

**MONOAMİN OKSİDAZ İNHİBİTÖRÜ İLAÇLARIN *İN VİTRO*  
HEPATOTOKSİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**İlknur Sıla LEBLEBİCİ**

**Eskişehir 2019**

**MONOAMİN OKSİDAZ İNHİBİTÖRÜ İLAÇLARIN *İN VİTRO*  
HEPATOTOKSİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**İlknur Sıla LEBLEBİCİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Özlem ATLI EKLIÖĞLU**

**Eskişehir**

**Anadolu Üniversitesi**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

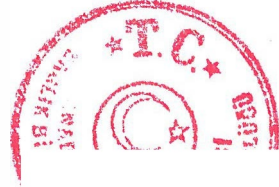
**Temmuz 2019**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

İlknur Sıla LEBLEBİCİ'nin "Monoamin Oksidaz İnhibitörlerinin Hepatotoksik Etkilerinin ve Etki Mekanizmalarının *In Vitro* Olarak Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 09.08.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Yeterlik Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Unvanı-Adı Soyadı

Üye (Tez Danışmanı) : Doç. Dr. Özlem ATLI EKLIÖĞLU  
Üye : Doç. Dr. Bülent ERGUN  
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Volkan KILIÇ



Prof.Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Monoamin Oksidaz İnhibitörü İlaçların *In Vitro* Hepatotoksik Etkilerinin  
Değerlendirilmesi

İlknur Sıla LEBLEBİCİ

Farmasotik Toksikoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temmuz 2019

Danışman: Doç. Dr. Özlem ATLI EKLİOĞLU

Monoamin oksidaz (MAO) inhibitörleri, uzun yıllardır depresyon, panik hastalığı ve sosyal fobinin tedavisinde kullanılmaktadır. Bu ilaçların uzun süreli kullanımına rağmen karaciğer hasarı açısından hepatotoksik etki profilleri ve bu etkilerin mekanizmaları hala tam olarak aydınlatılamamıştır; ancak MAO inhibitörlerinin ilaçlarla indüklenen karaciğer hasarı (İİKH) için yüksek risk taşıdığı ifade edilmektedir. Bu noktadan hareketle; tez kapsamında MAO inhibitörü ilaçlardan Moklobemid, Selejilin ve Klorjilinin hepatotoksitesinin HepG2 hücre hatları üzerinde değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ajanların 3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile sitotoksik etkileri, olası toksisitenin biyogöstergeleri olan alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), üre ve total bilirubin (TBILI) seviyeleri, apoptotik/nekrotik hücre ölümünün belirlenmesi, oksidatif stres parametreleri belirlenerek; olası hepatotoksiteleri ve mekanizmaları değerlendirilmiştir. Sonuç olarak; Klorjilin sitotoksiteyi indüklemiş ve ALT, AST ve üre miktarlarını arttırmıştır. Selejilin ALT, AST ve üre seviyelerini azaltmıştır. Tüm ilaçlar apoptotik süreçleri ve oksidatif stresi indüklemiş; fakat moklobemid pozitif kontrole kıyasla anlamlı reaktif oksijen türleri (ROT) artışına yol açmıştır. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, klorjilin diğer ajanlara göre daha fazla hepatotoksite belirtecinde anlamlı farklılıklara yol açmıştır. Sonuç olarak bu tez çalışmasında hem MAO inhibitörlerinin hepatotoksite izlemi gerçekleştirilmiş hem de prelinik dönemde tespiti oldukça zor fakat sonuçları yıkıcı olabilen İİKH için de diğer ilaçlar açısından bir izlem yöntemi ortaya konmuştur.

**Anahtar Sözcükler:** Moklobemid, Selejilin, Klorjilin, Hepatotoksite, *In vitro* hepatotoksite modelleri, İİKH

## ABSTRACT

Evaluation of *In Vitro* Hepatotoxic Effects of Monoamine Oxidase Inhibitor Drugs

İlknur Sıla LEBLEBİCİ

Department of Pharmaceutical Toxicology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, July 2019

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem ATLI EKLİOĞLU

Monoamine oxidase (MAO) inhibitors have been used for many years in the treatment of depression, panic disease and social phobia. Despite the long-term use of these drugs, the hepatotoxic effect profiles and mechanisms of these effects in terms of liver damage are still not fully elucidated; however, MAO inhibitors are reported to be at high risk for drug-induced liver injury (DILI). From this point; The aim of this thesis is to evaluate hepatotoxicity of MAO inhibitor drugs Moclobemide, Selegiline and Chlorgiline on HepG2 cell lines. For this purpose, cytotoxic effects of agents by 3- (4,5-dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) method, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), urea and total bilirubin (TBILI) levels, biomarkers of possible toxicity, determination of apoptotic/necrotic cell death, oxidative stress parameters were determined; possible hepatotoxicity and mechanisms were evaluated. As a result, chlorgiline induced cytotoxicity and apoptosis and increased ALT, AST and urea levels. Selegiline decreased ALT, AST and urea levels. All drugs induced apoptotic processes and oxidative stress; however, moclobemide led to significant reactive oxygen species (ROS) increase compared to positive control. When all the results were evaluated, chlorgiline caused significant differences in the markers of more hepatotoxicity than other agents. As a result, in this study, hepatotoxicity monitoring of MAO inhibitors was performed and a new follow-up method for DILI, which can be difficult to detect in the preclinical period but the results can be destructive, has been proposed.

**Keywords:** Moclobemide, Selegiline, Chlorgiline, Hepatotoxicity, *In vitro* hepatotoxicity models, DILI

## TEŞEKKÜR

12/07/2019

Hazırlamış olduğum bu yüksek lisans tezinin planlanması, araştırılması ve yürütülmesinde benden sabrını, ilgisini, sevgisini ve bilgisini bir an olsun esirgemeyen, çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendirmemi sağlayan, bana her zaman destek ve yol göstericim olan proje danışmanım saygıdeğer hocam Doç. Dr. Özlem ATLI EKLİOĞLU'na;

Bu süreç içerisinde karşılaştığım problemleri çözmemde her zaman içtenlikle yardımcı olan, çok değerli bilgi birikimiyle bana yol gösteren kıymetli hocam Doç. Dr. Sinem ILGIN'a;

Tüm samimiyeti, gülyüzü ve babacan muhabbeti için daima müteşekkür olduğum anabilim dalı başkanımız çok değerli büyüğüm saygıdeğer hocam Doç. Dr. Bülent ERGUN'a;

Tez çalışmamın her aşamasında benimle büyük bir özveriyle çalışan, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bu süreçte büyük emeği olan, desteğini hep üstümde hissettiğim, benim için bir hocadan çok daha ötesi olan çok sevgili ve değerli hocam Araş. Gör. Merve BAYSAL'a;

Pratik çalışmalarımız sırasında bana çok büyük yardımları dokunan, büyük özveri gösterip yardımına koşan dostum Araş. Gör. A. Burak KARADUMAN'a,

Yüksek lisans sürecimin bana ömür boyu kıymetli bir armağan olarak kazandırdığı kız kardeşlerim Uzm. Ecz. Büşra ÇELİKATEŞ ve Araş. Gör. Derya OSMANİYE'ye;

Lisans eğitimimizden bu yana ihtiyacım olduğu her zaman yardımına koşan, yanımda olan ve tez yazım sırasında teknik bilgisinden çok fazla faydalandığım çok sevgili arkadaşım Öğr. Gör. Asaf Evrim EVREN'e;

Sevgi, saygı ve destekleriyle hayatım boyunca her daim yanımda olup tüm kararlarıma sonsuz destek veren, her konuda beni cesaretlendiren, hayallerimi gerçekleştirmeme imkân sağlayan, çocukları olmaktan büyük gurur duyduğum canım annem Münevver TUNÇ ve canım babam Yusuf TUNÇ'a;

Son olarak hayatıma girdiği günden bugüne kadar dünyamı güzelleştiren, en zor zamanlarımda yanımda olup beni tekrar ayağa kalkmak için yüreklendiren, benimle üzüldüğü benimle sevinen, bana yürekten inanan sevgili eşim Ecz. İhsan LEBLEBİCİ'ye;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

## ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

12/07/2019

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

İlknur Silo LEBLİBİCİ

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

TEZ BAŞLIĞI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
KISALTMALAR DİZİNİ .....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ .....	3
2.1. Hepatotoksisite .....	3
2.2. İlaçla İndüklenen Karaciğer Hasarı (İİKH).....	4
2.2.1. Klinik sunum ve tanı.....	7
2.2.2. Risk faktörleri .....	8
2.2.2.1. Kazanılmış faktörler.....	8
2.2.2.2. Kalıtsal faktörler .....	9
2.2.3. Hepatotoksisitenin moleküler mekanizmaları .....	9
2.2.4. Hepatotoksik ajanların klinikopatolojik-mekanistik sınıflandırması.....	10
2.3. Monoamin Oksidaz İnhibitörleri (MAOI).....	11
2.3.1. MAO İnhibitörleri ile İlişkili Advers Etki Profili .....	14
2.3.1.1. Serotonin sendromu .....	14
2.3.1.2. Tiramin reaksiyonu ve peynir etkisi .....	15

2.3.2. MAO inhibitörlerinin sınıflandırılması .....	15
2.4. Moklobemid .....	16
2.5. Selejilin (l-deprenil, eldepril) .....	17
2.6. Klorjilin.....	18
2.7. Rasajilin .....	19
2.8. Parjilin.....	20
2.9. Safinamid .....	21
2.10. Ladostigil.....	23
2.11. M30 .....	23
2.12. Hepatotoksisitenin Biyogöstergeleri .....	24
2.12.1. Hepatoselüler hasar göstergeleri: ALT ve AST .....	25
2.12.2. Hepatoselüler hasarın ek göstergeleri: SDH ve GLDH.....	26
2.12.3. Hepatobiliyer hasarın göstergeleri: ALP, GGT, 5'-NT ve TBILI .....	26
2.12.4. Karaciğer fonksiyon parametreleri.....	27
2.13. <i>İn Vitro</i> Hepatotoksisitenin İncelenmesi ve Önemi .....	29
2.14. <i>İn Vitro</i> Toksikite Değerlendirmesinde Kullanılan Yöntemler .....	31
2.14.1. Sitotoksikite değerlendirme .....	31
2.15. Hücresel Ölüm Çeşitlerinin Belirlenmesi .....	31
2.16. Genotoksikite Değerlendirmesi .....	33
2.17. Flow (Akış) Sitometrisi .....	33
2.18. Oksidatif Stres .....	34
2.19. Reaktif Oksijen Türleri .....	35
3. GEREÇLER.....	37
3.1. Kullanılan Maddeler .....	37
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	38
4. YÖNTEMLER .....	39

4.1. Hücre Kültürlerinin Hazırlanması.....	39
4.2. Hücrelerin Çoğaltılması .....	39
4.3. Hücrelere MTT Sitotoksosite Testinin Uygulanması ve IC <sub>50</sub> Değerlerinin Hesaplanması.....	40
4.4. Apoptotik/Nekrotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi .....	41
4.5. Biyokimyasal Parametrelerin Seviyelerinin Belirlenmesi.....	41
4.5.1. AST, ALT, üre ve total bilirubin analizi.....	42
4.5.2. Reaktif oksijen türleri analizi .....	42
4.5.3. İstatistiksel Analiz.....	43
5. BULGULAR ve TARTIŞMA .....	44
5.1. MTT Yöntemi ile Bileşiklerin Sitotoksik Etki Sonuçları .....	44
5.2. Anneksin V/PI Yöntemi ile Bileşiklerin Apoptotik Etki Sonuçları .....	47
5.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Ölçümünün Değerlendirmesi .....	51
5.4. Biyokimyasal Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	54
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	57
KAYNAKÇA.....	60
ÖZGEÇMİŞ	

## TABLULAR DİZİNİ

### Sayfa

<b>Tablo 5.1.</b>	Moklobemid, selejilin ve klorjilin için farklı konsantrasyonlarda canlı/apoptotik/nekrotik hücre yüzdesi.....	50
<b>Tablo 5.2.</b>	Farklı konsantrasyonlarda moklobemid, selejilin ve klorjilinin uygulanan hücrelerde biyokimyasal parametre seviyeleri.....	54

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Şekil 5.1.</b> Moklobemid ile inkübe edilen HepG2 hücrelerinin canlılık yüzdeleri.....	46
<b>Şekil 5.2.</b> Selejilin ile inkübe edilen HepG2 hücrelerinin canlılık yüzdeleri .....	46
<b>Şekil 5.3.</b> Klorjilin ile inkübe edilen HepG2 hücrelerinin canlılık yüzdeleri.....	46
<b>Şekil 5.4.</b> HepG2 hücre hattı için moklobemid'in akış sitometrik analiz diyagramı .....	48
<b>Şekil 5.5.</b> HepG2 hücre hattı için selejilin'in akış sitometrik analiz diyagramı .....	49
<b>Şekil 5.6.</b> HepG2 hücre hattı için klorjilin'in akış sitometrik analiz diyagramı.....	50
<b>Şekil 5.7.</b> Farklı konsantrasyonlarda moklobemid, selejilin ve klorjilinin uygulanan hücrelerde reaktif oksijen türleri seviyeleri.....	53

## KISALTMALAR DİZİNİ

$^1\text{O}_2$	: Singlet oksijen
5'-NT	: 5'-nükleotidaz
ALDH	: Aldehit dehidrogenaz
ALP	: Alkalen fosfataz
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
ATCC	: American Type Culture Collection (Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu)
AUC	: Plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi altında kalan alan
ccK18	: Kaspazla parçalanmış keratin18
$C_{\max}$	: Maksimum serum konsantrasyonu
CYP450	: Sitokrom P450 enzimleri
DCF	: 2',7'-diklorofloresin
DCFHDA	: 2',7'-diklorofloresein diasetat
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DMSO	: Dimetilsülfoksit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EMA	: European Medicines Agency (Avrupa İlaç Ajansı)
FAD	: Flavın adenin dinükleotid
FDA	: Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç Dairesi)
FITC	: Floresan izotiyosiyanat
GGT	: Gama-glutamil transferaz
GLDH	: Glutamat dehidrogenaz
Gpx	: Glutatyon peroksidaz
GSH	: Glutatyon
$\text{GST}\alpha$	: Glutatyon-S-transferaz alfa
$\text{H}_2\text{O}_2$	: Hidrojen peroksit
$\text{HO}^\cdot$	: Hidroksil radikali
HBV	: Hepatit B virüsü
HCV	: Hepatit C virüsü
HIV	: İnsan immün yetmezlik virüsü

HPD	: Serum F proteini
IC <sub>50</sub>	: Inhibitory concentration 50 (İnhibitör konsantrasyon 50)
İİKH	: İlaçla indüklenen karaciğer hasarı
K18	: Total keratin18
LDH	: Laktat dehidrogenaz
MAO	: Monoamin oksidaz enzimi
MAO-A	: Monoamin oksidaz A
MAO-B	: Monoamin oksidaz B
MAOI	: Monoamin oksidaz enzim inhibitörü
MTT	: 3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NRC	: National Research Council (Ulusal Araştırma Konseyi)
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: Süperoksit anyon radikali
OCT	: Ornitin karmabil transferaz
OD	: Optik yoğunluk
PI	: Propidiyum iyodür
PS	: Fosfatidilserin
RNA	: Ribo nükleik asit
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SDH	: Sorbitol dehidrogenaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
SSRI	: Selektif serotonin geri alım inhibitörü
TBILI	: Total serum bilirubini
t-BOOH	: tert-Bütil hidroperoksit
T <sub>max</sub>	: Maksimum konsantrasyona ulaşma süresi
ULN	: Normal üst sınır
V <sub>d</sub>	: Dağılım hacmi

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İlaçların tedavide kullanıldıkları etkilerine ek olarak sekonder farklı sistemler üzerinde indükledikleri toksik/advers etkilerinin belirlenmesi, ilaç güvenilirliği açısından büyük önem taşımaktadır. Özellikle tekrarlayan dozlarda maruz kalınan ilaçların organ/sistem düzeyinde etkilerinin değerlendirilmesi toksikolojik araştırmalarda popüler araştırma konusu olarak karşımıza çıkmaktadır [1]. Karaciğer gerek anatomik yapısı gerekse de fizyolojik olaylardaki fonksiyonları nedeniyle ilaçlar dâhil kimyasallara yüksek konsantrasyonlarda maruz kalması nedeniyle toksik etkilere oldukça duyarlıdır. Tedavide kullanılan pek çok ilaç hafif ya da orta seviyede karaciğer transaminazlarının yükselmesine neden olmakla birlikte bir kısmı da özellikle duyarlı bireylerde tekrarlayan maruziyetleri takiben şiddetli seyredabilen karaciğer fonksiyon bozuklarına neden olabilmektedir [2]. Günümüzde ilaç adayları, ilaç araştırma-geliştirme sürecinde prelinik ve klinik çalışmalarda karaciğer üzerine toksik etkileri açısından değerlendirilmektedir. Ancak prelinik dönemde deneysel çalışmalarda kullanılan hayvanların hepatik hasar ile ilişkili son nokta seviyesindeki farklılıkları ve klinik dönemde maruz kalan insan sayısının az olması; toksisitenin tespitini zorlaştırmaktadır. Ayrıca bu çalışmaların hiçbiri olası toksisitenin mekanizmasını aydınlatmaya yönelik planlanmamaktadır [3]. Diğer bir önemli nokta ise ilaç ile indüklenen karaciğer hasarının piyasaya sürülen ilaçların geri çekilmesinin en önemli nedenlerinden biri olarak ifade edilmesidir. Dolayısıyla hastalıkların tedavisi için onaylanmış ilaçların da *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile hepatotoksitesinin değerlendirilmesi önemli bir araştırma konusu olarak karşımıza çıkmaktadır [4, 5]. Bu noktada *in vivo* sistemlerdense *in vitro* sistemler ile hepatotoksitenin değerlendirilmesinin hem zaman hem de maliyet açısından sağladığı üstünlükler gözardı edilmemelidir. Ayrıca insan hepatik sistemini taklit edebilen hücre dizileri ile insana uyumlu hepatik hasar son noktalarının değerlendirilmesi de çalışmalarda avantaj sağlamaktadır [6, 7].

Monoamin oksidaz inhibitörleri (MAOI) uzun yıllardır depresyon tedavisinde kullanılmakla birlikte panik hastalıkların, sosyal fobinin ve parkinsonun tedavisinde de sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle tedaviye dirençli depresyon ve atipik depresyon tedavisinde tercih edilmektedir [8]. Hastalar tarafından uzun yıllardır kullanılmalarına rağmen monoamin oksidaz enzim inhibitörlerinin hepatotoksite açısından risk oluşturduğu kabul edilse de; hepatotoksik etkilerini araştıran deneysel çalışma sonuçları ve vaka raporlarının çelişkili ve sınırlı sayıda olması nedeniyle; bu etki profilleri tam

olarak aydınlatılamamıştır [9-12]. Dolayısıyla bu tez kapsamında tedavide sıklıkla kullanılan monoamin oksidaz enzim inhibitörlerinin hepatotoksitesinin araştırılmasına ek olarak çalışmada kullanılan *in vitro* sistemin hepatotoksite açısından insan uyumluluğunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu noktadan hareketle bilimsel otoritelerce hepatotoksite araştırmaları açısından kabul gören *in vitro* sistemler olan HepG2 hücre hatlarının kullanılması amaçlanmıştır. Bu amaçla öncelikle seçilen monoamin oksidaz inhibitörlerinin (moklobemid, selejilin, klorjilin) HepG2 hücre hatları üzerinde 3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile inhibitör konsantrasyon 50 (inhibitory concentration 50-IC<sub>50</sub>) değerleri hesaplanmış, bu değerlerden hareketle hücre dizilerinde apoptotik/nekrotik hücre ölüm mekanizmaları belirlenmiş, hepatik hasarın biyogöstergeleri olarak alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), üre ve total bilirubin (TBILI) seviyeleri ölçülmüştür. Ayrıca olası hepatotoksitede oksidatif stresin rolünün aydınlatılmasına yönelik; hücre dizilerinde reaktif oksijen türlerinin seviyeleri belirlenmiştir.

## 2. KAYNAK BİLGİSİ

### 2.1. Hepatotoksisite

Karaciğer, ilaçların çoğunun biyotransformasyonunda yer aldığından; hepatotoksisite, çok sayıda ilacın potansiyel bir komplikasyonudur [13]. Hepatotoksisite; çeşitli akut ve kronik karaciğer hastalıklarına yol açan kimyasal kaynaklı karaciğer hasarı anlamına gelir ve majör ilaç sorunlarına neden olan en yaygın yan etkidir. Karaciğer enzimlerinin normal üst sınırından 1,25 kat veya daha yüksek olduğu ve/veya bulantı, kusma, sarılık veya alt ekstremitte ödemi dahil olmak üzere çeşitli semptomları içeren hasarla karakterize edilir. Normalin beş kat üstündeki enzimatik aktivite şiddetli kabul edilir [14]. Histolojik olarak, akut ve subakut hepatik toksisite; genellikle nekroz, steatoz, kolestaz, vasküler bozukluklar veya çoklu lezyonlardan oluşur [15]. Hepatotoksisite, ilaca bağlı kronik karaciğer hastalığı (ilaçla ilişkili yağlı karaciğer hastalığı, fibrozis, nodüler rejeneratif hiperplazi, sekonder sklerozan kolanjit) gibi çok çeşitli advers reaksiyonları içerirken; İİKH terimi başlangıçta akut olan advers olayları ifade eder [13]. Antidepresan kullanımı ile ilişkili bu riski değerlendirmek klinik olarak son derece önem taşır [16].

Akut veya fulminant hepatit; hepatotoksisite vakalarının %90'ından fazlasını oluşturan en yaygın sendromdur. Akut hepatotoksisite; ensefalopati ve semptomların başlangıcından sonraki 8 hafta içinde görülen deliryumla birlikte ortaya çıkan ciddi karaciğer hasarını ifade eder. Karaciğer hasarının en şiddetli hali ve ilaçlarla ilgili başta gelen ölüm nedeni olan akut karaciğer yetmezliğine yol açabilir [17]. Kronik karaciğer hastalığı ise; uzun süreli karaciğer hasarı ile karakterize olup, sağlıklı karaciğer dokusunun yerini fibrozise ve nodüllere bırakmasıyla ve fonksiyon kaybıyla sonuçlanır [18].

Karaciğer hasarı ve daha spesifik olarak hepatosit hasarına neden olan maddeler hepatotoksinler olarak adlandırılır. Karaciğer hasarı oluşturan ajanlar; intrinsik (öngörülebilir ve doza bağımlı) hepatotoksinler ve alışılmadık derecede hassas olan bireylerin sadece küçük bir kısmında karaciğer hasarı oluşturan idiyosenkratik (tahmin edilemeyen ve doz bağımsız) hepatotoksinler olmak üzere klasik olarak iki ana kategoriye ayrılmıştır [19]. İntrinsik hepatotoksinler etkilerini, bir ilacın veya metabolitlerinin (örneğin; reaktif fonksiyonel gruplar) kendine özgü özellikleriyle; idiyosenkratik hepatotoksinler ise büyük ölçüde alıcının ilaca verdiği yanıtla göstermektedir. İlaç kaynaklı hepatotoksisite vakalarının çoğu, idiyosenkratik hepatotoksinlerle ilişkilidir [20].

Günümüzde hepatotoksisite; klinik parametreler, hematoloji ve histopatoloji analizleri ile 28 günlük *in vivo* tekrarlı doz toksisite testleriyle değerlendirilmektedir. Bununla birlikte, bu parametrelerin duyarlılığı görece düşüktür ve yanlış negatif sonuçlara neden olur; böylelikle hepatotoksisite, genellikle klinik çalışmalarda veya ürün piyasaya sunulduktan sonra bile ortaya çıkmaktadır [21, 22].

Toksikolojik ve klinik çalışmalardaki iyileşmelere rağmen; tüm ilaçlar için genel hepatotoksisite sıklığı son 15 yılda azalmamıştır ve ilaç hepatotoksisitesinin erken evrede saptanması hala çok güçtür. Bu zorluklar kısmen, hayvan türlerindeki prelinik çalışmaların sınırlı negatif öngörü değerleri sergilemesi ve insanlarda kayda değer sayıda karaciğer hasarı vakasından sorumlu olan birçok ilaç örneği için hayvan modellerinde sinyal saptanamamasından kaynaklanmaktadır [17, 23, 24].

## **2.2. İlaçla İndüklenen Karaciğer Hasarı (İİKH)**

İlaçla indüklenen karaciğer hasarı (İİKH); bilinen herhangi bir karaciğer hastalığını taklit eden akut ve kronik karaciğer hasarı formlarını ifade eder. İİKH, transaminazlardaki asemptomatik artıştan, akut karaciğer yetmezliğine yol açan akut hepatit gibi ağır hastalıkların ortaya çıkışına kadar geçen tüm süreci kapsar [25, 26]. İİKH, ilaçların geliştirilmesi önündeki en büyük engel ve küresel olarak onaylanmış ilaçların piyasadan çekilmesinin başlıca sebebidir [27, 28]. 1969 ile 2002 yılları arasında piyasadan çekilen 76 ilaçtan 12'si karaciğer hasarı ile ilişkilendirilerek geri çekilmiştir [29]. Terapötik dozda ilaç alımı sonrasındaki önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir [30]. Genetik, metabolik ve immün faktörleri içeren karmaşık bir etyopatogeneze sahiptir. Akut veya kronik olabileceği gibi çoğu vaka akut karaciğer hasarı olarak ortaya çıkar [31]. Karaciğer hasarı çoğu durumda idiyosenkratik, öngörülemmez ve genellikle ilaç dozajından bağımsızdır. Tedavi başlangıcı ile karaciğer hasarının başlangıcı arasındaki süre genellikle birkaç gün ile 6 ay arasında değişkenlik gösterir [32]. Semptomlar ve ilerleyici hasar, karaciğerin rejenerasyon kapasitesi nedeniyle her zaman ortaya çıkmayabilir. Karaciğer biyopsisi de dahil olmak üzere; İİKH'yi kesin olarak gösteren klinik bir bulgu yoktur [33]. Antiepileptik ilaçlar, antimikrobiyal ve merkezi sinir sistemi ilaçları İİKH'nin dünya çapındaki önde gelen nedenleridir [25].

İİKH; ilaç toksisitesinin en yaygın belirtisi ve akut karaciğer yetmezliğinin, kronik karaciğer hastalığının ve karaciğer transplantasyonunun en sık nedeni olarak atfedilir [34, 35]. Tüm hastane yatışlarının %5'inden, açıklanamayan belirgin serum karaciğeri enzim

yüksekliklerinin yaklaşık %10'undan ve tüm akut karaciğer yetmezliğinin %50'sinden sorumludur [36].

Karaciğer hasarının ilaçlar ya da başka işlemlerden kaynaklanıp kaynaklanmadığının güvenilir bir şekilde teşhis edilebilmesi; ilaçla indüklenmiş hepatotoksisite insidansının ve klinik risk faktörlerinin belirlenmesi; hepatositler ve diğer karaciğer hücrelerine zarar veren mekanizmaların detaylandırılması aşamaları; İİKH sürecinin anlaşılmasını karmaşık hale getirmektedir [33, 37].

Terapötik dozlarla ilaç alan kişilerde İİKH insidansı; %0,001 ile %0,1 arasındadır ve bu nedenle klinik çalışmalarda önemli sayıda vaka gözlemlene olasılığı düşüktür [14, 32]. Klinik kullanımda olan birçok ilaç için, hepatik enzimlerin potansiyel asemptomatik yükselmeleri durumunda gerekli önlemler alınmakta ve ilaçlar uygun izleme ile kullanılmaya devam etmektedir [31]. Son çalışmalar, günlük dozu > 50-100 mg/gün dozdan daha fazla lipofilikliğe sahip olan ilaçların, daha az lipofiliklikte daha düşük dozda verilen ilaçlarla karşılaştırıldığında; İİKH'ye neden olma yatkınlıklarının daha fazla olduğunu göstermektedir [38, 39].

İİKH; genellikle hücresel hedeflerin etkileşimi veya bozulmasını içeren patofizyolojik mekanizmalar ile ortaya çıkmaktadır [40]. İİKH köken olarak idiyosenkratik veya öngörülebilir olabilir. İdiyosenkratik İİKH; öngörülemez, sıklıkla doz bağımsız ve en yaygın olarak görülen çeşididir. İdiyosenkratik ilaç reaksiyonlarının %75'inden fazlası, karaciğer nakliyle veya ölümle sonuçlanır [36]. Bu reaksiyonlar; immün aracılı karaciğer hasarının (immünoalerjik/immünolojik idiyosenkratik İİKH) veya doğrudan hücresel hasarın (metabolik idiyosenkratik İİKH) bir sonucudur. Ana ilaca genetik ve/veya çevresel bir yatkınlığı olan ya da doğrudan hücresel hasarı uyaran ya da zararlı bir immünoalerjik reaksiyona neden olan bir toksik metabolite sahip olan kişilerde ortaya çıkar [14]. İmmünoalerjik ilaç hasarı (ilaç alerjisi veya aşırı duyarlılık ilaç hasarı olarak da adlandırılır), 1-8 hafta gibi kısa bir duyarlılık döneminden sonra ortaya çıkar, ilacın kullanımının (bazen 1 veya 2 gün içinde) tekrarlanmasıyla başlar ve hipersensitivitenin diğer klinik bulgularına (örneğin; ateş, deri döküntüleri, otoantikör oluşumu, eozinofili, lenfadenopati, atipik lenfositoz) eşlik eder. Döküntü şiddetli olabilir ve toksik epidermal nekroliz veya Stevens-Johnson sendromu gelişebilir [41]. Metabolik idiyosenkrazi; hepatositlerde ana bileşiğin biyotransformasyonu, doza bağlı bir şekilde toksik bileşikler üretilmesiyle sonuçlanır. Bu tür problemler spesifik bir genetik polimorfizm ile bağlantılıdır ve çok nadir görülür [42-45].

Öngörülebilir doz bağımlı hepatotoksisite, çoğu ilaç için prelinik veya erken klinik çalışmalarda tespit edilebildiği ve böylece elimine edilebildiği için; İİKH'nin daha az yaygın olan şeklidir. Bu tip hepatotoksisite, ilacın yüksek dozlarını takiben veya hepatik bir enzim indükleyici ile birlikte verilmesinin ardından toksik metabolit birikimi ile karakterize edilir [32, 46].

Karaciğer hasarı ile ilişkili mekanik olaylar arasında apoptoz/nekroz, inflamasyon, oksidatif stres ve metabolik enzimlerin değişimi yer alır. Hepatositlerdeki doğrudan ilaç hasarına ek olarak; Kupffer hücreleri, zedelenmeyi arttıracak sitokinleri aktive edebilir; stellat hücreleri hasarı arttırabilir ve bazı ilaçlar, veno-oklüzif hastalığa yol açan sinüzoidal endotelial hücrelere zarar verebilir [47].

Alta yatan karaciğer hasarına bağlı olarak İİKH hepatoselüler (nekroz ve/veya steatoz), kolestatik (safra sekresyonu ve/veya safra akışı bozuklukları) veya karma olarak üç kategoride sınıflandırılabilir. Bazı ilaçlar, genellikle hepatositlerin nekrozu anlamına gelen, ağırlıklı olarak hepatoselüler hasara; diğerleri, kolestaza benzeyen biliyer hasara; son olarak, bazı ilaçlar ise karışık hepatoselüler ve biliyer hasara neden olur [48].

Hepatoselüler karaciğer hasarı; ALT, normal üst sınırının (ULN) 2 katından daha büyük olduğunda veya ALT/alkalen fosfataz (ALP) oranının 5 veya daha yüksek olduğu durumları tanımlar. AST karaciğer hasarı için daha az spesifikken; ALT hepatosit sitozolünde çok miktarda bulunur ve membrandaki hasar sonucu sistemik dolaşıma girer [46]. Hepatoselüler formdaki İİKH %10-%50 arasında değişen mortalite oranıyla en kötü prognoza sahiptir ve eşlik eden sistemik semptomları; sarılık ve belirgin şekilde artmış serum aminotransferaz seviyeleridir [14, 42, 49]. Hepatoselüler hasar aynı zamanda bilirubin konjugasyonunu bozar; bu nedenle toplam bilirubin artışı, konjuge bilirubine oranla artar ve bu nedenle bilirubin yüksekliği, fonksiyonel karaciğer hasarının bir göstergesi olarak kabul edilir [31]. Ağır hepatoselüler hasarlı olgularda bilirubin konsantrasyonundaki artışla birlikte protrombin zamanında azalma gözlenir [50]. Daha ciddi vakalarda koagülopati ve ensefalopati, akut fulminant karaciğer yetmezliğinin göstergesidir [42].

Kolestatik karaciğer hasarı hepatoselüler hasarın aksine; safra asitleri için kanaliküler membranlarda ve taşıyıcılarda doğrudan hasar ile karakterize edilir ve böylece safra kanalı tıkanmasına ve serum ALP miktarının artmasına yol açar [31]. Regresyonu hepatoselüler İİKH'den daha yavaştır [51]. Kolestatik karaciğer hasarı; ALP düzeyinin ULN'den 2 kat daha yüksek olduğu veya ALT/ALP oranının 2'ye eşit veya

daha küçük olduğu durumlar için tanımlayıcıdır. İİKH'nin kolestatik formu daha az görülür, genellikle hayatı tehdit edici değildir ve sarılık, orantısız artış gösteren serum ALP seviyeleri, kaşıntı ve ALT'de hafif artışlarla kendini gösterir [23].

Karma karaciğer hasarı halinde ise; ilgili serum belirteçleri ile birlikte hepatosit hasarı ve safra kanalı tıkanıklığı bir aradadır. Karma reaksiyonlarda hem ALT hem de ALP seviyeleri anormal derecede yüksektir; ALT/ALP oranı 2 ila 5 aralığındadır ve bireysel değerler ULN'den 2 kat daha büyüktür [42]. Ayrıca; ALT değeri  $> 3xULN$  veya ALP değeri  $> 2xULN$ , karma İİKH'nin göstergesidir. Bununla birlikte, bu eşik değerler hassas olmasına rağmen spesifik belirteçler değildir [52].

### 2.2.1. Klinik sunum ve tanı

Hepatik ilaç hasarının teşhisi; bu ilaçlar için tek bir teşhis testinin mevcut olmayışı ve birçok ajanın İİKH'ye neden olabilmesi yüzünden zordur. İİKH'nin klinik spektrumu hemen hemen diğer tüm karaciğer bozukluklarını (akut ve kronik hepatit, otoimmün hepatit, alkolik karaciğer hastalığı, non-alkolik steatohepatit, fibrozis/siroz, granümatöz hastalık, mikrovasküler steatoz, veno-oklüsif hastalık gibi akut ve kronik hepatobiliyer hastalık) taklit edebilir ve histopatolojik bulguları diğer birçok karaciğer hastalığına benzeyebilir [29, 42].

İİKH; çoğunlukla tıbbi öykü, sunum, laboratuvar verileri ve hastalık seyri gibi çoklu faktörlere dayanarak teşhis edilir. Temel parametreler; reaksiyonun başlangıç zamanı, karaciğer hasarının tipi dahil olmak üzere klinik özellikler, iyileşme zamanı ve seyri, spesifik risk faktörleri, hepatit ve karaciğer testi anormalliklerinin yaygın ortak nedenleri gibi diğer tanıların dışlanması ve ajanın hepatotoksitesine ilişkin önceki raporlardır [17].

Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından, ciddi hepatotoksitesite riskini öngörmek için altın standart olarak kabul edilen Hy's Kuralları kullanılmaktadır. Hy's Kuralları; ismini, sarılık ile ilişkili hepatoselüler hasar vakalarının en az %10'luk bir mortalite sergilediğini gözlemleyen Hyman Zimmerman'dan alır [17]. Bu paradigma, ALP kullanılarak değerlendirilen hepatobiliyer hasarın yokluğunda; TBILI'nin iki kattan daha fazla artmasıyla birlikte ALT'nin üç kattan fazla yükselmesinin saptanmasına dayanmaktadır. Ancak klinisyenler ve bilim insanları tarafından Hy'in yasaının eksikliklerini ele alan İİKH değerlendirmesiyle kriterler değiştirilerek; serum ALT'nin düşük seviyedeki İİKH ile ilişkili olmayan yükselmelerini ve klinik olarak ilgili olmayan ilaç kaynaklı olayları

dışlamak için ALT artış eşiği beş kattan fazla artırılmış ve hepatobiliyer sistem üzerindeki hasarın önemini vurgulamak için ise iki kattan daha büyük ALP artışı dahil edilmiştir [47].

İİKH semptomları son derece çeşitli olmakla birlikte bazı hastalarda semptom gözlenmeyebilir. Biyotransformasyonun merkez organı olan karaciğer, yüksek kan konsantrasyonları ve portal kandaki metabolitleri nedeniyle oral ilaç kullanımına bağlı oluşan toksisiteye özellikle yatkındır [53]. Muhtemel semptomlar; yorgunluk, iştahsızlık, bulantı, kusma, ateş, karın sağ üst bölgesinde basınç hissi, eklem ve kas ağrısı, kaşıntı, döküntü ve sarılıktır. Sarılık, karaciğer hasarının doğrudan göstergesi olan tek semptomdur [54].

### **2.2.2. Risk faktörleri**

Bir kişinin İİKH geliştirme yatkınlığında çok çeşitli faktörler rol oynar. Ancak hepatotoksik ilaç reaksiyonları geliştirme riski temelde iki gruba ayrılır. İlk grubu, ilacın nasıl elimine edildiği (karaciğer veya diğer yollarla), hangi enzimlerle metabolize olduğu ve ne tür hepatotoksik mekanizmalara sahip olduğu gibi ilacın özellikleriyle ilgili risk faktörleri; ikinci grubu ise, bireyin duyarlılığı ve ilaç alım şartları veya ortamı oluşturur [17]. Yaygın olarak belirtilen risk faktörleri; eşlik eden ilaçlar ve insan immün yetmezlik virüsü (HIV), hepatit B virüsü (HBV) ve hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonları gibi altta yatan hastalıkları içerir. Bunun yanı sıra İİKH duyarlılığını, ilaç metabolizmasını düzenleyen enzimler ve ilaç taşıyıcılarını kodlayan genleri içeren genetik polimorfizmler gibi genetik risk faktörleri de etkilemektedir [42].

#### **2.2.2.1. Kazanılmış faktörler**

Yaşlı hastaların genç hastalara, kadınların erkeklere göre; toksik karaciğer reaksiyonuna daha yatkın olduğu çalışmalarda bildirilmiştir [53]. 60 yaş üstü hastalarda çoklu ilaç kullanımından kaynaklı etkileşimler nedeniyle, ilaç hepatotoksitesisi riski artmış durumdadır. Beslenme kalitesi hepatotoksisiteyi farklı şekillerde etkileyebilir. Kronik alkol kullanımı; sitokrom P450'ler (CYP450'ler) gibi kritik enzimleri indükleyerek ve glutatyon (GSH) depolarını tüketerek, potansiyel toksik metabolitlere karşı direncin düşmesine neden olur ve hepatotoksisiteyi karmaşık mekanizmalarla güçlendirebilir. Ekstrahepatik ve hepatik hastalıklar da bazı ilaçların hepatotoksitesisine katkıda bulunabilir [17]. Yürütülen az sayıda kontrollü çalışma; önceden varolan

karaciğer hasarının, hepatotoksik reaksiyon durumunda karaciğerin yenilenme yeteneğini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir [54].

Aynı CYP450 izoenzim yolağı hedefleyen birden fazla ilacın aynı anda kullanılması İİKH riskini arttırabilir. Bazı antidepresanlar, CYP450 enzim aktivitesini inhibe edebilir veya indükleyebilir; böylece antidepresan ve metabolitlerinin serum konsantrasyonlarını etkileyerek potansiyel hepatik toksisite riskini arttırır [32].

#### **2.2.2.2. Kalıtsal faktörler**

Antidepresan ajanlarla yapılan çalışmalarda, idiyosenkratik İİKH'den ziyade duyarlılık ile ilişkilendirilen gen polimorfizmleri tanımlanmamıştır [32]. Genetik metabolik değişkenlik, İİKH için en önemli duyarlılık faktörüdür. Enzim polimorfizmleri; enzim fonksiyonunun yavaşlamasına veya tamamen bozulmasına neden olarak her zaman karaciğer hasarıyla sonuçlanmasa da maddelerin toksisite artışına neden olabilir [53].

İlaçların çoğunu metabolize eden CYP450 izoenzimlerinin genetik olarak belirlenmiş polimorfizmleri nedeniyle; bireyler zayıf, orta ve güçlü metabolizörler olarak kategorize edilebilirler [53]. Zayıf bir metabolizörün, aynı izoenzimin çeşitli substratlarını veya inhibitörlerini içeren ilaçlarla alınması, daha yavaş ilaç metabolizması nedeniyle toksisite riskini arttırır. CYP2D6 yokluğu veya eksikliği, Kafkas popülasyonlarının %5-%10'unda mevcut olan yaygın bir farmakogenetik polimorfizmdir [17, 55].

Risk faktörleri açısından yeni veriler, yoğun olarak karaciğerde CYP450 enzimleri tarafından metabolize edilen ilaçların İİKH'ye neden olma olasılığının yaklaşık dört kat daha yüksek olduğunu göstermektedir. Çalışmalarda spesifik olarak, CYP1A2, CYP2C8/CYP2C9 ve CYP3A5 tarafından metabolize edilen ilaçların, İİKH riskinin artmasıyla yakından ilişkili olduğu gözlenmiştir. Ayrıca yüksek günlük dozda (100 mg) verilen ilaçların düşük dozdaki ilaçlara kıyasla yaklaşık beş kat daha fazla İİKH'ye neden olduğu bildirilmiştir [56].

#### **2.2.3. Hepatotoksisitenin moleküler mekanizmaları**

Hepatotoksisite; toksik bir bileşiğin veya metabolitinin birikiminden veya sitotoksik etkisinden dolayı veya bu toksik ara maddelerin proteinlere bağlanmasıyla ortaya çıkan immün aracılı bir yanıtta kaynaklanabilir. İİKH etiyojisi, genellikle aktive

edilmiş immün cevap ve hepatosit metabolik disfonksiyonu arasındaki bir süreç olarak kabul edilmesine rağmen; çoğunlukla bir ara reaktif metabolitten kaynaklanmaktadır. Bir bileşiğin toksik etki oluşturup oluşturmayacağını; biyoaktivasyon, detoksifikasyon ve savunma/onarım mekanizmaları arasında denge belirler. İlaç biyotransformasyonu genel olarak detoksifikasyon sürecine paralel olmasına rağmen; biyoaktivasyon sıklıkla hepatosit hasarına neden olur [57, 58].

Doğrudan hepatotoksisite; ana bileşiğin etkileşiminin bir sonucu olarak ya da daha sıklıkla hepatositlere karşı sitotoksisiteye neden olan reaktif bir ara metabolitin ortaya çıkması sonucu gelişir [59]. İlaç metabolitleri sıklıkla; hücre makromolekülleri olan proteinler, lipidler, deoksiribo nükleik asit (DNA) ve ribo nükleik asit (RNA) üzerinde, araya girebilen elektrofilik bir etkileşim veya serbest radikaller aracılığıyla kovalent bağlar oluştururlar. Bu reaktif türler genellikle GSH ve diğer indirgenmiş gruplar tarafından detoksifiye edilir. İndirgenmiş GSH'nin azalması; toksik ara maddelerin proteinler, lipitler veya nükleik asitlere kovalent bağlanmasını veya lipit peroksidasyonunu arttırabilir. Bu kararlı ilaç eklentilerinin birikimi mitokondriyal hasarı arttırabilir ve sonrasında apoptozu ya da nekrozu indükleyen hücresel strese neden olabilir [60-62].

#### **2.2.4. Hepatotoksik ajanların klinikopatolojik-mekanistik sınıflandırması**

Bazı tıbbi ajanlar, aşırı dozda alındığında ve hatta bazen terapötik aralıklar içinde olduğunda bile karaciğere zarar verebilir. Laboratuvarlarda ve sanayide kullanılan kimyasal maddeler, doğal kimyasallar ve bitkisel ilaçlar gibi diğer kimyasal maddeler de hepatotoksisiteye neden olabilir. Günümüzde karaciğer hasarına neden olan 1.200'den fazla ilaç molekülü bulunmaktadır [17, 36].

Antidepresan kaynaklı karaciğer hasarı; karaciğer enzim düzeylerindeki artıştan; yorgunluk, asteni, anoreksi, bulantı, kusma ve üst sağ karın ağrısı gibi spesifik olmayan semptomlara ve ayrıca sarılık, koyu renkli idrar veya soluk dışkı, hepatik ensefalopati ile ilerleyici veya hatta fulminant karaciğer yetmezliği, hepatoselüler fonksiyonların kaybı, akut karaciğer yetmezliği gibi daha spesifik semptomlara kadar uzanan çeşitli biyolojik ve klinik tabloları içerir. Bununla birlikte; çoğu durumda hastalar klinik olarak asemptomatiktir ve karaciğer fonksiyon testleri üzerinde anormal sonuçlarla tanımlanan biyolojik değişiklikler; antidepresan kaynaklı karaciğer hasarı şüphesi oluşturabilen tek

unsurdur. Böylelikle, İİKH'nin teşhisi çoğu zaman ALT seviyelerindeki artışın tespitine dayanır [32].

Hemen hemen tüm antidepresanlar, terapötik dozda bile hepatotoksisiteyi indükleyebilir [63]. Tüm antidepresanlar; geçici olsa bile, bir dereceye kadar karaciğer enzim yükselmesine neden olur. Antidepresanlarla ilişkili karaciğer hasarının mekanizması metabolik veya immünoalerjiktir. Bir hipersensitivite sendromunun (ateş, kızarıklık, eozinofili, otoantikolar) ve kısa bir gecikme süresinin (1 ila 6 hafta) olması immün aracılı karaciğer hasarını gösterirken, herhangi bir hipersensitivite sendromunun yokluğu ve daha uzun bir gecikme süresi (1 aydan 1 yıla kadar) idiyosenkratik metabolik mekanizmayı tanımlar. Antidepresanlarla ilişkili İİKH genel olarak hepatoselüler tipte ve daha az sıklıkla kolestatik veya karma tiptedir. İİKH'nin başlangıcı çoğu durumda; idiyosenkratik, öngörülemez ve antidepresan tedavisinin başlamasından sonraki birkaç gün ile 6 ay arasındadır. Her ne kadar serum aminotransferaz aktiviteleri çoğu antidepresan için İİKH'nin zayıf bir göstergesi olsa da, hastaları izlemek için kullanılan altın standarttır [32, 63].

MAO inhibitörleri (MAOI), İİKH için yüksek derecede sorumlu olarak tanımlanmıştır. MAOI'nın uzun süreli kullanım geçmişine rağmen hepatotoksisitenin de içinde olduğu advers etki profilleri ve mekanizmaları hala yeterince anlaşılammıştır [53]. MAOI ile tedavi edilen hastaların %3'ünden fazlasında asemptomatik hafif anormal karaciğer fonksiyonu saptanmıştır [32]. Özellikle MAOI için hepatotoksisite verileri klinik çalışmaların sonuçları olmadığından sınırlıdır. Mevcut veriler sadece yayımlanan vaka raporlarına dayanır. Elde edilen veriler tüm antidepresanların hepatotoksisite riski ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, antidepresanlara bağlı karaciğer hasarının prevalansı ve ciddiyeti ile ilgili kesin sonuçlar için kanıtlar yeterli değildir [64].

### **2.3. Monoamin Oksidaz İnhibitörleri (MAOI)**

MAO, monoamin nörotransmitterlerinin deaktivasyonu için majör metabolik enzimdir ve nöro-psikofarmakolojide kilit bir hedeftir. MAO, bir C-terminal transmembran polipeptit segmenti ile mitokondriyal dış membrana bağlı; nöronal, glial ve diğer hücrelerde monoaminerjik homeostazı ve nörotransmisyonu düzenleyen; kofaktör olarak flavin adenin dinükleotidi (FAD) içeren anahtar enzimdir [65]. Gastrointestinal, hepatik ve nöronal dokularda yüksek ekspresyon seviyelerine sahiptir ve tüm vücutta yaygın olarak dağılım gösterir. Etkileri, merkezi sinir sisteminde nöroaktif

ve vazoaaktif biyojenik moleküllerin (endojen monoaminler) oksidatif deaminasyonu ile elde edilir ve detoksifikasyonunda önemli rollere sahiptir. Aynı zamanda diyet aminlerinin (ekzojen monoaminler-ksenobiyotik aminler) oksidatif katabolizmasında da önemli bir rol oynar [66-68]. Monoamin oksidazlar aynı zamanda; nöronal farmakoterapide potansiyel terapötik hedef olarak işlev gören, nörobiyolojik köken ve fonksiyonları barındıran, çok değerli bir nöronal enzim sınıfını temsil ettiği için bazı kaynaklarda "Nöroenzim" terimi ile de ifade edilmektedir [69]. MAO'nun memelilerde monoamin oksidaz A (MAO-A) ve monoamin oksidaz B (MAO-B) olmak üzere iki izoformu tanımlanmıştır [70]. MAO-A ve MAO-B'nin monoamin metabolizmasında dikkate değer ölçüde farklı rolleri olduğu saptanmıştır. MAO-A özellikle bağırsak kanalında, karaciğerde, plasentada ve periferik adrenerjik nöronlarda (adrenal bezler, arteriyel damarlar ve sempatik sinirler); MAO-B ise çoğunlukla beyin, karaciğer ve trombositlerde baskın halde bulunur. Bununla birlikte; belirtilen tüm alanlarda her iki izoenzim tipi de mevcuttur [71-73]. MAO etkisiyle üretilen aldehidler, aldehit dehidrojenaz ve aldehit redüktaz tarafından glikollere ve karboksilik asitlere metabolize edilir. Başlangıçta hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ile birlikte reaktif oksijen üretebilen aldehit oluşumu, MAO ürünlerinin nörotoksik olabileceğini göstermektedir [74]. MAO-B dopaminin parçalanmasında ve aynı zamanda dopamin salınımını uyaran ve nöronal yeniden alınımı inhibe eden endojen bir amin olan feniletik aminin deaminasyonunda rol oynar [71]. İnsan beyninde MAO'nun yaklaşık %75'i B alt tipindedir. MAO-B inhibitörleri, nigrostriatal dopaminerjik yoldaki bazal dopamin seviyesini artırır [73, 75].

Yarım yüzyıldan fazla bir süredir antidepresan ilaçlar olarak kullanılan MAOI'nın, monoaminerjik fonksiyonu arttırdığı ve beyin amin seviyelerini yükselttiği kanıtlanmıştır [76]. Bu durum MAOI'yı; melankolik, atipik ve tedaviye dirençli depresyon, anksiyete, saldırganlık, şizofreni, hiperaktivite, parkinson ve alzheimer dahil olmak üzere ruh hali ve dejeneratif bozuklukları tedavisinde umut vaat eden önemli bir ilaç grubu haline getirmiştir [77-79]. Ayrıca, MAO inhibisyonuyla amin oksidasyonuna eşlik eden amonyak, aldehit ara ürünleri ve  $H_2O_2$  üretiminin azalmasıyla oksidatif stresinin düşürülmesiyle sayısız nöroprotektif/nörokurtarma özelliği raporu; bu gruba olan ilgiyi son yıllarda önemli ölçüde arttırmıştır [80].

Bununla birlikte; tiramince zengin gıdaların (peynir, et) tüketimiyle ortaya çıkan hipertansif kriz riski ve bunun sonucunda da diyet tiramin kısıtlamasını gerektirmesi; aynı zamanda besin ve ilaçlarla toksik etkileşimleri nedeniyle potansiyel ölümcül hipertansif

kriz vakalarına sebep olması yüzünden, klinik kullanımları azalmış durumdadır [81, 82]. Son zamanlarda semptomimetik aminlerin potansiyalizasyonuna MAO-B değil MAO-A inhibitörlerinin neden olduğu ve reversibl MAO-A inhibitörlerinin minimal tiramin reaksiyonuna yol açtığı gerçeğinin anlaşılması, depresyon (reversibl MAO-A inhibitörleri ve yeni dozaj formlu MAO-B inhibitörü) ve parkinson hastalığının (MAO-B inhibitörleri) tedavisinde MAOI'nın güvenli ve etkin kullanımını tekrar gündeme getirmiştir [72, 75, 83]. Depresyon tedavisindeki üstün etkinliklerinden dolayı (diğer tedaviler ile başarısız olma durumunda gösterdikleri etkinlik sayesinde) daha güvenli ve daha iyi tolere edilen (daha selektif ve reversibl) MAOI'ların geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir [81, 84].

MAOI'ların gelişimi, iproniazidin tesadüf eseri antidepresan etkilerinin görülmesiyle (hastalarda erken klinik testler sırasında yan etki olarak bildirilen öfori gelişimi) başlamıştır. MAOI olan iproniazid, orijinal olarak antitüberküloz ajanı olarak sentezlenmiştir. 1952 yılında Zeller vd. tarafından iproniazidin MAO inhibisyon kabiliyetinin olduğunun anlaşılması ve potansiyel MAOI'ların depresyon tedavisinde kullanılabilceğinin öne sürülmesi; ardından fenelzin gibi diğer MAOI'ların keşfinin önünü açmıştır ve bu sayede antidepresanların gelişmesi yolunda büyük bir aşama kaydedilmiştir. 1960'lı yıllarda ise hidrazin türevlerinden fenelzinin ve izokarboksazidinin, nonhidrazin tranilsiprominin antidepresan ilaç olarak yaygın bir şekilde kullanılmasının ardından; iproniazid, 1960'lı yılların başlarında hepatotoksisite raporları nedeniyle piyasadan çekilmiştir [69, 82]. Hidrazin bazlı MAOI ile (seçici olmayan ve irreversible) ilişkili, karaciğer toksisitesi ve "peynir reaksiyonu" gibi bazı önemli advers etkilerin olması; beraberinde yeni araştırmaları, farklı etki mekanizmalarına sahip bazı yeni antidepresanların sentezlenmesi gerekliliğini getirerek ilgiyi yeni kategorilerin keşfine [trisiklik antidepresanlar ve selektif serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) ve advers etki profili düşük seçici MAO-A ve MAO-B inhibitörleri gibi] kaydırmıştır [69, 85].

MAO-A inhibitörleri antidepresanlar ve anksiyolitikler olarak bazı mental hastalıklarda; MAO-B inhibitörleri ise parkinson hastalığının tedavisinde ve aynı zamanda alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili semptomların yönetiminde kullanılmaktadır [70, 82]. MAO-A'nın seçici inhibisyonu, santral sinir sistemindeki nöradrenerjik ve serotonerjik nöronlardaki nörotransmitter miktarını

arttırarak klinik antidepresan etki gösterirken, MAO-B'un inhibisyonu, parkinsonyan beyindeki dopamin miktarını arttırarak antiparkinson etki gösterir [74].

### **2.3.1. MAO İnhibitörleri ile İlişkili Advers Etki Profili**

Birinci nesil MAOI'nın hepatotoksisite, ortostatik hipotansiyon ve en önemlisi, tiramin içeren gıdaların alınmasından sonra ortaya çıkan hipertansif kriz gibi ciddi yan etkileri vardır [73]. Hidrazin bileşiğinden köken alan MAOI, potansiyel hepatotoksindir ve karaciğer hasarı oluşturabilirler. Hidrazinler, P450 tarafından toksik ara ürünlere metabolize edilebilir [36]. Eski bir MAOI olan iproniazid yüksek sıklıkla karaciğer hasarına neden olduğu için piyasadan çekilmiştir. Fenelzinin şiddetli, akut ve kronik hepatik hasara neden olduğu bildirilmiştir [86, 87]. Bir nonhidrazin MAOI olan transililiprominin, hepatik patolojiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir [88].

Karaciğer hasarının spesifik bir serum otoantikoru ile ilişkisinin veya kanda spesifik bir reaktif metabolit saptanması gibi belirteçlerin varlığının son derece nadir olması MAO inhibitörleri için de geçerlidir. Sadece iproniazid için hepatotoksisite, spesifik bir belirteç olan otoantikor antimitokondriyal tip 6 ile ilişkilendirilmiştir [17].

Ortostatik hipotansiyon, sedasyon, baş dönmesi, uyuşukluk, ağız kuruluğu, insomnia ve bulantı oral MAOI'nın en sık bildirilen yan etkileridir. Kilo alımı, ödem, kas ağrısı, miyoklonus, parestezi, seksüel disfonksiyon ve nadiren hepatotoksisite gecikmiş yan etkilerdir. MAO inhibitörlerinin alımından kısa bir süre sonra (30 dakika ila 2 saat) geçici hipertansif ataklar, diyet veya ilaç etkileşimlerinden bağımsız olarak bildirilmiştir [89].

MAO inhibitörlerini içeren toksisiteler arasında başlıca serotonin sendromu ve peynir etkisi vardır:

#### **2.3.1.1. Serotonin sendromu**

Mental durum değişiklikleri, eksitasyon, huzursuzluk, miyoklonus, hiperrefleksi, rabdomiyoliz, böbrek yetmezliği, yayılmış intravasküler pıhtılaşma, diyaforez veya otonomik/nöromusküler hiperaktivite ile karakterize olan yaşamı tehdit edici, ilaca bağlı bir toksidrom olan serotonin sendromu; monoterapide MAOI ile nadir olarak bildirilmiştir. MAOI ile (özellikle MAO-A inhibitörü) serotonin konsantrasyonunu arttıran veya nöronal geri alımını inhibe eden diğer ilaçların (SSRI'lar veya trisiklik antidepresanlar gibi) birlikte kullanımı, serotonin sendromu (beyinde aşırı serotonin

uyarımı) olarak adlandırılan potansiyel olarak tehlikeli bir duruma neden olabilir [75, 90, 91]. Serotonin sendromunun başlangıç belirtileri arasında konfüzyon, huzursuzluk, aşırı terleme, kızarma, titreme ve istemsiz kas gerilmesi sayılabilir ve bu durumu takiben ilaçlar kesilmezse, bireyler yaşamı daha fazla tehdit eden komplikasyonlar geliştirebilir [69]. MAOI kullanan hastalarda serotonin sendromu riski nedeniyle, serotonerjik antidepressanların ve diğer serotonerjik ilaçların kullanımından kaçınılmalıdır [72].

### **2.3.1.2. Tiramin reaksiyonu ve peynir etkisi**

MAOI'nın yan etkileri 1960'ların ortalarında, 40'tan fazla tiramin kaynaklı hipertansif kriz vakası rapor edildiğinde (özellikle tranilsipromin ile) bildirilmiştir. Rapor edilen vakaların birçoğu, tiramince zengin gıdaların MAOI ile birlikte alınmasının ardından gerçekleşmiştir [92].

İnsanlarda MAO-A'nın inhibisyonu; serotonin, noradrenalin ve nihayetinde dopamin konsantrasyonunu yükseltir. Tiramin gibi eksojen vazopresör olan sempatomimetik aminlerin ilk geçiş metabolizmasının MAO tarafından bloke edilmesi; bu aminlerin dolaşım sistemine girmesine, böylelikle kan basıncında ve son organ hasarında ani, dramatik bir artışla karakterize olan hipertansif krize neden olur [84, 93]. Göğüs ağrısı ve sıkışması ile ilişkili olabilen oksipital baş ağrısı, boyunda sertlik veya ağrı, çarpıntı, terleme, bulantı, kusma, dilate pupil, fotofobi, taşikardi veya bradikardi ile karakterize olan hipertansif kriz tablosu, peynir etkisi veya peynir reaksiyonu olarak da adlandırılmaktadır [94, 95]. Bağırsak MAO'sunun %80'i MAO-A olduğundan, bu izoenzim özellikle tiramin degradasyonundan sorumludur ve bu nedenle MAO-A'nın inhibisyonu peynir reaksiyonu ile ilişkilidir [72, 96].

### **2.3.2. MAO inhibitörlerinin sınıflandırılması**

MAOI genel olarak, MAO-A veya MAO-B için seçici veya seçici olup olmamalarına ve etkilerinin reversibl olup olmadığına göre sınıflandırılabilir. Günümüzde hem reversibl hem irreversibl MAOI kullanılmaktadır [75]. Etki mekanizmalarındaki farklılıklara bağlı olarak dört MAOI sınıfı tanımlanmıştır. İlk grup, irreversibl ve seçici olmayan MAOI (fenelzin, tranilsipromin ve izokarboksazid) bileşiklerdir. Bu grup; geri dönüşümsüz enzim inhibitörleri olarak görülmekte, MAO'yu kovalent olarak bağlamakta (14-28 günlük kullanım ömrü boyunca enzime bağlanır) ve MAO fonksiyonunu kalıcı olarak bloke etmektedir. Lokal metabolik aktivitenin geri

kazanılması için yeni enzim sentezlenmesi gerekmektedir [72, 97]. İrreversibl MAOI'nın güçlü antidepresan etkisi olmasına rağmen; klinik kullanımları, diyet aminlerinin kardiyovasküler etkilerini potansiyalize etmesi dolayısıyla sınırlı durumdadır [74].

İkinci tip; MAO-A aktivitesini reversibl ve seçici olarak düşürür. Bu inhibitörler (moklobemid), terapötik dozlarda ilaç etkileşimleri için seçici olmayan MAOI'dan daha düşük bir potansiyele sahiptir; ancak seçici inhibitörler tarafından MAO-A inhibisyonunun süresi (16-24 saat); klasik, seçici olmayan MAOI tarafından indüklenen inhibisyondan (10 günden fazla) daha kısadır [98].

Üçüncü MAOI tipi irrevesibl, seçici MAO-B inhibitörleri (selejilin ve rasajilin) içerirken, son tip reversibl MAO-B inhibitörleridir (safinamid). Genel olarak, yalnızca bir MAO izoformununun blokasyonu, sadece verilen bileşiğin dar bir konsantrasyon aralığında mümkün olmakta; MAO alt tipi inhibisyonunun özgüllüğü daha yüksek dozlarda kaybedilmektedir [99].

#### **2.4. Moklobemid**

Mevcut MAOI'nın güvenlik problemlerini çözmeyi amaçlayan çalışmalar sonucunda, moklobemid gibi daha seçici ve reversibl MAOI geliştirilmiştir [82]. Moklobemid; benzamid türevli, geniş bir spektrumdaki depresif bozuklukların tedavisinde (anksiyete, travma sonrası stres ve panik bozukluklarında) endike olan, kısa etkili, spesifik, halihazırda kullanımı olan tek reversibl MAO-A inhibitörüdür [72]. Aynı zamanda anti-parkinson aktiviteye ve nöroprotektif etkilere de sahip olduğu çalışmalarda bildirilmiştir [100]. Terapötik dozu, 300-600 mg'dır [101]. Beyindeki serotonin ve nöradrenalin konsantrasyonlarını artırır. Hemen hemen tüm meta-analizler ve karşılaştırmalı çalışmalar, depresyonun akut yönetiminde trisiklik veya bazı heterosiklik antidepresanlar ve SSRI'lar kadar etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca ihmal edilebilir düzeydeki antikolinerjik ve antihistaminik etkilerden dolayı tri veya heterosiklik antidepresanlardan daha iyi tolere edilir [17, 69]. Ancak, fenelzin ve tranilsipromin gibi geleneksel MAO inhibitörlerine göre daha az etkili olduğu çalışmalarla gösterilmiştir [89].

Moklobemid hızlı ve neredeyse tamamen gastrointestinal sistemden absorbe edilir. Karaciğerde ilk geçiş metabolizmasına maruz kalır. Bu metabolizmayla, çoklu dozlar sonunda sistemik mevcudiyetinde %85'e kadar artış görülür. Proteinlere sadece %50 oranında bağlanır. Kısa bir plazma eliminasyon yarı ömrüne sahiptir [17]. Morfolin

halkasının C- ve N- oksidasyonu ve aromatik hidroksilasyon ile biyotransforme edilir. İlacın yaklaşık %95'i böbrekler aracılığı ile 24 saat içinde vücuttan atılır [73].

Moklobemid, CYP2C19'un substratıdır. CYP1A2, CYP2C19 ve CYP2D6'nın inhibitörü olmasına rağmen, moklobemidle ilgili az sayıda klinik önemi olan ilaç etkileşimi bildirilmiştir ve bu sayede doz aşımında bile nispeten güvenli olduğu kabul edilir. Renal disfonksiyonu olan hastalar için dozaj modifikasyonları gerekli olmamasına rağmen; şiddetli karaciğer yetmezliği olan hastalar için kullanımından sakınılması gerekmektedir [101].

Moklobemidin plazma konsantrasyonu ve terapötik etkinliği arasındaki ilişki belirgin olmamasına rağmen, advers olaylar ile arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır. Moklobemid ile ilişkili en sık bildirilen yan etkiler; uyku bozuklukları, artmış anksiyete, huzursuzluk ve baş ağrısıdır. SSRI'lar ve trisiklik antidepresanlar ile önemli ölçüde etkileşime girer. Ayrıca moklobemid kullanımı ile ortaya çıkan kardiyak aritmiler ve artmış karaciğer enzim düzeyleri bildirilmiştir [73]. MAO inhibitörlerinin aksine, tiramince zengin gıdaların alınmasından sonra hipertansif krizi tetikleme eğilimi çok düşük olduğundan katı diyet kısıtlamaları gerektirmez [69]. Gastrointestinal yan etkiler ve özellikle de seksüel disfonksiyon SSRI'lara kıyasla moklobemid ile çok daha az oranda görülmektedir. Terapötik dozlarda; psikomotor performans, kognitif fonksiyon veya kardiyovasküler sistem üzerinde önemli negatif etkileri bulunmaması nedeniyle yaşlı hastaların tedavisinde özellikle tercih edilmektedir [101].

## **2.5. Selejilin (l-deprenil, eldepril)**

Selejilin; selektif ve irreversibl bir proparjilamin türevi olarak, parkinsonda en sık kullanılan MAO-B inhibitörüdür [102]. 1972 yılında Knoll ve Magyar tarafından l-amfetamin'den sentezlenmiştir [103]. İnsan beynindeki dopaminin parçalanmasını inhibe eder. Düşük dozlarda parkinson hastalığının tedavisinde L-dopa tedavisini güçlendirmek ve aynı zamanda parkinson öncesi sendromu gösteren hastalarda nöroprotektif etki sağlamak amacıyla kullanılmaktadır [70, 104, 105]. Selejilinin ayrıca fluoksetin ile kombinasyon halinde, Huntington hastalığında yararlı etkiler gösterdiği bildirilmiştir [69].

Ayrıca, selejilin transdermal sistemi (Emsam) majör depresyon tedavisinde 2006 yılında onaylanmış ilk transdermal yamadır. Oral MAOI'nın aksine, günde en düşük 6 mg efektif dozda diyet kısıtlaması olmaksızın kullanılabilir. Transdermal iletimi

nedeniyle, beyinde antidepresan etki sağlarken, bağırsakta MAO-A tarafından diyet tiramin metabolizmasını inhibe etmez ve bu özelliğiyle majör depresif bozukluğun yönetiminde mevcut stratejilere umut verici bir alternatiftir [72].

Yine bu dozlarda (5-10 mg/gün per oral) gastrointestinal MAO-A inhibisyonuna neden olmaz ve diyet kısıtlaması olmaksızın kullanılabilir. Daha yüksek dozlarda (30-60 mg/gün per oral; tedavide kullanılan maksimum doz günde 30 mg'dır) ise, majör depresif bozuklukta etkili olmasına rağmen seçiciliğini kaybeder ve potansiyel olarak tiramin etkileşimlerine neden olarak kardiyovasküler semptomimetik etkinin kuvvetlenmesine neden olabilir [82, 84, 106, 107].

Selejilin hızla ve tamamen gastrointestinal yoldan emilir. Bununla birlikte; oral biyoyararlanım, yaygın hepatik ilk geçiş metabolizmasının bir sonucu olarak sadece %10'dur. Selejilin, R(-)-metamfetaminin proparjil türevidir ve başta CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6 ve CYP3A4 olmak üzere birçok CYP enzimi tarafından; R(-)-metamfetamin, R(-)-amfetamin ve N-desmetilselejiline metabolize edilir [107, 108]. Bu metabolitler ayrıca nörotoksisite ile de ilişkilidir ve semptomimetik aktiviteleriyle kan basıncını ve kalp atım hızını arttırmaları [109]. Selejilin, CYP2D6'nın atipik bir substratıdır ve CYP2B1'i irreversibl olarak inaktive eder [110]. Selejilin plazma eliminasyon yarı ömrü, tek bir dozdan 7 saat sonra gerçekleşir. Yaklaşık %86'sı böbrekler ile vücuttan atılır [73].

Selejilin ile en sık görülen advers olaylar; uykusuzluk, konfüzyon, halüsinasyon, kardiyovasküler yan etkiler, ortostatik hipotansiyon, anoreksiya, bulantı ve baş dönmesidir. Yüksek dozdaki selejilin MAO-B için seçiciliğini yitirir ve MAO-A inhibisyonuna da neden olur; böylelikle tiramin kaynaklı hipertansiyon riski yaratır. Ancak bu potansiyel yan etki klinik çalışmalarda terapötik dozlarda gözlenmemiştir [111]. Bu olumsuz etkilerin yanı sıra, klinik çalışmalarda serum AST ve ALT düzeylerinde artış kaydedilmiştir [73]. Parkinson hastalığında oral selejilin kullanımının gözden geçirildiği literatürde ise, bu ajanla ilgili hepatotoksisite raporlarına rastlanmamıştır ve selejilin hepatotoksisitesinin bulunduğuna dair şu an için herhangi bir kanıt yoktur [14, 17, 31].

## **2.6. Klorjilin**

Klorjilin, 1950'lerde parjilinin sentezlenmesinden sonra May ve Baker tarafından MAO-A'ya selektivite gösteren ilk MAOI olarak geliştirilmiştir [75, 106]. Depresyon,

anksiyete ve diğere duygudurum bozukluklarının tedavisinde kullanılan, seçici irreversibl MAO-A inhibitörüdür [112]. Klorjilin, rasajilin ve selejiline yapısal olarak benzerdir ancak bu bileşiklerden daha etkili bir MAOI'dır. Bu üç bileşiğin hepsi, flavin kofaktörüne kimyasal bağlanmadan sorumlu proparjilamin işlevselliği gösteren, irreversibl bir asetilenik MAOI sınıfına aittir [113]. Klorjilinin, melanoma hücrelerinde *in vitro* apoptozu önlediği ve beyindeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir [114, 115]. Malign olmayan insan hücrelerini iyonlaştırıcı radyasyon ve kemoterapi toksisitesinden koruduğu çeşitli çalışmalarda gözlemlenmiştir ve aynı zamanda kültürlenmiş prostat, meme kanseri ve nöroblastoma hücrelerinde hücre büyümesinde azalmaya neden olduğunu ve antikanser özellik gösterdiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır [116-118]. Fare ve insan sinir hücrelerinde aşırı MAO aktivitesinin inhibe edilmesiyle oksidatif stresin azaldığı ve hücresel canlılığın arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur [112]. Aynı zamanda nöroprotektif özellikte olduğu çalışmalarla rapor edilmiştir [100].

Bununla birlikte; zararlı hipertansif krizlerin varlığı, klorjilin gibi ikinci nesil MAOI'ların kullanımını sınırlamıştır [69]. Klinik çalışmalar norepinefrin, epinefrin, dopamin ve serotoninin beyin seviyelerini arttırdığını ve depresyon tedavisinde etkinliğini bildirmesine rağmen; klorjilin kullanımı, ilaç-diyet etkileşimlerinden kaynaklanan ciddi yan etkiler nedeniyle gölgede kalmıştır [119]. Bu durum klinik faydasını sınırlamasına rağmen; şu anda MAO-A'yı inhibe etmek için prelinik olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [67, 120]. Literatürde bu ajanla ilgili yapılmış herhangi bir hepatotoksisite çalışması mevcut değildir.

## 2.7. Rasajilin

Rasajilin (N-proparjil-1-R-aminoindan), 2001 yılında başka bir proparjilamin bileşiği olarak Youdim vd. tarafından keşfedilmiştir [108]. İyi tolere edilebilen, güçlü, selektif ve irreversibl bir MAO-B inhibitörüdür [71]. MAO izoform aktivitesinin spesifik inhibisyonu, inhibitörün belirli bir konsantrasyon aralığında (1 mg/gün) mümkündür; bu spesifite yüksek dozlarda (2 mg/gün) kaybolur ve MAO-A da inhibe edilir [121]. Parkinson hastalığında monoterapide veya L-dopa'ya ek tedavi olarak geliştirilmiştir. *In vitro* ve *in vivo* olarak nöroprotektif aktiviteye sahiptir [109]. MAO-B selektif dozları, afektif bozuklukların tedavisi için etkili değildir [75]. Fare modellerinde ALS tedavisinde faydalı olduğu bildirilmiştir [122]. Akut ve kronik uygulamada *in vivo* sıçan beyinde ve

karaciğerde, MAO-B'nin inhibisyonu için selejilinden 3 ila 15 kat daha etkili olmasına rağmen; *in vitro* olarak benzer etkilere sahip olduğu belirtilmektedir [108].

Rasajilin, oral uygulamadan sonra iyi absorbe edilir ve kolayca kan-beyin bariyerini geçer. Oral biyoyararlanımı %35'tir ve maksimum konsantrasyona ulaşma süresi ( $T_{max}$ ) 0,5–1 saattir ve bu değer gıda alımı tarafından değişmez. Farklı raporlara göre dağılım hacmi ( $V_d$ ) 87-243 L arasında değişmektedir. Plazma albümin bağlanması %60-70 olarak kabul edilmektedir. Yarılanma ömrü 1,5-3,5 saattir. Başlıca CYP1A2 ile hepatik metabolizmaya uğrar. MAO-B inhibitörlerinin prototipi olan selejilinin aksine, potansiyel olarak toksik amfetamin ürünlerine değil; aminoindana metabolize edilir. İlacın oral klirensi 94,3 L/saattir [102].

Rasajilin tedavisi ile yaygın olarak görülen yan etkiler; baş ağrısı, uykusuzluk, keyifsizlik, senkop, karaciğer fonksiyon bozukluğu, kserostomi, abdominal rahatsızlık, bulantı ve diyare, postüral hipotansiyon, diskinezi, artralji, kilo kaybı, anoreksi, depresyon, kusma, denge bozukluğu ve halüsinasyondur. Ancak tüm bu etkilere rağmen, iyi bir yan etki profiline sahiptir ve iyi tolere edilir. Hipertansif kriz riski tüm MAOI'lar ile mevcut olduğundan, rasajilin ile tedavi edilen hastalarda diyet tiramininin (örneğin; peynir ve şarap) ve sempatomimetik aminlerin (örneğin; fenilefrin) kısıtlanması önerilmektedir. Bununla birlikte, klinik çalışmalar selejilin gibi rasajilinin de terapötik dozajlarda “peynir etkisi” ile ilişkili olmadığını göstermektedir. Hafif karaciğer yetmezliği olan hastalarda rasajilin plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi altında kalan alan (AUC) %80 ve  $C_{max}$  %38 oranında artar. Orta derecede karaciğer yetmezliğinde AUC %568 ve maksimum serum konsantrasyonu ( $C_{max}$ ) %83 oranında artmaktadır. Bu nedenle, orta veya ağır karaciğer yetmezliği olan hastalarda rasajilin tedavisi önerilmemektedir [102, 111]. Literatürde bu ajanla ilgili yapılmış herhangi bir hepatotoksisite çalışması bulunmamaktadır.

## 2.8. Parjilin

Bir başka proparjilamin türevi bileşik olan parjilin; özellikle parkinson hastalığında endike, irreversibl seçici olmayan MAO inhibitörüdür (MAO-A için  $IC_{50}$  0,01152  $\mu\text{mol/L}$ , MAO-B için 0,00820  $\mu\text{mol/L}$ 'dir). Parjilin, serotonin birikimini arttırdığı için, klinik bağlamda depresyon modelleriyle yapılan çalışmalarda kullanılmaktadır. Yapısındaki proparjilamin parçası, nöroprotektif özelliklerde önemli rol oynar [123-125]. *In vivo* deneyler neticesinde mitokondriyal hasara yol açan enerji bozulmasına karşı

nöroprotektif özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir [126]. Parjilinin aynı zamanda çeşitli meme kanseri hücre hatları tarafından oluşturulan tümör büyümesini azalttığı, hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve insan meme kanseri tedavisi için antikanser potansiyele sahip olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur [117, 127]. Tiramin etkisine neden olmaz [128].

Parjilin, hepatic CYP450 enzimleri tarafından yüksek reaktif hepatotoksik ara ürün reaktif  $\alpha$ ,  $\beta$  doymamış aldehit olan propiolaldehite metabolize edilir. Propiolaldehitin, parjilinin toksik etkilerini ortaya çıkaran muhtemel metabolit olduğu düşünülmektedir. Propiolaldehitin dolayısıyla, parjilinin hepatotoksik etkilerinin incelendiği sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada çeşitli parjilin doz aralıklarında, sıçanların GSH seviyelerinin ciddi şekilde tükendiği, serum transferazlarının ve karaciğerin vücut ağırlığına oranının doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde arttığı, ışık mikroskopisi ile incelenen histolojik bölümlerinde yüksek dozda önemli nekroz ortaya çıktığı belirtilmiştir. Çalışmada parjilinin yüksek dozlarda hepatotoksik potansiyele sahip olabileceği ve santrilobüler nekrozun gösterdiği toksisiteye, parjilinin reaktif metaboliti propiolaldehitin aracılık ettiği belirtilmektedir [129].

## 2.9. Safinamid

Oral olarak aktif bir alfa-aminoamid türevi olan, erken evre parkinson hastalığında dopamin agonistlerine, orta ve geç evre parkinson hastalığında levodopaya ek tedavi olarak etkili; hem dopaminerjik hem de nondopaminerjik etki mekanizmalarına sahip; bu sayede motor semptomlarda ve bazı motor olmayan semptomlarda iyileşmeler sağlayabilen, faz III klinik deneme aşamasında olan, güçlü, reversibl ve yüksek düzeyde seçici yeni bir MAO-B inhibitörüdür [130, 131]. Tüm bu özellikleriyle çoklu etkilere sahip tek reversibl MAO-B inhibitörü olma özelliğini taşır [132, 133]. Dopaminerjik etkisi; güçlü MAO-B inhibisyonu ile beyin dopamin konsantrasyonunun artmasına neden olur. Safinamid, aynı zamanda sodyum kanalı antagonisti ve glutamat salınımı inhibitörüdür [105]. MAO inhibisyonuna ek olarak dopaminerjik olmayan etkisini, voltaja duyarlı sodyum ve N tipi kalsiyum kanalları üzerindeki sırasıyla blokaj ve modülasyon etkileriyle glutamat salınımının inhibisyonuyla gösterir. MAO-A'yı etkilemeden gösterdiği MAO-B inhibitör aktivitesi, parkinson hastalığında dopamin biyoaktivasyonunu önlediği için önemlidir [74]. Çeşitli hayvan modellerinde glutamaterjik nöronları *in vitro* inhibe etme kabiliyeti sayesinde güçlü nöroprotektif ve

antikonvulsan aktivite gösterdiği, parkinson hastalığının erken döneminde motor fonksiyonlarını iyileştirdiği ve bilişsel gelişme sağladığı çalışmalarla bildirilmiştir [119, 134]. Klinik çalışmalar güvenli, iyi tolere edilebilir özellikte, eşsiz ve çeşitli farmakolojik bir profile sahip olduğunu ve bu nedenle parkinson tedavisi için umut verici yeni bir ajan olduğunu göstermektedir [133].

Günde bir kez 50-100 mg oral dozda uygulanır, suda çözünür, doza bağımlı, terapötik doz aralığında dozajla orantılı lineer farmakokinetik profil gösterir ve böylelikle enteral emilimi, doğrusal ve uygulanan dozla orantılıdır [105]. Yaygın olarak biyotransforme edilir ve %95 oranında yüksek bir mutlak biyoyararlanıma sahiptir. Oral dozda 1,8-2,8 saatte pik plazma konsantrasyonuna ulaşarak hızla absorbe edilir ve kararlı durumda herhangi bir birikme yapmaz. İnsanlarda eliminasyon yarı ömrü 21-24 saattir ve total klirensi 4,6 L/s'tir [133]. Plazma proteinlerine %92 oranında bağlanır ve sadece küçük bir kısmı (sırasıyla idrar ve dışkıdan %7 ve %1,5 oranında) değişmeden atılır. Dağılım hacmi yaklaşık 165 L'dir, bu değer vücut hacminin 2,5 katıdır ve safinamidin geniş kapsamlı ekstravasküler dağılımının göstergesidir. Metabolizması ağırlıklı olarak iki ana yoldan oluşur. Potansiyel olarak CYP 3A4 ve 2C19 enzimlerini, MAO-A'yı ve aldehit dehidrogenaz (ALDH)'ı içeren bu karmaşık ve çok aşamalı süreç sonunda safinamidin ana dolaşımdaki plazma metabolitini temsil eden NW-1689 olarak adlandırılan bir karboksilik asit metaboliti ve safinamid asit oluşur. Sıçan beynindeki MAO-B inhibisyonu için IC<sub>50</sub> seviyesi 0,098 uM'dır. İnsan trombositlerinde MAO-B için IC<sub>50</sub> 0,009 uM'dır. Sıçanlarda yapılan çalışmalar MAO-B için MAO-A'ya göre 5000 kat, insanlarda ise 1000 kat daha seçici olduğunu göstermiştir. Bu seçiciliği sayesinde, yüksek dozlarda bile tiramin ilişkili hipertansiyon riski düşüktür, peynir reaksiyonunu indüklemeyen ve kayda değer bir gıda etkisi bulunmamaktadır [135]. *In vitro* deneyler CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYD2E1 ve CYP3A4 tarafından kontrol edilen oksidatif metabolik yollarla ilgili herhangi bir etkileşime neden olmadığını göstermektedir [133].

Bildirilen advers etkileri arasında bulantı, baş dönmesi, düşme, uyku hali, baş ağrısı, sırt ağrısı, idrar yolu enfeksiyonları ve geçici hafif diskinezi bulunmaktadır [105].

Safinamid ile tedavi edilen sağlıklı gönüllüler ve placebo grubunun vital bulgular, kan/idrar biyokimyasal analizler ve advers etkiler yönünden karşılaştırıldığı çalışmada; iki grup arasında sadece bir olguda zaman zaman gözlenen, tamamen geri dönüşümlü olan ALT artışının dışında, klinik olarak anlamlı herhangi bir fark bulunmadığı

gösterilmiştir ve böylece safinamidin güvenli ve iyi tolere edilen bir ilaç profili sergilediği kabul edilmiştir [136].

Parkinson tedavisinde rasajilinin kullanımının ardından, Profesör Moussa Youdim vd. tarafından proprajilamin farmakoforu temel alınarak, spesifik farmakolojik etkilere sahip, içerisinde ladostigil ve M30'un da bulunduğu yeni bileşiklerin üretimi için çalışmalar başlamıştır [103].

## 2.10. Ladostigil

Ladostigil (TV-3326), MAO-B inhibitörü rasajilin ve karbamat kolinesteraz inhibitörü rivastigminin bir kombinasyonudur. Böylelikle, asetilkolinesteraz/MAO'yu birlikte inhibe eder ve nöroprotektif özellik gösterir [137]. Bu bileşik MAO-A ve MAO-B'ye karşı yaklaşık olarak benzer aktivite gösterir ve santral sinir sistemi için seçiciliğe sahiptir. Periferik dokularda düşük MAO inhibisyonu sayesinde; tavşanlarda yapılmış çalışmalarda önemli tiramin potansiyeline neden olmadığı gösterilmiştir [138]. MAO-A ve MAO-B'nin neredeyse tamamının inhibisyonuna neden olan 52 mg/kg gibi yüksek bir dozda, sıçanlarda dopaminin striatal seviyelerini arttırdığı ve bu dozda sıçanlarda beyin MAO'sunun yüksek derecede inhibisyonu ile davranışsal hiperaktiviteyi inhibe ettiği gösterilmiştir. Ladostigil'in, ana bileşik olan proprajilamin türevli rasajilinde gözlenen nöroprotektif ve antiapoptotik özellikleri de koruduğu çalışmalarla gösterilmiştir [139]. Ladostigil, şu anda demans ile birlikte parkinsonizm tedavisi için geliştirilme aşamasındadır [140]. Literatürde bu ajanla ilgili yapılmış herhangi bir hepatotoksisite çalışması mevcut değildir.

## 2.11. M30

M30 (5-[N-metil-N-proprajilaminometil]-8-hidroksikinolin), 8-hidroksikinolinine bir proprajil grubu ilave edilerek sentezlenen, *in vitro* olarak ladostigilden daha güçlü beyin selektif irreversible MAO-A ve MAO-B inhibitör aktivitesine ve ayrıca demir şelasyon özelliğine sahip lipofilik bir moleküldür [103, 141]. Karaciğer ve ince bağırsak gibi periferik MAO enzim aktiviteleri üzerine etkileri çok düşük düzeydedir [142]. M30, ayrıca tiraminin kardiyovasküler etkisini güçlendirmeyerek peynir etkisine neden olmaz [119]. IC<sub>50</sub> değeri MAO-A için 0,037 ± 0,02; MAO-B için 0,057 ± 0,01'dir. M30 ile akut ve kronik tedavide; dopamin, serotonin ve noradrenalin düzeylerinin arttığı çalışmalarda gösterilmiştir. Bu nedenle, diğer seçici olmayan MAO-A ve MAO-B ve seçici MAO-A

inhibitörlerine benzer şekilde antidepresan aktiviteye sahip olduğu çalışmalarda vurgulanmaktadır. Dopamin ise eşit olarak MAO-A ve MAO-B ile metabolize edildiğinden, geliştirilmekte olan beyin dopaminini değiştirmeyen seçici MAO-B inhibitörlerine kıyasla daha yüksek bir dopamin nörotransmisyon potansiyeline sahip olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmektedir [143-145]. Parkinson hastalığında gangliyonlarda ve diğer bazı nörodejeneratif hastalıklarda yüksek düzeyde seyreden demir düzeyleri için, molekülün sahip olduğu demir şelasyon özelliği, nöroprotektif etkisi sayesinde potansiyel kullanım için umut verici bir strateji olarak görülmektedir [146]. Ayrıca, çalışmalar M30'un insülin üreten beta-hücrelerinde oksidatif stres ile indüklenmiş sitotoksositeye karşı önemli bir sitoprotektif etkinlik sergilediğini ve bu durumun diyabetes mellitus tedavisinde terapötik kullanım için faydalı olabileceğini göstermektedir [147]. Literatürde bu ajanla ilgili yapılmış herhangi bir hepatotoksosite çalışması bulunmamaktadır.

## **2.12. Hepatotoksisitenin Biyogöstergeleri**

Biyolojik belirteçler (biyobelirteçler, biyogöstergeler); hayvanlarda veya insanlarda fizyolojik, farmakolojik veya hastalık süreçlerini yansıtan; ölçülebilir özellikler olarak tanımlanmaktadır. Biyobelirteçler toksikolojide; zararlı bir maddeye maruziyeti doğrulamak, toksikanta karşı bireysel duyarlılığı ve tedavi etkinliğini izlemek ve toksikantın organizmaya zararlı etkilerini kantitatif olarak değerlendirmek için kullanılır. Karaciğer, ilaçların ve diğer kimyasalların advers etkileri için genel bir hedef olduğu için; ksenobiyotiklere karşı istenmeyen karaciğer yanıtının biyobelirteçleri özellikle önemlidir [15].

Karaciğer hasarı biyogöstergelerinin ideal özellikleri arasında karaciğer için organ spesifitesi, histopatoloji ile güçlü bir korelasyon, serum transaminazlarının performansı veya ALT ve/veya AST ile ölçüldüğünde karaciğer toksisitesi hakkında ek bilgi sağlama yeteneği, tarama testlerinin ticari olarak temin edilebilen yüksek verimli yöntemlere uyarlanabilirliği, serum veya idrar gibi kolayca toplanan biyosıvılarda bulunabilirliği ve prelinik türlerden insanlara translasyonu yer almaktadır [148].

Hali hazırda kullanılan biyobelirteç paradigması, hasarı oluştuktan sonra tespit eder ve sınırlı prognostik değere sahiptir. Hayvan çalışmaları ve geleneksel klinik patoloji ölçümlerini kullanan ilaç adaylarının prelinik değerlendirmesinin, insanlarda potansiyel olarak hepatotoksik bileşiklerin %40'ına kadarını tespit etmediği tahmin edilmektedir

[149]. Omik yöntemler ise; hepatotoksisite için istenen özgünlüğe sahip ve potansiyel olarak mevcut serum belirteçlerinden daha erken bir hasarı gösteren yeni prognostik biyobelirteçleri belirlemek; karaciğere özgü translasyonel tanı sağlamak ve yeni toksik yolları ortaya çıkarmak için çok uygundur. Toksikogenomik, proteomik ve metabolomik dahil olmak üzere omik teknolojideki gelişmeler; ilacın karaciğer üzerindeki potansiyel advers etkilerinin erken teşhisi için hepatotoksisite paternlerinin tanımlanmasında, yeni biyokimyasal yolları ve hepatotoksisite biyobelirteçlerini ortaya çıkarmada çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu teknolojiler, prelinik hayvan çalışmalarında ve idrar ve serum gibi kolayca elde edilen biyosıvılardaki hepatotoksisite belirteçleri için klinik çalışmalarda kullanılmaktadır [150-152].

Değişmiş karaciğer fonksiyonunu gösteren konvensiyonel biyobelirteçler arasında; hepatoselüler hasarın [ALT, AST, glutamat dehidrogenaz (GLDH), total safra asitleri] veya hepatobiliyer yaralanmanın [gama-glutamil transpeptidaz (GGT), ALP, 5'-nükleotidaz (5'-NT), TBILI veya total safra asitleri) göstergeleridir. Ek testler albümin, total protein, trigliserit ve pıhtılaşma ölçüm testlerini içerebilir [15, 153].

Serum hepatik sızıntı enzimleri; ALT, AST, sorbital dehidrogenaz (SDH) ve GLDH'ı içerir. ALT, AST, GLDH ve SDH hepatosit sitoplazmasında bulunurken; GLDH ve AST'nin bazı bileşenleri mitokondri içerisinde de bulunur. Hepatosit hasarına bağlı hepatoselüler ve mitokondriyal membranların membran bütünlüğünün değişmesi, bu enzimlerin periferik kan içine sızmasına ve böylelikle kandaki enzim düzeylerinin yükselmesine yol açar [15, 154]. Plazma enzim aktivitesindeki artışın büyüklüğü ve süresi; normal doku aktivitesine, hücresel lokasyona, plazmadan çıkış oranına ve tipine ve hasarın ciddiyetine ve süresine bağlıdır [155].

### **2.12.1. Hepatoselüler hasar göstergeleri: ALT ve AST**

ALT aktivitesi, hepatoselüler hasar için en sık kullanılan biyobelirteçtir ve karaciğer hasarının saptanması için klinik altın standarttır [156]. Amino asit metabolizmasında ve glukoneogenezde önemli bir rol oynar [157]. ALT; esas olarak karaciğerde lokalize olup, iskelet kası ve kalp dokusunda düşük aktiviteye sahiptir. Karaciğer, kas ve kırmızı kan hücreleri gibi çeşitli dokularda daha yüksek seviyelerde bulunan AST'ye kıyasla daha spesifik ve duyarlı bir hepatoselüler hasar göstergesi olarak kabul edilir [155]. Hepatoselüler hasara bağlı olarak her iki enzim düzeyi artmasına rağmen ALT artışı; ALT'nin uzun yarılanma ömrü (ALT 40-60 saat, AST 12 saat) ve

AST'nin mitokondriye bağılı oranın (ALT sitozolik, AST hem sitozolik hem de mitokondriyal lokasyon) daha yüksek olması nedeniyle genellikle AST'den daha büyüktür ve ölçümü potansiyel olarak daha güvenilirdir [158].

Spesifik olarak, ALT aktivitesindeki >2xULN düzeyindeki artışlar, hepatoselüler hasarın göstergesi olarak kabul edilirken; ALT aktivitesindeki >3xULN ve TBILI konsantrasyonunda >2xULN düzeyindeki artış daha ciddi ve potansiyel olarak yaşamı tehdit eden hepatoselüler hasar durumunu göstermektedir [158].

### **2.12.2. Hepatoselüler hasarın ek göstergeleri: SDH ve GLDH**

SDH; sorbitol, fruktoz ve nikotinamid adenin dinükleotit (NADH)'in reversibil oksidasyon-redüksiyonunu katalize eder. Başlıca karaciğer, böbrek ve seminal veziküllerin sitoplazması ve mitokondrilerinde bulunmasına rağmen diğer dokularda da yaygın olarak bulunur. Kemirgenlerde akut hepatoselüler hasarın spesifik bir göstergesi olarak ve aynı zamanda insanlarda da önemli bir biyogösterge olarak kabul edilir [157].

GLDH, karaciğer hasarının ve toksisitesinin öngörülmesinde duyarlı bir enzimatik serum biyobelirteçidir. GLDH mitokondride bulunur ve glutamatın oksidatif deaminasyonunda rol oynar. İnsanlarda böbrekte de eksprese edilmesine rağmen esas olarak karaciğerde bulunur ve böylece serum aktivitesi hemen hemen sadece karaciğerden kaynaklanır. ALT'ye benzer şekilde, aktivitesi hepatoselüler hasarla artar. Serum GLDH aktivitesi karaciğere, transaminazlardan daha özgüdür ve iskelet kası hasarından büyük ölçüde etkilenmez [156, 159].

Serum SDH ve GLDH aktivitelerinin karaciğer hasarı için spesifik olduğu gösterilmiştir ancak uygun standartlaştırılmış reaktiflerin eksikliği nedeniyle hepatik hasarı değerlendirmek için yaygın ve rutin olarak kullanılmamaktadır [158].

Laktat dehidrogenaz (LDH) ve ornitin karbamiltransferaz (OCT); hepatoselüler toksisitenin potansiyel göstergeleri olarak kullanımı için literatürde zaman zaman karşılaşılan diğer sızdırma enzimleridir; ancak bu enzimlerin hepatik özgüllüğü tartışmalıdır ve bu nedenle rutin olarak kullanılmamaktadır [155].

### **2.12.3. Hepatobiliyer hasarın göstergeleri: ALP, GGT, 5'-NT ve TBILI**

Hepatobiliyer fonksiyonu değerlendirmek için yapılan testler, karaciğer sentetik kapasitesini ve hepatoselüler alımı; metabolik işlem ve atılımının ölçümünü yapan testler

olarak sınıflandırılır. ALP, GGT ve 5'-NT hepatobiliyer kökenli kolestatik-indüksiyon enzimleri olarak kabul edilir [155].

ALP ve GGT, bozulmuş safra akımını (kolestaz) tespit etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır [155].

ALP, özellikle hepatositler olmak üzere çoklu dokularda hücre zarlarıyla ilişkilidir. Monofosfatazları alkali pH'ta hidrolize eder. Öncelikle hepatobiliyer etkilerin ve kolestazın bir göstergesidir [157]. İnsanlarda, serum ALP aktivitesi kolestaz ile artar fakat genel olarak <3xULN düzeyinde kalır [158].

GGT, serum aktivitesi kolestatik karaciğer hastalığında artan kanaliküler bir enzimdir. Karaciğere, böbreğe ve pankreas dokularına lokalizedir; ancak karaciğerdeki enzim konsantrasyonu böbreğe göre düşüktür [157]. Dolaşımdaki GGT aktivitesindeki artışlar safra akışı ve biliyer epitelyal nekrozdan kaynaklanabilir [158]. Kandaki serum GGT aktivitesinin çoğu karaciğere aittir ve bu nedenle tanısal olarak önemli bir enzimdir [154]. GGT aktivitesi, özellikle kolestaz ve safra etkileri olmak üzere hepatobiliyer yaralanmanın belirteçidir ve yüksek hassasiyet göstermektedir [157].

Bahsi geçen kolestatik enzimlere ek olarak kolestazı tespit etmek için TBILI de kullanılabilir [154].

TBILI, indirekt (nonhepatik) ve direkt (hepatik) bilirubin bileşimidir. Hemoglobin degradasyonunun bu ürünü, özellikle kolestaz ve safra etkileriyle birlikte hepatobiliyer yaralanmanın belirteçidir [160]. Serum TBILI konsantrasyonundaki artışlar genellikle safra retansiyonunun sonucudur ve intrahepatik veya ekstrahepatik safra akımının bozulmasının ve artmış eritrosit tahribatı veya değişmiş bilirubin metabolizması ile ilişkili artan üretimin ardından ortaya çıkmaktadır [158]. Bilirubin, karaciğer hasarı için oldukça spesifik olmasına rağmen düşük hassasiyete sahiptir ve karaciğerin ekskretuar kapasitesinin yaklaşık yarısı kaybedildikten sonra önemli düzeyde artmaktadır [156].

#### **2.12.4. Karaciğer fonksiyon parametreleri**

Karaciğer fonksiyon belirteçleri, hepatik sentetik ve sekretuar aktivitelerin periferal göstergelerini, enterohepatik fonksiyonu veya karaciğer alımını ve dolaşımdaki biyomoleküllerin atılımını ifade eder [15]. Karaciğer sentez kapasitesinin azalmasını tespit edebilen karaciğer fonksiyon testleri arasında albümin, glikoz, koagülasyon faktörleri, amonyak ve üre nitrojen bulunur [155]. Total protein, albümin, trigliseritler,

kolesterol, glikoz, üre, aktive parsiyel tromboplastin zamanı ve protrombin zamanı hepatik sentetik fonksiyonun ek göstergeleri olarak kabul edilir. Bu analizlerin sentezi için çok büyük düzeyde rezerv kapasitesi olduğundan; bu parametrelerin kandaki değişiklikleri genellikle karaciğer fonksiyonunda önemli bir kayıp (>%70-80) olduğunda kendini gösterir [14]. Serum albümin seviyesinde veya protrombin zamanındaki değişiklik, karaciğer fonksiyonundaki azalma ile ilişkili olabilmesine rağmen karaciğer hastalığına özgü değildir [161].

Safra asitleri, fonksiyonel olarak katabolizmaya ve kolesterol eliminasyonuna katkıda bulunur; temelde pankreatik sekresyonları düzenler, gastrointestinal peptitlerin salınımını ve ince bağırsakta yağın (ve dolaylı olarak yağda çözünen vitaminlerin) sindirilmesine ve emilmesine yardımcı olur. Safra asidi homeostazının bozulması; İİKH'nin erken bir göstergesidir ve karaciğer hasarı ve fonksiyonel değişimi ile artmaktadır. Dolaşımdaki seçilmiş safra asitleri, potansiyel olarak hassas ve erken İİKH prelinik biyobelirteçleri olarak kullanılabilir [162].

Serum F proteini (HPD), karaciğer hasarını gösteren bir başka duyarlı ve spesifik biyobelirteçtir [156]. Tirozin katabolizmasında anahtar bir enzim olan 4-hidroksifenil piruvat dioksijenaz olarak tanımlanmıştır. Sağlıklı bireylerde, düşük serum konsantrasyonlarında bulunur ve esas olarak karaciğerde, daha az miktarda böbreklerde üretilir. Hepatoselüler hasarlı hastaların serumlarında ise yüksek düzeyde bulunur. Bazı çalışmalar, konvensiyonel karaciğer fonksiyon testlerinden (AST, ALP, GGT aktiviteleri) daha duyarlı ve spesifik bir karaciğer hasarı göstergesi ve karaciğer hasarının histolojik değerlendirmesiyle yakın ilişkili olduğunu göstermektedir [157].

Glutatyon-S-transferaz alfa (GST $\alpha$ ) plazma seviyeleri de karaciğer hasarının biyogöstergesi olarak kullanılabilir. Ekspresyonu karaciğer ve böbrek ile sınırlıdır, karaciğerde sentrilobüler hücrelerde yüksek bir konsantrasyona sahiptir. Bu nedenle, karaciğer hasarına özgü bir belirteç olarak kullanılma ihtimali yüksektir [156]. GST'ler, GSH metabolizmasının I. fazı sırasında oluşan reaktif metabolitlerle konjugasyonunu katalize eden, indüklenebilir faz II detoksifikasyon enzimleridir. Bu etki toksisiteyi azaltır ve idrar atılımını kolaylaştırır [157, 163].

Arginaz, arginini üre ve ornitine katalize eden bir hidrolazdır. Serum arginaz I, karaciğere yüksek düzeyde özgüdür ve bu özelliğiyle diğer karaciğer enzimlerine kıyasla daha yüksek prelinik hassasiyet gösterir ancak pratikte prelinik arginaz I tahlili mevcut değildir [157, 164].

### 2.13. *In Vitro* Hepatotoksisitenin İncelenmesi ve Önemi

Karaciğer, sistemik dolaşımdaki doğal ve sentetik bileşiklerin detoksifikasyonunda primer göreve sahiptir. Diğer biyolojik ve fizyolojik fonksiyonları arasında albümin, safra tuzları ve kolesterol gibi kritik kan ve safra bileşenlerinin üretimi ve salgılanması yer alır. Ayrıca protein, steroid ve yağ metabolizmasının yanı sıra vitamin, demir ve şeker depolamasında da görev alır. Parankimal hücreler veya hepatositler, karaciğere atfedilen fonksiyonların çoğunu yerine getiren, oldukça farklılaşmış epitelyal hücrelerdir. Hepatositler, iki farklı membranın korumasında yüksek derecede polarize edilmiş hücrelerdir. Sinüsoidal ve kanaliküler membran alanları sıkı bağlantılarla ayrılır; önemli ölçüde yapısal, bileşimsel ve fonksiyonel farklılıklar gösterir. Polarize hücre ve membran yapısının korunması, normal safra atılımını ve ksenobiyotik eliminasyonu sağlamak için gereklidir [45, 165].

İlaç endüstrisi için daha az advers etkiye, öngörülebilir farmakokinetik özelliklere ve ölçülebilir ilaç-ilaç etkileşimleri ile daha güvenli ilaçları üretme temel amaçlardan olduğundan; potansiyel hepatotoksisitenin değerlendirilmesi yeni ilaçların geliştirilmesinde kritik bir adımdır. Bileşik optimizasyonu, ilaç geliştirme aşamasında önemli bir aşamadır ve insan *in vivo* toksisitesini yansıtan *in vitro* tarama sistemlerinin oluşturulması, erken güvenlik değerlendirmesi için gereklilik arz eder. İnsan hücrel modelleri, ilaca bağlı karaciğer hasarını ve altta yatan yatkınlığın moleküler ve hücrel süreçlerini anlamak için değerli araçlar oluşturur [43].

Pek çok prelinik aday bileşik, organ toksisitesini indüklemesi nedeniyle Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) gibi düzenleyici kuruluşlar tarafından onay alamaz [158]. Organ toksisitesi yüzünden çalışmalarını sonlandıran prelinik aday bileşiklerin yarısından fazlası; nekroz, steatoz, kolestatik, proliferasyon, enflamasyon ve safra kanalı hiperplazisi dahil olmak üzere hepatotoksik etkiler göstermektedir. Yeni terapötiklerin insanlarda karaciğer hasarına yol açma potansiyelinin değerlendirilmesi, prelinik türlerde hepatotoksisitenin histomorfolojik ve klinik patolojik uç noktalarının kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesine dayanmaktadır. Ayrıca tahminler; mevcut klinik öncesi test rejimlerinin, klinik çalışmaların yapıldığı vakaların sadece %50'siyle hepatik advers olaylar yönünden ilişkili olduğunu göstermektedir [157].

Ulusal Araştırma Konseyi (NRC) tarafından 2007 yılında yayımlanan, "21. Yüzyılda Toksikite Testi: Bir Vizyon ve Strateji" başlıklı raporu, *in vivo* toksikolojik çalışmalar yerine *in vitro* sistemlerin kullanımını desteklemekte ve *in vivo* araştırmalara

alternatif stratejiler geliştirmeyi sağlamaktadır. Raporda *in vivo* alışmaların; insanların maruz kaldığı kimyasalların çok daha dūřuk konsantrasyonlarını ve bileşimlerini değerlendiremediği, etki mekanizmalarına ilişkin yeterli bilgi sağlamadığı, yanıtlarda ve duyarlılıkta kişiler arası değişkenliği açıklayamadığı belirtilmektedir. Raporda ayrıca, *in vitro* alışmanın; hūcrenel yanıt ağlarını, toksisite yollarını, etki mekanizmalarını açığa çıkarabildiği; yūksok hızlı çalışmalara ve genom temelli araştırmalara olanak sağladığı, doz-yanıt ilişkilerini geliştirdiği, *in vivo* alışmadan çok daha fazla konsantrasyonların değerlendirebildiği, farmakokinetik ve dinamik modellerin ūretimi için bilgi sağladığı vurgulanmaktadır [166].

Preklinik tūrler ile dięer dokuları etkileyen insan toksisiteleri arasındaki yūksok korelasyonun aksine; hepatotoksisite hayvan çalıřmaları ile dūřuk bir uyum gōstermektedir. Toksisite testlerinde *in vitro* modellerin kullanılması; hayvan sayısında azalma, hayvan idame ve bakım maliyetlerinin azaltılması, test için gerekli kimyasalların dūřuk miktarı, ihtiyaç duyulan sūrenin kısaltılması, hepatik olmayan faktōrlerin etkisi olmaksızın kesin olarak kontrol edilen bir ortamda spesifik parametrelerin arařtırılması ve çoklu kimyasalları ve metabolitlerini deęerlendirmedeki verimde artıř dahil olmak ūzere birçok avantaja sahiptir. *Īn vitro* sistemler ayrıca arařtırmacıların kimyasal metabolizmayı incelemeleri, toksisite mekanizmalarını deęerlendirmeleri, enzim kinetiklerini ūlmeleri ve doz-cevap iliřkilerini incelemelerini saęlar [166, 167]. *Īn vitro* veriler, geleneksel *in vivo* yōntemlerle kombinasyon halinde yeni bileřiklerin gūvenlik/risk potansiyelini tahmin etmek ve optimizasyon ve klinik izlemede ūneriler ūretmek için kullanılabilir. *Īn vitro* sistemlerin basitlięi, etik kabullerini arttırır ve verilerin daha kolay analiz edilmesine ve yorumlanmasına olanak saęlar; ancak sonuçların uygunluęunu ve dūzenleyici otoriteler tarafından kabul edilebilirlięini azaltır [168].

Tarihsel olarak, toksisite testinin amacı; basit sitotoksisite analizleri (canlı/ūlū boyalar, LDH sızıntısı, adozin trifosfat, MTT kullanarak HepG2, HepaRG veya kemirgen primer hepatositleri gibi belirlenmiř hūcre hatlarında akut toksinleri ve ilaçları basitçe deęerlendirmektedir. İKH'nin birçok formu, insan spesifik metabolizması tarafından ūretilen reaktif metabolitlerden kaynaklandıęı için; çalıřmaların metabolik açıdan yetkin insan hepatositleri ve parankimal olmayan hūcrelerle yapılması önemlidir. Bu yaklařım, genel olarak ilgili faz I metabolik aktivitesi, faz II konjugasyonu, ilaç klirensi ile ilgili tařıyıcı fonksiyonları eksik olan insan hūcre hatlarını veya farklı

metabolik ilaç klirensi yollarına sahip olabilen kemirgen primer hepatositlerinin kullanımını ekarte etmektedir [169].

Hassas kesilmiş karaciğer dilimleri, izole edilmiş ve kültürlenmiş hepatositler, ölümsüzleştirilmiş hücre hatları ve hepatik hücre dizileri olmak üzere karaciğer kaynaklı *in vitro* sistemler, *in vivo* hepatotoksisiteye vekil modeller olarak; kimyasalların ve ilaçların potansiyel advers etkilerinin araştırılmasını sağlamak ve hepatotoksisite ile ilgili mekanizmaları tanımlamak için yaygın olarak kullanılan en önemli sistemlerdir. Dokular, hücresel ve hücre içi preparatlar, hepatotoksisite çalışmaları için uygulanmakta olup her biri belirli avantajları ve kısıtlamaları barındırmaktadır. Her iki modelde de sınırlamalar olmasına rağmen; ölümsüzleştirilmiş hücre hatları ve izole primer insan hepatositleri, karaciğer toksisitesi testleri içinde şu anda en yaygın kullanılan *in vitro* modellerdir [170].

## **2.14. *In Vitro* Toksikite Değerlendirmesinde Kullanılan Yöntemler**

### **2.14.1. Sitotoksisite değerlendirme**

*In vitro* toksisite testleri incelendiğinde en geçerli olanlarından ilki sitotoksisite testleridir. Bu testler diğer ileri düzeyde mekanistik yaklaşımlara temel oluşturmaktadır ve yeni bileşikler karşılaştırmak için yararlı bir araçtır [171]. Sitotoksisite, çok bölmeli plakaların (96, 384 ve 1536 yuvalı) kullanımıyla çeşitli hücre tiplerinde kolaylıkla ölçülebilir. Sitotoksik etki mekanizması çeşitli son noktaların kullanımıyla değerlendirilebilir. Örneğin; MTT metabolizması ve hücre ATP içeriği, mitokondriyal bozulmadan kaynaklanan sitotoksisiteyi ölçmek için; plazma membran hasarı için LDH, AST ve ALT gibi sitoplazmik enzimler; apoptoz için kaspaz aktivasyonu ve reaktif metabolitlerin oluşumu için hücre indirgenmiş GSH kullanılır. Bu son noktaların yüksek içerikli çoklu parametre sitotoksisite analizleriyle kombinasyon halinde kullanılmasının toksisite tahmininin doğruluğunu arttırdığı çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir [172, 173].

MTT testi, sitotoksisitenin değerlendirilmesinde standart ve güvenilir bir yöntem olarak önem taşımaktadır. Yaygın olarak kullanılan diğer sitotoksite testleri ise nötral kırmızı, propidiyum iyodür (PI) testi, membran bütünlüğü/LDH salınımı, GSH tükenmesi ve tripan mavi testidir [174, 175].

## **2.15. Hücresel Ölüm Çeşitlerinin Belirlenmesi**

Çok hücreli organizmalarda homeostaz, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki denge ile sağlanır. Ölüm türünden bağımsız olarak *in vivo* hücre ölümü, fagositik kapasiteyi aşmadığı ya da fagositozun deregülasyonu ya da işlevsel olmadığı zaman aralığı boyunca genellikle tespit edilmeden kalır. Literatürde hücre ölümünün apoptoz (tip I), otofaji (tip II) ile ilişkili hücre ölümü ve nekroz (tip III) olmak üzere üç ana morfolojisi tanımlanmıştır [176]. Hücre ölümlerini tanımlamak ve birbirinden ayırt etmek için çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bu teknikler; (1) morfoloji (hızlandırılmış ve transmisyon elektron mikroskobu ve akış fluorositometrisi); (2) hücre yüzeyi belirteçleri (akış fluorositometrisi ile membran geçirgenliğine karşı fosfatidilserin maruziyeti); (3) hücre içi belirteçler (akış fluorositometrisi ile oligonükleozomal DNA fragmentasyonu, kaspaz aktivasyonu, Western blotting ile sitokrom c salımı); (4) hücre dışı belirteçlerin süpernatant içinde salınımı (kaspazlar, yüksek mobilite grubu protein 1 ve sitokeratin 18) başlıca olmak üzere çeşitli hücre ölüm parametrelerine dayanmaktadır [177].

Apoptoz; çok hücreli organizmalarda gelişim sırasında gereksiz hücrelerin atılması ve doku homeostazının korunmasında (enfekte olmuş ve hasar görmüş hücrelerin yok edilmesi için) önemli rol oynayan bir programlanmış hücre ölümü şeklidir. Moleküler düzeyde kaspaz adı verilen özel bir proteaz dizisi tarafından gerçekleştirilir. Apoptoz geçiren hücreler; plazma membran şişmesi, hücre büzülmesi, plazma zarının bütünlüğünün bozulması, kromatinin nükleer membrana marjinalleşmesi ile kromatin yoğunlaşması, fosfatidilserin dışlanması, apoptotik cisimlerin oluşumunu takip eden karyoheksis (çekirdek parçalanması), internükleozomal DNA bölünmesine ve geniş DNA fragmentasyonuna neden olan endonükleazların aktivasyonu, kaspazların mutlak bir hücre ölümü belirteci olarak aktivasyonu ve apoptotik cisimlerin oluşumu gibi tipik iyi tanımlanmış ortak morfolojik değişiklikler sergiler [171, 178, 179].

Otofaji, çift membranlı otofajik vakuolların varlığı ile karakterize edilir ve besin maddesi veya büyüme faktörü yoksunluğu bulunan hücrelerde aktive olan hayatta kalma mekanizmasıdır. Uzun ömürlü proteinler ve bütün organeller için hücre içi toplu bozulma sistemidir. Hücresel stres devam ettiği sürece hücre ölümü, tek başına otofaji ile devam edebilir veya apoptotik veya nekrotik hücre ölümü özellikleri ile ilişkili hale gelir [180].

Nekroz (onkosis), hızlı sitoplazmik şişlik ile karakterize edilir ve plazma membran rüptürü ve organel yıkımı ile sonuçlanır. Nekroz; sıcaklık, ozmotik şok, mekanik stres, donma-çözdürme ve yüksek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu gibi aşırı fizyokimyasal stresin bir sonucu olarak da ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle hücre ölümü, stresin hücre üzerindeki

doğrudan etkisi nedeniyle hızlı bir şekilde gerçekleşmekte ve hücre ölümü süreci kazara ve kontrolsüz olarak tanımlanmaktadır. Nekroz, özellikle insan patolojilerinde sıklıkla istenmeyen hücre kaybıyla ilişkili olduğundan diğer hücre ölümü biçimlerinden ayırt edilmesi önem taşımaktadır [177, 181].

## **2.16. Genotoksisite Değerlendirmesi**

Gen ve kromozom üzerindeki farklı mutasyon aşamalarını içeren *in vitro* genotoksisite testleri yardımıyla genotoksik potansiyel belirlenebilmektedir. DNA hasarının değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan yöntemler; Comet (Tek hücreli jel elektroforez yöntemi) tahlili, genellikle genotoksik ajanların toksik potansiyelini değerlendirmek için kullanılan mikronükleus testi, hücre bölünmesi bozukluğu tespiti için kullanılan kromozomal sapma testi, hücre ölümünü belirlemek için çok sık kullanılan hücre döngüsü ve DNA içerik analizidir. Hücre döngüsü analizi ve hücrelerin DNA içerik ölçümü, PI gibi nükleik asit boyama boyaları kullanılarak akış sitometrisi ile değerlendirilebilir [171]. Akış sitometrisi, kimyasalların toksik etkilerinin taranmasında; hücre döngüsü, apoptoz ve nekroz gibi çeşitli parametreleri kümülatif olarak anlama imkanı sunan önemli bir yöntemdir [182].

## **2.17. Flow (Akış) Sitometrisi**

Akış sitometrisi hücre ölümünü çeşitli şekilleriyle ölçmek ve karakterize etmek için güçlü bir seçimdir ve sağlam bir veri tekrarlanabilirliği sağlar. Akış sitometresi, hücrelerin bir ışık kaynağının önünde tek tek akışını aydınlatan ve daha sonra aydınlatmadan kaynaklanan hücrelerden gelen sinyalleri tespit edip ilişkilendiren bir yöntemdir [183]. 1960'larda kullanılmaya başlanmasından günümüze kadar hücre biyolojisi araştırmaları için vazgeçilmez bir araç olmuştur. Teşhis, araştırma ve ilaç keşif uygulamalarında yüksek doğrulukta nicel ölçümlere imkan sağlamaktadır [184]. Başlangıçta partiküllerin sadece boyutlarının ölçülebildiği akış sitometrisi ile günümüzde çeşitli boyalar ve antikorlar kullanılarak pek çok durum (bütün hücre ve organeller, mikroorganizmalar, çekirdekler, DNA, RNA, kromozomlar, sitokinler, hormonlar ve protein içeriği gibi); optik ve floresans özelliklerine göre tespit edilebilmektedir. Hücre proliferasyonu ve hücre döngüsü analizi, kalsiyum akışı ve membran potansiyelleri ölçümleri gibi hücresel bileşenler de akış sitometrisinde sık araştırılan örneklerdir [185].

Akış sitometrisinin temel prensibi, hareket eden parçacıklara çarpan uyarma kaynağından (genellikle bir lazer ışını) gelen ışık saçılımı ve floresans emisyonu ile ilgilidir. Elde edilen veriler parçacıkların biyokimyasal, biyofiziksel ve moleküler yönleri hakkında değerli bilgiler verebilir. Multiparametre analizi sayesinde sitometri, ışık saçılımı ve floresans ölçümlerine dayanan birçok hücre özelliği korele ederek sonuç verir. Işık saçılması hücrenin yapısal ve morfolojik özellikleri ile doğrudan ilişkilirken, bir floresans probundan türetilen floresan emisyonu, hücreye veya hücresel bileşene bağlı floresan prob miktarı ile orantılıdır [180, 185]. Akış sitometrisinin başlıca avantajları arasında belirli bir hücre proliferasyonu veya apoptoz profili ile ilgili redoks durumunun hızlı (saniyede bin hücre) ve doğru bir şekilde değerlendirilmesi için farklı ilaç muameleleri altında çok sayıda örneğin eşzamanlı ölçümüne izin veren yüksek verimlilik sağlaması ve bir seferde farklı hücresel olayların korelasyonu ile çoklu ölçüm yapılabilmesi bulunur [186, 187].

## 2.18. Oksidatif Stres

*In vitro* olarak toksisitenin ve mekanizmasının belirlenmesi için mutlaka değerlendirilmesi gereken bir belirteç de oksidatif strestir. *In vitro* deneylerde oksidatif stresin aydınlatılması, olası toksik etki mekanizmalardan biri olarak önem taşımaktadır [171, 174]. Reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu hücresel stres için ortak bir işarettir. ROT hücrenin savunma sistemini aştığında ve redoks homeostazında değişiklik olduğunda, sonuç oksidatif stres olur [188]. ROT ve oksidatif hasarın kanser, ateroskleroz, diğer nörodejeneratif hastalıklar ve diyabet gibi birçok hastalıkta önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, ROT'un ve oksidatif hasarın doğru bir şekilde ölçülebilmesi son derece önem taşır [189].

Oksidatif stres terimi ilk olarak 1985 yılında Helmut Sies tarafından ROT seviyelerinin; biyolojik sistemdeki potansiyel hasara yol açan, antioksidan savunmaların kapasitesini önemli ölçüde bastırıldığı bir durumu ifade etmek için tanımlanmıştır. Orta derecedeki oksidatif stres hücre disfonksiyonuna ve değişmiş davranışa (hızlandırılmış yaşlanma, anormal proliferasyon, düzensiz iltihaplı enflamatuar cevaplar ve hücre tümörizasyonu) neden olurken, son derece artmış oksidatif stres genellikle hücre ölümüne neden olabilir [190-194].

Hücreler içindeki oksidatif stresi ölçmenin yaygın yolları, GSH ölçümü, oksidatif strese duyarlı transkripsiyon faktörleri, oksijen radikallerinin kolorimetrik veya floresan

bazlı problemlerle ölçülmesi yöntemleridir [174]. Hücre içi ROT seviyelerinin uygun şekilde ölçülmesi; hücre fonksiyonunun ve ilaç toksisitesinin redoks düzenlenmesini anlayabilmek için oldukça önemlidir [186].

## 2.19. Reaktif Oksijen Türleri

Serbest radikallerin hücre fizyolojisi ve patolojisindeki faydalı ve zararlı rollerini inceleyen çalışmaların ana odağını, ROT adı verilen oksijen içeren yüksek güçlü oksidanlar oluşturur. ROT terimi; süperoksit anyon radikali ( $O_2^-$ ) ve hidroksil ( $HO^\cdot$ ) radikal gibi oksijensiz radikalleri ve  $H_2O_2$  ve singlet oksijen ( $^1O_2$ ) gibi radikal olmayan oksidanları kapsar. ROT, aerobik solunumun bir sonucu olarak normal şartlar altında sürekli olarak üretilir; enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalarla birbirlerine dönüştürülebilir. ROT'un temel iç kaynağı mitokondriyal elektron taşıma zinciridir ve hemen hemen her memeli hücre tipi tarafından iyonlaştırıcı radyasyon, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz, sitokrom P450 redüktaz, ksantin oksidaz ve nitrik oksit sentaz gibi çeşitli endojen kaynaklardan üretilmektedir [186, 188]. Bununla birlikte ROT seviyeleri sadece üretilen oranla değil aynı zamanda hücrel antioksidan savunmalarının varlığı ve aktiviteleri ile de belirlenir. Bazı çevresel kimyasallarının yanı sıra ilaçlar da elektrofilik metabolitler oluşturmak üzere metabolize edilir [190, 191].

Son araştırmalar, ROT'un hücre içi sinyal yollarının önemli fizyolojik düzenleyicileri olarak işlev gördüğünü ve ROT'un büyüme faktörü stimülasyonuna cevaptan inflamatuvar yanıtın oluşumuna kadar değişen çeşitli fizyolojik parametreleri düzenlediğini ve düzensiz ROT sinyalinin bir dizi insan hastalığına neden olabileceğini göstermektedir [195]. ROT sinyali ve rolü; hücre çoğalması, farklılaşması, migrasyon, immün cevap, hücre yaşlanması ve ölümü, iskemiye bağlı hastalık, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalık, malign transformasyon, diabetes mellitus, romatoid artrit, yaşlanma gibi kalıtsal veya edinilmiş patolojilerle ilişkili hayati hücrel fonksiyonlarda oldukça önemlidir. Redoks homeostazının; mitokondri, hücreler ve organizmaların normal çalışması için kritik bir faktör olduğu literatürde ortak olarak bildirilen görüşür [196, 197]. Hücrelerde bazı biyotik veya abiyotik koşullara cevap olarak ROT seviyesi artabilir ve böylelikle farklı hücre ölümü veya otofaji yollarının aktivasyonu için sinyal verebilir [187, 198, 199].

Memeliler, hayati biyomolekülleri ROT'tan ve ilgili türlerin aracılık ettiği hasardan korumak için bir dizi antioksidan savunma sistemi geliştirmiştir. Antioksidan terimi; bir

hedef biyomolekölün ROT kaynaklı hasarını önleyebilen, azaltabilen veya onarabilen herhangi bir madde olarak tanımlanabilir. ROT'un hedef molekülleri genellikle proteinler, lipitler ve nükleik asitlerdir [200]. Antioksidanların; (i) halihazırda oluşan ROT'u doğrudan temizleyen antioksidanlar, (ii) hücrel kaynaklardan ROT oluşumunu engelleyen antioksidanlar ve (iii) ROT'un neden olduğu hasar veya modifikasyonları ortadan kaldıran veya onarabilen antioksidanlar olmak üzere üç temel etki şekli vardır [190, 191].

Antioksidanlar ayrıca birincil veya ikincil savunma mekanizmaları olarak da ayrılabilir. Primer antioksidan savunma bileşenleri, hücre içi hedeflere zarar vermeden, doğrudan ROT'u yakalayarak oksidatif hasarı önleme işlevini yerine getirir. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (Gpx), katalaz ve tioredoksin redüktazdan oluşur. Bugüne kadar dört SOD sınıfı tanımlanmıştır. Bunlar Mn-SOD, Cu, Zn-SOD, Ni-SOD ve hücre dışı SOD'dur. Dört SOD enziminin tümü, serbest radikal süperoksidi,  $H_2O_2$ 'ye dönüştürerek tahrip eder.  $H_2O_2$ , hücredeki ana ROT'tan biridir ve doğrudan hücreler arası haberci görevi görür. Düşük seviyeler apoptoza neden olurken, yüksek seviyeler nekroz veya kaspaz bağımlı apoptoza yol açabilir.  $H_2O_2$ 'ye karşı birincil savunma mekanizmaları, GSH redoks döngüsü boyunca katalaz ve Gpx'tir. Katalaz bilinen en etkili enzimlerden biridir. Sitozolik veya mitokondriyal bölmelerde katalazın aşırı ekspresyonunun, hücreleri oksidatif yaralanmalara karşı koruduğu gösterilmiştir. GSH sistemi muhtemelen hücrede bulunan en önemli hücrel savunma mekanizmasıdır. GSH, sadece bir ROT tutucu olarak işlev görmez, aynı zamanda hücre içi redoks durumunun düzenlenmesinde de işlev görür. GSH, Gpx ve glutatyon redüktazdan oluşur. Gpx,  $H_2O_2$  ve diğer peroksidazların azalmasını katalize eder ve GSH'yi oksitlenmiş disülfür formuna (GSSG) dönüştürür. GSSG daha sonra glutatyon redüktaz ile GSH'ye redükte edilir. Hücrenin GSH'yi yeniden üretme kabiliyeti (GSSG'nin redükte edilmesi veya GSH'nin yeni sentezi), oksidatif stresin yönetilmesinde önemli bir faktördür [189, 197]. DNA bazlarının oksidatif hasarından sorumlu olan en güçlü ve agresif oksidan ise, nispeten kısa bir yarı ömre sahip olan hidroksil radikalidir [192, 201, 202].

### 3. GEREÇLER

#### 3.1. Kullanılan Maddeler

2',7'-Diklorofluoresin diasetat	: Santo Cruz Biotechnology
3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	: Sigma-Aldrich
Dimetil sülfoksit (DMSO)	: Carlo Erba
Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)	: Wisent Bio Products
FITC Annexin V Apoptoz Kiti	: BD Biosciences
Fosfat tamponu çözeltisi	: Biomatik
Föetal sığır serumu	: Capricorn Scientific
Klorjilin	: Sigma-Aldrich
Moklobemid	: Sigma-Aldrich
Penisilin-streptomisin çözeltisi	: Wisent Bio Products
Selejilin	: Sigma-Aldrich
tert-Bütül hidroperoksit, %70	: ACROS Organics
Tripsin-EDTA çözeltisi	: Wisent Bio Products

### 3.2. Kullanılan Cihazlar

Akış sitometre cihazı	: BD Biosciences FACS Aria III
Biyogüvenlik kabini	: Heal Force HF Safe 1800
Buz makinası	: Kale Kd 030
Buzdolabı	: Arçelik 2470 NEX
Derin dondurucu (-20°C ve -80°C)	: Arçelik 2470 NEX
ELISA plak okuyucusu	: Biotek Eon
Enjektör filtresi (0,2 µm por büyüklüğü)	: Aisimo
Hassas terazi	: Ohaus Pioneer PA64
Hücre kültür kabı (25 ve 75 cm <sup>2</sup> )	: Nest
Hücre plağı (6, 24 ve 96 kuyucuklu)	: Nest
Hücre Sayım Cihazı	: Bio-Rad TC20
İnkübatör (CO <sub>2</sub> dönüşümlü)	: Thermo Fisher Scientific Hera Cell 240
Kilitli kapaklı mini santrifüj tüpleri (2 mL)	: Nest
Kriyo tüp	: Nest
Otoklav	: Hirayama HG-80
Otomatik pipet (10, 20, 100, 200 ve 1000 µL)	: Eppendorf
Pipet ucu (10, 20, 100, 200, 300 ve 1000 µL)	: Nest
Polipropilen tüp (15 ve 50 mL)	: Nest
Soğutmalı santrifüj	: Eppendorf Centrifuge 5810 R
Steril polipropilen santrifüj tüpü (15 ve 50 mL)	: Isolab
Steril serolojik pipet (5, 10, 25 ve 50 mL)	: LP
Termostatlı su banyosu	: Wise Clean Wisd WUC-D06H
Ters mikroskop	: Leica DMI1
Vorteks	: Bio-Rad BR-2000

## 4. YÖNTEMLER

Karaciğer hücre hatları, normal karaciğer hücrelerinin faz I ve faz II metabolizmasından sorumlu fonksiyonel enzimlere benzer genotipik ve fenotipik özellikler gösterdiği için toksik kimyasalların tespiti ve hepatotoksisite değerlendirilmesini sağlamada en iyi seçimdir. Toksisitenin anlaşılmasında birçok hepatik *in vitro* model kullanılmaktadır. Karaciğer hücre hatları HepG2, Hep3B, HBG ve HepaRG karaciğer toksisitesi çalışmasının *in vitro* değerlendirmesinde kullanılan, genellikle ölümsüzleştirilmiş karaciğer kökenli hücre hatlarıdır [171]. Tuschl ve Schwab, çalışmalarında insan karaciğer kanseri hücre hattı HepG2'nin karşılaştırıldıkları diğer hücrelere göre, karaciğer toksisitesinin değerlendirilmesi ve bazı kimyasal bileşiklerin hücre döngüsü etkilerinin karşılaştırılmasında en iyi *in vitro* model olduğunu bildirmiştir [182].

Tez maddelerinin hepatotoksisitesinin araştırılmasında insan hepatoselüler karsinoma hücre hattı HepG2 (ATCC®HB-8065™) kullanılmıştır. Besiyeri olarak %10 fetalbovin serum ve %1 penisilin-streptomisin (100 IU/mL-100 mg/mL) ilave edilmiş Dulbecco's Minimum Essential Medium kullanılmıştır.

### 4.1. Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Hücre kültürü çalışmalarında steril malzemeler kullanılmıştır. Çalışmalar steril kabinde gerçekleştirilmiştir. Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu [American Type Culture Collection (ATCC)]'dan alınan hücre hattı önerilen besiyeri kullanılarak %5 CO<sub>2</sub> içeren nemli atmosferde ve 37°C'deki inkübatörlerde üretilmiştir. 25 cm<sup>2</sup>'lik ve 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda geliştirilen hücreler, haftada bir veya iki kez tripsinlenerek alt kültürlerine ayrılıp çoğaltılmıştır [203, 204].

### 4.2. Hücrelerin Çoğaltılması

Deneylerde kullanılan HepG2 hücrelerinin çoğaltılması ve deneye hazırlanması için 2-3 günde bir rutin olarak pasajlama işlemi yapılmıştır. İnkübatörden alınan hücre kültür şişesi, ölü hücrelerin besiyeri çözeltisine geçmesini sağlamak için hafifçe çalkalanmış ve ortamdaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin yıkanması için hücre kültür şişesine 5 mL fosfat tamponu ilave edilip yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kültür şişesine tripsin-etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) çözeltisi (1X) ilave edildikten sonra inkübatörde yaklaşık 5 dakika bekletilmiştir (%5 CO<sub>2</sub>, %95

nem ve 37°C). İnkübatörden alınan kültür şişelerinin üzerine besiyeri ilave edilerek hücreler süspanse edilmiş ve 1:2, 1:3 bölünerek yeni kültür şişelerine aktarılmıştır. Kültür şişeleri inkübatöre konularak inkübasyona bırakılmıştır.

#### **4.3. Hücrelere MTT Sitotoksitate Testinin Uygulanması ve IC<sub>50</sub> Değerlerinin Hesaplanması**

İnkübatörden alınan hücre kültürü flaskalarının içindeki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Flaskalara tripsin-EDTA çözeltisi (1X) (75 cm<sup>2</sup>'lik flaskalara 3-5 mL, 25 cm<sup>2</sup>'lik flaskalara 1-3 mL) ilave edilerek inkübatörde 3-5 dakika bekletilmiş ve inkübatörde bekletilen hücrelerin mikroskopta yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilmiştir. Gerektiğinde nazikçe vurularak yüzeyden ayrılması sağlanan hücreler üzerine tripsin-EDTA çözeltisinin en az iki katı hacimde besiyeri ilave edilmiş ve pipetleme ile hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Pipet yardımıyla santrifüj tüpüne alınan hücre süspansiyonu +4°C'de 1200 rpm hızda 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti üzerine uygun hacimde besiyeri eklenerek pipet yardımıyla nazikçe hücre süspansiyonu oluşumu sağlanmıştır. 10 µL hücre süspansiyonu ile 10 µL tripan mavisi solüsyonu karıştırılıp hücre sayımı cihaz yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

HepG2 hücreleri 96 kuyucuklu plaklara her bir kuyucukta  $1 \times 10^4$  hücre/100 µL olacak şekilde hesaplama yapılarak kuyucuklara ekilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hücre kültür plakalarının üst kısmı ters çevrilerek uzaklaştırılmış, hücreler fosfat tamponu ile yıkanmış ve yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırılmıştır. İnkübasyonun ardından çözücü ve besiyeri ile hazırlanmış tez maddelerinin (moklobemid, selejilin, klorjilin) 1-0,000316 mM aralığında olacak şekilde hazırlanmış 8 farklı konsantrasyonu 8 tekrarlı olacak şekilde hücre kültür plakasının her bir kuyucuğuna; büyüme (sadece besiyeri içeren) ve çözücü kontrol çözeltileri (test maddelerinin çözülmesinde kullanılan çözücüler ve besiyeri içeren) kuyucuklara ilave edilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Süre sonunda kuyucuklardaki çözeltiler uzaklaştırılmıştır. 5 mg/mL konsantrasyonda fosfat tamponu çözeltisi (PBS) ile hazırlanmış MTT çözeltisi, 1:10 oranında besiyeri ile seyreltilerek 100 µL hacimde (0,5 mg/mL) kuyucuklara eklenmiştir. 3 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kültür plakasının üst kısmı ters çevrilerek MTT çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hücre kültür plakasının her bir kuyucuğuna 100 µL dimetilsülfoksit (DMSO) ilave edilerek kuyucuklarda oluşan formazan tuzları

çözölmüştür. Hafifçe çalkalanan plakların, mikroplak okuyucuda 540 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Tez maddelerinin (moklobemid, selejilin, klorjilin) her bir konsantrasyonu için % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Non-lineer regresyon analizi ile maddelerin IC<sub>50</sub> değerleri belirlenmiş ve sitotoksik özellikleri yorumlanmıştır [175, 205-208]. MTT sitotoksisite testi, tez maddeleri için 3 kez tekrarlanmıştır.

*In vitro* modeller ile toksisitenin belirlenmesinde kullanılan önemli yöntemlerden biri de hücre ölüm yolağının aydınlatılmasından geçmektir. Bu test yöntemleri ile hem hücre ölümünün seviyesi belirlenebilmekte hem de apoptotik düzeye geçişin yolağı aydınlatılabilmektedir [209].

#### **4.4. Apoptotik/Nekrotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi**

Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan hücre süspansiyonu içindeki hücre sayısı belirlendikten sonra HepG2 hücreleri, her bir kuyucukta  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültür plakasına ekilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. MTT sitotoksisite sonuçlarına göre tez maddelerinden selejilin ve moklobemid için 0,316-0,1-0,0316 mM ve klorjilin için 0,15-0,1-0,05 mM olacak şekilde hazırlanmış 3 farklı konsantrasyonu 2 tekrarlı olacak şekilde hücre kültür plakasının her bir kuyucuğuna uygulanmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hücre kültür plakasındaki besiyerleri farklı santrifüj tüplerine aktarılmış ve hücre pelleti fosfat tamponu ile 2 kez yıkanmıştır. Hücre kültür plakasının her bir kuyucuğuna tripsin-EDTA çözeltisi (1X) ilave edilmiş ve plaka inkübatörde yaklaşık 5 dakika bekletilmiştir. İnkübatörden alınan hücre kültür plakasının her bir kuyucuğuna besiyeri ilave edilmiş ve pipetleme ile hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Her bir kuyucuktaki hücre süspansiyonu ilgili santrifüj tüpüne aktararak +4°C, 1200 g, 5 dakika santrifüj edilmiştir.

Supernatant ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelletine 100 µL “Binding buffer” ilave edilmiştir. Daha sonra tüpe 5 µL Anneksin-5, floresan izotiyosiyanat (FITC) ve 10 µL PI ilave edilerek 15 dakika karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda tüpe 400 µL “Binding buffer” ilave edilerek hücreler tekrar süspanse edilmiştir. Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi, Hücre Kültürü Laboratuvarında bulunan Akış Sitometri cihazında analiz gerçekleştirilmiştir. Akış sitometri testi tez maddeleri için 3 kez tekrarlanmıştır [208].

#### **4.5. Biyokimyasal Parametrelerin Seviyelerinin Belirlenmesi**

#### 4.5.1. AST, ALT, üre ve total bilirubin analizi

Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan hücre süspansiyonu içindeki hücre sayısı belirlendikten sonra 25 m<sup>2</sup> flasklara 5x10<sup>5</sup> HepG2 olacak şekilde hücreler ekilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda besiyeri uzaklaştırılmış ve MTT sitotoksisite sonuçlarına göre tez maddelerinden selejilin ve moklobemid için 0,316-0,1-0,0316 mM ve klorjilin için 0,15-0,1-0,05 mM olacak şekilde hazırlanmış 3 farklı konsantrasyonu farklı hücre kültür şişelerine eklenmiş ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hücre kültür şişesindeki besiyerleri toplanmış ve +4°C, 1200 g, 5 dakika satrifüj edilmiştir. Süpernatantta ELİSA kit prosedürüne uygun olarak AST, ALT, üre ve TBILI seviyeleri belirlenmiştir [204].

#### 4.5.2. Reaktif oksijen türleri analizi

Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan hücre süspansiyonu içindeki hücre sayısı belirlendikten sonra her bir kuyucukta 5x10<sup>4</sup> hücre olacak şekilde 96'lık hücre kültür plakasına hücre süspansiyonu ekilmiş, 24 saat inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda besiyeri uzaklaştırılmıştır. MTT sitotoksisite sonuçlarına göre tez maddelerinden selejilin ve moklobemid için 0,316-0,1-0,0316 mM ve klorjilin için 0,15-0,1-0,05 mM olacak şekilde hazırlanmış 3 farklı konsantrasyonu ve pozitif kontrol olarak 0,5 mM tert-Bütil hidroperoksit (t-BOOH) hücre kültür plakasına uygulanmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hücre kültür plakasının her bir kuyucuğuna besiyerinde hazırlanmış 20 µM 2',7'-diklorofloresein diasetat (DCFH-DA) çözeltisi ilave edilmiş ve 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hücre kültür plakasının üst kısmı ters çevrilerek besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücre kültür plakasının her bir kuyucuğuna 100 µL fosfat tamponu çözeltisi ilave edilerek yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücre kültür plakasının 485 nm eksitasyon ve 530 nm emisyon dalga boylarında floresans ölçümü gerçekleştirilmiştir [204, 210].

#### 4.5.3. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur. İstatistiksel değerlendirmeler GraphPad Prism 5 programında tek yönlü varyans analizi ve ardından Tukey çok yönlü karşılaştırma testi ile gerçekleştirilmiştir. P<0,05 değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Yukarıda sözü edilen yöntemlerin uygulanması ile bu bileşiklerin insan üzerindeki toksisiteleri ile ilgili kapsamlı bir *in vitro* değerlendirme yapılmıştır. Seçilen tüm yöntemler *in vitro* olarak toksisitenin ve mekanizmasının belirlenmesinde kabul görmüş hassas, ekonomik ve güvenilir yöntemler olup maddelerin toksisite profillerinin çıkarılması için gereken tüm ihtiyacı karşılamaktadır.

## 5. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında haklarında hepatotoksisite gelişimi açısından şüphe duyulan fakat haklarında limitli çalışma verisi bulunan moklobemid, selejilin ve klorjilinin hepatotoksisitenin HepG2 hücre dizisinde değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Hepatotoksik bileşiklerin belirlenmesine yardımcı olan hepatosit kültür sistemlerinin kurulması için uzun yıllardır çok fazla çaba harcanmıştır ve son dönemde hepatoselüler karsinoma insan hücre hattı HepG2 hücrelerinin bu amaçla kullanımı giderek daha popüler hale gelmiştir [166]. 1970'lerde üretilen insan hepatoblastoma hücre hattı HepG2 hücreleri, ilaçların hepatik kökenli hücrelerin metabolizmasına etkileri üzerine yeni veriler elde etmek ve prelinik çalışmalarda hepatotoksisite riskini değerlendirmek için yararlı bir model olarak kullanılır [212, 213]. İnsan hepatoblastomunun iyi tanımlanmış fonksiyonu nedeniyle insan karaciğer modeli olarak kullanımı en faydalı hücre dizilerinden biridir ve en yaygın kullanılan insan hepatom hücrelerindedir [214, 215]. HepG2 hücreleri, yüksek proliferasyon oranında ve pek çok farklılaşmış hepatik fonksiyonları yerine getiren epitel benzeri morfolojide nontümörjenik hücrelerdir ve normal karaciğer hücrelerinin birçok tipik özelliğine sahiptir [216, 217]. HepG2 hücre hattının kullanımı kolaydır, tekrarlanabilir bir sistem sağlar ve kolayca bulunabilir. Bununla birlikte, ilaç metabolize edici enzimlerin ifadesi *in vivo* durumdan farklı olduğu için HepG2 hücreleri yetişkin insan karaciğer hücre metabolizmasını tahmin etmek için daha az uygundur [57, 218, 219]. Temel sınırlamaları, ana molekülün toksisitesini test etmek için uygun olan ancak metabolit toksisite tayini için daha az uygun olan primer hepatositlere kıyasla düşük metabolik kapasiteye sahip olmasıdır [220, 221]. HepG2 hücrelerini kullanan basit sitotoksisite deneylerinin, insan hepatotoksik ilaçlarını tespit etmek için nispeten az duyarlı olduğunu bildiren çalışmaların yanında O'Brien vd. tarafından 2006 yılında yayımlanan çalışma; HepG2 hücrelerinde hepatotoksik ilaçların saptanması için % 90'lık bir duyarlılık hesaplamıştır [222, 223].

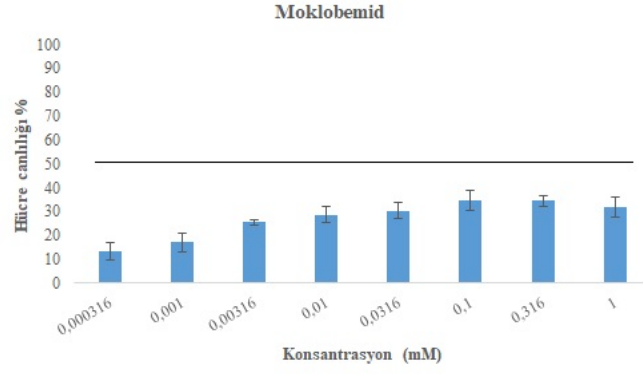
### 5.1. MTT Yöntemi ile Bileşiklerin Sitotoksik Etki Sonuçları

1983 yılında Mosmann tarafından, canlı hücrelerin metabolik aktivitesini ölçmek için geliştirilen kolorimetrik MTT mikroparka testi (metil-tiyazolil-tetrazolyum), memeliden mikrobiyal kökene kadar değişen hücrelerin sitotoksisite, hücre canlılığı ve proliferasyon çalışmalarının değerlendirilmesinde günümüzde en çok kullanılan yöntemlerden bir tanesidir [224]. Tetrazolyum halkası, sadece metabolik olarak aktif

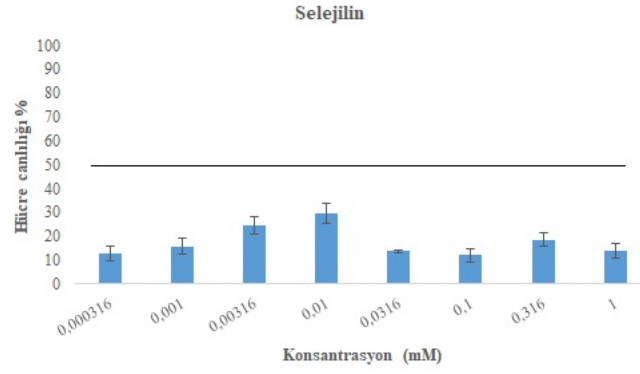
hücrelerde mitokondriyal süksinik dehidrogenazların aktivitesi sonucu açıldığı için; bu testle sadece oksidatif metabolizma varlığı gösteren canlı hücreler tanımlanır ve nicel olarak ölçüm sağlanır. Meydana gelen formazan miktarı, numunede bulunan canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Bu yöntemde canlı hücrelerin MTT reaktifini azaltma yeteneği spektrofotometrik olarak ölçülerek hücre canlılığını hızlı ve kesin olarak belirlenmektedir [225-227].

Hücrelerin mitokondriyal aktivitesi; sarı tetrazolyum tuzunun homojen ölçüm için çözünebilen mor formazan kristallerine dönüştürülmesiyle yansıtılır ve hücre sayısındaki herhangi bir artış veya azalma, 540 ve 720 nm'de bir plaka okuyucu kullanılarak optik yoğunluktaki (OD) formazan konsantrasyonunun ölçülmesiyle tespit edilir. İlaçlarla inkübe edilen hücrelere sahip kuyucukların OD değerleri, ilaçlara maruz kalmayan hücrelere sahip olan kuyucukların OD değerleri ile karşılaştırılarak ilaç duyarlılıkları hesaplanır. Hücre sayısındaki azalma, hücre büyümesinin inhibisyonunu yansıtır ve ilaç hassasiyeti ilaçla muamele edilmemiş kontrolün büyümesine kıyasla %50 büyüme inhibisyonu elde etmek için gereken ilacın konsantrasyonu olarak belirlenir [227, 228]. Spektrofotometre ile ölçülen mor renkli bir ürün olan çözünmeyen formazan kristalini çözmek için bir organik çözücü (genellikle DMSO) kullanılır. Absorbans, hücre sayısı ile doğrudan ilişkili olup daha mor renk daha canlı hücrelerin varlığını göstermektedir [206].

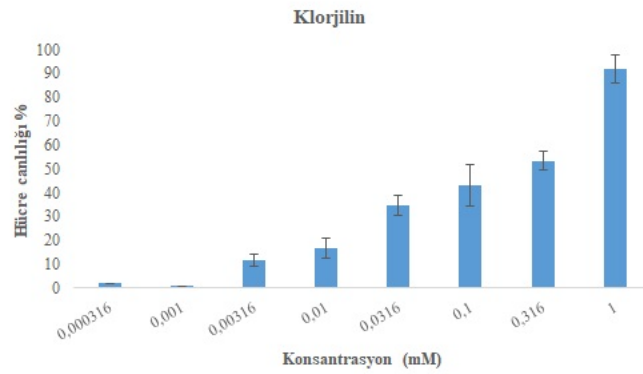
MTT sitotoksosite sonuçlarına göre moklobemid ve selejilin HepG2 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında test edildikleri konsantrasyonlarda %50 hücre inhibisyonuna ulaşamamışlardır. Çalışma sonuçlarına göre HepG2 hücre dizisi üzerinde en fazla sitotoksosite gösteren ilaç 0,369±0,002 mM IC<sub>50</sub> değeri ile klorjilin olarak bulunmuştur. Klorjilin ile ilgili primer hepatositlerde bizim çalışmamıza benzer olarak sitotoksositeyi düşük dozlarda indükleyebileceği gösterilmiştir [229]. Maddelerin her bir konsantrasyon için yüzde hücre inhibisyon değerleri Şekil 5.1, Şekil 5.2 ve Şekil 5.3'de sunulmuştur.



**Şekil 5.1.** Moklobemid ile inkübe edilen HepG2 hücrelerinin canlılık yüzdeleri



**Şekil 5.2.** Selejilin ile inkübe edilen HepG2 hücrelerinin canlılık yüzdeleri



**Şekil 5.3.** Klorjilin ile inkübe edilen HepG2 hücrelerinin canlılık yüzdeleri

## 5.2. Anneksin V/PI Yöntemi ile Bileşiklerin Apoptotik Etki Sonuçları

Kanser ilaç keşfi çalışmalarında, her zaman nekrozdan ziyade hedef hücrelerde apoptozu indükleyen bileşikler aranmaktadır. Günümüze kadar apoptoz ve nekrozun tespiti ve ayırt edilmesi için çok sayıda analiz yapılmıştır ve apoptoz için en popüler ve en yaygın kullanılan yöntem, floresan konjuge edilmiş anneksin V kullanılarak membrana maruz kalan fosfatidilserin (PS) tespitini içeren yöntem olmuştur [230]. Anneksin V bağlanma deneyi, erken/geç apoptoz ve apoptoz/nekroz arasındaki farkı tespit etmek için kullanılan en hassas ve en yaygın tekniklerden biridir [179].

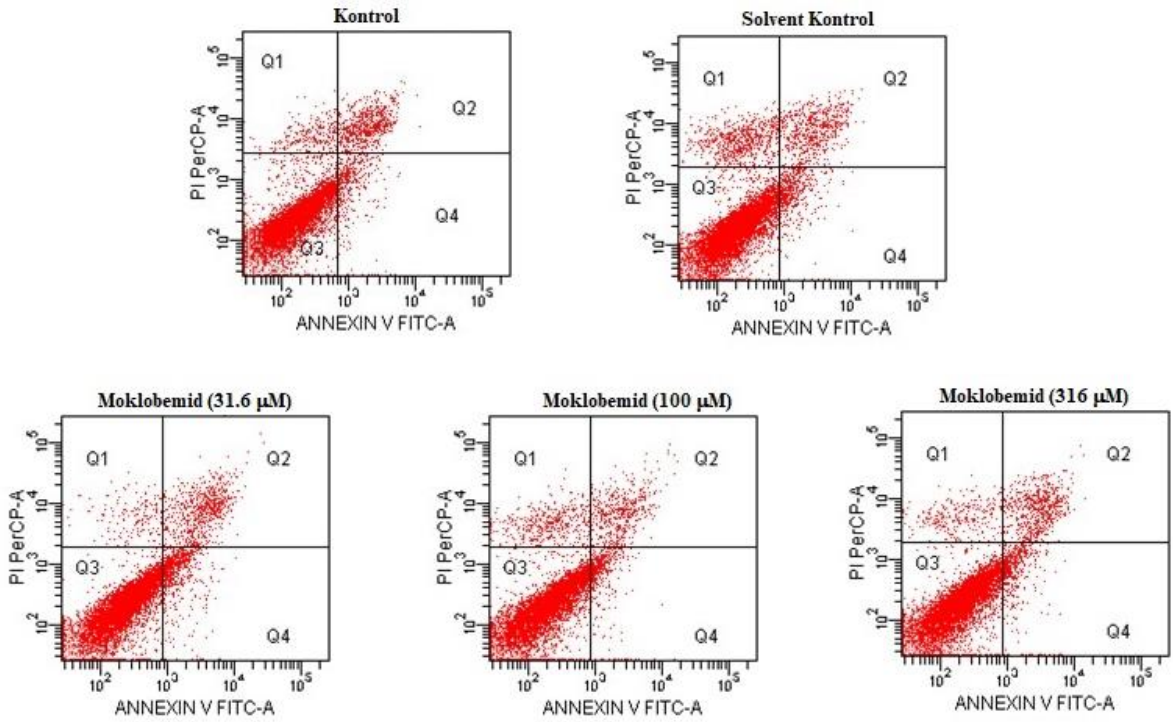
Apoptotik olmayan canlı hücrelerde; plazma zarı fosfolipidleri, plazma zarı iç ve dış yaprakçıkları arasında asimetrik olarak dağıtılır ve PS'nin neredeyse tamamı sadece zarın iç yüzeyinde bulunur. Apoptozun başlarında bu asimetride bir bozulma meydana gelir ve PS plazma zarının dış yapraklarına doğru yönelir. Bir  $Ca^{+2}$  bağımlı antikoagülan protein olan Anneksin V, bir fosfolipid PS bağlayıcı proteindir; negatif yüklü PS için yüksek afiniteye sahiptir ve bir florokrom ile konjüge edildiğinde apoptozu tanımlamak için bir gösterge olarak kullanılır. Apoptotik olmayan hücreler Anneksin V negatif ve erken apoptotik hücreler Anneksin V pozitif şekilde boyanır. Anneksin V testi; hücre zarı bütünlüğünün kaybolmasından önce apoptozun erken evrelerini tespit etme imkânı sunar ve apoptotik ölüm kinetiklerinin hücre döngüsü ile ilişkili olarak ölçülmesine olanak tanıyan çok kolay ve hızlı bir yöntemdir [231-233].

Anneksin V ayrıca nekrotik hücreleri de boyayabilir çünkü bu hücreler Anneksin V'nin tüm plazma membranına erişmesine izin veren yırtılmış membranlara sahiptir. Bununla birlikte, apoptotik hücreler PI ile birlikte boyanarak nekrotik hücrelerden ayırt edilebilir, çünkü PI nekrotik hücrelere girer, ancak apoptotik hücrelerden çıkarılır. PI bozulmamış hücre zarlarından geçemediği için canlı hücrelerin boyanması için uygundur [234]. Apoptotik hücreler önce anneksin V pozitif ve PI negatif olur, PI alımı daha sonraki zaman noktalarında olur. Buna karşılık, nekrotik hücreler doğrudan bir Anneksin V/PI çift pozitif durumuna geçerler [181, 235].

Akış sitometrisi çalışmaları ile moklobemid, selejilin ve klorjilin için stimüle edilmiş hücre ölüm yolağının apoptoz olduğu belirlenmiştir. Karaciğerdeki apoptotik hücrelerin ksenobiyotik metabolizmasının toksisitesinde önemli rol üstlendiği literatürde çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir [182]. Yüksek düzeyde düzenli bir mekanizma olan apoptoz, herhangi bir advers enflamatuvar cevap olmadan hücre ölümünü indükler ve dolayısıyla nekroza göre tercih edilir [236]. Nekrotik hücre ölümü, endojen "tehlike

sinyalleri” ve sonraki inflamasyonun salınması ile karakterize edilirken, apoptoz büyük ölçüde tolerjeniktir. Bu nedenle, ilaç keşfi ve sonrasındaki aşamalarda ana zorunluluk, apoptozu nekrozdan ayırmaktır [176, 235]. Sonuçlarımıza göre incelenen MAOI ilaçlar karaciğerde apoptozu indükleyerek hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu noktada tolere edilebilirliklerinin görece nekrozu indükleyen diğer ajanlara göre fazla olduğunu söylemek mümkündür.

Moklobemid’in 0,0316 mM konsantrasyonu için apoptotik hücre popülasyonu %14 ve nekrotik hücre popülasyonu %1,8; 0,1 mM konsantrasyonu için apoptotik hücre popülasyonu %9,5 ve nekrotik hücre popülasyonu %4,4; 0,316 mM konsantrasyonu için apoptotik hücre popülasyonu %13,1 ve nekrotik hücre popülasyonu %3,8 olarak belirlenmiştir. Moklobemidin akış sitometrik analiz diyagramı Şekil 5.4’te sunulmuştur.

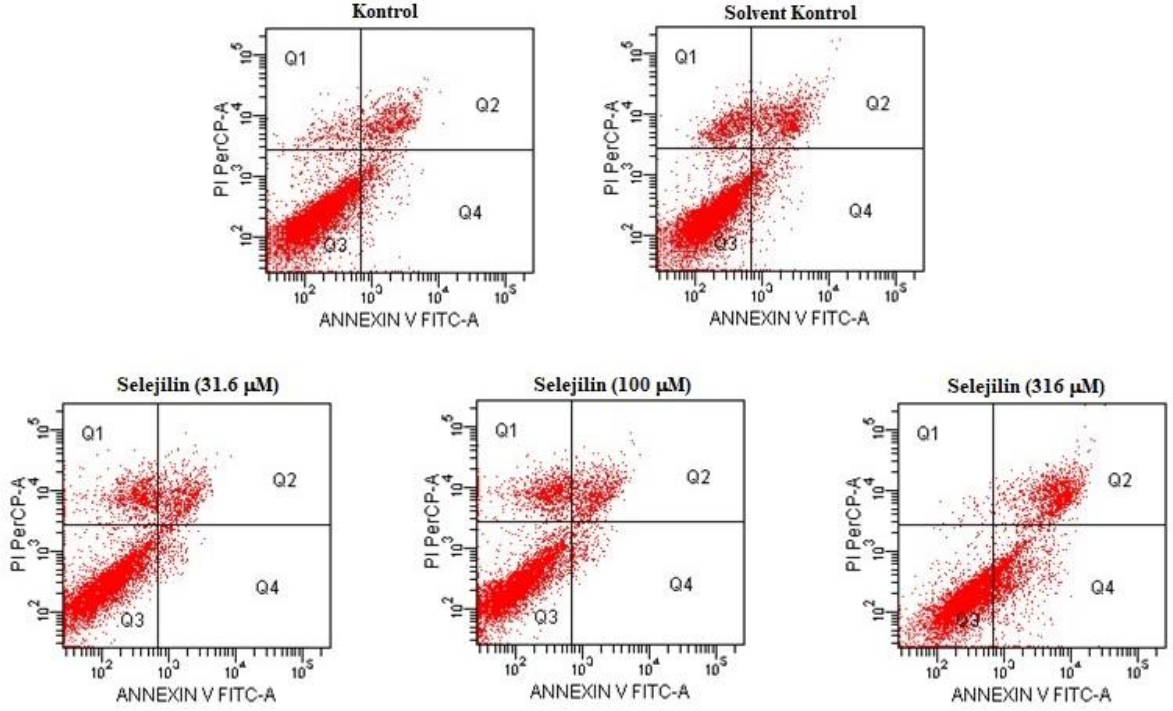


**Şekil 5.4.** HepG2 hücre hattı için moklobemid’in akış sitometrik analiz diyagramı

Üst sol kadrant nekrotik (Q1; Anneksin V-negatif/PI-pozitif); üst sağ kadrant geç apoptotik hücreler (Q2; Anneksin V-pozitif/PI-pozitif); alt sol kadrant canlı hücreler (Q3; Anneksin V-negatif/PI-negatif) ve alt sağ kadrant apoptotik hücreler (Q4; Anneksin V-pozitif/PI-negatif).

Selejilin’in 0,0316 mM konsantrasyonu için apoptotik hücre popülasyonu %8,4 ve nekrotik hücre popülasyonu %7,7; 0,1 mM konsantrasyonu için apoptotik hücre popülasyonu %12,5 ve nekrotik hücre popülasyonu %4,5; 0,316 mM konsantrasyonu için

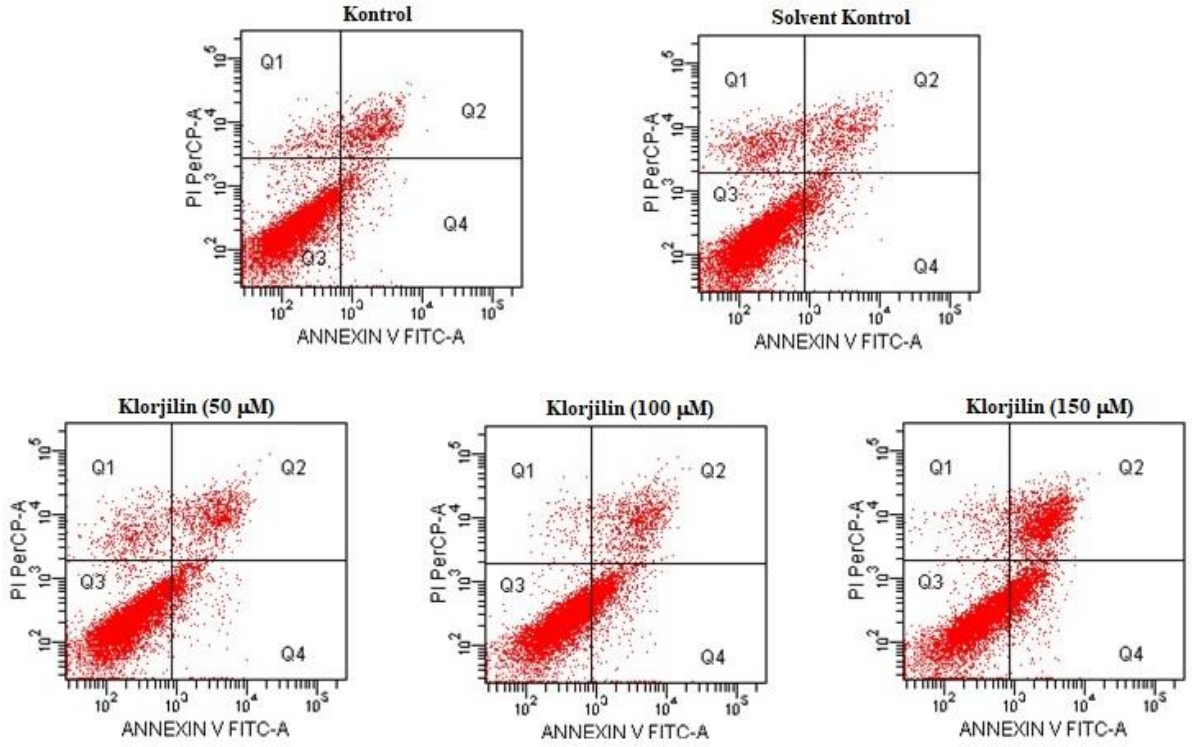
apoptotik hücre popülasyonu %24,4 ve nekrotik hücre popülasyonu %0,4 olarak belirlenmiştir. Selejilin'in akış sitometrik analiz diyagramı Şekil 5.5'te sunulmuştur.



Şekil 5.5. HepG2 hücre hattı için selejilin'in akış sitometrik analiz diyagramı

Üst sol kadrant nekrotik (Q1; Anneksin V-negatif/PI-pozitif); üst sağ kadrant geç apoptotik hücreler (Q2; Anneksin V-pozitif/PI-pozitif); alt sol kadrant canlı hücreler (Q3; Anneksin V-negatif/PI-negatif) ve alt sağ kadrant apoptotik hücreler (Q4; Anneksin V-pozitif/PI-negatif).

Klorjilin'in 0,05 mM konsantrasyonu için apoptotik hücre popülasyonu %13,3 ve nekrotik hücre popülasyonu %4,4; 0,1 mM konsantrasyonu için apoptotik hücre popülasyonu %20,1 ve nekrotik hücre popülasyonu %1,2; 0,15 mM konsantrasyonu için apoptotik hücre popülasyonu %30,2 ve nekrotik hücre popülasyonu %2,6 olarak belirlenmiştir. Klorjilin'in akış sitometrik analiz diyagramı Şekil 5.6'da sunulmuştur.



**Şekil 5.6.** HepG2 hücre hattı için klorjilin'in akış sitometrik analiz diyagramı

Üst sol kadrant nekrotik (Q1; Anneksin V-negatif/PI-pozitif); üst sağ kadrant geç apoptotik hücreler (Q2; Anneksin V-pozitif/PI-pozitif); alt sol kadrant canlı hücreler (Q3; Anneksin V-negatif/PI-negatif) ve alt sağ kadrant apoptotik hücreler (Q4; Anneksin V-pozitif/PI-negatif).

Analiz edilen 3 farklı konsantrasyon için, canlı/apoptotik/nekrotik hücre yüzdeleri Tablo 5.1'de sunulmuştur.

**Tablo 5.1.** Moklobemid, selejilin ve klorjilin için farklı konsantrasyonlarda canlı/apoptotik/nekrotik hücre yüzdesi

Madde	µM	Q1	Q2	Q3	Q4
Moklobemid	31,6	1,8	6,6	84,2	7,4
	100	4,4	4,7	86,2	4,8
	316	3,8	5,9	83,0	7,2
Selejilin	31,6	7,7	6,3	83,9	2,1
	100	4,5	7,5	83,0	5,0
	316	0,4	10,4	75,2	14,0
Klorjilin	50	4,4	7,6	82,3	5,7
	100	1,2	8,0	78,7	12,1
	150	2,6	16,6	67,2	13,6

Q1 (Anneksin V-negatif/PI-pozitif): nekrotik hücreler; Q2 (Anneksin V-pozitif/PI-pozitif): geç apoptotik hücreler; Q3 (Anneksin V-negatif/PI-negatif): canlı hücreler; Q4 (Anneksin V-pozitif/PI-negatif): apoptotik hücreler.

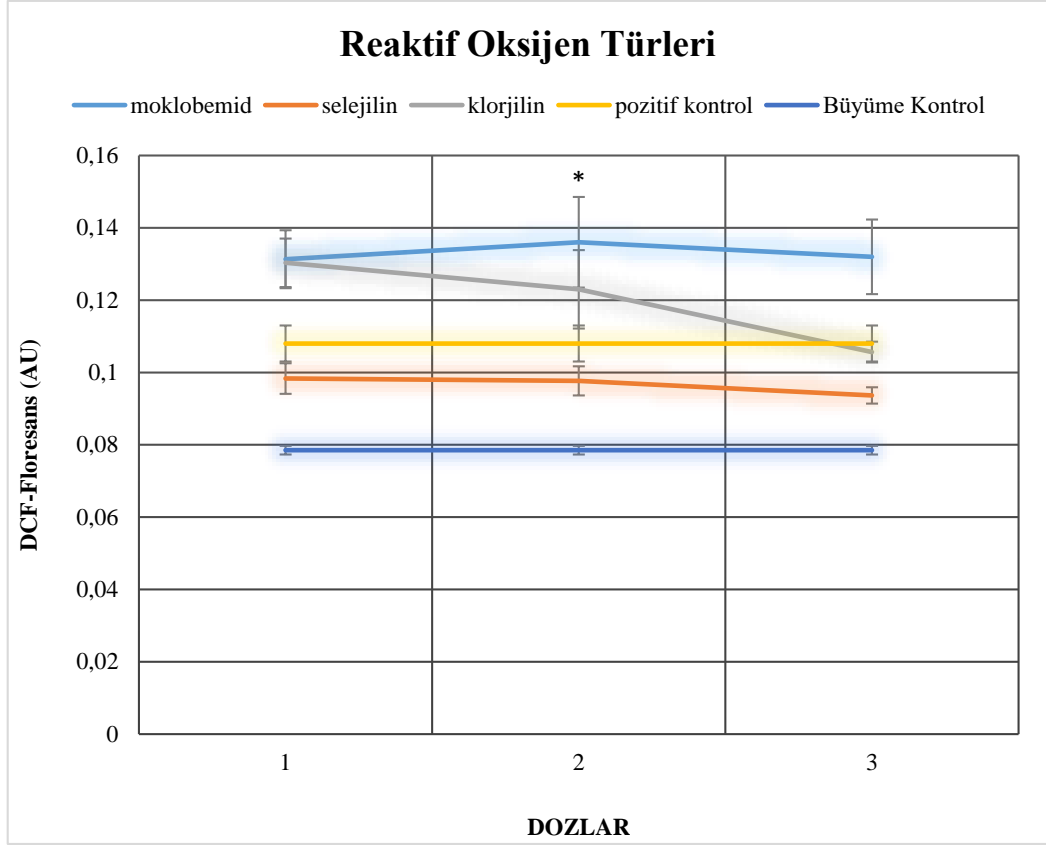
Apoptozun düzenlenmesinde genel olarak; kalsiyum, seramid, Bcl-2 protein ailesi, p53, kaspazlar, ve sitokrom-c önemli rol oynar. Bir hücrenin apoptoza eğilimini ve doku homeostazını; Bcl-2 ailesi genlerinin birbirine zıt özellik gösteren proapoptotik ve antiapoptotik üyeleri arasındaki denge belirler. Hücrede proapoptotik proteinlerin fazlalığı apoptoza eğilimi artırırken; antiapoptotik proteinlerin fazlalığı ise hücrenin apoptoz ihtimalini düşürür. Proapoptotik üyeler Bad, Bax, Bid, Bcl-Xs, Bak, Bim, Puma ve Noxa'dır. Bu proteinlerin tümör süpresör gen olarak görev yaptığı düşünülmektedir. Antiapoptotik üyeler ise Bcl-2, Bcl-xL, A1 ve Mcl-1'dir. Antiapoptotik üyeler özellikle hücredeki  $Ca^{+2}$  oranını kontrol ederler ve ayrıca hücreyi parçalayan proteazların (kaspazların) öncü formlarıyla Apoptoz indükleyici faktör ve sitokrom-c salınımını bloke ederek apoptozu inhibe ederler ve hücre yaşamını destekler [237-239]. Bcl-2, keşfedilen ilk hayatta kalma yanlısı proteindir ve çalışmalarda bu proteinin proliferasyonu arttırmak yerine hücre ölümünü sınırlandırarak kanseri teşvik ettiği, hücreleri indüklenmiş apoptozdan koruduğu belirtilmektedir [240]. Ayrıca, Bcl-2 proteinin, mitokondriyal ve/veya sitozolik ROT seviyelerinin düzenlenmesinde etkileri olabileceği çalışmalarda belirtilmektedir [104]. Tümörojenik olmayan hücre kültürlerinde selejilin ve klorjilin ile yapılan çalışma; her iki ilaçla muamelenin ardından Bcl-2 protein seviyesinin önemli ölçüde arttığını; ancak tümör hücrelerinde bu proteinin zaten yüksek olan seviyelerinde herhangi bir değişikliğe sebep olmadığını göstermiştir. Bcl-2'nin bir apoptoz/programlanmış hücre ölümü inhibitörü olduğu literatürde kabul gören bir gerçek olduğundan; selejilin ve klorjilinin protektif etkilerinin normal hücre içinde antiapoptotik yolların aktivasyonunu yoluyla meydana geldiği düşünülmektedir [104]. Fakat bu tez çalışmasında tümörojenik bir hücre hattı olan HepG2 ile çalışıldığını göz önüne aldığımızda bir çeşit regülasyon sağlama mekanizması sonucunda ajanların apoptozu indükleme potansiyelleri olduğu düşünülebilir.

### **5.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Ölçümünün Değerlendirmesi**

Hücrelerde serbest radikal üretimini ölçmek için birçok yöntem vardır. En basit teknikler içerisinde hücre geçirgen fluoresan ve kemilüminesan problemleri bulunur. ROT'un hücresel konsantrasyonunu/dağılımını daha fazla araştırmak için; ROT ile etkileşime

girdikten sonra 2',7'-diklorofloresin (DCF)'e dönüşebilen DCFH-DA fluorometrik prob yöntemi, 1965 yılında Brandt ve Keston tarafından geliştirilmiştir [188, 200, 241]. DCFH-DA yöntemi, DCFH-DA'nın hücre membranı boyunca yayıldığı ve hücre içi esterazlar tarafından hücre içinde sıkışıp kalan DCF'ye hidrolize edilmesi esasına dayanmaktadır [242]. Bu yöntem, bir hücrenin redoks durumunu doğrudan ölçmek için kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. Geliştirilen diğer tekniklere göre; kullanımı çok kolaydır, hücredeki redoks değişikliklerine karşı son derece hassastır, ucuzdur ve zaman içinde ROT'taki değişiklikleri takip etmek için kullanılabilir. DCFH-DA floresan problemleriyle, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub><sup>-</sup> oluşumu ölçülebilir [189, 243]. Bu prob, hücrelere kolayca dağılan, stabil, lipofilik, floresan olmayan, nonpolar bir bileşiktir. DCFH-DA, hücrelerin içine girdikten sonra, hücre içi esterazlar tarafından deasetilizasyona uğrayarak hücre içi ROT ile reaksiyona giren, nispeten polar, floresan olmayan ve zarı geçirmeyen bir bileşik olan DCFH üretir [186]. Hücre içi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya düşük moleküler ağırlıklı peroksit, DCFH'yi, yüksek oranda floresan bir bileşik olan DCF'ye oksitlemektedir [204, 244]. DCF floresansının akış sitometri tespiti ile hücrelerde ROT üretimi hücreler tarafından üretilen peroksit miktarıyla orantılıdır ve bu sayede dolaylı bir şekilde ölçümü sağlanabilmektedir [199, 245].

Çalışma sonuçlarına göre, HepG2 hücrelerinde selejilin ve klorjilin ile DCF'nin floresans yoğunluğunda herhangi bir belirgin artış görülmez iken; moklobemid 0,1 mM konsantrasyonlarında pozitif kontrol t-BOOH'ya göre belirgin olarak DCF floresans yoğunluğunu arttırmıştır (p<0,01). Ayrıca pozitif kontrol de büyüme kontrolüne göre, anlamlı olarak DCF floresans yoğunluğunu arttırmıştır (Şekil 5.7). Bu sonuçlara göre, moklobemid ROT üretimini arttırırken, selejilin ve klorjilin büyüme kontrolüne göre ROT artışına sebep olsa da pozitif kontrole göre anlamlı olarak ROT artışına neden olmamıştır.



**Şekil 5.7.** Farklı konsantrasyonlarda moklobemid, selejilin ve klorjilinin uygulanan hücrelerde reaktif oksijen türleri seviyeleri

\*kontrolden farklı ( $p < 0,05$ )

Bunun yanı sıra moklobemidin primer olarak %99 oranında oksidatif metabolizmaya uğradığını unutmamak gerekir [246]. Bu noktada ROT oluşumunun gerekçesi oksidatif yolların varlığına da bağlanabilir. Ayrıca yine selejilin de hepatik biyotransformasyona ve oksidatif metabolizmaya uğrayan bir bileşiktir [247]. Bu durum da büyüme kontrolüne oranla daha fazla ROT üretimine sebep olmuş olabilir. Klorjilin ise CYP2B6'nın metabolizmaya dayalı inhibitörüdür ve CYP2B1'i de etkisizleştirmektedir [110, 248]. Klorjilin ve CYP2B1 ile ara metabolit oluşumu gösterilmiş olup [249], bu çalışmada da ROT oluşumunu büyüme kontrole göre indüklemiştir.

#### 5.4. Biyokimyasal Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Karaciğer hasarının konvensiyonel biyobelirteçleri temel olarak normal karaciğer fonksiyonunun veya homeostazının değişimini ve doku ve hücre bütünlüğünün değişimini gösteren spesifik biyobelirteçleri içerir. Karaciğer hasarını tespit etmek için klinik pratikte kullanılan dolaşımdaki en yaygın biyobelirteçler, TBILI ve total safra asitlerinin seviyelerindeki değişiklikler gibi normal karaciğer fonksiyonundaki değişimin ölçülmesiyle veya ALT, AST ve ALP gibi hücre spesifik bileşenlerin serum içine sızmasıyla hücre ve doku bütünlüğünün değişiminin ölçülmesiyle saptanır [148].

Yapılan test sonuçlarına göre, AST seviyelerinde kontrol grubuna göre selejilin 0,1 mM konsantrasyonunda ALT seviyesini azaltırken; klorjilin 0,15 ve 0,1 mM konsantrasyonlarında anlamlı olarak arttırmıştır. ALT seviyeleri açısından ise klorjilin 0,15 ve 0,1 mM konsantrasyonlarında ALT seviyelerini anlamlı olarak arttırırken; selejilin 0,1 mM konsantrasyonunda ALT seviyesini azaltmıştır. Üre seviyeleri ölçüldüğünde kontrol grubuna göre selejilin 0,1 mM konsantrasyonda üre miktarını azaltırken; klorjilin 0,1 ve 0,15 mM konsantrasyonlarında anlamlı artışlara neden olmuştur. TBILI seviyeleri açısından gruplar arasında herhangi bir farklılığa rastlanmamıştır.

**Tablo 5.2.** Farklı konsantrasyonlarda moklobemid, selejilin ve klorjilinin uygulanan hücrelerde biyokimyasal parametre seviyeleri

	Kontrol	Moklobemid ( $\mu\text{M}$ )			Selejilin ( $\mu\text{M}$ )			Klorjilin ( $\mu\text{M}$ )		
		31,6	100	316	31,6	100	316	50	100	150
<b>AST</b>	8,91 $\pm$ 0,67	8,27 $\pm$ 0,75	8,20 $\pm$ 1,06	7,07 $\pm$ 1,10	9,10 $\pm$ 1,15	5,17 $\pm$ 0,76 (*)	8,01 $\pm$ 1,01	7,03 $\pm$ 1,05	15,07 $\pm$ 1,01 (*)	15,03 $\pm$ 0,95 (*)
<b>ALT</b>	5,99 $\pm$ 0,81	5,23 $\pm$ 1,08	5,03 $\pm$ 0,95	4,13 $\pm$ 1,01	4,17 $\pm$ 1,26	3,13 $\pm$ 1,21 (*)	4,27 $\pm$ 0,64	3,0 $\pm$ 1,0 (*)	7,07 $\pm$ 1,01	7,30 $\pm$ 1,13
<b>Üre</b>	3,29 $\pm$ 0,08	3,30 $\pm$ 0,09	3,20 $\pm$ 0,09	3,40 $\pm$ 0,09	3,50 $\pm$ 0,09	2,41 $\pm$ 0,08 (*)	3,30 $\pm$ 0,09	3,20 $\pm$ 0,09	3,79 $\pm$ 0,13 (*)	3,90 $\pm$ 0,09 (*)
<b>TBILI</b>	0,01 $\pm$ 0,006	0,01 $\pm$ 0,001	0,02 $\pm$ 0,009	0,023 $\pm$ 0,001	0,01 $\pm$ 0,005	0,01 $\pm$ 0,005 4	0,01 $\pm$ 0,005 3	0,01 $\pm$ 0,008 9	0,03 $\pm$ 0,004 9	0,04 $\pm$ 0,005

Moklobemid hepatotoksitesinin gözden geçirildiği literatürde; tek dozdan sonra %40, çoklu dozdan sonra %85'e kadar artış gösteren sistemik yararlanımda bile hepatotoksiste vakası bildirilmediği ve moklobemid hepatotoksitesi hakkında şu an için herhangi bir kanıt olmadığı belirtilmektedir [17, 73]. Prada vd. tarafından sıçanlar üzerinde yürütülen çalışmada hepatotoksik etkisi bulunmadığı belirtilmektedir [250]. Hilton vd. tarafından moklobemid kullanan hastalarda 3 yıl boyunca yürütülen klinik çalışma sonucunda; en sık bildirilen advers etkilerin psikiyatrik, nörolojik ve gastrointestinal bozukluklar olduğu, hepatobiliyer advers etkilerin nadir olarak gözlemlendiği ve moklobemidin büyük ölçüde hepatotoksik potansiyelden yoksun olduğu ifade edilmektedir [251]. Bununla birlikte moklobemid, kolestatik tipteki İİKH ile ilişkilendirilmiş; Timmings ve Lamont tarafından, moklobemid kullanımıyla ilişkili ölümle sonuçlanan intrahepatik kolestaz vakası rapor edilmiştir [32]. Vakada hastanın seri karaciğer fonksiyon testlerinin hepatik ve obstrüktif bir görüntü sergilediği; aynı zamanda karaciğer fonksiyon testlerinin normalden 10 kat, GGT düzeyinin ise normalden 20 kat daha yüksek seyrettiği bildirilmiştir. Çalışmada daha eski, geri dönüşsüz MAOI kullanımının karaciğer fonksiyon testleri ve hepatoselüler hasar olmak üzere %1'lik karaciğer hasarı insidansı ile sonuçlandığı ve benzer etkilerin moklobemid ile de ilişkili olabileceği vurgulanmıştır [252]. Tüm sonuçlar gözden geçirildiğinde moklobemidin görece ROT oluşturma potansiyelinin dışında herhangi bir hepatotoksiste belirtecinde değişikliğe yol açmadığı görülmektedir. Moklobemidin bir ölümcül İİKH vakasına sebep olduğu ve serum transaminaz seviyelerini arttırabildiği fakat bu durumun immünoalerjik mekanizmalar ile oluştuğuna dair veriler mevcuttur [246, 253]. Bu noktada sonuçlarımıza göre moklobemide ilişkin hepatotoksiste ihtimalinin düşük olduğu söylenebilir.

Selejilin ile yapılmış klinik çalışmalarda serum AST ve ALT düzeylerinde artış kaydedilmiştir [73]. Karaciğer ve böbrek fonksiyonları üzerine etkisinin incelendiği başka bir çalışmada, kontrol grubunun ve İİKH bulunan hastaların laboratuvar testlerinin sonuçları (ALT, AST, ALP, GGT); klinik olarak anlamlı bir anormallik göstermemiştir ve çalışma esnasında hiçbir advers etki bildirilmemiştir [107]. Ancak çalışma sonucunda anormal karaciğer fonksiyonuna sahip hastalara reçete edildiğinde doz azaltımı gerekebileceği vurgulanmıştır [14]. Parkinson hastalığında oral selejilin kullanımının gözden geçirildiği literatürde ise, bu ajanla ilgili hepatotoksiste raporlarına rastlanmamıştır ve selejilin hepatotoksitesinin bulunduğu dair şu an için herhangi bir kanıt yoktur [14, 17, 31]. Bu tez çalışmasının sonuçlarına göre ise selejilin ALT, AST ve

üre düzeylerinde anlamlı azalmalara yol açmıştır. ALT'nin karaciğere spesifik oluşu, AST'nin de hepatoselüler hasar göstergeleri arasında önemini taşıması ve ürenin de hepatik sentezin ek göstergelerinden olması sebebiyle selejilinin bu belirteçler düzeyinde azalmaya yol açması literatürde bu enzimlerin sentezi için gerekli olan piridoksal-5'-fosfat (Vitamin B<sub>6</sub>) eksikliğinden kaynaklanmış olabilmesine bağlanmıştır [161]. Üre siklusunun görevi ise amino asit katabolizmasının bir ürünü olan amonyağı detoksifiye etmektir [254]. Bu noktada da üre miktarındaki azalmalar, bu katabolizmanın ve detoksifikasyonun azaldığına işaret edebilir.

Klorjilin şu anda MAO-A'yı inhibe etmek için prelinik olarak yaygın şekilde kullanılmakta olsa da herhangi bir hepatotoksisite çalışmasının olmadığı dikkat çekmiştir [67, 120]. Ayrıca, klorjilin metabolizmasının gözden geçirildiği literatür taramasında bu ajana dair herhangi bir metabolizma/biyotransformasyon verisi olmadığı dikkat çekmiştir. Ayrıca, yine hepatoselüler toksisitenin göstergeleri olan ALT, AST ve hepatik sentezin ek göstergelerinden olan üre miktarını belirgin olarak arttırmıştır. Üre miktarı üzerinde etkili olabileceği de başka bir çalışma ile gösterilmiştir [229]. Klorjilinin de hem hepatik biyogöstergelerde artışı hem de hücre ölümünü tetiklemesi hepatotoksisite potansiyelinin olabileceğini ortaya koymaktadır.

## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Moklobemid; geniş spektrumdaki depresif bozuklukların tedavisinde endike olan, hali hazırda kullanılan tek reversibl MAO-A inhibitörüdür. Selejilin, parkinsonda en çok kullanılan selektif irreversibl MAO-B inhibitörüdür. Klorjilin ise, günümüzde klinikte kullanımı bulunmayan; ancak prelinik olarak depresyon, anksiyete ve diğer duygudurum bozuklukları tedavisi çalışmalarında sıkça kullanılan, etkinliği otoritelerce kabul görmüş seçici reversibl MAO-A inhibitörüdür. Tez kapsamında çalışılan bu ajanların karaciğer hasarını indüklediği yönünde yaygın bir şüphe olmasına rağmen; haklarında yapılmış yeterli sayıda hepatotoksisite çalışması bulunmamaktadır. Bu noktadan hareketle; ajanların sitotoksik etkileri, hepatik hasarın biyogöstergeleri olarak kabul edilen biyokimyasal parametreler ve ROT seviyeleri insan karaciğerini iyi reflekte eden ve dünyaca kabul gören *in vitro* bir model olan HepG2 hücre hatları üzerinde incelenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, moklobemidin diğer ajanlara ve pozitif kontrole kıyasla ROT oluşumunu indüklediği; selejilinin ALT, AST ve üre düzeylerinde anlamlı azalmalara yol açtığı; klorjilinin HepG2 hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği, hepatik biyogöstergelerde artışa yol açtığı ve hücre ölümünü tetiklediği sonucuna ulaşılmıştır. Tüm bu parametreler göz önünde bulundurulduğunda; klorjilinin hepatotoksisite potansiyelinin bir adım daha önde olabilme ihtimali ortaya çıksa da bu ajanların hepatotoksisite potansiyeline sahip olabileceği gerçeği, ihmal edilmemesi gereken önemli bir advers etki alanı oluşturmaktadır. Sonuçlarımıza göre tez kapsamında incelenen MAOI ilaçlar; patolojik etkiler sonucu gerçekleşen ve enflamasyona neden olan hücre ölüm şekli olan nekrozdan ziyade, karaciğerde apoptozu indükleyerek amacı hücreyi korumak olan hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu sonuçlar, nörodejeneratif hastalıklarda endikasyonu sıklıkla araştırılan bu ilaçların kullanımını doğrulamaktadır. İlerleyen çalışmalarda tez kapsamında değerlendirilen parametrelerin yanı sıra; *in vitro* hepatotoksisitenin değerlendirilmesi için faydalı olabilecek yeni biyobelirteçlerden olan total keratin18 (K18) ve kaspazla parçalanmış keratin18 (ccK18), makrofaj koloni uyarıcı faktör reseptörü ve microRNA-122'nin kullanımı; olası toksisite mekanizmalarını aydınlatmada ve tüm ilaçlar için yeni bir izlem yöntemi ortaya koymada gelecekte yapılacak olan çalışmalar açısından son derece umut vaat edici olacaktır. Klinikte hepatik biyotransformasyona sahip ve hepatik enzimler üzerinde etkileri bulunan ajanların terapötik izleminin yapılmasına, klinisyenlerin de bu konuda hassas davranmasına ve

hepatotoksisite riskini tam olarak belirleyebilmek için epidemiyolojik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

## KAYNAKÇA

- [1] He, C., Wan, H. (2018). Drug metabolism and metabolite safety assessment in drug discovery and development. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 14 (10), 1071-1085.
- [2] Chalhoub, W.M., Sliman, K.D., Arumuganathan, M., Lewis, J.H. (2014). Drug induced liver injury: what was new in 2013? *Exper. Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 10 (7), 959-980.
- [3] Li, A.P. (2014). Biomarkers and human hepatocytes. *Biomark. Med.*, 8 (2), 173-183.
- [4] Neuman, M.G. (2019). Biomarkers of Drug-Induced Liver Toxicity. *Ther. Drug. Monit.*, 41 (2), 227-234.
- [5] McGill, M.R., Jaeschke, H. (2018). Biomarkers of drug-induced liver injury: progress and utility in research, medicine, and regulation. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 18 (9), 797-807.
- [6] Funk, C., Roth, A. (2017). Current limitations and future opportunities for prediction of DILI from in vitro. *Arch. Toxicol.*, 91 (1), 131-142.
- [7] Kuna, L., Bozic, I., Kizivat, T., Bojanic, K., Mrso, M., Kralj, E., Smolic, R., Wu, G.Y., Smolic, M. (2018). Models of Drug Induced Liver Injury (DILI) - Current Issues and Future Perspectives. *Curr. Drug Metab.*, 19 (10), 830-838.
- [8] Ramsay, R.R. (2016). Molecular aspects of monoamine oxidase B. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 69, 81-89.
- [9] Self, T.H., Chrisman, C.R., Baciewicz, A.M., Bronze, M.S. (1999). Isoniazid Drug and Food Interactions. *Am. J. Med. Sci.*, 317 (5), 304-311.
- [10] Timbrell, J.A. (1979). The role of metabolism in the hepatotoxicity of isoniazid and iproniazid. *Drug Metab. Rev.*, 10 (1), 125-147.
- [11] Metushi, I., Uetrecht, J., Phillips, E. (2016). Mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity: then and now. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 81 (6), 1030-1036.
- [12] Wang, P., Pradhan, K., Zhong, X.B., Ma, X. (2016). Isoniazid metabolism and hepatotoxicity. *Acta Pharm. Sin. B*, 6 (5), 384-392.
- [13] Aithal, G.P. (2015). Pharmacogenetic testing in idiosyncratic drug-induced liver injury: current role in clinical practice. *Liver Int.*, 35 (7), 1801-1808.
- [14] Sedky, K., Nazir, R., Joshi, A., Kaur, G., Lippmann, S. (2012). Which psychotropic medications induce hepatotoxicity? *Gen. Hosp. Psychiatry*, 34 (1), 53-61.

- [15] Amacher, D.E. (2002). A toxicologist's guide to biomarkers of hepatic response. *Hum. Exp. Toxicol.*, 21 (5), 253-262.
- [16] Suzuki, A., Andrade, R.J., Bjornsson, E., Lucena, M.I., Lee, W.M., Yuen, N.A., Hunt, C.M., Freston, J.W. (2010). Drugs associated with hepatotoxicity and their reporting frequency of liver adverse events in Vigibase: unified list based on international collaborative work. *Drug Saf.*, 33 (6), 503-522.
- [17] Larrey, D., Ripault, M.-P. (2013). Hepatotoxicity of Psychotropic Drugs and Drugs of Abuse. *Drug-Induced Liver Disease* içinde (s. 443-462).
- [18] Sass, D.A., Shakil, A.O. (2005). Fulminant hepatic failure. *Liver Transpl.*, 11 (6), 594-605.
- [19] Senior, J.R. (2008). What is idiosyncratic hepatotoxicity? What is it not? *Hepatology*, 47 (6), 1813-1815.
- [20] Uetrecht, J. (2009). Immunoallergic drug-induced liver injury in humans. *Semin. Liver Dis.*, 29 (4), 383-392.
- [21] Van Summeren, A., Renes, J., van Delft, J.H., Kleinjans, J.C., Mariman, E.C. (2012). Proteomics in the search for mechanisms and biomarkers of drug-induced hepatotoxicity. *Toxicol. In Vitro*, 26 (3), 373-385.
- [22] Schuster, D., Laggner, C., Langer, T. (2005). Why drugs fail--a study on side effects in new chemical entities. *Curr. Pharm. Des.*, 11 (27), 3545-3559.
- [23] Fontana, R.J. (2014). Pathogenesis of idiosyncratic drug-induced liver injury and clinical perspectives. *Gastroenterology*, 146 (4), 914-928.
- [24] Temple, R.J., Himmel, M.H. (2002). Safety of Newly Approved Drugs. *JAMA*, 287 (17), 2273-2275.
- [25] Devarbhavi, H. (2012). An Update on Drug-induced Liver Injury. *J. Clin. Exp. Hepatol.*, 2 (3), 247-259.
- [26] Raschi, E., De Ponti, F. (2015). Drug- and herb-induced liver injury: Progress, current challenges and emerging signals of post-marketing risk. *World J. Hepatol.*, 7 (13), 1761-1771.
- [27] Fung, M., Thornton, A., Mybeck, K., Wu, J.H.-h., Hornbuckle, K., Muniz, E. (2016). Evaluation of the Characteristics of Safety Withdrawal of Prescription Drugs from Worldwide Pharmaceutical Markets-1960 to 1999. *Drug Inf. J.*, 35 (1), 293-317.

- [28] Onakpoya, I.J., Heneghan, C.J., Aronson, J.K. (2016). Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature. *BMC Med.*, 14, 10.
- [29] Kullak-Ublick, G.A., Andrade, R.J., Merz, M., End, P., Benesic, A., Gerbes, A.L., Aithal, G.P. (2017). Drug-induced liver injury: recent advances in diagnosis and risk assessment. *Gut*, 66 (6), 1154-1164.
- [30] Vuppalanchi, R., Liangpunsakul, S., Chalasani, N. (2007). Etiology of new-onset jaundice: how often is it caused by idiosyncratic drug-induced liver injury in the United States? *Am. J. Gastroenterol.*, 102 (3), 558-562.
- [31] DeSanty, K.P., Amabile, C.M. (2007). Antidepressant-induced liver injury. *Ann. Pharmacother.*, 41 (7), 1201-1211.
- [32] Voican, C.S., Corruble, E., Naveau, S., Perlemuter, G. (2014). Antidepressant-induced liver injury: a review for clinicians. *Am. J. Psychiatry*, 171 (4), 404-415.
- [33] Lee, W.M., Senior, J.R. (2005). Recognizing drug-induced liver injury: current problems, possible solutions. *Toxicol. Pathol.*, 33 (1), 155-164.
- [34] Bunes, A., Roth, A., Herrmann, A., Schmitz, O., Kamp, H., Busch, K., Suter, L. (2014). Identification of metabolites, clinical chemistry markers and transcripts associated with hepatotoxicity. *PLOS One*, 9 (5), e97249.
- [35] Ostapowicz, G., Fontana, R.J., Schiodt, F.V., Larson, A., Davern, T.J., Han, S.H., McCashland, T.M., Shakil, A.O., Hay, J.E., Hynan, L., Crippin, J.S., Blei, A.T., Samuel, G., Reisch, J., Lee, W.M., Group, U.S.A.L.F.S. (2002). Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann. Intern. Med.*, 137 (12), 947-954.
- [36] Pandit, A. (2012). Drug-Induced Hepatotoxicity: A Review. *J. Appl. Pharm. Sci.*, 2 (5), 233-243
- [37] Persson, M., Loye, A.F., Mow, T., Hornberg, J.J. (2013). A high content screening assay to predict human drug-induced liver injury during drug discovery. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 68 (3), 302-313.
- [38] Chen, M., Borlak, J., Tong, W. (2013). High lipophilicity and high daily dose of oral medications are associated with significant risk for drug-induced liver injury. *Hepatology*, 58 (1), 388-396.

- [39] Lammert, C., Einarsson, S., Saha, C., Niklasson, A., Bjornsson, E., Chalasani, N. (2008). Relationship between daily dose of oral medications and idiosyncratic drug-induced liver injury: search for signals. *Hepatology*, 47 (6), 2003-2009.
- [40] Han, D., Shinohara, M., Ybanez, M.D., Saberi, B., Kaplowitz, N. (2010). Signal transduction pathways involved in drug-induced liver injury. *Handb. Exp. Pharmacol.*, (196), 267-310.
- [41] Kleiner, D.E. (2018): Drugs and Toxins. *Macswen's Pathology of the Liver* içinde (s. 673-779).
- [42] Park, S., Ishino, R. (2013). Liver Injury Associated with Antidepressants. *Curr. Drug Saf.*, 8 (3), 207-223.
- [43] Gomez-Lechon, M.J., Lahoz, A., Gombau, L., Castell, J.V., Donato, M.T. (2010). In Vitro Evaluation of Potential Hepatotoxicity Induced by Drugs. *Curr. Pharm. Des.*, 16 (17), 1963-1977.
- [44] Roth, R.A., Ganey, P.E. (2010). Intrinsic versus idiosyncratic drug-induced hepatotoxicity--two villains or one? *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 332 (3), 692-697.
- [45] Lee, W.M. (2003). Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med*, 349 (5), 474-485.
- [46] Kaplowitz, N. (2005). Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 4 (6), 489-499.
- [47] Amacher, D.E., Schomaker, S.J., Aubrecht, J. (2013). Development of blood biomarkers for drug-induced liver injury: an evaluation of their potential for risk assessment and diagnostics. *Mol. Diagn. Ther.*, 17 (6), 343-354.
- [48] Peters, T.S. (2005). Do preclinical testing strategies help predict human hepatotoxic potentials? *Toxicol. Pathol.*, 33 (1), 146-154.
- [49] Bjornsson, E., Olsson, R. (2005). Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease. *Hepatology*, 42 (2), 481-489.
- [50] Aithal, G.P., Watkins, P.B., Andrade, R.J., Larrey, D., Molokhia, M., Takikawa, H., Hunt, C.M., Wilke, R.A., Avigan, M., Kaplowitz, N., Bjornsson, E., Daly, A.K. (2011). Case definition and phenotype standardization in drug-induced liver injury. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 89 (6), 806-815.
- [51] Bjornsson, E.S., Jonasson, J.G. (2013). Drug-induced cholestasis. *Clin. Liver Dis.*, 17 (2), 191-209.
- [52] Verma, S., Kaplowitz, N. (2009). Diagnosis, management and prevention of drug-induced liver injury. *Gut*, 58 (11), 1555-1564.

- [53] Friedrich, M.E., Akimova, E., Huf, W., Konstantinidis, A., Papageorgiou, K., Winkler, D., Toto, S., Greil, W., Grohmann, R., Kasper, S. (2016). Drug-Induced Liver Injury during Antidepressant Treatment: Results of AMSP, a Drug Surveillance Program. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 19 (4), 1-9.
- [54] Chang, C.Y., Schiano, T.D. (2007). Review article: drug hepatotoxicity. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 25 (10), 1135-1151.
- [55] Ingelman-Sundberg, M. (2005). Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J.*, 5 (1), 6-13.
- [56] Sarges, P., Steinberg, J.M., Lewis, J.H. (2016). Drug-Induced Liver Injury: Highlights from a Review of the 2015 Literature. *Drug Saf.*, 39 (9), 801-821.
- [57] Wilkening, S., Stahl, F., Bader, A. (2003). Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab. Dispos.*, 31 (8), 1035-1042.
- [58] Eaton, D.L., Bammler, T.K. (1999). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sci.*, 49 (2), 156-164.
- [59] Kaplowitz, N. (2004). Drug-induced liver injury. *Clin. Infect. Dis.*, 38 (2), 44-48.
- [60] Gunawan, B.K., Kaplowitz, N. (2007). Mechanisms of drug-induced liver disease. *Clin. Liver Dis.*, 11 (3), 459-475.
- [61] Thompson, R.A., Isin, E.M., Ogese, M.O., Mettetal, J.T., Williams, D.P. (2016). Reactive Metabolites: Current and Emerging Risk and Hazard Assessments. *Chem. Res. Toxicol.*, 29 (4), 505-533.
- [62] Boelsterli, U.A., Lim, P.L. (2007). Mitochondrial abnormalities--a link to idiosyncratic drug hepatotoxicity? *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 220 (1), 92-107.
- [63] Billioti de Gage, S., Collin, C., Le-Tri, T., Pariente, A., Begaud, B., Verdoux, H., Dray-Spira, R., Zureik, M. (2018). Antidepressants and Hepatotoxicity: A Cohort Study among 5 Million Individuals Registered in the French National Health Insurance Database. *CNS Drugs*, 32 (7), 673-684.
- [64] Gartlehner, G., Gaynes, B.N., Hansen, R.A., Thieda, P., DeVeugh-Geiss, A., Krebs, E.E., Moore, C.G., Morgan, L., Lohr, K.N. (2008). Comparative benefits and harms of second-generation antidepressants: background paper for the American College of Physicians. *Ann. Intern. Med.*, 149 (10), 734-750.

- [65] Edmondson, D.E., Binda, C., Wang, J., Upadhyay, A.K., Mattevi, A. (2009). Molecular and mechanistic properties of the membrane-bound mitochondrial monoamine oxidases. *Biochemistry*, 48 (20), 4220-4230.
- [66] Edmondson, D.E., Mattevi, A., Binda, C., Li, M., Hubalek, F. (2004). Structure and Mechanism of Monoamine Oxidase. *Curr. Med. Chem.*, 11 (15), 1983-1993.
- [67] Fowler, J.S., Logan, J., Ding, Y.S., Franceschi, D., Wang, G.J., Volkow, N.D., Pappas, N., Schlyer, D., Gatley, S.J., Alexoff, D., Felder, C., Biegon, A., Zhu, W. (2001). Non-MAO A binding of clorgyline in white matter in human brain. *J. Neurochem.*, 79 (5), 1039-1046.
- [68] Billett, E. (2004). Monoamine Oxidase (MAO) in Human Peripheral Tissues. *NeuroToxicology*, 25 (1-2), 139-148.
- [69] Tripathi, A.C., Upadhyay, S., Paliwal, S., Saraf, S.K. (2018). Privileged scaffolds as MAO inhibitors: Retrospect and prospects. *Eur. J. Med. Chem.*, 145, 445-497.
- [70] Binda, C., Newton-Vinson, P., Hubalek, F., Edmondson, D.E., Mattevi, A. (2002). Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nat. Struct. Biol.*, 9 (1), 22-26.
- [71] Minguez-Minguez, S., Solis-Garcia Del Pozo, J., Jordan, J. (2013). Rasagiline in Parkinson's disease: a review based on meta-analysis of clinical data. *Pharmacol. Res.*, 74, 78-86.
- [72] Wimbiscus, M., Kostenko, O., Malone, D. (2010). MAO inhibitors: risks, benefits, and lore. *Cleve. Clin. J. Med.*, 77 (12), 859-882.
- [73] Yamada, M. (2004). Clinical Pharmacology of MAO Inhibitors: Safety and Future. *NeuroToxicology*, 25 (1-2), 215-221.
- [74] Finberg, J.P., Rabey, J.M. (2016). Inhibitors of MAO-A and MAO-B in Psychiatry and Neurology. *Front. Pharmacol.*, 7, 340.
- [75] Finberg, J.P. (2014). Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. *Pharmacol. Ther.*, 143 (2), 133-152.
- [76] Entzeroth, M., Ratty, A.K. (2017). Monoamine Oxidase Inhibitors—Revisiting a Therapeutic Principle. *Open J. Depress.*, 06 (02), 31-68.
- [77] Oreland, L., Nilsson, K., Damberg, M., Hallman, J. (2007). Monoamine oxidases: activities, genotypes and the shaping of behaviour. *J. Neural. Transm. (Vienna)*, 114 (6), 817-822.

- [78] Bortolato, M., Shih, J.C. (2011). Behavioral outcomes of monoamine oxidase deficiency: preclinical and clinical evidence. *Int. Rev. Neurobiol.*, 100, 13-42.
- [79] Song, M.S., Matveychuk, D., MacKenzie, E.M., Duchcherer, M., Mousseau, D.D., Baker, G.B. (2013). An update on amine oxidase inhibitors: multifaceted drugs. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 44, 118-124.
- [80] Kaludercic, N., Mialet-Perez, J., Paolocci, N., Parini, A., Di Lisa, F. (2014). Monoamine oxidases as sources of oxidants in the heart. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 73, 34-42.
- [81] Wecker, L., James, S., Copeland, N., Pacheco, M.A. (2003). Transdermal selegiline: targeted effects on monoamine oxidases in the brain. *Biol. Psychiatry*, 54 (10), 1099-1104.
- [82] Patkar, A.A., Pae, C.-U., Masand, P.S. (2014). Transdermal Selegiline: The New Generation of Monoamine Oxidase Inhibitors. *CNS Spectr.*, 11 (5), 363-375.
- [83] Edmondson, D.E., Binda, C. (2018). Monoamine Oxidases. *Subcell. Biochem.*, 87, 117-139.
- [84] Nandagopal, J.J., DelBello, M.P. (2009). Selegiline transdermal system: a novel treatment option for major depressive disorder. *Expert Opin. Pharmacother.*, 10 (10), 1665-1673.
- [85] Ramachandraith, C.T., Subramanyam, N., Bar, K.J., Baker, G., Yeragani, V.K. (2011). Antidepressants: From MAOIs to SSRIs and more. *Indian J. Psychiatry*, 53 (2), 180-182.
- [86] Bonkovsky, H.L., Blanchette, P.L., Schned, A.R. (1986). Severe liver injury due to phenelzine with unique hepatic deposition of extracellular material. *Am. J. Med.*, 80 (4), 689-692.
- [87] Daneshmend, T.K., Scott, G.L., Bradfield, J.W. (1979). Angiosarcoma of liver associated with phenelzine. *Br. Med. J.*, 1 (6179), 1679.
- [88] Zimmerman, H.J., Ishak, K.G. (1987). The Hepatic Injury of Monoamine Oxidase Inhibitors. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 7 (4), 211-213.
- [89] Fiedorowicz, J.G., Swartz, K.L. (2004). The Role of Monoamine Oxidase Inhibitors in Current Psychiatric Practice. *J. Psychiatr. Pract.*, 10 (4), 239-248.
- [90] Chen, J.J. (2011). Pharmacologic safety concerns in Parkinson's disease: facts and insights. *Int. J. Neurosci.*, 121 (2), 45-52.

- [91] Isbister, G.K., Buckley, N.A., Whyte, I.M. (2007). Serotonin toxicity: a practical approach to diagnosis and treatment. *Med. J. Aust.*, 187 (6), 361-365.
- [92] Asatoor, A.M., Levi, A.J., Milne, M.D. (1963). Tranylcypromine and Cheese. *The Lancet*, 282 (7310), 733-734.
- [93] Da Prada, M., Kettler, R., Keller, H.H., Burkard, W.P., Haefely, W.E. (1989). Preclinical profiles of the novel reversible MAO-A inhibitors, moclobemide and brofaromine, in comparison with irreversible MAO inhibitors. *J. Neural. Transm. Suppl.*, 28, 5-20.
- [94] Wang, S.M., Han, C., Bahk, W.M., Lee, S.J., Patkar, A.A., Masand, P.S., Pae, C.U. (2018). Addressing the Side Effects of Contemporary Antidepressant Drugs: A Comprehensive Review. *Chonnam. Med. J.*, 54 (2), 101-112.
- [95] Cattaneo, C., Caccia, C., Marzo, A., Maj, R., Fariello, R.G. (2003). Pressor response to intravenous tyramine in healthy subjects after safinamide, a novel neuroprotectant with selective, reversible monoamine oxidase B inhibition. *Clin. Neuropharmacol.*, 26 (4), 213-217.
- [96] Chen, J.J., Wilkinson, J.R. (2012). The monoamine oxidase type B inhibitor rasagiline in the treatment of Parkinson disease: is tyramine a challenge? *J. Clin. Pharmacol.*, 52 (5), 620-628.
- [97] Riederer, P., Laux, G. (2011). MAO-inhibitors in Parkinson's Disease. *Exp. Neurol.*, 20 (1), 1-17.
- [98] Riederer, P., Muller, T. (2017). Use of monoamine oxidase inhibitors in chronic neurodegeneration. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 13 (2), 233-240.
- [99] Bartl, J., Muller, T., Grunblatt, E., Gerlach, M., Riederer, P. (2014). Chronic monoamine oxidase-B inhibitor treatment blocks monoamine oxidase-A enzyme activity. *J. Neural. Transm. (Vienna)*, 121 (4), 379-383.
- [100] Al-Nuaimi, S.K., Mackenzie, E.M., Baker, G.B. (2012). Monoamine oxidase inhibitors and neuroprotection: a review. *Am. J. Ther.*, 19 (6), 436-448.
- [101] Bonnet, U. (2003). Moclobemide: Therapeutic Use and Clinical Studies. *CNS Drug Rev.*, 9 (1), 97-140.
- [102] Lecht, S., Haroutiunian, S., Hoffman, A., Lazarovici, P. (2007). Rasagiline - a novel MAO B inhibitor in Parkinson's disease therapy. *Ther. Clin. Risk Manag.*, 3 (3), 467-474.

- [103] Youdim, M.B. (2013). Multi target neuroprotective and neurorestorative anti-Parkinson and anti-Alzheimer drugs ladostigil and m30 derived from rasagiline. *Exp. Neurobiol.*, 22 (1), 1-10.
- [104] Seymour, C.B., Mothersill, C., Mooney, R., Moriarty, M., Tipton, K.F. (2003). Monoamine oxidase inhibitors l-deprenyl and clorgyline protect nonmalignant human cells from ionising radiation and chemotherapy toxicity. *Br. J. Cancer*, 89 (10), 1979-1986.
- [105] Dezsi, L., Vecsei, L. (2014). Safinamide for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 23 (5), 729-742.
- [106] Vindis, C., Seguelas, M.H., Bianchi, P., Parini, A., Cambon, C. (2000). Monoamine oxidase B induces ERK-dependent cell mitogenesis by hydrogen peroxide generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 271 (1), 181-185.
- [107] Anttila, M., Sotaniemi, E.A., Pelkonen, O., Rautio, A. (2005). Marked effect of liver and kidney function on the pharmacokinetics of selegiline. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 77 (1), 54-62.
- [108] Youdim, M.B., Gross, A., Finberg, J.P. (2001). Rasagiline [N-propargyl-1R(+)-aminoindan], a selective and potent inhibitor of mitochondrial monoamine oxidase B. *Br. J. Pharmacol.*, 132 (2), 500-506.
- [109] Abassi, Z.A., Binah, O., Youdim, M.B. (2004). Cardiovascular activity of rasagiline, a selective and potent inhibitor of mitochondrial monoamine oxidase B: comparison with selegiline. *Br. J. Pharmacol.*, 143 (3), 371-378.
- [110] Benedetti, M.S. (2001). Biotransformation of xenobiotics by amine oxidases. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 15 (2), 75-84.
- [111] Dezsi, L., Vecsei, L. (2017). Monoamine Oxidase B Inhibitors in Parkinson's Disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, 16 (4), 425-439.
- [112] Garcia-Miralles, M., Ooi, J., Ferrari Bardile, C., Tan, L.J., George, M., Drum, C.L., Lin, R.Y., Hayden, M.R., Pouladi, M.A. (2016). Treatment with the MAO-A inhibitor clorgyline elevates monoamine neurotransmitter levels and improves affective phenotypes in a mouse model of Huntington disease. *Exp. Neurol.*, 278, 4-10.
- [113] Pavlin, M., Mavri, J., Repic, M., Vianello, R. (2013). Quantum-chemical approach to determining the high potency of clorgyline as an irreversible acetylenic monoamine oxidase inhibitor. *J. Neural. Transm. (Vienna)*, 120 (6), 875-882.

- [114] Pietrangeli, P. (2004). Amine Oxidases and Tumors. *NeuroToxicology*, 25 (1-2), 317-324.
- [115] Ledesma, J.C., Escrig, M.A., Pastor, R., Aragon, C.M. (2014). The MAO-A inhibitor clorgyline reduces ethanol-induced locomotion and its volitional intake in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 116, 30-38.
- [116] Satram-Maharaj, T., Nyarko, J.N., Kuski, K., Fehr, K., Pennington, P.R., Truitt, L., Freywald, A., Lukong, K.E., Anderson, D.H., Mousseau, D.D. (2014). The monoamine oxidase-A inhibitor clorgyline promotes a mesenchymal-to-epithelial transition in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. *Cell Signal*, 26 (12), 2621-2632.
- [117] Lee, H.T., Jung, K.H., Kim, S.K., Choi, M.R., Chai, Y.G. (2013). Effects of pargyline on cellular proliferation in human breast cancer cells. *Mol. Cell. Toxicol.*, 8 (4), 393-399.
- [118] Mihalik, J., Maslankova, J., Spakovska, T., Marekova, M., Hodorova, I., Kusnir, J., Rybarova, S., Ferenc, P., Schmidtova, K. (2010). Impact of 2 doses of clorgyline on the rat preimplantation embryo development and the monoamine levels in urine. *Reprod. Sci.*, 17 (8), 734-741.
- [119] Youdim, M.B., Riederer, P.F. (2007). Monoamine oxidase A and B inhibitors in Parkinson's disease. *Handb. Clin. Neurol.*, 84, 93-120.
- [120] Glynn, D., Gibson, H.E., Harte, M.K., Reim, K., Jones, S., Reynolds, G.P., Morton, A.J. (2010). Clorgyline-mediated reversal of neurological deficits in a Complexin 2 knockout mouse. *Hum. Mol. Genet.*, 19 (17), 3402-3412.
- [121] Muller, T., Foley, P. (2017). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Safinamide. *Clin. Pharmacokinet.*, 56 (3), 251-261.
- [122] Waibel, S., Reuter, A., Malessa, S., Blaugrund, E., Ludolph, A.C. (2004). Rasagiline alone and in combination with riluzole prolongs survival in an ALS mouse model. *J. Neurol.*, 251 (9), 1080-1084.
- [123] Lima, F.B., Szawka, R.E., Anselmo-Franci, J.A., Franci, C.R. (2007). Pargyline effect on luteinizing hormone secretion throughout the rat estrous cycle: correlation with serotonin, catecholamines and nitric oxide in the medial preoptic area. *Brain Res.*, 1142, 37-45.
- [124] Yang, H.L., Cai, P., Liu, Q.H., Yang, X.L., Li, F., Wang, J., Wu, J.J., Wang, X.B., Kong, L.Y. (2017). Design, synthesis and evaluation of coumarin-pargyline hybrids

- as novel dual inhibitors of monoamine oxidases and amyloid-beta aggregation for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.*, 138, 715-728.
- [125] Bianchi, P., Seguelas, M.H., Parini, A., Cambon, C. (2003). Activation of proapoptotic cascade by dopamine in renal epithelial cells is fully dependent on hydrogen peroxide generation by monoamine oxidases. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 14 (4), 855-862.
- [126] Bazzu, G., Rocchitta, G., Migheli, R., Alvau, M.D., Zinellu, M., Puggioni, G., Calia, G., Mercanti, G., Giusti, P., Desole, M.S., Serra, P.A. (2013). Effects of the neurotoxin MPTP and pargyline protection on extracellular energy metabolites and dopamine levels in the striatum of freely moving rats. *Brain Res.*, 1538, 159-171.
- [127] Lee, H.T., Choi, M.R., Doh, M.S., Jung, K.H., Chai, Y.G. (2013). Effects of the monoamine oxidase inhibitors pargyline and tranylcypromine on cellular proliferation in human prostate cancer cells. *Oncol. Rep.*, 30 (4), 1587-1592.
- [128] Hempel, A., Camerman, N., Camerman, A., Mastropaolo, D. (2005). Pargyline hydrochloride, a monoamine oxidase inhibitor: an orthorhombic form. *Acta Crystallogr. E*, 61 (6), 1598-1600.
- [129] DeMaster, E.G., Sumner, H.W., Kaplan, E., Shirota, F.N., Nagasawa, H.T. (1982). Pargyline-induced hepatotoxicity: Possible mediation by the reactive metabolite, propionaldehyde. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 65 (3), 390-401.
- [130] Borgohain, R., Szasz, J., Stanzione, P., Meshram, C., Bhatt, M.H., Chirilineau, D., Stocchi, F., Lucini, V., Giuliani, R., Forrest, E., Rice, P., Anand, R., Study, I. (2014). Two-year, randomized, controlled study of safinamide as add-on to levodopa in mid to late Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, 29 (10), 1273-1280.
- [131] Krosser, S., Marquet, A., Gallemann, D., Wolna, P., Fauchoux, N., Hermann, R., Johne, A. (2012). Effects of ketoconazole treatment on the pharmacokinetics of safinamide and its plasma metabolites in healthy adult subjects. *Biopharm. Drug Dispos.*, 33 (9), 550-559.
- [132] Schapira, A.H. (2010). Safinamide in the treatment of Parkinson's disease. *Expert Opin. Pharmacother.*, 11 (13), 2261-2268.
- [133] Onofri, M., Bonanni, L., Thomas, A. (2008). An expert opinion on safinamide in Parkinson's disease. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 17 (7), 1115-1125.
- [134] Leonetti, F., Capaldi, C., Pisani, L., Nicolotti, O., Muncipinto, G., Stefanachi, A., Cellamare, S., Caccia, C., Carotti, A. (2007). Solid-phase synthesis and insights

- into structure-activity relationships of safinamide analogues as potent and selective inhibitors of type B monoamine oxidase. *J. Med. Chem.*, 50 (20), 4909-4916.
- [135] Leuratti, C., Sardina, M., Ventura, P., Assandri, A., Muller, M., Brunner, M. (2013). Disposition and metabolism of safinamide, a novel drug for Parkinson's disease, in healthy male volunteers. *Pharmacology*, 92 (3-4), 207-216.
- [136] Marzo, A., Dal Bo, L., Monti, N.C., Crivelli, F., Ismaili, S., Caccia, C., Cattaneo, C., Fariello, R.G. (2004). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of safinamide, a neuroprotectant with antiparkinsonian and anticonvulsant activity. *Pharmacol. Res.*, 50 (1), 77-85.
- [137] Youdim, M.B., Fridkin, M., Zheng, H. (2005). Bifunctional drug derivatives of MAO-B inhibitor rasagiline and iron chelator VK-28 as a more effective approach to treatment of brain ageing and ageing neurodegenerative diseases. *Mech. Ageing Dev.*, 126 (2), 317-326.
- [138] Weinstock, M., Gorodetsky, E., Wang, R.H., Gross, A., Weinreb, O., Youdim, M.B.H. (2002). Limited potentiation of blood pressure response to oral tyramine by brain-selective monoamine oxidase A-B inhibitor, TV-3326 in conscious rabbits<sup>11</sup>Supported by Teva Pharmaceuticals Ltd (Israel). *Neuropharmacology*, 43 (6), 999-1005.
- [139] Bolea, I., Gella, A., Unzeta, M. (2013). Propargylamine-derived multitarget-directed ligands: fighting Alzheimer's disease with monoamine oxidase inhibitors. *J. Neural. Transm. (Vienna)*, 120 (6), 893-902.
- [140] Sagi, Y., Drigues, N., Youdim, M.B. (2005). The neurochemical and behavioral effects of the novel cholinesterase-monoamine oxidase inhibitor, ladostigil, in response to L-dopa and L-tryptophan, in rats. *Br. J. Pharmacol.*, 146 (4), 553-560.
- [141] Kupersmidt, L., Amit, T., Bar-Am, O., Weinreb, O., Youdim, M.B. (2012). Multi-target, neuroprotective and neurorestorative M30 improves cognitive impairment and reduces Alzheimer's-like neuropathology and age-related alterations in mice. *Mol. Neurobiol.*, 46 (1), 217-220.
- [142] Gal, S., Fridkin, M., Amit, T., Zheng, H., Youdim, M.B. (2006). M30, a novel multifunctional neuroprotective drug with potent iron chelating and brain selective monoamine oxidase-ab inhibitory activity for Parkinson's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.*, 70, 447-456.

- [143] Gal, S., Zheng, H., Fridkin, M., Youdim, M.B. (2005). Novel multifunctional neuroprotective iron chelator-monoamine oxidase inhibitor drugs for neurodegenerative diseases. In vivo selective brain monoamine oxidase inhibition and prevention of MPTP-induced striatal dopamine depletion. *J. Neurochem.*, 95 (1), 79-88.
- [144] Salkovic-Petrisic, M., Knezovic, A., Osmanovic-Barilar, J., Smailovic, U., Trkulja, V., Riederer, P., Amit, T., Mandel, S., Youdim, M.B. (2015). Multi-target iron-chelators improve memory loss in a rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Life Sci.*, 136, 108-119.
- [145] Zheng, H., Gal, S., Weiner, L.M., Bar-Am, O., Warshawsky, A., Fridkin, M., Youdim, M.B. (2005). Novel multifunctional neuroprotective iron chelator-monoamine oxidase inhibitor drugs for neurodegenerative diseases: in vitro studies on antioxidant activity, prevention of lipid peroxide formation and monoamine oxidase inhibition. *J. Neurochem.*, 95 (1), 68-78.
- [146] Golko-Perez, S., Mandel, S., Amit, T., Kupersmidt, L., Youdim, M.B., Weinreb, O. (2016). Additive Neuroprotective Effects of the Multifunctional Iron Chelator M30 with Enriched Diet in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotox. Res.*, 29 (2), 208-217.
- [147] Mechlovich, D., Amit, T., Mandel, S.A., Bar-Am, O., Bloch, K., Vardi, P., Youdim, M.B. (2010). The novel multifunctional, iron-chelating drugs M30 and HLA20 protect pancreatic beta-cell lines from oxidative stress damage. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 333 (3), 874-882.
- [148] Aubrecht, J., Schomaker, S.J., Amacher, D.E. (2013). Emerging hepatotoxicity biomarkers and their potential to improve understanding and management of drug-induced liver injury. *Genome Med.*, 5 (9), 85.
- [149] Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monro, A., Kolaja, G., Lilly, P., Sanders, J., Sipes, G., Bracken, W., Dorato, M., Van Deun, K., Smith, P., Berger, B., Heller, A. (2000). Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 32 (1), 56-67.
- [150] Amacher, D.E. (2010). The discovery and development of proteomic safety biomarkers for the detection of drug-induced liver toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 245 (1), 134-142.

- [151] Beger, R.D., Sun, J., Schnackenberg, L.K. (2010). Metabolomics approaches for discovering biomarkers of drug-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 243 (2), 154-166.
- [152] Kier, L.D., Neft, R., Tang, L., Suizu, R., Cook, T., Onsurez, K., Tiegler, K., Sakai, Y., Ortiz, M., Nolan, T., Sankar, U., Li, A.P. (2004). Applications of microarrays with toxicologically relevant genes (tox genes) for the evaluation of chemical toxicants in Sprague Dawley rats in vivo and human hepatocytes in vitro. *Mutat. Res.*, 549 (1-2), 101-113.
- [153] Dear, J.W., Clarke, J.I., Francis, B., Allen, L., Wraight, J., Shen, J., Dargan, P.I., Wood, D., Cooper, J., Thomas, S.H.L., Jorgensen, A.L., Pirmohamed, M., Park, B.K., Antoine, D.J. (2018). Risk stratification after paracetamol overdose using mechanistic biomarkers: results from two prospective cohort studies. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.*, 3 (2), 104-113.
- [154] Solter, P.F. (2005). Clinical pathology approaches to hepatic injury. *Toxicol. Pathol.*, 33 (1), 9-16.
- [155] Ramaiah, S.K. (2007). A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food Chem. Toxicol.*, 45 (9), 1551-1557.
- [156] Schnackenberg, L., Yang, X., Salminen, W.F. (2012). Current and emerging biomarkers of hepatotoxicity. *Curr. Biomark. Find.*, 2012 (2), 43-55.
- [157] Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., Schomaker, S. (2008). The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*, 245 (3), 194-205.
- [158] Boone, L., Meyer, D., Cusick, P., Ennulat, D., Bolliger, A.P., Everds, N., Meador, V., Elliott, G., Honor, D., Bounous, D., Jordan, H. (2005). Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in preclinical studies. *Vet. Clin. Pathol.*, 34 (3), 182-188.
- [159] Weemhoff, J.L., Woolbright, B.L., Jenkins, R.E., McGill, M.R., Sharpe, M.R., Olson, J.C., Antoine, D.J., Curry, S.C., Jaeschke, H. (2017). Plasma biomarkers to study mechanisms of liver injury in patients with hypoxic hepatitis. *Liver Int.*, 37 (3), 377-384.
- [160] Luo, L., Aubrecht, J., Li, D., Warner, R.L., Johnson, K.J., Kenny, J., Colangelo, J.L. (2018). Assessment of serum bile acid profiles as biomarkers of liver injury and liver disease in humans. *PLOS One*, 13 (3), e0193824.

- [161] Giannini, E.G., Testa, R., Savarino, V. (2005). Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*, 172 (3), 367-379.
- [162] Yamazaki, M., Miyake, M., Sato, H., Masutomi, N., Tsutsui, N., Adam, K.P., Alexander, D.C., Lawton, K.A., Milburn, M.V., Ryals, J.A., Wulff, J.E., Guo, L. (2013). Perturbation of bile acid homeostasis is an early pathogenesis event of drug induced liver injury in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 268 (1), 79-89.
- [163] Beckett, G.J., Chapman, B.J., Dyson, E.H., Hayes, J.D. (1985). Plasma glutathione S-transferase measurements after paracetamol overdose: evidence for early hepatocellular damage. *Gut*, 26 (1), 26-31.
- [164] Antoine, D.J., Lewis, P.S., Goldring, C.E., Park, B.K. (2013). Are we closer to finding biomarkers for identifying acute drug-induced liver injury? *Biomark. Med.*, 7 (3), 383-386.
- [165] LeCluyse, E.L., Alexandre, E., Hamilton, G.A., Viollon-Abadie, C., Coon, D.J., Jolley, S., Richert, L. (2005). Isolation and culture of primary human hepatocytes. *Methods Mol. Biol.*, 290, 207-229.
- [166] Soldatow, V.Y., Lecluyse, E.L., Griffith, L.G., Rusyn, I. (2013). In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicol. Res. (Camb)*, 2 (1), 23-39.
- [167] Renwick, A.B., Watts, P.S., Edwards, R.J., Barton, P.T., Guyonnet, I., Price, R.J., Tredger, J.M., Pelkonen, O., Boobis, A.R., Lake, B.G. (2000). Differential maintenance of cytochrome P450 enzymes in cultured precision-cut human liver slices. *Drug Metab. Dispos.*, 28 (10), 1202-1209.
- [168] Godoy, P., Hewitt, N.J., Albrecht, U., Andersen, M.E., Ansari, N., Bhattacharya, S., Bode, J.G., Bolleyn, J., Borner, C., Bottger, J., Braeuning, A., Budinsky, R.A., Burkhardt, B., Cameron, N.R., Camussi, G., Cho, C.S., Choi, Y.J., Craig Rowlands, J., Dahmen, U., Damm, G., Dirsch, O., Donato, M.T., Dong, J., Dooley, S., Drasdo, D., Eakins, R., Ferreira, K.S., Fonsato, V., Fraczek, J., Gebhardt, R., Gibson, A., Glanemann, M., Goldring, C.E., Gomez-Lechon, M.J., Groothuis, G.M., Gustavsson, L., Guyot, C., Hallifax, D., Hammad, S., Hayward, A., Haussinger, D., Hellerbrand, C., Hewitt, P., Hoehme, S., Holzhutter, H.G., Houston, J.B., Hrach, J., Ito, K., Jaeschke, H., Keitel, V., Kelm, J.M., Kevin Park, B., Kordes, C., Kullak-Ublick, G.A., LeCluyse, E.L., Lu, P., Luebke-Wheeler, J., Lutz, A., Maltman, D.J., Matz-Soja, M., McMullen, P., Merfort, I., Messner, S., Meyer, C., Mwinyi, J., Naisbitt, D.J., Nussler, A.K., Olinga, P., Pampaloni, F., Pi, J., Pluta, L., Przyborski,

- S.A., Ramachandran, A., Rogiers, V., Rowe, C., Schelcher, C., Schmich, K., Schwarz, M., Singh, B., Stelzer, E.H., Stieger, B., Stober, R., Sugiyama, Y., Tetta, C., Thasler, W.E., Vanhaecke, T., Vinken, M., Weiss, T.S., Widera, A., Woods, C.G., Xu, J.J., Yarborough, K.M., Hengstler, J.G. (2013). Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch. Toxicol.*, 87 (8), 1315-1530.
- [169] Bale, S.S., Verneti, L., Senutovitch, N., Jindal, R., Hegde, M., Gough, A., McCarty, W.J., Bakan, A., Bhushan, A., Shun, T.Y., Golberg, I., DeBiasio, R., Usta, B.O., Taylor, D.L., Yarmush, M.L. (2014). In vitro platforms for evaluating liver toxicity. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 239 (9), 1180-1191.
- [170] Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C. (2007). The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.*, 168 (1), 66-73.
- [171] Jain, A.K., Singh, D., Dubey, K., Maurya, R., Mittal, S., Pandey, A.K. (2018). Models and Methods for In Vitro Toxicity. *In Vitro Toxicology içinde* (s. 45-65).
- [172] Moeller, T.A., Shukla, S.J., Xia, M. (2012). Assessment of compound hepatotoxicity using human plateable cryopreserved hepatocytes in a 1536-well-plate format. *Assay Drug Dev. Technol.*, 10 (1), 78-87.
- [173] Abraham, V.C., Towne, D.L., Waring, J.F., Warrior, U., Burns, D.J. (2008). Application of a high-content multiparameter cytotoxicity assay to prioritize compounds based on toxicity potential in humans. *J. Biomol. Screen.*, 13 (6), 527-537.
- [174] Schmidt, B.Z., Lehmann, M., Gutbier, S., Nembo, E., Noel, S., Smirnova, L., Forsby, A., Hescheler, J., Avci, H.X., Hartung, T., Leist, M., Kobolak, J., Dinnyes, A. (2017). In vitro acute and developmental neurotoxicity screening: an overview of cellular platforms and high-throughput technical possibilities. *Arch. Toxicol.*, 91 (1), 1-33.
- [175] Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., Bullock, P. (2004). Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol. In Vitro*, 18 (5), 703-710.

- [176] Vanden Berghe, T., Grootjans, S., Goossens, V., Dondelinger, Y., Krysko, D.V., Takahashi, N., Vandenabeele, P. (2013). Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods*, 61 (2), 117-129.
- [177] Krysko, D.V., Vanden Berghe, T., D'Herde, K., Vandenabeele, P. (2008). Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44 (3), 205-221.
- [178] Wlodkowic, D., Skommer, J., Darzynkiewicz, Z. (2009). Flow cytometry-based apoptosis detection. *Methods Mol. Biol.*, 559, 19-32.
- [179] Hollville, E., Martin, S.J. (2016). Measuring Apoptosis by Microscopy and Flow Cytometry. *Curr. Protoc. Immunol.*, 112, 1-24.
- [180] Wlodkowic, D., Telford, W., Skommer, J., Darzynkiewicz, Z. (2011). Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. *Methods Cell Biol.*, 103, 55-98.
- [181] Chen, D., Eyupoglu, I.Y., Savaskan, N. (2017). Ferroptosis and Cell Death Analysis by Flow Cytometry. *Methods Mol. Biol.*, 1601, 71-77.
- [182] Tuschl, H., Schwab, C.E. (2004). Flow cytometric methods used as screening tests for basal toxicity of chemicals. *Toxicol. In Vitro*, 18 (4), 483-491.
- [183] Givan, A.L. (2011). Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol. Biol.*, 699, 1-29.
- [184] Kaur, M., Esau, L. (2015). Two-step protocol for preparing adherent cells for high-throughput flow cytometry. *Biotechniques*, 59 (3), 119-126.
- [185] Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 37 (2), 163-176.
- [186] Fan, L.M., Li, J.M. (2014). Evaluation of methods of detecting cell reactive oxygen species production for drug screening and cell cycle studies. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 70 (1), 40-47.
- [187] Lyublinskaya, O.G., Ivanova, J.S., Pugovkina, N.A., Kozhukharova, I.V., Kovaleva, Z.V., Shatrova, A.N., Aksenov, N.D., Zenin, V.V., Kaulin, Y.A., Gamaley, I.A., Nikolsky, N.N. (2017). Redox environment in stem and differentiated cells: A quantitative approach. *Redox Biol.*, 12, 758-769.
- [188] Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 65 (2-3), 45-80.

- [189] Eruslanov, E., Kusmartsev, S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol. Biol.*, 594, 57-72.
- [190] Li, R., Jia, Z., Trush, M.A. (2016). Defining ROS in Biology and Medicine. *React. Oxyg. Species (Apex)*, 1 (1), 9-21.
- [191] Scialo, F., Fernandez-Ayala, D.J., Sanz, A. (2017). Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease. *Front. Physiol.*, 8, 428.
- [192] D'Autreaux, B., Toledano, M.B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 8 (10), 813-824.
- [193] Zorov, D.B., Juhaszova, M., Sollott, S.J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol. Rev.*, 94 (3), 909-950.
- [194] Starkov, A.A. (2010). Measurement of mitochondrial ROS production. *Methods Mol. Biol.*, 648, 245-255.
- [195] Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.*, 194 (1), 7-15.
- [196] Liang, J., Liu, B. (2016). ROS-responsive drug delivery systems. *Bioeng. Transl. Med.*, 1 (3), 239-251.
- [197] Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 82 (1), 47-95.
- [198] Zandalinas, S.I., Mittler, R. (2018). ROS-induced ROS release in plant and animal cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 122, 21-27.
- [199] Oparka, M., Walczak, J., Malinska, D., van Oppen, L., Szczepanowska, J., Koopman, W.J.H., Wieckowski, M.R. (2016). Quantifying ROS levels using CM-H2DCFDA and HyPer. *Methods*, 109, 3-11.
- [200] Yang, B., Chen, Y., Shi, J. (2019). Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. *Chem. Rev.*, 119 (8), 4881-4985.
- [201] Dupre-Crochet, S., Erard, M., Nubetae, O. (2013). ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J. Leukoc. Biol.*, 94 (4), 657-670.
- [202] Kristiansen, K.A., Jensen, P.E., Moller, I.M., Schulz, A. (2009). Monitoring reactive oxygen species formation and localisation in living cells by use of the fluorescent probe CM-H(2)DCFDA and confocal laser microscopy. *Physiol. Plant*, 136 (4), 369-383.

- [203] Feng, H., Ou, B., Dong, W., Thasler, W.E. (2018). Preparation and Culture of Human Liver Resident Immune Cells. *Curr. Protoc. Cell Biol.*, 80 (1), e50.
- [204] Mostafavi-Pour, Z., Khademi, F., Zal, F., Sardarian, A.R., Amini, F. (2013). In Vitro Analysis of CsA-Induced Hepatotoxicity in HepG2 Cell Line: Oxidative Stress and alpha2 and beta1 Integrin Subunits Expression. *Hepat. Mon.*, 13 (8), e11447.
- [205] Kaya, B., Hussin, W., Yurttas, L., Turan-Zitouni, G., Gencer, H.K., Baysal, M., Karaduman, A.B., Kaplancikli, Z.A. (2017). Design and Synthesis of New 1,3,4-Oxadiazole - Benzothiazole and Hydrazone Derivatives as Promising Chemotherapeutic Agents. *Drug Res. (Stuttg)*, 67 (5), 275-282.
- [206] Aras, M.A., Hartnett, K.A., Aizenman, E. (2008). Assessment of cell viability in primary neuronal cultures. *Curr. Protoc. Neurosci.*, 44, 1-15.
- [207] Hansen, J., Bross, P. (2010). A cellular viability assay to monitor drug toxicity. *Methods Mol. Biol.*, 648, 303-311.
- [208] Altintop, M.D., Sever, B., Ozdemir, A., Ilgin, S., Atli, O., Turan-Zitouni, G., Kaplancikli, Z.A. (2018). Synthesis and Evaluation of a Series of 1,3,4-Thiadiazole Derivatives as Potential Anticancer Agents. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 18 (11), 1606-1616.
- [209] Martinez-Reyes, I., Diebold, L.P., Kong, H., Schieber, M., Huang, H., Hensley, C.T., Mehta, M.M., Wang, T., Santos, J.H., Woychik, R., Dufour, E., Spelbrink, J.N., Weinberg, S.E., Zhao, Y., DeBerardinis, R.J., Chandel, N.S. (2016). TCA Cycle and Mitochondrial Membrane Potential Are Necessary for Diverse Biological Functions. *Mol. Cell*, 61 (2), 199-209.
- [210] Alvarez-Cilleros, D., Ramos, S., Goya, L., Martin, M.A. (2018). Colonic metabolites from flavanols stimulate nitric oxide production in human endothelial cells and protect against oxidative stress-induced toxicity and endothelial dysfunction. *Food Chem. Toxicol.*, 115, 88-97.
- [211] Xin, L., Wang, J., Fan, G., Che, B., Cheng, K., Dong, G. (2016). Comparative oxidative stress elicited by nanosilver in stable HSPA1A promoter-driven luciferase reporter HepG2 and A549 cells. *Toxicol. Res. (Camb)*, 5 (5), 1298-1305.
- [212] Kamalian, L., Chadwick, A.E., Bayliss, M., French, N.S., Monshouwer, M., Snoeys, J., Park, B.K. (2015). The utility of HepG2 cells to identify direct

- mitochondrial dysfunction in the absence of cell death. *Toxicol. In Vitro*, 29 (4), 732-740.
- [213] Snopov, S.A., Teryukova, N.P., Sakhenberg, E.I., Teplyashina, V.V., Nasyrova, R.F. (2017). Use of HepG2 cell line for evaluation of toxic and metabolic antipsychotic action. *Cell Tissue Biol.*, 11 (5), 405-415.
- [214] Ogino, M., Nagata, K., Yamazoe, Y. (2002). Selective Suppressions of Human CYP3A Forms CYP3A5 and CYP3A7 by Troglitazone in HepG2 Cells. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 17 (1), 42-46.
- [215] Hu, N., Hu, M., Duan, R., Liu, C., Guo, H., Zhang, M., Yu, Y., Wang, X., Liu, L., Liu, X. (2014). Increased Levels of Fatty Acids Contributed to Induction of Hepatic CYP3A4 Activity Induced by Diabetes — In Vitro Evidence From HepG2 Cell and Fa2N-4 Cell Lines. *J. Pharmacol. Sci.*, 124 (4), 433-444.
- [216] Donato, M.T., Tolosa, L., Gomez-Lechon, M.J. (2015). Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods Mol. Biol.*, 1250, 77-93.
- [217] Sassa, S., Sugita, O., Galbraith, R.A., Kappas, A. (1987). Drug metabolism by the human hepatoma cell, Hep G2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 143 (1), 52-57.
- [218] Hurrell, T., Lilley, K.S., Cromarty, A.D. (2019). Proteomic responses of HepG2 cell monolayers and 3D spheroids to selected hepatotoxins. *Toxicol. Lett.*, 300, 40-50.
- [219] Ghallab, A. (2014). The rediscovery of HepG2 cells for prediction of drug induced liver injury (DILI). *EXCLI J.*, 13, 1286-1288.
- [220] Olsavsky, K.M., Page, J.L., Johnson, M.C., Zarbl, H., Strom, S.C., Omiecinski, C.J. (2007). Gene expression profiling and differentiation assessment in primary human hepatocyte cultures, established hepatoma cell lines, and human liver tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 222 (1), 42-56.
- [221] Rodriguez-Antona, C., Donato, M.T., Boobis, A., Edwards, R.J., Watts, P.S., Castell, J.V., Gomez-Lechon, M.J. (2002). Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica*, 32 (6), 505-520.
- [222] O'Brien, P.J., Irwin, W., Diaz, D., Howard-Cofield, E., Krejsa, C.M., Slaughter, M.R., Gao, B., Kaludercic, N., Angeline, A., Bernardi, P., Brain, P., Hougham, C. (2006). High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro

- cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Arch. Toxicol.*, 80 (9), 580-604.
- [223] Gerets, H.H., Tilmant, K., Gerin, B., Chanteux, H., Depelchin, B.O., Dhalluin, S., Atienzar, F.A. (2012). Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol. Toxicol.*, 28 (2), 69-87.
- [224] Stockert, J.C., Blazquez-Castro, A., Canete, M., Horobin, R.W., Villanueva, A. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.*, 114 (8), 785-796.
- [225] Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65 (1-2), 55-63.
- [226] Berridge, M.V., Herst, P.M., Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 11, 127-152.
- [227] van Meerloo, J., Kaspers, G.J., Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol. Biol.*, 731, 237-245.
- [228] Prabst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., Hubner, H. (2017). Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol. Biol.*, 1601, 1-17.
- [229] Mayumitsuji, K.K., Okazaki, M. (1993). Hepatotoxicity of monoamine oxidase inhibitors in isolated and primary cultured hepatocytes of rat. *Monoamine Oxidase: Basic and Clinical Aspects* içinde (s. 89).
- [230] Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods*, 184 (1), 39-51.
- [231] Gorczyca, W. (1999). Cytometric analyses to distinguish death processes. *Endocr. Relat. Cancer*, 6 (1), 17-19.
- [232] Darzynkiewicz, Z., Bedner, E., Smolewski, P. (2001). Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin. Hematol.*, 38 (2), 179-193.

- [233] Kumar, G., Degheidy, H., Casey, B.J., Goering, P.L. (2015). Flow cytometry evaluation of in vitro cellular necrosis and apoptosis induced by silver nanoparticles. *Food Chem. Toxicol.*, 85, 45-51.
- [234] Crowley, L.C., Marfell, B.J., Scott, A.P., Waterhouse, N.J. (2016). Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2016 (11), 953-958.
- [235] Henry, C.M., Hollville, E., Martin, S.J. (2013). Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods*, 61 (2), 90-97.
- [236] Lekshmi, A., Varadarajan, S.N., Lupitha, S.S., Nair, M., Chandrasekharan, A., Santhoshkumar, T.R. (2018). A Real-Time Image-Based Approach to Distinguish and Discriminate Apoptosis from Necrosis. *Curr. Protoc. Toxicol.*, 75, 1-16.
- [237] Adams, J.M., Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281 (5381), 1322-1326.
- [238] Schenk, R.L., Strasser, A., Dewson, G. (2017). BCL-2: Long and winding path from discovery to therapeutic target. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 482 (3), 459-469.
- [239] Subramanian, T., Chinnadurai, G. (2003). Pro-apoptotic activity of transiently expressed BCL-2 occurs independent of BAX and BAK. *J. Cell Biochem.*, 89 (6), 1102-1114.
- [240] Dietrich, J.B. (1997). Apoptosis and anti-apoptosis genes in the Bcl-2 family. *Arch. Physiol. Biochem.*, 105 (2), 125-135.
- [241] Brandt, R., Keston, A.S. (1965). Synthesis of Diacetyldichlorofluorescein: A Stable Reagent for Fluorometric Analysis. *Anal. Biochem.*, 11, 6-9.
- [242] Figueroa, D., Asaduzzaman, M., Young, F. (2018). Real time monitoring and quantification of reactive oxygen species in breast cancer cell line MCF-7 by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 94 (1), 26-33.
- [243] Rhee, S.G., Chang, T.S., Jeong, W., Kang, D. (2010). Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Mol. Cells*, 29 (6), 539-549.
- [244] Aranda, A., Sequedo, L., Tolosa, L., Quintas, G., Burello, E., Castell, J.V., Gombau, L. (2013). Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a

- quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. *Toxicol. In Vitro*, 27 (2), 954-963.
- [245] Ubezio, P., Civoli, F. (1994). Flow cytometric detection of hydrogen peroxide production induced by doxorubicin in cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 16 (4), 509-516.
- [246] Rakic Ignjatovic, A., Miljkovic, B., Todorovic, D., Timotijevic, I., Pokrajac, M. (2009). Moclobemide monotherapy vs. combined therapy with valproic acid or carbamazepine in depressive patients: a pharmacokinetic interaction study. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 67 (2), 199-208.
- [247] Szoko, E., Kalasz, H., Magyar, K. (1999). Biotransformation of deprenyl enantiomers. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 24 (4), 315-319.
- [248] Nirogi, R., Palacharla, R.C., Mohammed, A.R., Manoharan, A., Ponnamaneni, R.K., Bhyrapuneni, G. (2015). Evaluation of metabolism dependent inhibition of CYP2B6 mediated bupropion hydroxylation in human liver microsomes by monoamine oxidase inhibitors and prediction of potential as perpetrators of drug interaction. *Chem. Biol. Interact.*, 230, 9-20.
- [249] Sharma, U., Roberts, E.S., Hollenberg, P.F. (1996). Formation of a metabolic intermediate complex of cytochrome P4502B1 by clorgyline. *Drug Metab. Dispos.*, 24 (11), 1247-1253.
- [250] Da Prada, M., Kettler, R., Burkard, W.P., Lorez, H.P., Haefely, W. (1990). Some basic aspects of reversible inhibitors of monoamine oxidase-A. *Acta Psychiatr. Scand. Suppl.*, 360, 7-12.
- [251] Hilton, S., Jaber, B., Ruch, R. (1995). Moclobemide safety: monitoring a newly developed product in the 1990s. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 15 (4), 76-83.
- [252] Timmings, P., Lamont, D. (1996). Intrahepatic cholestasis associated with moclobemide leading to death. *The Lancet*, 347 (9003), 762-763.
- [253] Gahr, M., Zeiss, R., Lang, D., Connemann, B.J., Hiemke, C., Schonfeldt-Lecuona, C. (2016). Drug-Induced Liver Injury Associated With Antidepressive Psychopharmacotherapy: An Explorative Assessment Based on Quantitative Signal Detection Using Different MedDRA Terms. *J. Clin. Pharmacol.*, 56 (6), 769-778.
- [254] Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., Yao, J., Zhou, L., Zeng, Y., Li, H., Li, Y., Shi, J., An, W., Hancock, S.M., He, F., Qin, L., Chin, J., Yang,

P., Chen, X., Lei, Q., Xiong, Y., Guan, K.L. (2010). Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science*, 327 (5968), 1000-1004.