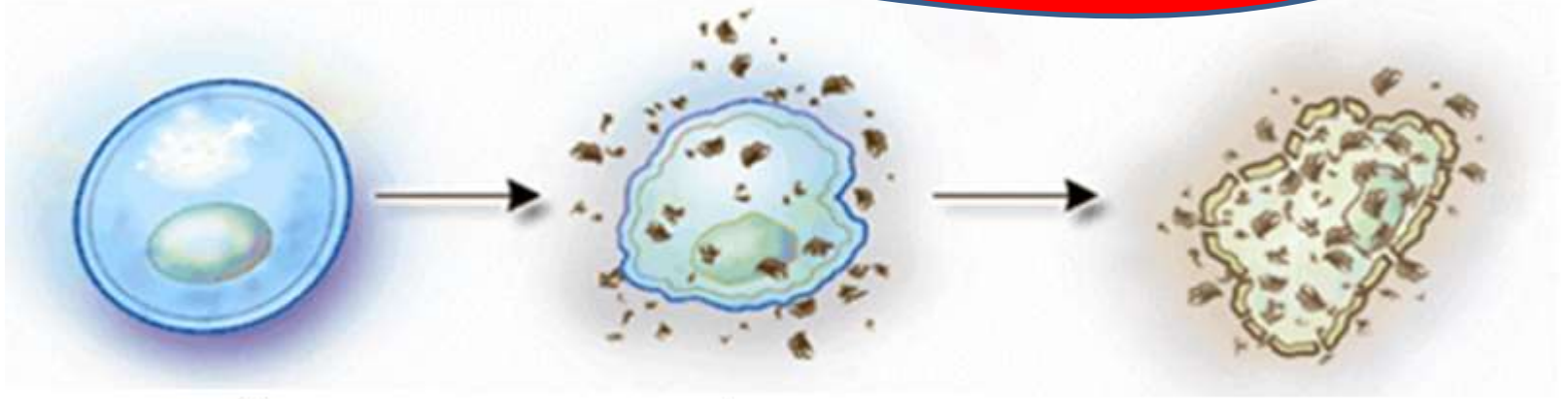


RATLARDA OKSİDATİF STRES ÜZERİNE N-ASETİLSİSTEİN'İN ETKİSİ

ELİF DELİBAŞ , K. KÖSE , C. YAZICI , *K. DENİZ

Erciyes Üniversitesi Tıbbi Biyokimya ve *Tıbbi Patoloji
Anabilim Dalları, Kayseri

OKSİDATİF STRES



NORMAL HÜCRE

SERBEST RADİKAL SALDIRISI

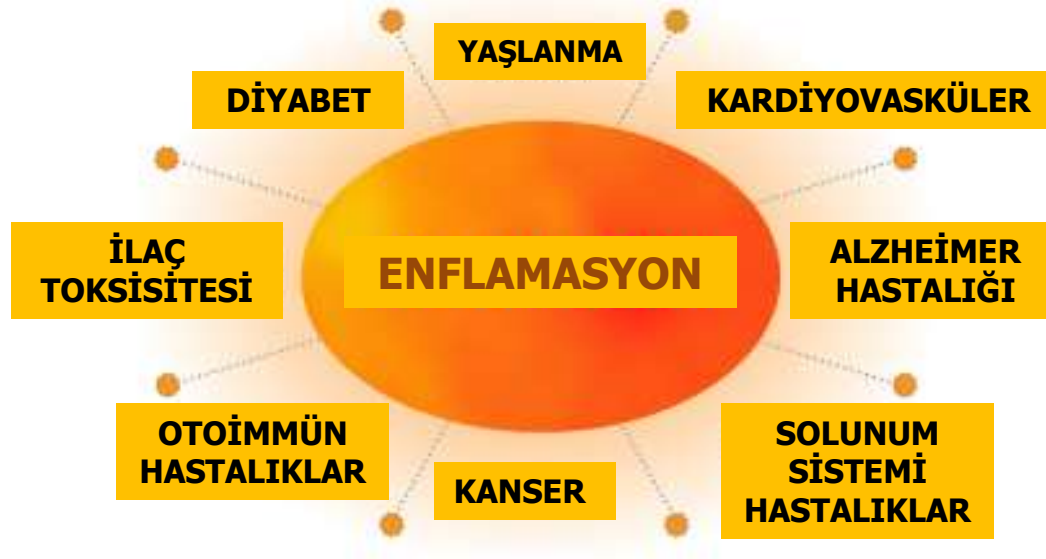
OKSİDATİF STRES

BİYOMOLEKÜLLER

MEMBRANLAR

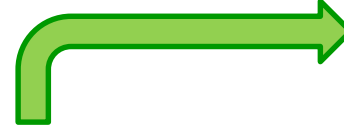
DOKULAR

OKSİDATİF STRES



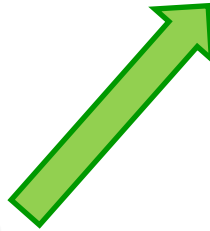
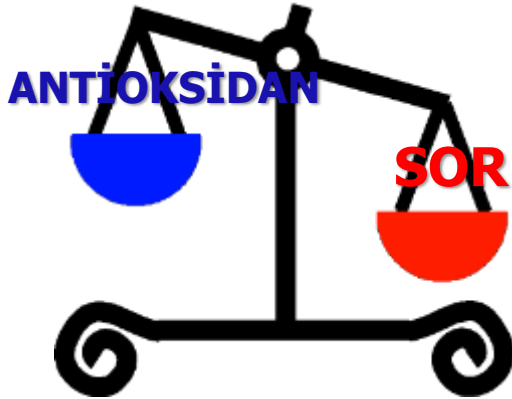


**TOKSİSİTE
OKSİDATİF STRES**



**OKSİDATİF
HASAR**

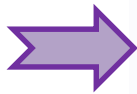
**OKSİDATİF
STRES**



HEPATOTOKSİSİTE MODELİ

- **CCl₄, etanol**
- **Kadmiyum, demir**
- **Metotreksat , siklosporin A (CsA)**

CCl₄



- ✓ **Saf**
- ✓ **Modifikasyona uyumlu**
 - **Doz**
 - **Süre**
 - **Uygulama yolu**
 - **Dilüsyon oranı**

✓ *in vivo* – *in vitro* toksikoloji çalışmalarında ideal ajan

HEPATOTOKSİSİTE MODELİ

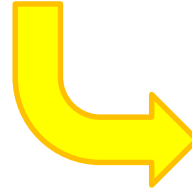


**CCl₄ aracılı
toksisite için;**



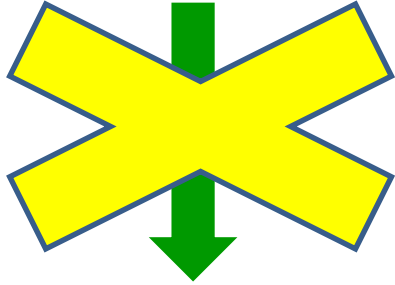
RATLAR

- ✓ iyi standardize edilen
- ✓ tekrarlanabilirliği yüksek bir deney modeli



ANTIÖKSİDAN

SOR ↑



OKSİDATİF STRES ↓
TİYOL KAYBI ↓

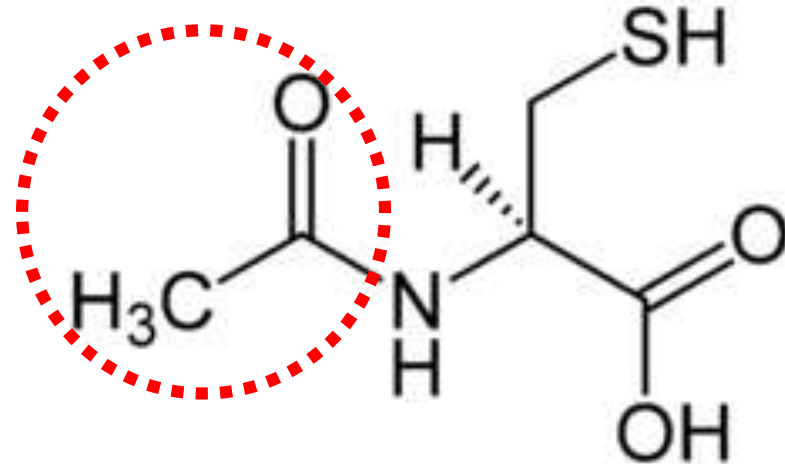
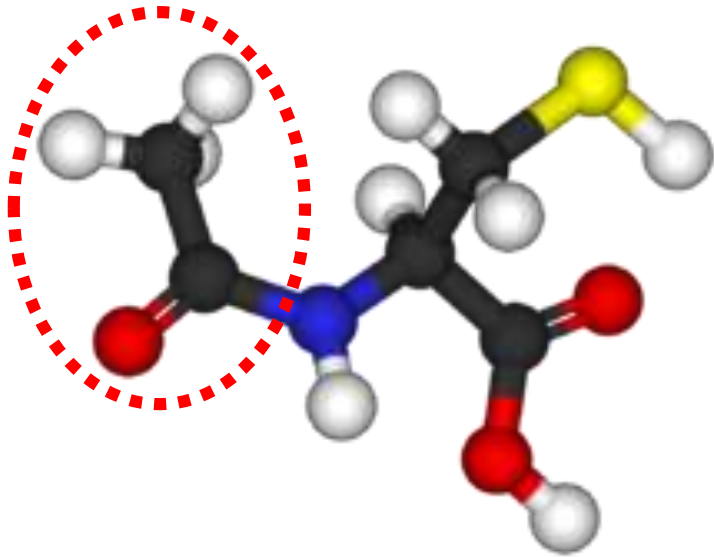


HÜCRE HASARI ↓



✓ **FARMAKOLOJİK AJAN KULLANIMI**

N-ASETİLSİSTEİN (NAC)



(*R*)-2-asetamido-3-sülfanilpropanoik asit

Formül: $C_5H_9NO_3S$

Molekül ağırlığı: 163,2 g/mol



N-ASETİLSİSTEİN

Mukolitik ajan

Detoksifikasyon ajanı

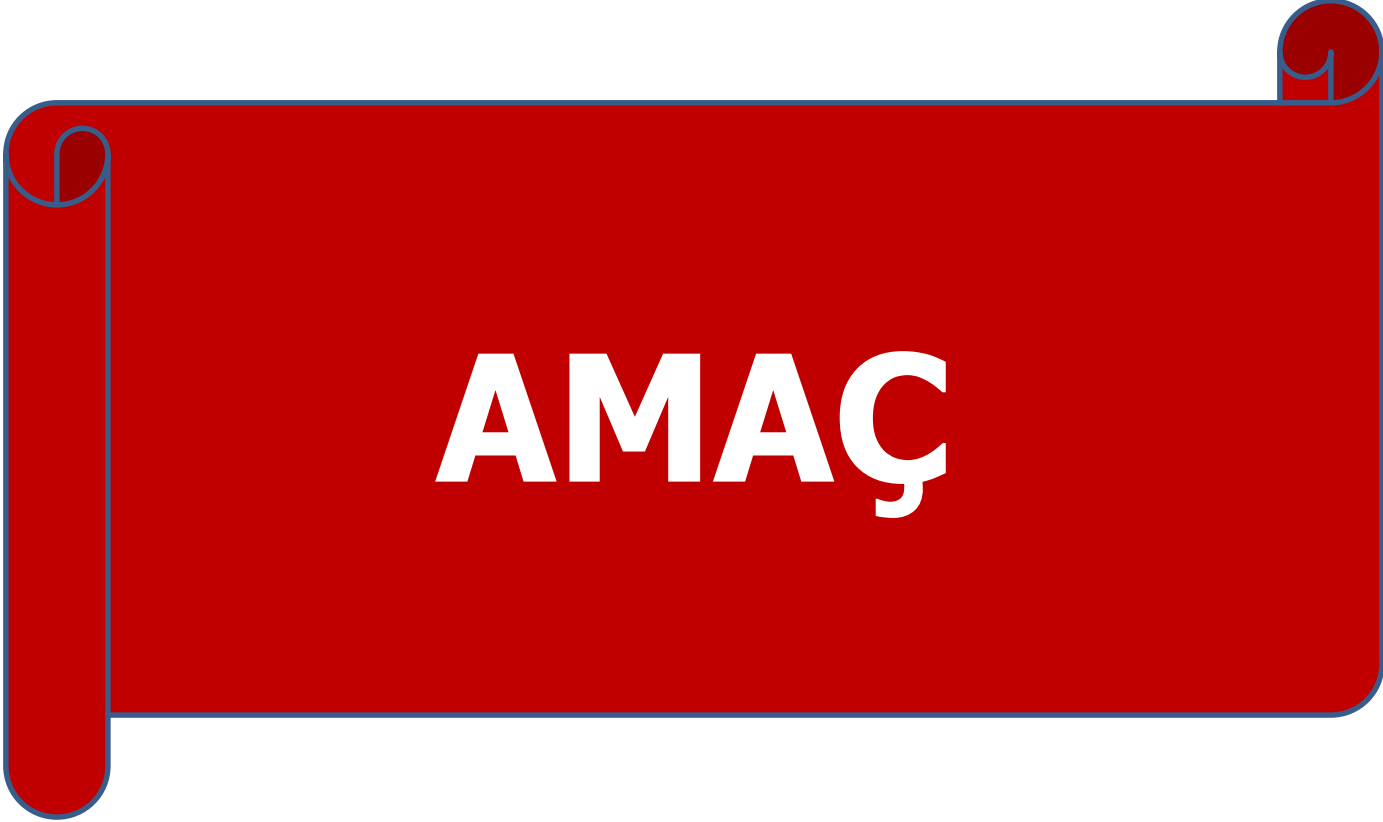
Glutasyon prekürsörü

Antioksidan

Asetaminofen antidotu

Ağır metal şelatörü



A red scroll graphic with a blue outline, featuring a vertical strip on the left and a horizontal strip on the right, both with rounded ends and a small circular detail at the top right corner.

AMAÇ

AMAÇ



CCl_4
toksisitesi



Oksidatif stres
modeli



Hepatotoksisite

LİPİD/PROTEİN
OKSİDASYONU

?

NAC

A red scroll graphic with a blue outline, featuring a vertical strip on the left and a horizontal strip on the right, both with rounded ends and a small circular detail at the top right corner.

ÇALIŞMA GRUPLARI

Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)

- *Wistar albino,*
- 90-120 günlük,
- 250-300 g,
- 40 erkek rat



- 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü
- Normal oda sıcaklığı ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$) ve nemi
- Standart pellet yem ve musluk suyu

ÇALIŞMA GRUPLARI

Her biri 10 rat içeren dört grup

Kontrol grubu

CCl₄

NAC

CCl₄-NAC



Kontrol grubu

SF/zeytinyağı
1.0 mL/1,0 mL ,*ip*, tek doz

CCl₄

CCl₄, CCl₄-NAC gruplarındaki ratlara,
1.0 mL/kg rat ağırlığı,*ip*, tek doz
Çözücü: zeytin yağı

NAC

NAC; CCl₄-NAC gruplarındaki ratlara,
200 mg/kg rat ağırlığı/gün,*ip*, üç doz
Çözücü: Serum fizyolojik



MATERYAL



Kan, abdominal aortadan
**antikoagülanlı (heparin) ve
düz tüplere alındı**

KC,
•Histolojik inceleme



MATERYAL



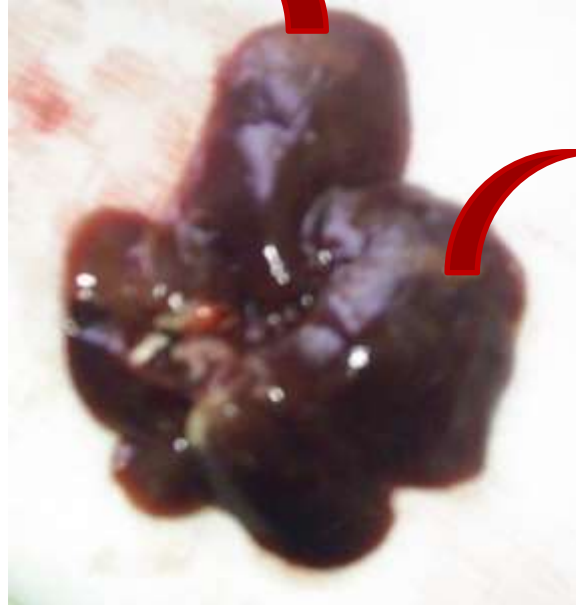
Serum → **Rutin analizler**

Plazma → **Biyokimyasal çalışma**
➤ **alıklar**



• **Histolojik inceleme**

- **%10'luk formalin**
- **24 saat fiksasyon**
- **Erciyes Üniv. Patoloji AD**



• **Biyokimyasal çalışma**
➤ **alıklar**



YÖNTEM

YÖNTEM

- **Rutin Analiz**
- **Histopatolojik
inceleme**
- **Biyokimyasal
çalışma**



Rutin Analiz

- Alanin aminotransferaz (ALT)
- Aspartat aminotransferaz (AST)
- Laktat dehidrogenaz (LDH)
- Albümin

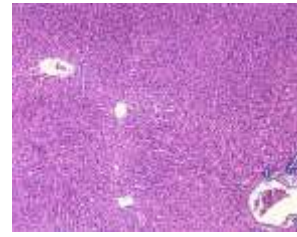
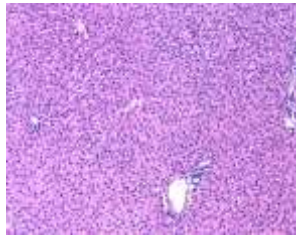
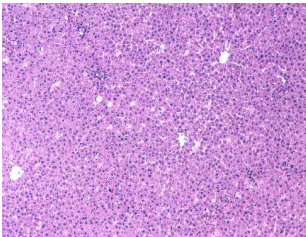
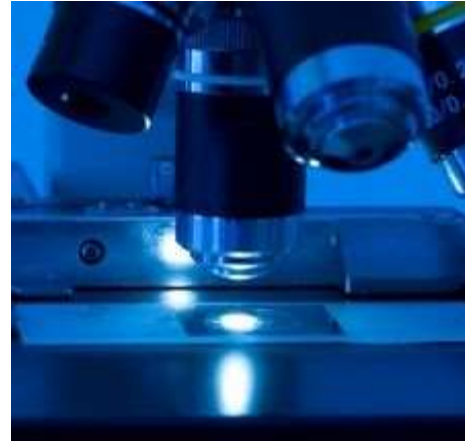
**Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Merkez
Laboratuvarı**



Histopatolojik inceleme

Erciyes Üniv. Tıp Fakültesi Hastaneleri Patoloji AD

- **Doku takip cihazı**
- **Mikrotom** →
- **Hematoksilen-Eozin boyama**
- **Işık mikroskobu**
- **Mikro fotoğrafları**



BİYOKİMYASAL ÇALIŞMA

Parametre	Materyal	Kaynak
Pirrolize Protein (nmol/mg protein)	Serum	Hidalgo ve ark
Total Lipid Hidroperoksit (μ mol/L)	Heparinli plazma	Nourooz-Zadeh

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

- **"SPSS 16.0 for Windows"**
- **ANOVA ve post-ANOVA
(Scheffe prosedür)**
- **Regresyon analizleri**

Tüm istatistiki karşılaştırmalarda, anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi

A red scroll graphic with a blue outline, featuring a vertical strip on the left and a horizontal strip on the right, both with rounded ends and a small blue circle at the top. The text is centered on the horizontal strip.

BULGULAR ve TARTIŞMA

CCl₄ dozu ve HEPATOTOKSİSİTE MODELİ

LİTERATÜR

CCl₄

```
graph TD; CCl4[CCl4] --> D1[tek doz  
ardışık 2-7 gün  
haftanın 3 günü  
bir ay  
elli gün, haftada 2 doz]; CCl4 --> D2[Doz miktarı;  
0,8 mL/kg -  
10mL/kg]; CCl4 --> D3[Uygulama şekli;  
intragastrik sonda  
ip  
sc]; CCl4 --> D4[Çözücü;  
zeytin yağı  
ayçiçek yağı  
mısırözü yağı]
```

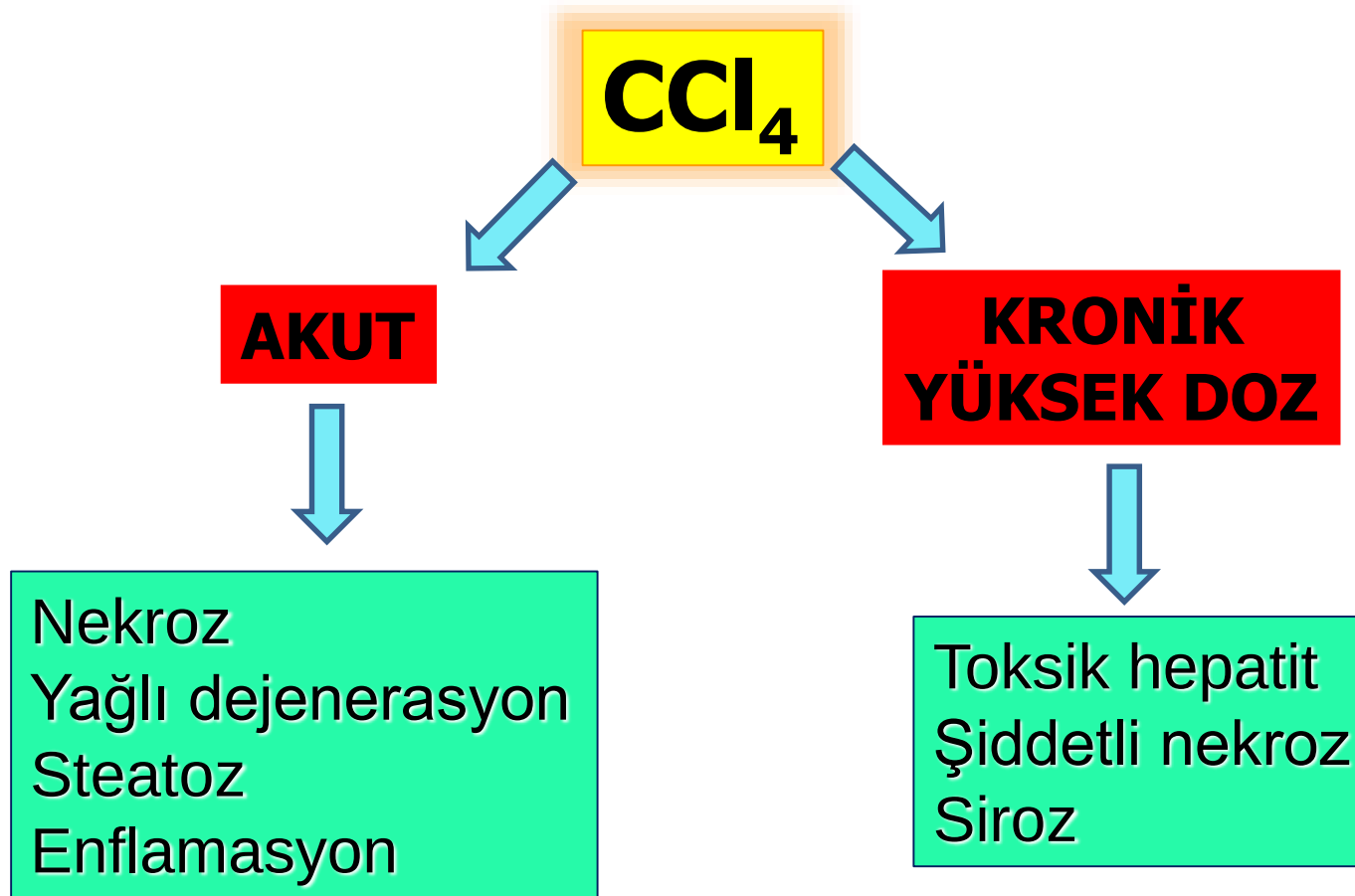
tek doz
ardışık 2-7 gün
haftanın 3 günü
bir ay
elli gün, haftada 2 doz

Doz miktarı;
0,8 mL/kg -
10mL/kg

Uygulama şekli;
intragastrik sonda
ip
sc

Çözücü;
zeytin yağı
ayçiçek yağı
mısırözü yağı

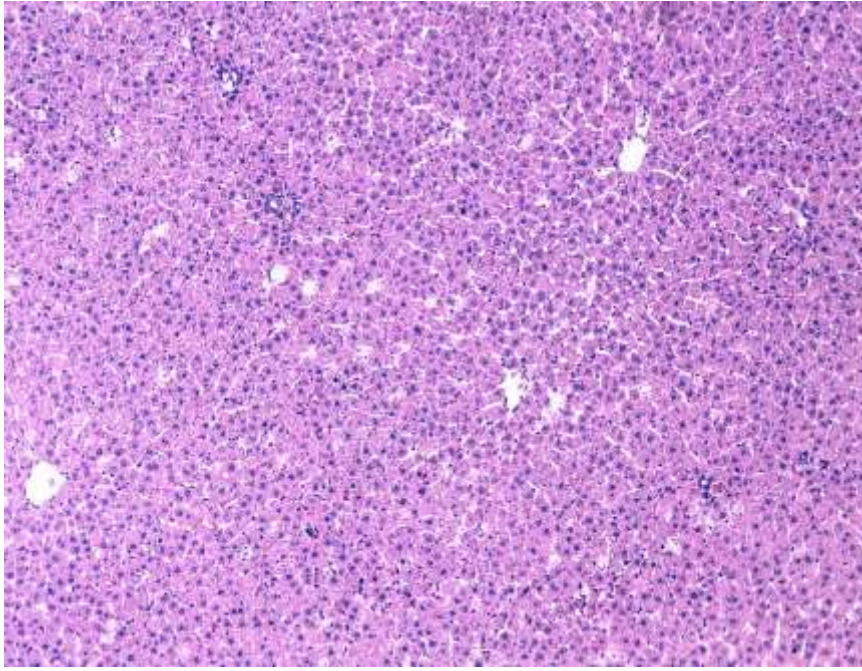
CCl₄ ve KC HİSTOPATOLOJİSİ



CCl₄ HASARI ve HİSTOPATOLOJİ

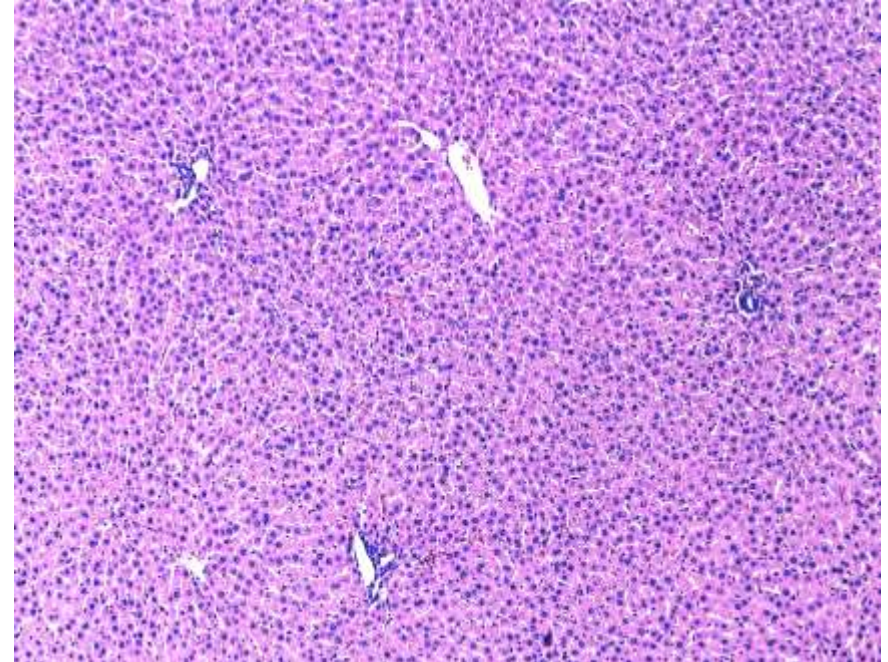
KARACİĞER DOKUSU

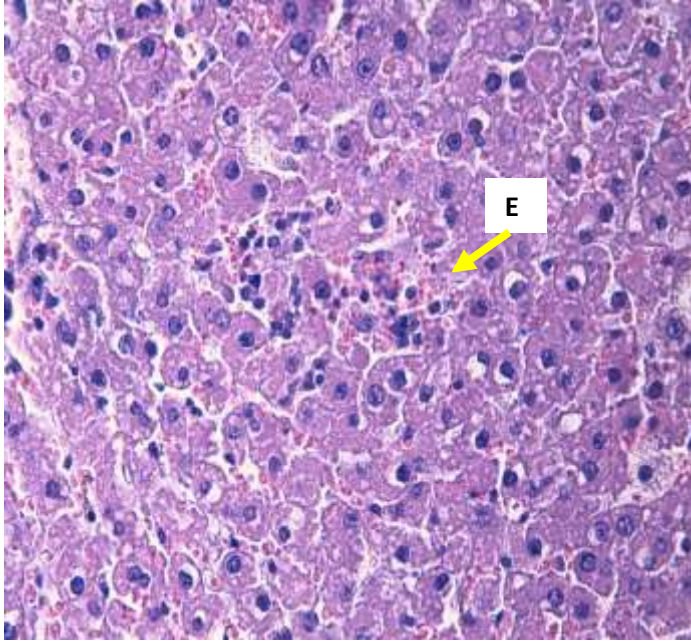
LİTERATÜR	nekroz	steatoz	enflamasyon	balonlaşma
Lu ve ark (2002)	↑	↑	↑	↑
Yang ve ark (2008)	↑	↑	↑	-
Abdel-Wahhab El-Deen ve ark (2011)	↑	↑	↑	↑
Bu çalışma	↑	↑	↑	-



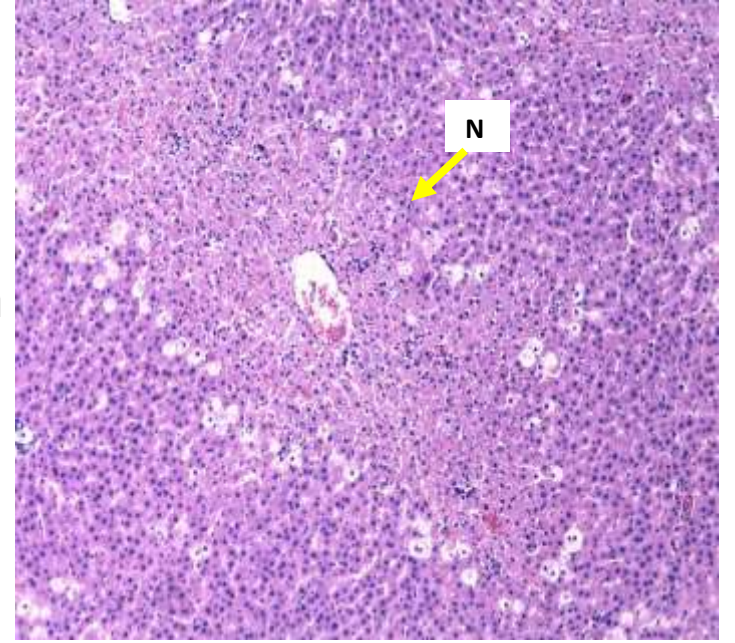
Kontrol Grubu
KC Dokusunun Histolojik
Görünümü
(HEx100)

NAC Grubu
KC Dokusunun Histolojik
Görünümü
(HEx100)

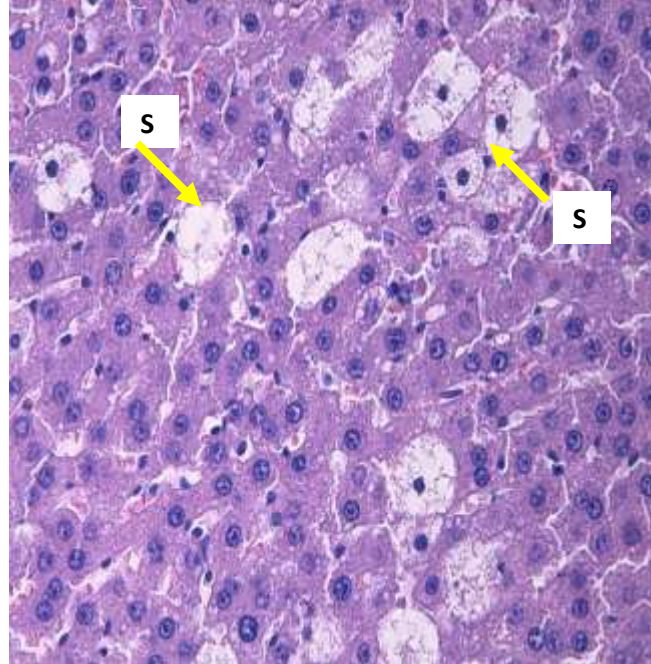




CCl₄ Grubu
KC Dokusunda
Steatoz (S)
Görünümü
(HEx400)

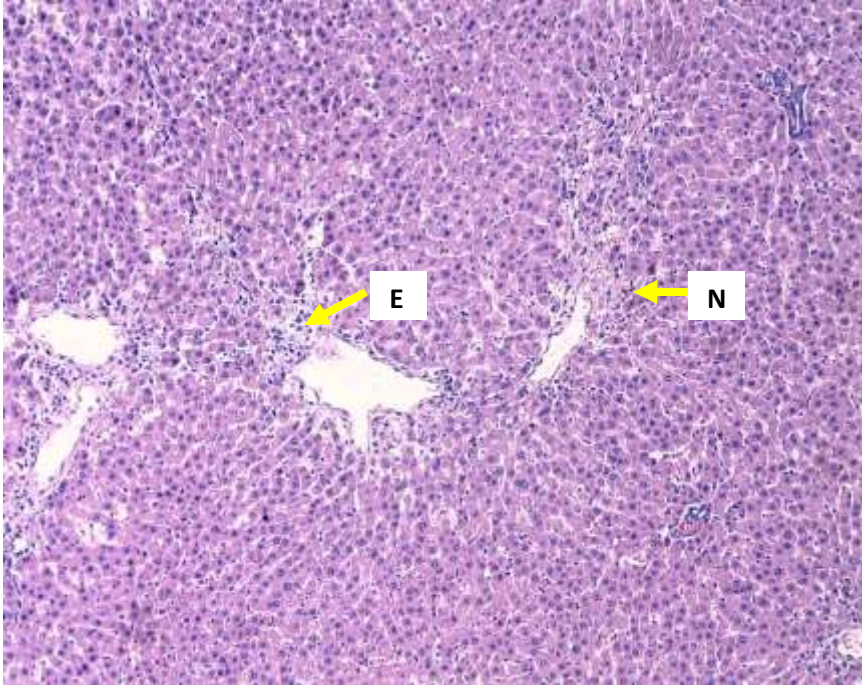


CCl₄ Grubu
KC Dokusunda
Nekroz (N)
Görünümü
(HEx100)



CCl₄ Grubu
KC Dokusunda
Enflamasyon (E)
Görünümü
(HEx400)





CCl₄ –NAC Grubu
KC Dokusunun Histolojik
Görünümü
(HEx100)
N: Nekroz, E: Enflamasyon

SKORLAMA TABLOSU

	Yok	Hafif	Orta	Şiddetli
Enflamasyon	0	1	2	3
Steatoz	0	1	2	3
Nekroz	0	1	2	3

Enflamasyon için:

0→ hasar yok;

1,2 ve 3→ hafif , orta ve şiddetli enflamasyon

Steatoz için:

0→ hasar yok;

1→ parankimin % 0-33'ünü tutan steatoz

2→ parankimin % 33-66'sını tutan steatoz

3→ parankimin % 66-100'ünü tutan steatoz

Nekroz için:

0→ hasar yok;

1→ zon 3'te fokal nekroz

2→ zon 3'te konflüent nekroz

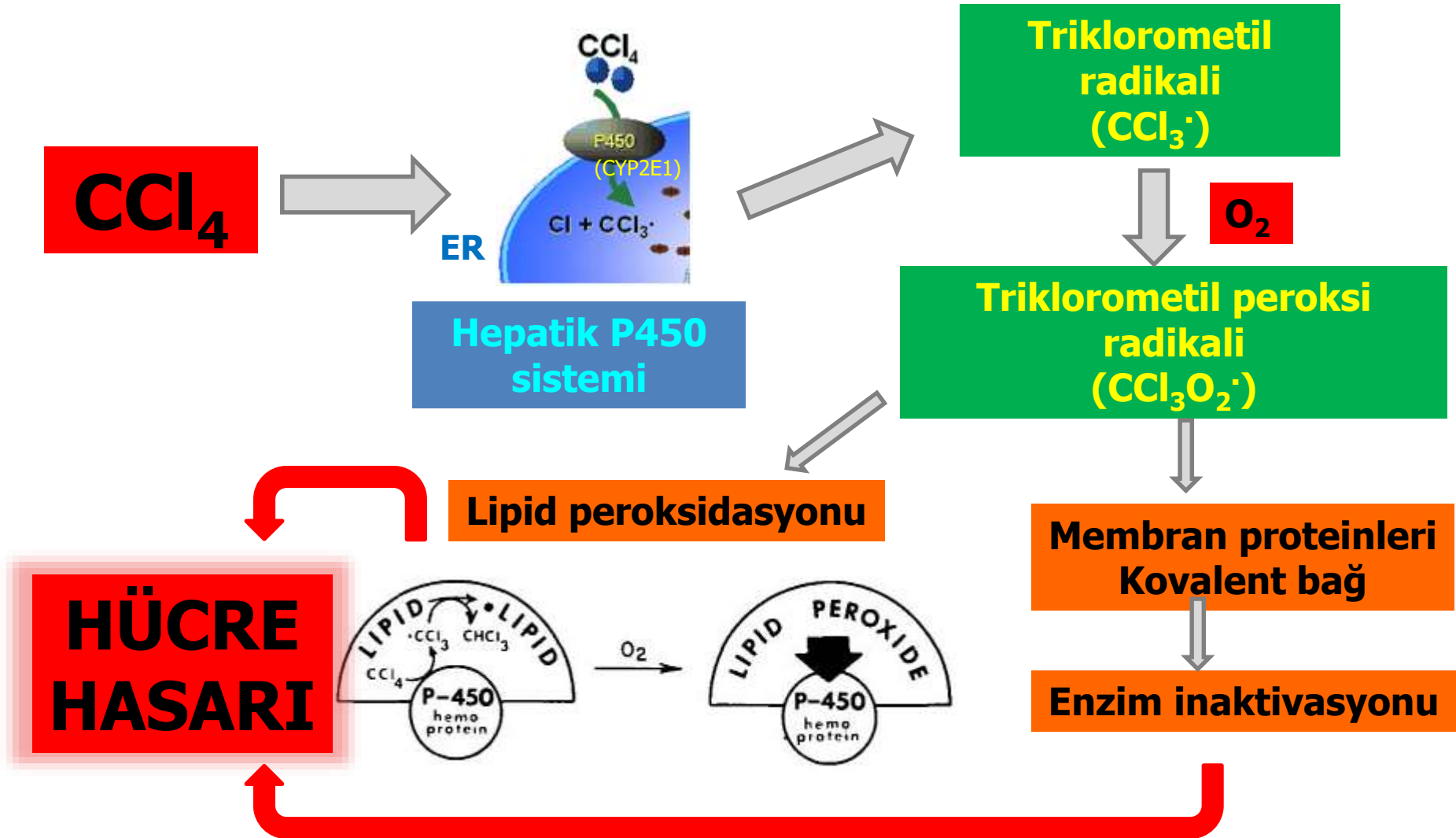
3→ massif nekroz

Kontrol, CCl₄ ve/veya NAC Kombinasyonlarının KC Dokusu Üzerindeki Etkileri

Histopatolojik bulgular					
GRUPLAR	n	Steatoz	Enflamasyon	Nekroz	Toplam skor
Kontrol	10	0	0	0	0
NAC	10	0	0	0	0
CCl ₄	10	1,5 ± 0,71*	2,6 ± 0,52*	2,7 ± 0,48*	6,8 ± 1,1*
CCl ₄ -NAC	10	0 ^c	1,0 ± 0,82*, ^c	1,2 ± 0,92*, ^c	2,2 ± 1,7*, ^c

FARK YOK. TOKSİK DEĞİL.

CCl₄ METABOLİZMASI ve SOR



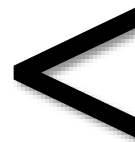
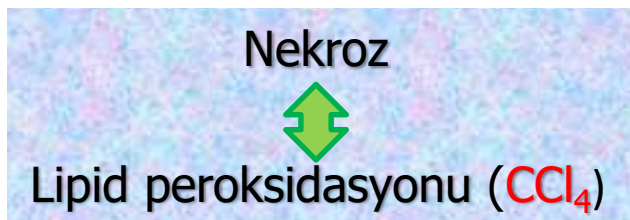
CCl₄ ile oksidatif stres oluşturulan hayvan modelleri

Díaz Gómez ve ark (1975)

CCl₄'ün hücre komponentlerine kovalent bağlanma özelliği,

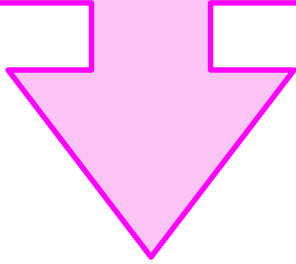


CCl₄ ile indüklenen lipid peroksidasyonunun şiddeti,



CCl₄ aracılı OKSİDATİF STRES

- **KISA YARI ÖMÜR**
- **DÜŞÜK STABİLİTE**
- **DÜŞÜK SPESİFİTE**



MDA

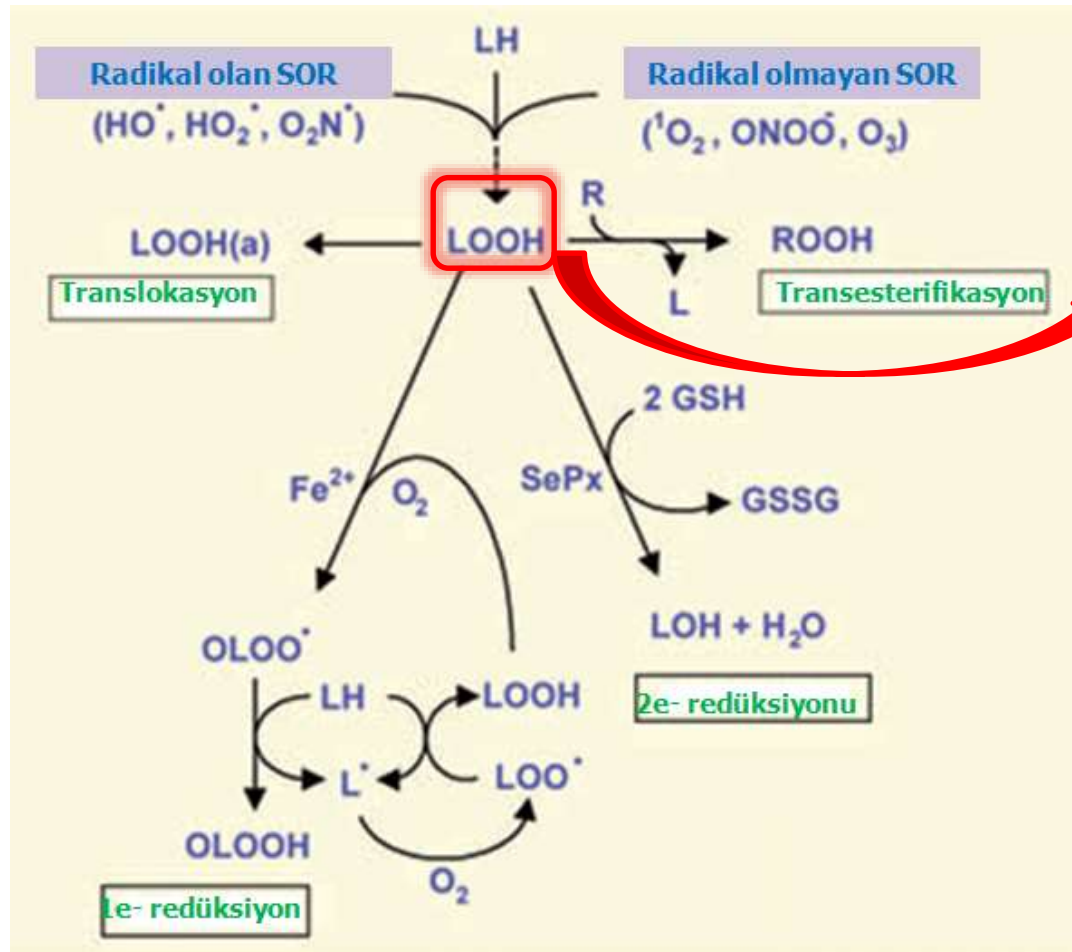


**LİPİD PEROKSİDASYONU
PRİMER ÜRÜNLER
EN STABİL İLK ÜRÜN**



**LİPİD
HİDROPEROKSİT**

CCl₄ HEPATOTOKSİTESİ ve TOTAL LİPİD HİDROPEROKSİT



Çalışma Gruplarının Plazma Total Lipid Peroksit Düzeyleri

Plazma Total Lipid Peroksit Düzeyleri

GRUPLAR	n	($\mu\text{mol/L}$)	GRUPLAR	n	($\mu\text{mol/L}$)
Kontrol	10	$9,51 \pm 1,79$	CCl_4	10	$18,02 \pm 3,77^{*,n}$
NAC	10	$9,32 \pm 1,93$	$\text{CCl}_4\text{-NAC}$	10	$12,61 \pm 2,65^c$

CCl₄ HEPATOTOKSİTESİ ve TOTAL LİPİD HİDROPEROKSİT

DOKU

LİTERATÜR

Lipid hidroperoksit

Ohta ve ark (2008)



Gnanaprakash ve ark (2010)



Ferreira ve ark (2010)



PLAZMA

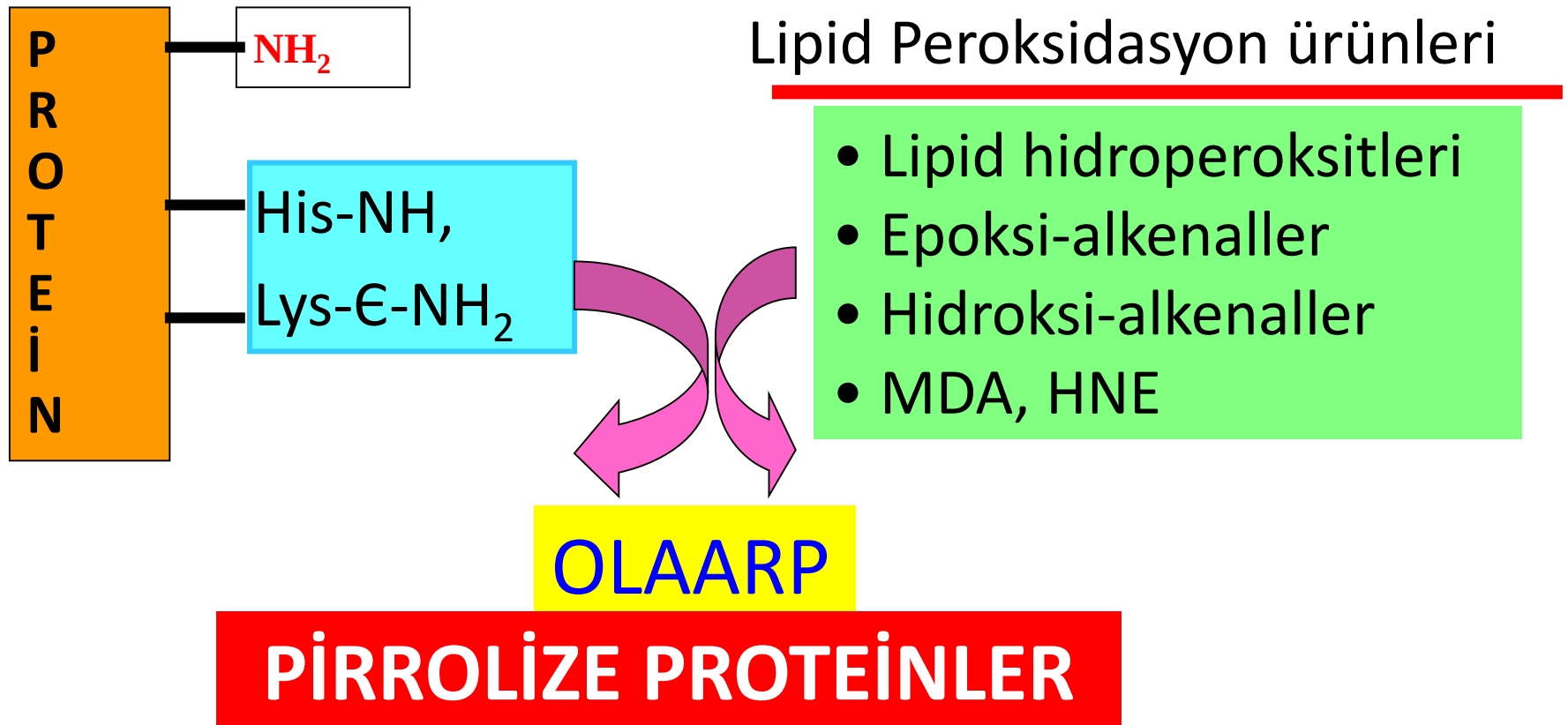
Lipid hidroperoksit

Bu çalışmada



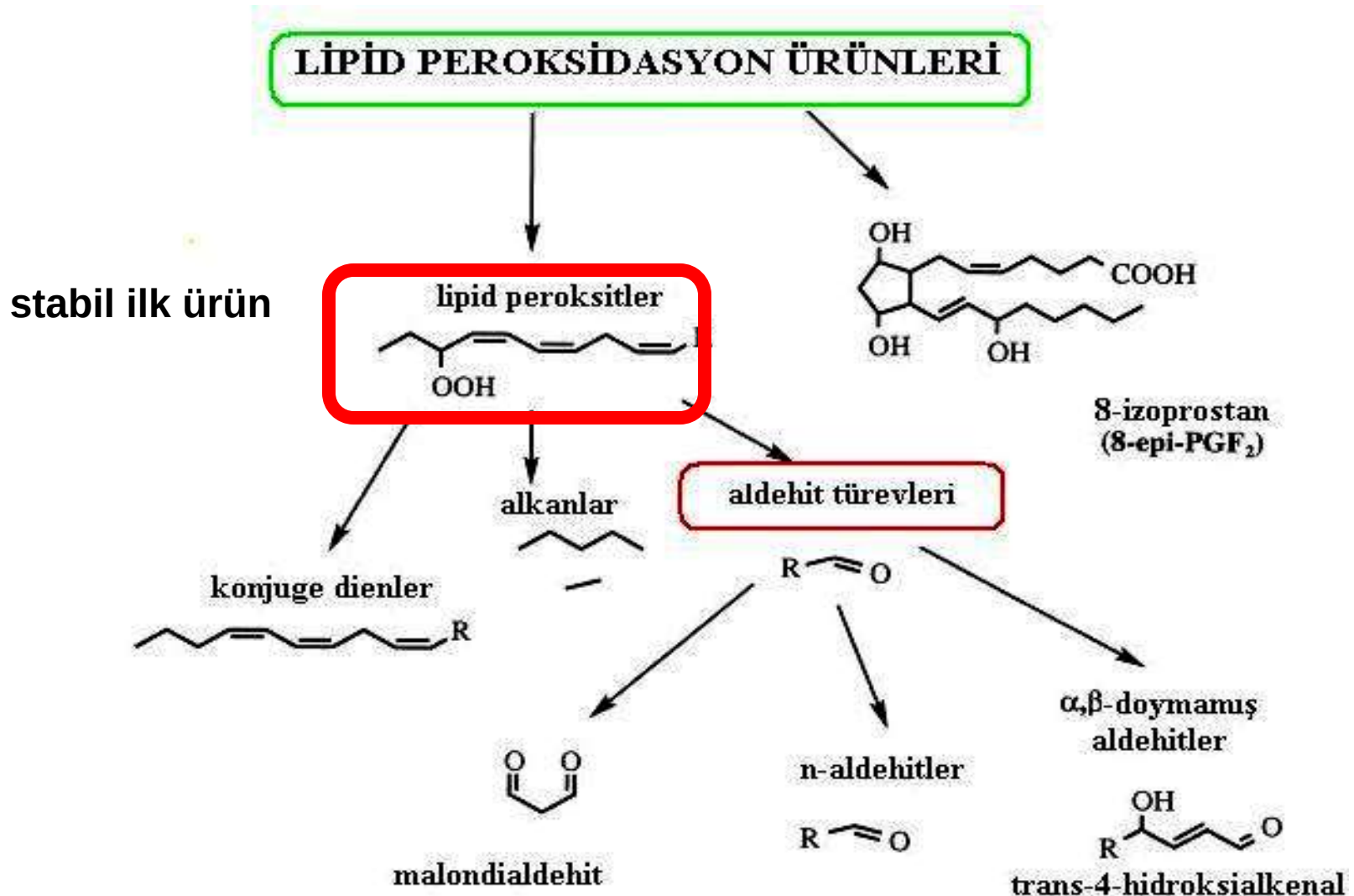
PİRROLİZE PROTEİN

Oksidatif stres varlığında, *in vivo* protein oksidasyonu “marker”ı

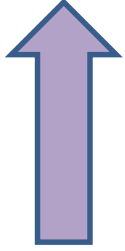


PROTEİN PİRROLİZASYONU

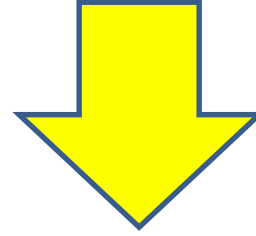
Lipid peroksidasyonunun nihai sonucu



PİRROLİZE PROTEİN



STABİLİTE



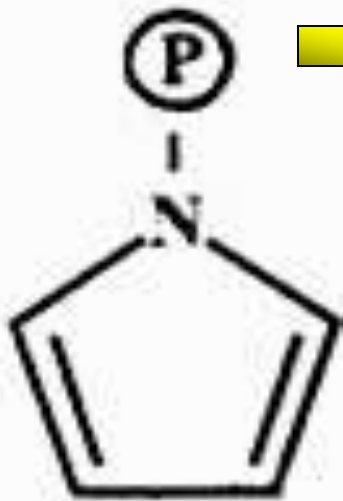
OKSİDATİF STRES

MARKER



Kimyasal-spektrofotometrik
yöntem

PİRROLİZE PROTEİN



A
L
B
Ü
M
İ
N

Lys-ε-NH₂

Plazma albümininde
lizil artışı ↑↑↑



Organizmada pirrol oluşumu, en çok
albümin üzerinde gerçekleşir

Serum

Pirrolize Protein

Bu çalışma

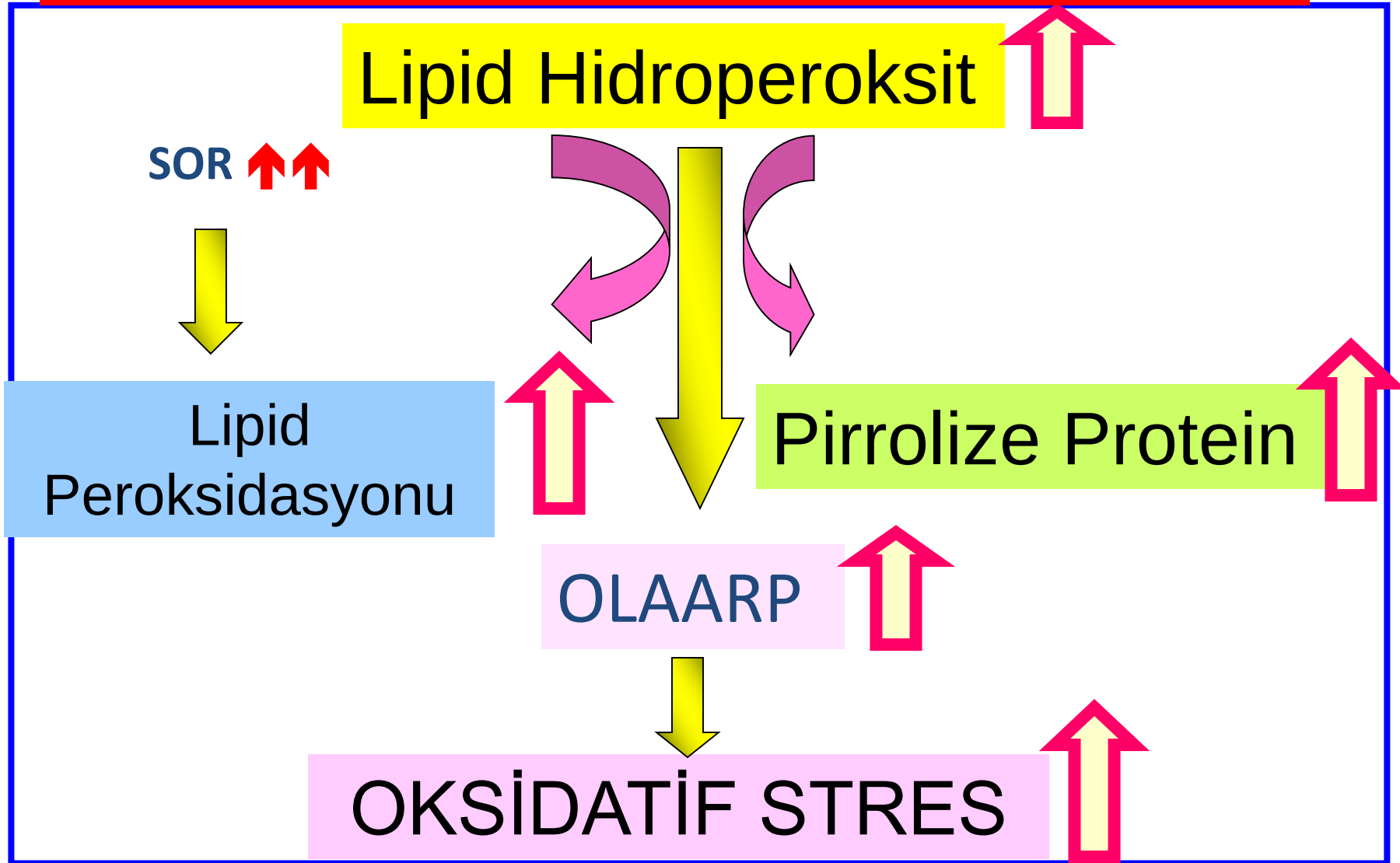


Çalışma Gruplarının Serum Pirrolize Protein Düzeyleri

Serum Pirrolize Protein Düzeyleri

GRUPLAR	n	(nmol/mg protein)	GRUPLAR	n	(nmol/mg protein)
Kontrol	10	1,27 ± 0,28	CCl₄	10	2,05 ± 0,54*, ⁿ
NAC	10	1,07 ± 0,20	CCl₄-NAC	10	1,23 ± 0,31 ^c

TOTAL LİPİD HİDROPEROKSİT SEVİYELERİ



LİPİD HİDROPEROKSİT ↑↑

PROTEİN
OKSİDASYONU ↑↑

OKSİDATİF
STRES

PİRROLİZE PROTEİN ↑↑

TİYOL ↓↓

CCl₄ HEPATOTOKSİSİTE MODELİ ve ANTİOKSİDANLAR

LİTERATÜR

Bayram ve ark (2004) Şahin ve ark (2003)	α-tokoferol	✓CCl ₄ ile indüklenen hepatotoksisiteyi, farklı mekanizmalarla önlediği / kısmen iyileştirdiği gösterilmiştir.
Bayram ve ark (2004)	askorbik asit	
Şahin ve ark (2003)	selenyum	
Hong ve ark (2009)	MEL	

NAC-HEPATOTOKSİTE OLUŞTURULMUŞ DENEYSEL ÇALIŞMALAR

LİTERATÜR

Ratlara uygulanan NAC'ın...

Pereira-Filho ve ark (2008)	CCl₄ + NAC	AST ↓	ALT ↓	TBARS ↓	GSH ↑
Maksimchik ve ark (2008)	CCl₄ + NAC	PCC ↓		TİYOL ↑	
Galicia-Moreno ve ark (2009)	CCl₄ + NAC	AST ↓	ALT ↓	TBARS ↓	GSH ↑

Ronis ve ark (2005)	etanol+NAC	ALT ↓	GSH ↑	TAK ↑
Aydoğdu ve ark (2007)	kadmiyum+NAC		GSH ↑	
Çetinkaya ve ark (2006)	metotreksat+NAC	MPO ↓		GSH ↑
Kaya ve ark (2008)	CsA+NAC	MDA ↓	ALT ↓	AST ↓

NAC-ANTİOKSİDAN ETKİ

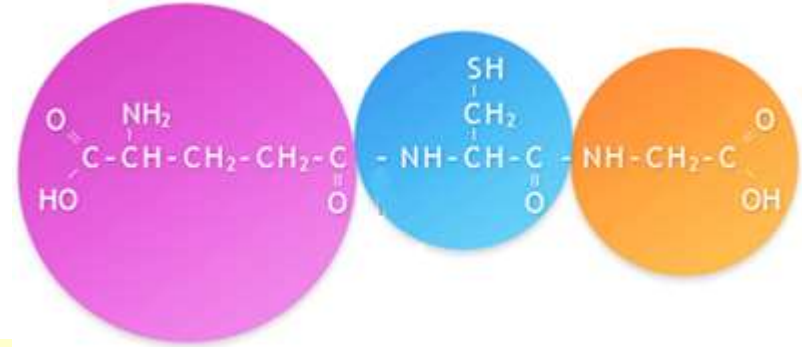
■ GSH prekürsörü

• GSH biyosentezi ↑

• İntraselüler GSH düzeyi ↑

• İntraselüler GSH deposu ↑

• Ekstraselüler sistin/sistein düzeyleri ↑



Serbest tiyol kaynağı

NAC-ANTIOKSİDAN ETKİ

- Direkt antioksidan etki

$O_2\cdot$, $HO\cdot$, H_2O_2 , $HOCl$ gibi SOR türevlerini toplar

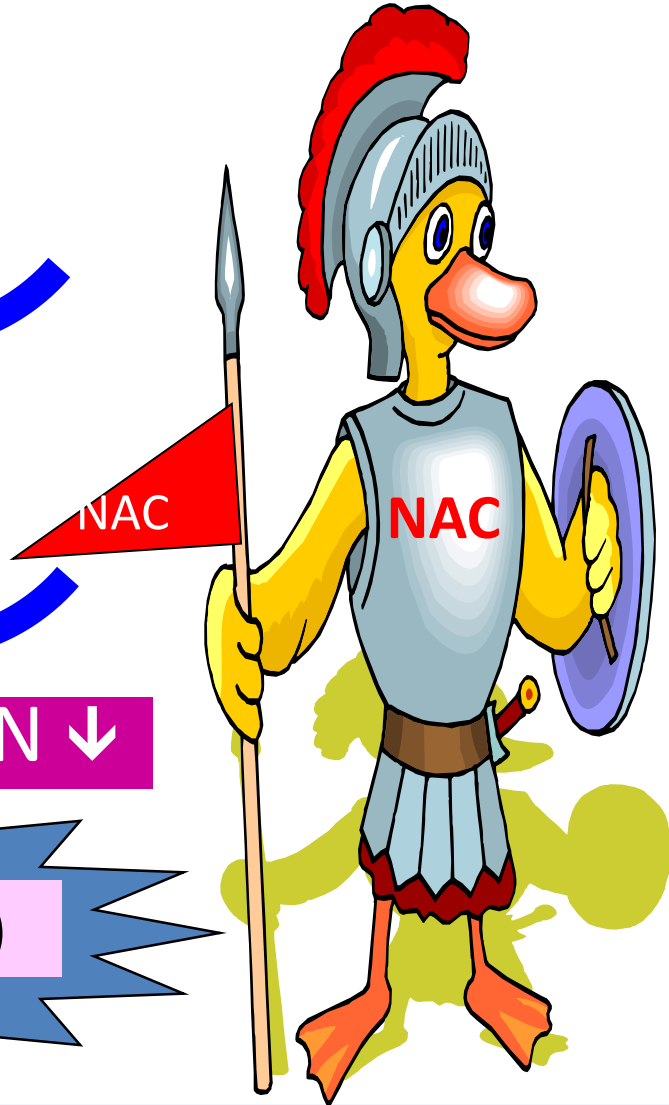


HOCI
SOR

ROOH

PIRROLIZE PROTEİN ↓

PROTEİN (ALBÜMİN)



NAC-YAN ETKİ ?

- ALT ve AST
- LDH
- ALBÜMİN

	RUTİN PARAMETRELER			
GRUPLAR	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	LDH (IU/L)	Alb (g/dL)
Kontrol	33,30 ± 2,11	44,60 ± 2,50	410,20 ± 63,16	4,44 ± 0,25
NAC	30,20 ± 2,74	45,5 ± 2,64	398,80 ± 32,36	4,65 ± 0,28
CCl ₄	246,40 ± 19,29*	194,50 ± 23,88*	1630,20 ± 107,87*	2,22 ± 0,13*
CCl ₄ -NAC	103,70 ± 12,28*, c	78,30 ± 5,87*, c	956,80 ± 40,37*, c	3,42 ± 0,27*, c

A red scroll graphic with a blue outline, featuring a vertical strip on the left and a horizontal strip on the right, both with rounded ends and a small circular detail at the top. The word "SONUÇ" is written in white, bold, uppercase letters in the center of the horizontal strip.

SONUÇ

SONUÇ-1

CCl₄ ile oluşturulmuş hepatotoksisite modelinde;
OKSİDATİF STRES

TOTAL LİPİD HİDROPEROKSİT ↑↑

PİRROLİZE PROTEİN ↑↑

SONUÇ-2

- Güçlü bir antioksidan olan ve ciddi bir yan etkisi olmayan NAC ile protein oksidasyonunun önlendiği
- NAC'ın oksidatif stresle ilişkili birçok hastalığın tedavi protokolüne eklenebileceği söylenebilir



A red scroll graphic with a blue outline, featuring a vertical strip on the left and a horizontal strip on the right, both with rounded ends and a small circular detail at the top right corner.

**TEŞEKKÜR
EDERİM...**