BOR DERGİSİ
JOURNAL OF BORON
https://dergipark.org.tr/boron

4-Hidroksifenilboronik asitin HEPG2 hücre hattında asetaminofen ile indüklenen karaciğer hücre hasarı üzerine etkisinin araştırılması

Muhammet Çelik [1,*], **Pelin Aydın** [2]

[1]Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, 25240, Türkiye
[2]Erzurum Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Anestezi ve Reanimasyon Kliniği, Erzurum, 25240, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Makale Geçmişi:
İlk gönderi 26 Şubat 2022
Kabul 12 Eylül 2022
Online 30 Eylül 2022

Araştırma Makalesi

DOI: 10.30728/boron.1079589

Anahtar kelimeler:
4-Hidroksifenilboronik asit
Asetaminofen
HEPG2
Karaciğer hasarı

ÖZET

Karaciğer; detoksifikasyon, metabolizma, sindirime yardımcı olan safra salgısını üretmek başta olmak üzere yüzlerce farklı iş yapan özel bir organdır. Karaciğer hastalıkları ve sonrasında gelişebilecek karaciğer yetersizliği insanlar için çok kritik klinik sorunlardır. Son yıllarda karaciğer hasarının kemoterapotiklerin, antiviral ilaçların ve bitkisel destekleyici ürün kullanımının artışı ile beraber insidansının arttığı görülmektedir. Bu nedenle, günümüzde karaciğer hasarının tedavi edilebilmesi önem arz etmektedir. Asetaminofen (APAP), dünyada en yaygın kullanılan, reçetesiz satılan analjezik ve antipiretik ilaçlarından biridir. Bununla beraber, aşırı dozda APAP alınmasına bağlı olarak karaciğer hasarı gelişebilir. APAP'ın metaboliti, N-asetil-benzokinonimin(NAPQI), toksik etkinin ortaya çıkmasından sorumludur. NAPQI'nın hücre içi proteinlere, özellikle mitokondriyal proteinlere, kovalent bağlanması, mitokondriyal oksidatif stresi ve nihayetinde hepatosit nekrozunu tetiklediği bilinmektedir. Bor içeren bileşiklerin antibakteriyel, antiviral, antioksidatif ve antiinflamatuvar özelliklerine sahip olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Bor ve türevlerinin HIV, obezite, diabet ve kanser gibi hastalıkların tedavisinde faydaları da bilinmektedir. Borun bu özellikleri antioksidan mekanizma üzerinden hepatosit nekrozu için umut vadetmektedir. Bu çalışmada, boronik asit türevi olan 4-hidroksifenilboronik asidin (4-OHFBA) APAP ile indüklenmiş karaciğer hasarındaki etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 4-OHFBA tedavisi ile yüksek AST ve ALT seviyelerinin düştüğü gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar 4-OHFBA'nın karaciğer hasarının tedavisinde etkili olabileceğini göstermiştir.

Investigation of the effect of 4-hydroxyphenylboronic acid on acetaminophen-induced liver cell injury in HEPG2 cell line

ARTICLE INFO

Article History:
Received February 26, 2022
Accepted September 12, 2022
Available online September 30, 2022

Research Article

DOI: 10.30728/boron.1079589

Keywords:
4-Hydroxyphenylboronic acid
Acetaminophen
HEPG2
Liver damage

ABSTRACT

The liver is a special organ that does hundreds of different jobs, especially in detoxification, metabolism, producing bile secretion that helps digestion. Liver diseases and subsequent liver failure are very critical clinical problems for humans. In recent years, it has been detected that the incidence of liver damage has increased with the increasing use of chemotherapeutics, antiviral drugs and herbal supplements. Therefore, it is important to treat liver damage. Acetaminophen (APAP) is one of the most widely used, non-prescribed analgesic and antipyretic drug in the world. However, liver damage may develop due to overdose of acetaminophen. The N-acetyl-benzoquinonimine (NAPQI), metabolite of APAP, is responsible for the occurrence of the toxic effect. Covalent binding of NAPQI to intracellular proteins, especially mitochondrial proteins, is known to trigger mitochondrial oxidative stress and ultimately hepatocyte necrosis. It has been shown in previous studies that boron-containing compounds have antibacterial, antiviral, antioxidative and anti-inflammatory properties. The benefits of boron and its derivatives in the treatment of diseases such as HIV, obesity, diabetes and cancer are also known. These properties of boron show promise for hepatocyte necrosis through the antioxidant mechanism. In this study, it was aimed to investigate the efficacy of 4-hydroxyphenylboronic acid (4-OHFBA), a derivative of boronic acid, in APAP-induced liver injury. According to the results obtained, it was found that high AST and ALT levels decreased with 4-OHFBA treatment. These results showed that 4-OHFBA may be effective for treatment of liver damage.

*Corresponding author: drmuhammetcelik@gmail.com

1. Giriş (Introduction)

Parasetamol (asetaminofen), dünyada en yaygın kullanılan, analjezik ve antipiretik ilaçlarından biridir. Terapötik dozlarda kullanımı çok iyi tolere edilir. Ancak aşırı dozda alınması hepatotoksisiteye sebep olabilir ve bu durum, ilacın kullanımındaki en büyük problemdir. Hepatotoksisite sonucu akut karaciğer yetmezliği ile ölüm riski ortaya çıkabilir [1]. Asetaminofen (APAP), dar bir terapötik pencereye sahip, yaygın olarak kullanılan bir ateş düşürücü ve analjezik ilaçtır, ancak yüksek dozda, alkol ile birlikte veya diğer ksenobiyotiklerle kombinasyon halinde alınması, sentrilobüler hepatik nekroza neden olarak akut karaciğer yetmezliğine neden olur [2].

APAP, oral alındığında karaciğer tarafından hızlıca konjuge edilir ve glukuronidasyon ve sülfatlama reaksiyonları ile elimine edilir. Aynı zamanda, küçük bir yüzde, sitokrom-P450 enzimleri, özellikle CYP2E1 aracılığıyla toksik metabolit olan N-asetil-benzokinonimin'e (NAPQI) dönüştürülür. Terapötik dozlarda, NAPQI glutatyon tarafından kolayca detoksifiye edilir, ancak yüksek dozlarda, sülfatasyon yolu doyurulur ve glukuronidasyon reaksiyonu aşırı derecede NAPQI oluşumuna ve glutatyon tükenmesine yol açar [3]. NAPQI'nin hücre içi proteinlere, özellikle mitokondriyal proteinlere kovalent bağlanması, mitokondriyal oksidatif stresi ve nihayetinde hepatosit nekrozunu tetiklediği bildirilmiştir [4].

Özellikle ilaca bağlı karaciğer hasarının neden olduğu akut karaciğer yetmezliğinin, artık tüm dünyada önemli bir sağlık problemi olduğu düşünülmektedir [5,6]. Birleşik Krallık'ta yapılan bir vaka sunumunda APAP toksisitesinin çocuklarda akut karaciğer yetmezliği vakalarının %15'inden ve aynı zamanda da toplam vakaların %50'sine kadarından sorumlu olduğu düşünülmektedir [7]. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) 'nde APAP toksisitesine bağlı yılda 26.000 hastaneye yatış ve 450 ölüm rapor edilmektedir [8,9]. Parasetamolün neden olduğu akut karaciğer yetmezliği olan hastaların %29'unda doku transplantasyonu gerektirdiği ve bu hastaların %28'inin daha sonra çoklu organ yetmezliği gelişerek öldüğü bildirilmiştir [10,11]. Bu yüzden son zamanlarda APAP'a bağlı karaciğer toksisitesi klinikte önem kazanmıştır. Günümüzde mitokondriyal oksidatif strese bağlı hepatosit hasarını azaltmak için, fizyolojik antioksidan kapasiteyi arttırmak ve ROS oluşumunu ortadan kaldırmak adına hepatoprotektif ajanlar geliştirmek çok önemli bir stratejidir [12].

İnsan akut karaciğer yetmezliği ile ilgili en yaygın kullanılan deneysel model, APAP ile oluşturulan modeldir [13]. HepG2, HuH7 ve SK-Hep1 gibi hepatoma hücre hatları tipik olarak in vivo gözlemlenen APAP'ın reaktif metabolitini oluşturmak için CYP450 aktivitesinden yoksundurlar. Ancak yüksek dozda APAP'a karşı apoptoz yoluyla cevap oluşturmaktadır. Bu nedenle bu hücre hatları yaygın olarak in vitro toksikolojik modellerde kullanılır [14,15]. Bunlar arasından HEPG2, iyi bilinen bir hepatokarsinom hücre hattıdır. Düşük ilaç metabolize etme kapasitesi ve farklılaşma gibi karakteristik özellikleriyle zayıf karaciğer fonksiyonları ile karakterize edilebilir [16].

Bor, doğada yaygın olarak bulunan, periyodik tablonun 3A grubunda yer alan, atom numarası 5, atom kütlesi 10,811 g/mol olan bir metaloiddir. 1808 yılında Sir Humphry Davy ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir [17]. Bor, doğada element halinde bulunmaz. Bitki, hayvan ve insan organizmalarında fizyolojik olarak önemli olan bor formları, sodyum ve oksijen ile organobor kompleksleri oluşturur [18]. Bor, aynı zamanda mikrobiyal sistemlerin fizyolojik ve metabolik aktivitelerinde de önemli rollere sahiptir [19]. Borik asit, borik oksit, çinko borat, sodyum metaborat dihidrat, potasyum tetraborat tetrahidrat vb gibi çok sayıda bor bileşikleri mevcuttur [20]. Yapılan çalışmalar borun çeşitli metabolik, beslenme, hormonal ve fizyolojik süreçlerde rol oynadığı ve insanlar için gerekli olduğunu göstermiştir [21]. Bununla beraber bor içeren bileşikler antibakteriyel [22], antiviral [23], antioksidatif [24] ve antiinflamatuvar [25] özelliklerine sahip oldukları gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada borun, ROS oluşumunu inhibe ederek antioksidan aktivite sergilediğini ve aynı zamanda antijenotoksik ve hepatoprotektif etkilere sahip olduğu bildirilmiştir [25,26]. Antioksidan özellikleri ile hepatosit nekrozu için umut vaat ededen bir başka bor türevi olan boronik asit ise, biyolojik olarak aktif bileşiklerin sentezinde kullanılmaları ve HIV, obezite, diabet ve kanser gibi birçok tedavide kullanılmak üzere kendilerinin farmasötik özelliklerinin bulunması nedeniyle son zamanlarda oldukça fazla dikkat çekmeye başlamıştır [27,28]. Yapılan bir çalışmada fenilboronik asitin, β-laktamaz inhibitörleri olarak kullanılması yönünde olumlu sonuçlar gösterdiği bulunmuştur [29].

Yapılan literatür incelenmesinde HEPG2 hücre hattında APAP toksisitesi oluşturularak 4-OHFBA'nın etkinliğinin olup olmadığı ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Tüm bu bilgiler ışığında bu çalışmada, dünyada ve ülkemizde ilaç zehirlenmesinin en sık nedenlerinden biri olan parasetamolün oluşturduğu karaciğer hasarına karşı bir boronik asit türevi olan 4-OHFBA'nın koruyucu etkinliğinin olup olmadığı invitro canlılık testleri, AST ve ALT gibi karaciğer fonksiyon testleri incelenerek gösterilmeye çalışılmıştır.

2. Malzemeler ve Yöntemler (Materials and Methods)

2.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler (Materials Used in the Study)

APAP, Doğa İlaç'tan (Harbiye, İstanbul) 4-OHFBA ise Türkiye Enerji, Nükleer ve Maden Araştırma Kurumu Bor Araştırma Enstitüsü'nden (TENMAK BOREN) temin edilmiştir Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Medyumu (DMEM), fetal sığır serumu, penisilin, streptomisin, amfoterisin B gibi materyaller, Gibco'dan (Invitrogen Inc., Grand Island, New York, ABD) temin edilmiştir. Metiltiazol tetrazolyum (MTT) hücre proliferasyon kiti ise Roche'tan (Basel, İsviçre) satın alınmıştır. ALT ve AST enzim düzeyleri ölçümü için

gerekli olan kitler Roche Diagnostics'ten (Almanya) temin edilmiştir.

2.2. Hücre Kültürü Prosedürü ve APAP Uygulaması (Cell Culture Procedure and Acetaminophen Administration)

HEPG2 hücre hattı, American Type Culture Collection (ATCC, ABD)'dan temin edildikten sonra sıvı azot tankından çıkarılmış, %10 FBS, %1 penisilin streptomisin içeren DMEM besi yeri bulunan T75 cm^2 flaska ekilmiş ve 37°C'te, %90 nemlilikte %5 CO_2'li etüvde inkübe edilmiştir. Hücreler ardışık olarak pasajlanmıştır. İkinci pasajlama sonrası hücre sayımı yapılmış, 48 kuyucuk içeren plakanın her bir kuyucuğuna 2×10^5 hücre ekimi yapılmıştır. Hücrelerin yaklaşık olarak %90 oranında yüzeyi kaplaması beklendikten sonra adhezyon için 24 saat inkübe edilmiştir. Sonra, hücreler 20mM APAP ile 4 saat muamele edilmiştir [30,31]. APAP verilişinden sonra 4-OHFBA'nın 31,25µM, 62,5µM, 125µM ve 250µM dozları kuyucuklara eklenerek 24. ve 48. saatlerde hücre canlılığı değerlendirilmiştir [30]. Tedavi grupları, kontrol grupları ile kıyaslanmıştır.

2.3. Çalışma Grupları (Study Groups)

Çalışma grupları aşağıda sunulduğu gibi altı gruptan oluşmaktadır:

- Sağlıklı grup (Çözücü dışında bir uygulama yapılmamıştır).
- APAP grubu.
- APAP+31,25µM 4-OHFBA grubu.
- APAP+62,5µM 4-OHFBA grubu.
- APAP+125µM 4-OHFBA grubu.
- APAP+250µM 4-OHFBA grubu.

Tüm gruplarda kuyucukların bir kısmı 24. saatte, bir kısmı 48. saatte canlılık testine tabi tutulmuştur.

2.4. Metiltiazol Tetrazolyum Ölçümleri (Metiltiazol Tetrazolium Assays)

HEPG2 hücre hattı, American Type Culture Collection (ATCC, ABD)'dan alındıktan sonra sıvı azot tankında saklanmış, pasaj ve sayım işlemleri yapılmış, 3 farklı 96 kuyucuk içeren plakanın her bir kuyucuğuna 5×10^4 hücre ekimi yapılarak, daha sonra hücreler 20mM APAP'a maruz bırakılmıştır. APAP uygulamasından 4 saat sonra farklı konsantrasyonlarda (31,25µM, 62,5µM, 125µM ve 250µM) 4-OHFBA tedavisi uygulanmıştır. 4-OHFBA'nın APAP'a karşı hücre canlılığı üzerindeki etkilerini incelemek için hücreler 24 ve 48 saat süreyle inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuğa final konsantrasyonu 5mg/ml olacak şekilde Metiltiazol tetrazolyum (MTT) solüsyonu eklenerek hücreler 37°C'de 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. MTT formazon kristalleri oluştuktan sonra kuyucuklardaki tüm sıvı hacim çekilmiştir. Mor formazon kristallerinin çözülmesi için DMSO eklenmiş ve daha sonra hücre canlılık tespiti için, 550nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür (Epoch Mikroplaka Spektrofotometresi, BioTek, ABD) [32,33].

2.5. AST ve ALT Enzim Seviyelerinin Ölçümi (Measurement of AST and ALT Enzyme levels)

AST ve ALT enzim düzeyleri, hücre süpernatantlarında, Roche Cobas 8100 Otoanalizöründe (Modul Cobas C702, Roche Diagnostic, Almanya) spektrofotomertik olarak ölçülmüştür. AST ve ALT enzim aktiviteleri U/L birimi ile ifade edilmiştir.

2.6. İstatistiksel Analizler (Statistical Analyzes)

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi için SPSS-20 (IBM Corp., Armonk, NY, ABD) programı kullanılmıştır. Nümerik verilerin normal dağılımının tespiti için Shapiro-Wilk testi kullanılmıştır. Normal dağılım gösterdiği tespit edilen AST ve ALT sonuçlarının gruplar arası karşılaştırmasında One–way ANOVA ve post–hoc Duncan testi kullanılmıştır. Benzer şekilde normal dağılım gösteren MTT ölçüm sonuçları One–way ANOVA ve post–hoc Tukey testi ile analiz edilmiştir. Tüm analizlerde $P<0,05$ değeri istatistiki açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir [34].

3. Sonuçlar ve Tartışma (Results and Discussion)

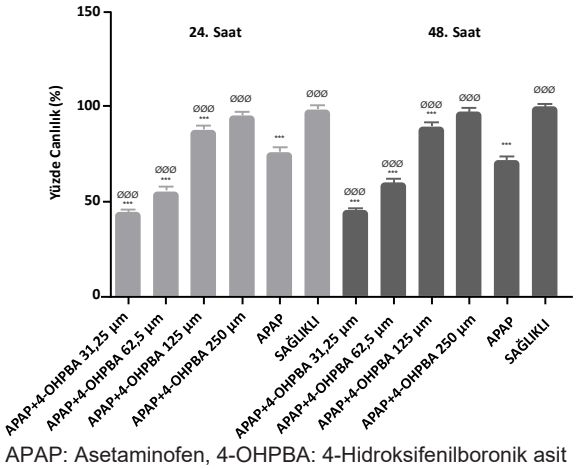
3.1. MTT Sonuçları (MTT Results)

Bir hepatokarsinom hücresi olan HEPG2 hücre hattında APAP uygulanan grubun, 24. ve 48. saatlerdeki MTT sonuçlarına göre, sağlıklı grupla karşılaştırıldığında hücre canlılık yüzdesinin anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır ($p<0,0001$). APAP verilerek hücre toksisitesi oluşturulmuş ve 4-OHFBA uygulanmış gruplar ile sadece APAP verilen grup karşılaştırıldığında, 125µM ve 250µM dozlarda 4-OHFBA ile muamele edilen gruplarda anlamlı derecede hücre canlılık yüzdesinin yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0,0001$). 250µM 4-OHFBA uygulanan grubun diğer tüm gruplara göre canlılık yüzdesi anlamlı derecede daha yüksek olarak saptanmış olup canlılık yüzdesi sağlıklı gruba en yakın grup olduğu tespit edilmiştir ($p<0,0001$) (Şekil 1).

3.2. AST ve ALT Bulguları (AST and ALT Results)

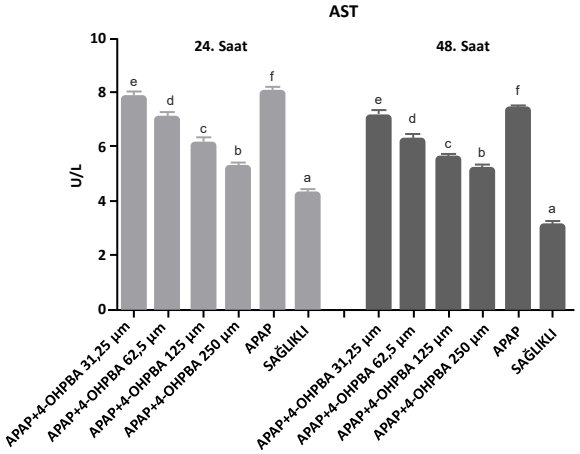
24. ve 48. saatlerdeki AST seviyelerine bakıldığında, APAP grubunda AST seviyesinin sağlıklı grupla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükseldiği gözlenmiştir ($p<0.05$). AST seviyelerinin, APAP+31,25µM, APAP+62,5µM, APAP+125µM ve APAP+250µM 4-OHFBA gruplarında APAP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$). APAP+250µM 4-OHFBA grubunda AST seviyelerinin çok daha fazla azaldığı ve sağlıklı grubun AST düzeylerine en yakın olan grup olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 2).

24. ve 48. Saatteki ALT seviyeleri incelendiğinde APAP grubundaki ALT seviyesinin sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde



APAP: Asetaminofen, 4-OHPBA: 4-Hidroksifenilboronik asit

Şekil 1. 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık yüzdelerinin karşılaştırmaları (MTT ölçüm sonuçları) Gruplar arası karşılaştırmada sağlıklı kontrole göre istatistiksel anlamlı farkı ifade etmek için * işareti kullanılırken, APAP grubuna göre anlamlı farkı ifade etmek için Ø işareti kullanılmıştır (*** ve ØØØ p<0,0001'i ifade etmektedir)) (Comparison of cell viability percentages at 24th and 48th hours (MTT measurement results). In the comparison between the groups, * sign was used to express the statistically significant difference compared to the healthy control, while the Ø sign was used to express the significant difference compared to the APAP group (*** and ØØØ represent p<0,0001)).



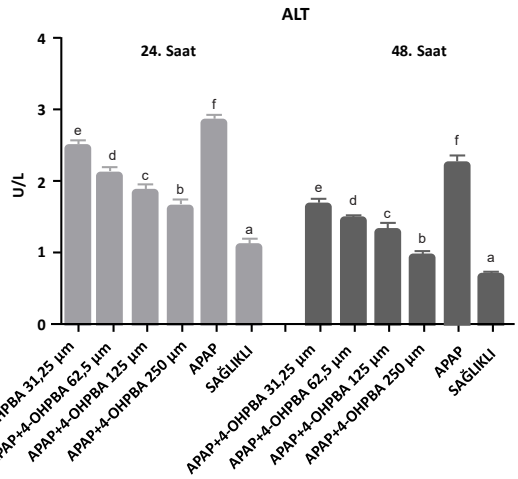
APAP: Asetaminofen, 4-OHPBA: 4-Hidroksifenilboronik asit

Şekil 2. AST seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılması (Aynı harfle işaretli gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yokken, p>0,05; farklı harfle işaretli gruplar arasında istatistiksel farklılık vardır, p<0,05) (Comparison of AST levels between groups (There is no statistically significant difference between groups marked with the same letter, p>0.05; there is a statistical difference between groups marked with different letters, p<0.05)).

yükseldiği gözlenmiştir (p<0,05). ALT seviyelerinin, APAP+31,25µM, APAP+62,5µM, APAP+125µM ve APAP+250µM 4-OHFBA gruplarında APAP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır (p<0,05). Bu azalmanın APAP+250µM 4-OHFBA grubunda çok daha belirgin olduğu ve sağlıklı grubun ALT seviyelerine en yakın olan grup olduğu saptanmıştır (p<0,05) (Şekil 3).

3.3. Sonuçların Tartışması (Discussion of the Results)

Gerçekleştirilen bu çalışmada, boronik asit türevi olan



APAP: Asetaminofen, 4-OHPBA: 4-Hidroksifenilboronik asit

Şekil 3. ALT seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılması (Aynı harfle işaretli gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yokken, p>0,05; farklı harfle işaretli gruplar arasında istatistiksel farklılık vardır, p<0,05) (Comparison of ALT levels between groups (There is no statistically significant difference between groups marked with the same letter, p>0.05; there is a statistical difference between groups marked with different letters, p<0.05)).

4-OHFBA'nın parasetamol ile indüklenmiş karaciğer hasarı modelinde muhtemel koruyucu etkisi HEPG2 hücre hattında incelenmiştir. Çalışmanın sonuçları incelendiğinde APAP ile toksisite oluşturulmuş HEPG2 hatlarında 4-OHFBA ile muamele sonrası 24. ve 48. saatlerde hücre canlılık oranının APAP grubuna göre arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar toksisiteye bağlı ortaya çıkan karaciğer hücre hasarını önlemede 4-OHFBA'nın etkili olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmada AST ve ALT değerleri incelendiğinde HEPG2 hücrelerine APAP muamelesi sonrasında artan AST ve ALT miktarının 4-OHFBA'ın tüm dozlardaki uygulamasıyla azaldığı tespit edilmiştir. Bu bulgular 4-OHFBA'nın APAP'a bağlı karaciğer hasarını önlemede hücresel düzeyde koruyucu etkisinin olduğunu göstermiştir.

Karaciğer; detoksifikasyon, metabolizma, sindirime yardımcı olan safra salgısını üretmek başta olmak üzere yüzlerce farklı iş yapan özel bir organdır. Karaciğer hastalıkları ve sonrasında gelişebilecek karaciğer yetersizliği insanlar için çok kritik bir klinik sorundur. Virüsler, ilaçlar, alkol, toksik kimyasallar ve besin takviyelerinin metabolitlerle ilgili doğrudan veya dolaylı toksisite yoluyla karaciğer hasarına neden olabileceği iyi bilinmektedir [35]. APAP analjezik ve antiinflamatuar etki için önerilen terapötik konsantrasyonlarda güvenli olduğu düşünülen dünyada en sık reçetesiz yazılan ilaçtır. Bununla beraber, aşırı dozda APAP alınmasına bağlı olarak karaciğer hasarı gelişebilir. Akut karaciğer yetmezliği ve hatta ölüme yol açma riski mevcuttur [36]. APAP, terapötik dozlarda güvenli olmasına rağmen bireysel farklılıklar analjezik etki için kolayca aşırı miktarda kullanılır. Doz aşımının neden olduğu karaciğer hasarı, alımdan sonra 24-48 saat içinde hızla meydana gelir [37]. Günümüzde APAP kaynaklı hepatotoksisitenin klinik tedavisi son derece sınırlıdır. N-asetilsisteinin (NAC), APAP zehirlenmesi için etkili

bir birinci basamak antidot olarak uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Ancak etkinliği sınırlıdır [4]. APAP'ın yüksek reaktif metabolit olan NAPQI, hücresel glutatyonu tüketerek ciddi oksidatif strese sebep olur. Bu da hepatoselüler nekroz ile sonuçlanır. Yüksek dozda APAP alındığında artan NAPQI, karaciğerin doğuştan gelen bağışıklık hücreleri inflamatuar mediatörlerin ve proinflamatuar sitokinlerin salımı ile hepatositlerdeki hasar artmasına sebep olur. NAPQI'nin mitokondriyal proteinlere bağlanması sonucu ortaya çıkan mitokondriyal hasarın APAP'ın toksisitesinin ana nedeni olduğu bilinmektedir [38]. İnsan akut karaciğer yetmezliği ile ilgili en yaygın kullanılan deneysel model ise APAP modelidir [13]. Bu çalışmada en sık toksisite modeli olan APAP kullanıldı.

HEPG2 hücre hatları, hepatositlerin birincil kültürlerinden daha stabildir. Aynı zamanda hücre kültüründe sınırsız ömürleri vardır ve ilaç metabolize edici enzimleri de taşımaktadırlar. Bu nedenle hepatotoksik ilaçlarla ilgili metabolizma ve toksisite çalışmalarında bu tür hücre dizileri sıklıkla tercih edilmektedir [39]. HEPG2 hücrelerinin, kontrol hücre kültürlerine kıyasla hücre canlılığının azalmasına yol açan APAP maruziyetine duyarlı olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. HEPG2 hücrelerinde APAP'a sürekli maruz kalma ile zamana bağlı sitotoksik etkiler görülmüştür [40]. Bu çalışmada HEPG2 hücre hattında APAP muamelesi sonrasında hücre canlılık yüzdesinin azaldığı görülmüştür.

Bor, ülkemizdeki rezervler açısından büyük önem arz eden bir elementtir. Borun canlı organizmalar üzerinde birçok etkisinin olduğu bilinmektedir [41]. Bor, canlıların beslenmesinde esansiyel bir elementtir [42]. Fizyolojik miktarlarda alınan bor organizmanın büyüme ve gelişiminde etkili olan birçok farklı maddenin metabolizmasında değişikliklere yol açabilir [43]. Bu değişikliklere bağlı olarak beyin, iskelet, cilt, bağışıklık ve sindirim sistemleri gibi birçok organ ve sistemlerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde görev alır [44]. Literatür incelendiğinde, bor ve bor bileşiklerinin artrit, osteoporoz, koroner kalp hastalıklarında, kanser tedavisinde olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir [45,46].

Bu çalışmada APAP ile indüklenen karaciğer hasarında 4-OHFBA'in potansiyel koruyucu etkisi hem hücre canlılık yüzdesi ile hem de AST ve ALT değerleri değerlendirilerek gösterilmiştir.

4. Sonuçlar (Conclusions)

Bu çalışmadaki tüm bulgular bir arada incelendiğinde APAP uygulaması ile artmış olan hücre ölümünün ve aynı zamanda karaciğer hücre hasarının belirteci olan artmış AST ve ALT seviyelerinin 4-OHFBA muamelesi ile azaldığı gösterilmiştir. Bu bulgular 4-OHFBA'nın APAP'a bağlı hücre ölümünde ve karaciğer hasarında etkili olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmanın daha ileri klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Kaynaklar (References)

[1] Graham, G. G., Scott, K. F., & Day, R. O. (2005). Tolerability of paracetamol. *Drug Safety*, *28*(3), 227-240.

[2] Ramachandran, A., & Jaeschke, H. (2018). Acetaminophen toxicity: Novel insights into mechanisms and future perspectives. *Gene Expression*, *18*(1), 19-30.

[3] McGill, M. R., & Jaeschke, H. (2013). Metabolism and Disposition of Acetaminophen: Recent Advances in Relation to Hepatotoxicity and Diagnosis. *Pharmaceutical Research*, *30*(9), 2174-2187.

[4] Du, K., Ramachandran, A., & Jaeschke, H. (2016). Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox Biology*, *10*, 148-156.

[5] Larson, A. M., Polson, J., Fontana, R. J., Davern, T. J., Lalani, E., Hynan, L. S., ... & Shakil, A. O. (2005). Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology*, *42*(6), 1364-1372.

[6] Bunchorntavakul, C., & Reddy, K. R. (2013). Acetaminophen-related hepatotoxicity. *Clinics in Liver Disease*, *17*(4), 587-607.

[7] Murray, K. F., Hadzic, N., Wirth, S., Bassett, M., & Kelly, D. (2008). Drug-related hepatotoxicity and acute liver failure. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *47*(4), 395-405.

[8] Jaeschke, H. (2015). Acetaminophen: Dose-dependent drug hepatotoxicity and acute liver failure in patients. *Digestive Diseases*, *33*(4), 464-471.

[9] Chun, L. J., Tong, M. J., Busuttil, R. W., & Hiatt, J. R. (2009). Acetaminophen hepatotoxicity and acute liver failure. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *43*(4), 342-349.

[10] Dong, V., Nanchal, R., & Karvellas, C. J. (2020). Pathophysiology of acute liver failure. *nutrition in clinical practice*, *35*(1), 24-29.

[11] Yoon, E., Babar, A., Choudhary, M., Kutner, M., & Pyrsopoulos, N. (2016). Acetaminophen-induced hepatotoxicity: A comprehensive update. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, *4*(2), 131-142.

[12] Lv, H., Hong, L., Tian, Y., Yin, C., Zhu, C., & Feng, H. (2019). Corilagin alleviates acetaminophen-induced hepatotoxicity via enhancing the AMPK/GSK3β-Nrf2 signaling pathway. *Cell Communication and Signaling*, *17*(1), 2-2.

[13] Maes, M., Vinken, M., & Jaeschke, H. (2016). Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *290*, 86-97.

[14] Boulares, A. H., Zoltoski, A. J., Stoica, B. A., Cuvillier, O., & Smulson, M. E. (2002). Acetaminophen induces a caspase-dependent and Bcl-XL sensitive apoptosis in human hepatoma cells and lymphocytes. *Pharmacology & Toxicology*, *90*(1), 38-50.

[15] Manov, I., Hirsh, M., & Iancu, T. C. (2004).

N-acetylcysteine does not protect HepG2 cells against acetaminophen-induced apoptosis. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *94*(5), 213-225.

[16] Bai, J., & Cederbaum, A. I. (2004). Adenovirus mediated overexpression of CYP2E1 increases sensitivity of HepG2 cells to acetaminophen induced cytotoxicity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *262*(1), 165-176.

[17] Bolanos, L., Lukaszewski, K., Bonilla, I., & Blevins, D. (2004). Why boron?. *Plant Physiology and Biochemistry*, *42*(11), 907-912.

[18] Hunt, C. D. (2003). Dietary boron: An overview of the evidence for Its role in immune function. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, *16*(4), 291-306.

[19] Tanaka, M., & Fujiwara, T. (2008). Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. *Pflugers Archiv*, *456*(4), 671-677.

[20] Demircan, B., & Velioğlu, Y. S. (2020). Gıda ve çevreden alınan bor bileşiklerinin toksikolojik değerlendirmesi [Toxicological evaluation of boron compounds taken from food and environment]. *Akademik Gıda*, *18*(3), 312-322.

[21] Hunt, C. D. (2012). Dietary boron: progress in establishing essential roles in human physiology. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *26*(2-3), 157-160.

[22] Lang, P. A., Parkova, A., Leissing, T. M., Calvopiña, K., Cain, R., Krajnc, A., ... & Trapencieris, P. (2020). Bicyclic boronates as potent inhibitors of ampC, the class C β-lactamase from Escherichia coli. *Biomolecules*, *10*(6), 899.

[23] Beer, L. C., Vuong, C. N., Barros, T. L., Latorre, J. D., Tellez, G., Fuller, A. K., & Hargis, B. M. (2020). Research note: Evaluation of boric acid as a chemoprophylaxis candidate to prevent histomoniasis. *Poultry Science*, *99*(4), 1978-1982.

[24] Çelikezen, F. Ç., Turkez, H., Togar, B., & Izgi, M. S. (2014). DNA damaging and biochemical effects of potassium tetraborate. *EXCLI Journal*, *13*, 446-450.

[25] Acaroz, U., Ince, S., Arslan-Acaroz, D., Gurler, Z., Demirel, H. H., Kucukkurt, I., ... & Zhu, K. (2019). Bisphenol-A induced oxidative stress, inflammatory gene expression, and metabolic and histopathological changes in male Wistar albino rats: Protective role of boron. *Toxicology Research*, *8*(2), 262-269.

[26] Hu, Q., Li, S., Qiao, E., Tang, Z., Jin, E., Jin, G., & Gu, Y. (2014). Effects of boron on structure and antioxidative activities of spleen in rats. *Biological Trace Element Research*, *158*(1), 73-80.

[27] Yang, W., Gao, X., & Wang, B. (2003). Boronic acid compounds as potential pharmaceutical agents. *Medicinal Research Reviews*, *23*(3), 346-368.

[28] Cambre, J. N., & Sumerlin, B. S. (2011). Biomedical applications of boronic acid polymers. *Polymer*, *52*(21), 4631-4643.

[29] Kiener, P. A., & Waley, S. G. (1978). Reversible inhibitors of penicillinases. *Biochemical Journal*, *169*(1), 197-204.

[30] Lőrincz, T., Deák, V., Makk-Merczel, K., Varga, D., Hajdinák, P., & Szarka, A. (2021). The Performance of HepG2 and HepaRG Systems through the Glass of Acetaminophen-Induced Toxicity. *Life (Basel)*, *11*(8), 856.

[31] Duan, L., Ramachandran, A., Akakpo, J. Y., Weemhoff, J. L., Curry, S. C., & Jaeschke, H. (2019). Role of extracellular vesicles in release of protein adducts after acetaminophen-induced liver injury in mice and humans. *Toxicology Letters*, *301*, 125-132.

[32] Ayaz, G., Halici, Z., Albayrak, A., Karakus, E., & Cadirci, E. (2017). Evaluation of 5-HT7 receptor trafficking on in vivo and in vitro model of lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory cell injury in rats and LPS-treated A549 cells. *Biochemical Genetics*, *55*(1), 34-47.

[33] Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2018*(6).

[34] Bilen, A., Calik, I., Yayla, M., Dincer, B., Tavaci, T., Cinar, I., ... & Mercantepe, F. (2021). Does daily fasting shielding kidney on hyperglycemia-related inflammatory cytokine via TNF-α, NLRP3, TGF-β1 and VCAM-1 mRNA expression. *International Journal of Biological Macromolecules*, *190*, 911-918.

[35] Dai, G., He, L., Chou, N., & Wan, Y. J. Y. (2006). Acetaminophen metabolism does not contribute to gender difference in its hepatotoxicity in mouse. *Toxicological Sciences*, *92*(1), 33-41.

[36] James, L. P., Mayeux, P. R., & Hinson, J. A. (2003). Acetaminophen-induced hepatotoxicity. Drug *Metabolism and Disposition*, *31*(12), 1499-1506.

[37] Singh, D., Cho, W. C., & Upadhyay, G. (2016). Drug-induced liver toxicity and prevention by herbal antioxidants: An overview. *Frontiers in Physiology*, *6*, 363.

[38] Woolbright, B. L., & Jaeschke, H. (2017). Role of the inflammasome in acetaminophen-induced liver injury and acute liver failure. *Journal of Hepatology*, *66*(4), 836-848.

[39] Donato, M. T., Lahoz, A., Castell, J. V., & Gomez-Lechon, M. J. (2008). Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Current Drug Metabolism*, *9*(1), 1-11.

[40] Nicod, L., Viollon, C., Regnier, A., Jacqueson, A., & Richert, L. (1997). Rifampicin and isoniazid increase acetaminophen and isoniazid cytotoxicity in human HepG2 hepatoma cells. *Human & Experimental Toxicology*, *16*(1), 28-34.

[41] Balabanlı, B., & Balaban, T. (2015). Investigation into the effects of boron on liver tissue protein carbonyl, MDA, and glutathione levels in endotoxemia. *Biological Trace Element Research*, *167*(2), 259-263.

[42] Mohora, M., Boghianu, L., Muscurel, C., Duta, C., & Dumitrache, C. (2002). Effects of boric acid on redox status in the rat liver. *Romanian Journal Biophysics*, *12*(3-4), 77-82.

[43] Kot, F. S. (2009). Boron sources, speciation and its potential impact on health. *Reviews in Environmental Science Bio/Technology*, *8*(1), 3-28.

[44] Smith, R. A., & McBroom, R. B. (2000). Boron oxides, boric acid, and borates. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*.

[45] Khaliq, H., Juming, Z., & Ke-Mei, P. (2018). The physiological role of boron on health. *Biological Trace Element Research*, *186*(1), 31-51.

[46] Mogoşanu, G. D., Biţă, A., Bejenaru, L. E., Bejenaru, C., Croitoru, O., Rău, G., ... & Scorei, R. I. (2016). Calcium fructoborate for bone and cardiovascular health. *Biological Trace Element Research*, *172*(2), 277-281.