde önemli rol oynadığı kabul edilip, parasetamolün reaktif ara ürünü olan N-asetil-p-benzokinonimin (NAPQI) oksidasyonundaki artışı, süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumlarında artışa sebep olmaktadır. NPAQI'ın karaciğerde hasar

oluşturabilmesi için parasetamolün yüksek dozlarda alınması gerekir. Bu reaktif ürünün GSH depolarını tamamen tüketmesinden dolayı karaciğer hasarına neden olduğu bilinmektedir (12).

Yapılan çalışmada, literatürde yapılan araştırmalarla antioksidan sistemi ve temel metabolik parametreleri olumlu yönde desteklediği düşünülen, CAPE nin parasetamolün neden olduğu karaciğer hasarına olası koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Kaynaklardaki veriler göz önüne alındığında parasetamolün 750 mg/kg, 1, 2 ve 3 g/kg dozlarının uygulamasında benzer hasarların meydana geldiği fakat şiddetlerinin farklı ölçülerde olduğu tespit edilmiştir. Önceki yapılan çalışmalarda fareler üzerinde yapılan birçok deneysel işlemlerde parasetamolün 300 mg/kg ve bunun üzerindeki dozlarda kullanılmasıyla birlikte akut karaciğer nekrozuna şiddetli olarak etkisini gösterdiği tespit edilmiştir (13,14).

Parasetamol ya da başka toksik madde ile oluşturulan karaciğer hasarı, karaciğer fonksiyonunu ölçmek için biyokimyasal (ALT) ve (AST) enzimlerinin oluşturduğu seviyeler, karaciğer dokusundaki en önemli belirteçlerdendir. ALT ve AST hepatosellüler hasar ya da nekroza bağlı olarak artmaktadır.

Vücudun antioksidan savunma sistemi ile serbest radikaller arasındaki dengenin oksidanlar

lehine kayması durumuna oksidatif stres denilmektedir (13). Oksidatif stres, hücre membranı ve diğer hücre bileşenlerinin değişimiyle sonuçlanan lipidlerin ve diğer makromoleküllerin oksidatif tahribatına yol açarak, hücrenin nekroz ve ölümüne dolayısıyla doku hasarına ve kronik hastalıklara sebep olmaktadır (13). Aynı zamanda birçok farklı hastalık için kullanılan ilaçların vücutta birikimi sonucunda da serbest radikal oluşmaktadır. Serbest radikallerin oluşumu, parasetamol toksisitesinde artarak doymamış yağ asitlerinin yıkılmasına yol açar ve hücrede hasara neden olur (13,14,15). Yapılan araştırmalarda parasetamol indüklü karaciğer hasarı sonucu, reaktif oksijen ürünlerinin düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek, antioksidan enzimlerin düzeylerinin ise düşük bulunduğu belirtilmiştir (15).

Ratlarda parasetamol ile hepatotoksosite oluşturulan çalışmalarda, toksikasyon grubunun kontrol grubu ile karşılaştırılmasında MDA düzeyinde artma söz konusu olmuştur (16,17). Parasetamolle toksik hepatit oluşturulmuş ratlarda plazma MDA düzeyi kontrol grubuna göre artış gösterirken karaciğer MDA düzeyi önemli oranda artış göstermiştir (17).

Ayrıca yapılan başka çalışmalarda da parasetamol toksikasyonu sonucunda meydana gelen karaciğer hasarı sonucu CAT ve SOD düzeyleri incelenmiş, Domitrovich ve ark. (18)'na göre toksisite oluşturulan grup, kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman serum SOD düzeyinde önemli derecede artış tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular sonucunda, toksikasyon sebebiyle serbest radikal artışına bağlı gelişen antioksidan savunma sistemindeki artışa bağlı olarak antioksidan enzim seviyelerinin arttığını düşündürmektedir. Bu çalışmada, parasetamol grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, SOD seviyeleri parasetamol grubunda anlamlı olarak düşük bulunmuştur, elde edilen veriler bize oksidatif stres sonucu varlığında antioksidan seviyelerinin azalmış olabileceğini düşündürmektedir.

Bir başka parasetamol uygulanan çalışmada, hepatotoksosite oluşturulan gruplarda kontrol

grubuyla karşılaştırıldığında CAT aktivitesinin düştüğü tespit edilmiştir (16). Bulgular, sunulan bu çalışmanın bulgularıyla uyumludur.

Parasetamol toksisitesine bağlı meydana gelen karaciğer hasarında, oksidatif stres oluşumu gözlenirken aynı zamanda serum sitokinlerinin ve özellikle TNF- α 'nın da önemli olduğu yapılan son çalışmalarda tespit edilmiştir. TNF- α genellikle karaciğerdeki makrofajlardan üretilen proinflamatuvar sitokin özelliğine sahiptir. Sistemik toksisitenin ve karaciğer hasarının primer mediatörüdür ve karaciğer hasarının birçok tipinde TNF- α 'nın önemi bilinmektedir (19).

Parasetamol indüklü hepatotoksosite modelinde kontrol grubunda oksidatif stres parametrelerinin ve sitokin seviyelerinin istatistiksel olarak arttığı, CAPE verilen gruplar ile parasetamol grubu karşılaştırıldığında CAPE'nin meydana gelen inflamasyon ve oksidatif strese karşı koruyucu bir etki gösterdiği gözlenmiştir. Karaciğer hasarında erken ortaya çıkan TNF-alfa diğer inflamatuvar sitokinlerin yapımını da tetiklemektedir.

İlaç ile oluşturulan hepatotoksitede üretilen TNF- α , IL- β gibi çeşitli inflamatuvar sitokinlerin doku hasarının hızlanmasında etkili oldukları ispatlanmıştır (20,21).

TNF α hem hepatositler için mitojenik olup karaciğer hasarındaki onarımda ve kısmi hepatektomiye takiben rejenerasyonda görev alır hem de aşırı inflamatuvar cevabı indükleyerek hücre hasarına sebep olabilir (22).

Teng ve arkadaşlarının (23) yaptığı çalışmada *Tournefortia sarmentosa* adlı maddenin parasetamol toksisitesine bağlı gelişen hepatotoksosite üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada parasetamol toksisitesi oluşturulan gruptaki TNF- α düzeyleri sağlıklı gruba göre anlamlı derecede artmıştır. *Tournefortia sarmentosa* ile tedavi edilen gruplarda ölçülen TNF- α düzeyleri toksisite grubuna kıyasla anlamlı düşük bulunmuş. Yan-Ling Wu ve arkadaşlarının (24) yaptığı çalışmada farelerde parasetamol ile toksisite

oluşturulmuş ve parasetamol verilen gruplarda TNF- α seviyesinin yükseldiği tespit edilirken acanthoic acid verilen grupta belirgin düşük olduğu tespit edilmiş. Sheng-Lei Yan ve arkadaşlarının (25) yaptığı çalışma bütün diğer çalışmaları destekler nitelikte olup karaciğer toksisitesi oluştuğunda TNF- α seviyesinin yükseldiği ve uygulanan tedavinin başarısına göre toksisite azaldıkça TNF- α seviyesinin azaldığı gözlenmiştir.

Başka bir çalışmada, Yan-Ling Wu ve arkadaşları, fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada parasetamol ile toksisite oluşturulmuş ve TNF- α seviyesinin arttığını göstermişlerdir (26). Sunulan bu çalışmada parasetamol ile karaciğer toksisitesinde TNF- α 'nın önemli bir şekilde arttığını gözlemlendi ve literatürle uyumlu olduğu tespit edildi.

Çalışmanın sonunda, parasetamol verilen grupta, AST ve ALT enzimlerinin kontrol grubuna göre anlamlı artışı, parasetamolün karaciğer hepatotoksikasyonu oluşturması bakımından literatürle uyumludur. Aynı zamanda, parasetamol kaynaklı karaciğer hasarı sonrasında serbest radikallerin seviyelerinin arttığı, antioksidanların ve antioksidan kapasitenin azaldığı görülmüştür, buna bağlı olarak oluşan oksidatif stres aracılığı ile parasetamolün karaciğerde hasar meydana getirdiği düşünülebilir, bununla birlikte inflamatuvar belirteçlerin düzeylerindeki artış, parasetamolün oluşturduğu inflamasyonu ortaya koymuştur. Oluşan hasara karşı ise CAPE'nin parasetamol kaynaklı hepatotoksisiteye neden olduğu düşünülen oksidatif stres ve inflamasyona karşı koruyucu bir rol oynayabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Yapılan çalışmanın en önemli verilerinden birisi CAPE'nin parasetamol kaynaklı oluşan karaciğer hasarına karşı koruyucu bir etki göstermesidir.

Elde edilen veriler ışığında, CAPE'nin karaciğer hasarına neden olan durumlarda hepatositlerdeki hasarın önlenmesi veya azaltılması açısından tedavide kullanılabilecek bir alternatif olabileceğini akla getirmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmadan elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, CAPE'nin hem yetişkin hem de çocukluk döneminde sık rastlanılan ve toplum sağlığını tehdit eden ilaç veya kimyasal madde zehirlenmesi sonucu oluşan karaciğer toksisitesini ve buna bağlı olarak gelişen komplikasyonların önlenmesinde yeni bir terapötik ajan olarak değerlendirilebileceği sonucuna varıldı.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Emet M., 2016. Asetaminofen (Parasetamol) Zehirlenmesi. Türkiye Klin J Emerg Med Top, 2, 51-57.
2. Jack A., Hinson Dean W., Roberts Laura P., 2010. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. Handb Exp Pharmacol, 196, 369-405.
3. Mohammed A., Almansori Hassan I., Alhammadi Fahad A., 2015. Paracetamol overdose: Analysis of a sample from a tertiary hospital in Eastern Saudi Arabia. Saudi J Med Sci, 3, 209-212.
4. Licata A., 2016. Adverse drug reactions and organ damage: The liver. Eur J Intern Med, 28, 9-16.
5. Hepşen F., Tdlgen F., Er H., 1996. Propolis: Tıbbi özellikleri ve oftalmolojik kullanımı. Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi, 3, 386-391.
6. Azza H., Sobhy E., Asmaa E., Ahmed A., 2016. Effect of bee venom or propolis on molecular and parasitological aspects of Schistosoma mansoni infected mice. J Parasit Dis, 40, 390-400.
7. Ümit G., Cihan T., İzzet S., Bugra C., Mustafa O., Tayfun G., Engin D., 2017. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. Int J Morphol, 35, 141-147.
8. Laura C., Marco B., Jianbo X., Bruno B., 2017. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. Front

- Pharmacol, 8, 412-419.
9. Uzkeser M., Karakus E., Albayrak A., Kiki İ., Bayir Y., Cadirci E., Unal D., Halici Z., Karadeniz A., 2012. Protective effect of panax ginseng against N-acetyl-pamino-phenol-induced hepatotoxicity in rats. *Afr J Pharm*, 6, 2634-2642.
 10. Sushil JK., 1986. Membran lipid peroxidation in erythrocytes of the newborn. *Cli Chi Acta*, 161, 301-306.
 11. Mun Chiang C., James P., 2016. Pharmacological targeting of the HIF hydroxylases – a new field in medicine development. *Mol Aspects Med*, 47, 54-75.
 12. Halliwell B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 35, 1147-1150.
 13. Douidar SM., Boor PJ., Ahmed AE., 1985. Potentiation of the hepatotoxic effect of acetaminophen by prior administration of salicylate. *J Pharmacol Exp Ther*, 233, 242-248.
 14. Mohammed M., Gulrana K., Mohammad F., Sohail H., Mohammad AS, 2016. Cadmium-induced nephrotoxicity via oxidative stress in male Wistar rats and capsaicin protects its toxicity. *Bull Env Pharmacol Life Sci*, 5, 05-11.
 15. Hoi-Shan W., Pratiksha A., Vojtech M., Pierre-Axel M., Martin D., 2017. Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions. *J Biol Chem*, 292, 16804-16809.
 16. Parmar SR., Vashrambhai PH., Kalia K., 2010. Hepatoprotective activity of some plants extract against paracetamol induced hepatotoxicity in rats. *J Herb Med*, 4, 101-106.
 17. Naguib YM., Azmy RM., Samaka RM., Salem MF., 2014. *Pleurotus ostreatus* opposes mitochondrial dysfunction and oxidative stress in acetaminophen-induced hepato-renal injury. *BMC Complement Altern Med*, 14, 494.
 18. Domitrovic R., Jakovac H., Rahelic D., Romc Z., Tadic Z., 2010. Antifibrotic activity of taraxacum officinale root in carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *J Ethnopharmacol*, 130, 569-577.
 19. Malhi H., Gores GJ., Lemasters JJ., 2006. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology*, 43, 31-44.
 20. Yuan Mohamed A., Richard D., Salminen L., Mendrick Y., 2017. Proteomic analysis of acetaminophen-induced hepatotoxicity and identification of heme oxygenase 1 as a potential plasma biomarker of liver injury. *Proteomics Clin Appl*, 11, 1600123.
 21. Chularojmontri L, Wattanapitayakul SK., Herunsalee A., Charuchongkolwongse S., Niumsakul S., Srichairat S., 2005. Antioxidative and cardioprotective effects of *Phyllanthus urinaria* L. on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biol Pharm Bull*, 28, 1165-1171.
 22. Luster MI., Simeonova PP., Gallucci RM., Bruccoleri A., Blazka ME., Yuceosoy B., Matheson JM., 2009. The role of tumor necrosis factor alpha in chemical-induced hepatotoxicity. *Ann N Y Acad Sci*, 919, 214-20.
 23. Teng CY., Lai YL., Huang HI., Hsu WH., Yang CC., Kuo WH., 2012. *Tournefortia sarmentosa* extract attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Pharm Biol*, 50, 291-396.
 24. Wu YL., Jiang YZ., Jin XJ., Lian LH., Piao JY., Wan Y., Jin HR., Joon Lee J., Nan JX., 2010. Acanthoic acid, a diterpene in *Acanthopanax koreanum*, protects acetaminophen-induced hepatic toxicity in mice. *Phytomedicine*, 17, 475-479.
 25. Yan SL, Wu ST, Yin MC, Chen HT, Chen HC. 2009. Protective effects from carnosine and histidine on acetaminophen-induced liver injury. *Journal of food science*, 74, 259-260.
 26. Wu YL., Jiang YZ., Jin XJ., Lian LH., Piao JY., Wan Y., Jin HR., Joon LJ., Nan JX., 2010. Acanthoic acid, a diterpene in *Acanthopanax koreanum*, protects acetaminophen-induced hepatic toxicity in mice. *Phytomedicine*, 17, 475-479.