

ÖZGE YAZICI

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2020

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**METİMAZOL İNDÜKLÜ PANKREATİT OLUŞUM
MEKANİZMALARININ İN VİTRO ŞARTLARDA
DEĞERLENDİRİLMESİ**

ÖZGE YAZICI

**DANIŞMAN
PROF. DR. GÜL ÖZHAN**

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin her aşamasında desteğini ve yardımını esirgemeven ilgisini ve motivasyonunu en içten şekilde hissettiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Gül Özhan'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans programım boyunca birikim ve katkılarını benimle paylaşan İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı üyelerine, ve ayrıca tez çalışmam süresince de desteğine devam etmiş değerli hocam Prof. Dr. Sibel Özden'e en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Her anımda yanımda olan canım aileme, hayatımda yer bulmuş ve beni oluşturmamda katkıda bulunmuş tüm sevdiklerime teşekkür ederim.

Bu çalışmayı (Proje No: 36298) destekleyen, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Metimazol	3
2.2. Metimazol Yan Etkileri ve Toksisitesi	4
2.3. Akut Pankreatit	7
2.4. İlaç İndüklü Pankreatit.....	10
2.5. İlaça Bağlı Pankreatit Oluşumunun Önlenmesi	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar	19
3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	20
3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler	21
3.4. Kullanılan Yöntemler.....	21
3.4.1. Hücre Dizisi ve Kültür Koşulları	21
3.4.2. Maruziyet Ortamı	23
3.5. Sitotoksitenin Tespiti.....	24
3.6. Apoptoz Potansiyelinin Anneksin V-FTIC/PI Apoptoz Testi İle Tespiti	25
3.7. Oksidatif Hasar Potansiyelinin Tespiti	26
3.8. İstatistiksel Değerlendirme	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. Sitotoksite Bulguları.....	29

4.2. Apoptoz Bulguları.....	30
4.3. Oksidatif Hasar Bulguları	31
5. TARTIŞMA	34
KAYNAKLAR	38
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	43
ÖZGEÇMİŞ	44



TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2-1: Metimazol kullanımı sonrası görülen akut pankreatit vakaları.....	7
Tablo 2-2: Akut pankreatit ile ilişkili ilaç ve ilaç grupları	11
Tablo 2-3: İlaç indüklü pankreatitin sınıflandırma sistemi.....	13
Tablo 4-1: Metimazolün 5-200 mM maruziyet konsantrasyon aralığında gözlenen maksimum hücre ölüm yüzdeleri.....	29
Tablo 4-2: Metimazolün apoptotik ve nekrotik etkileri.....	30
Tablo 4-3: Metimazolün oksidatif hasar etkileri.....	31
Tablo 4-4: Metimazolün PANC-1 hücreleri üzerinde oksidatif hasar etkileri.....	33

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4-1: Metimazolün PANC-1 hücre dizisi üzerine sitotoksik etkilerinin MTT testi ile tespiti.....	30
Şekil 4-2: Metimazolün apoptotik ve nekrotik etkileri.....	31
Şekil 4-3: Metimazolün PANC-1 hücreleri üzerine oksidatif hasar oluşturma potansiyelinin flowsitometrik yöntem ile değerlendirilmesi	32
Şekil 4-4: GSH standart ölçü eğrisi	32



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
8-OHdG	8-Hidroksi-2-deoksiguanozin
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ATCC	Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu
BSA	Sığır serum albumini
CO ₂	Karbondiyoksit
CYP450	Sitokrom P450
dL	Desilitre
dk	Dakika
DCF	Diklorofluorescein
DMEM	Dulbecco'nun modifiye edilmiş besiyeri
DMEM F-12	Ham's F-12 / Yüksek glukozlu DMEM besiyeri karışımı
DMSO	Dimetilsülfoksit
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
ELISA	Enzim-bağılı immun test
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
g	Gram

GSH	Glutasyon
H ₂ DCF-DA	2',7'-Diklorodihidrofluoressein diasetat
HDAC	Histon deasetilaz
IC ₃₀	Hücrelerin %30'unun öldüğü inhibisyon konsantrasyonu
IL-6	İnterlökin-6
iPSC	İndüklenmiş pluripotent kök hücre
kg	Kilogram
LPL	Lipoprotein lipaz
mL	Mililitre
mg	Miligram
mM	Milimolar
MTT	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
OD	Optik dansite
PANC-1	İnsan pankreas hücresi
PBS	Fosfat tamponu çözeltisi
PI	Propidyum iyodür
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Dakikadaki devir sayısı

T3	Tri-iodotironin
T4	Tiroksin
TNF- α	Tümör nekrozis faktör- α
WHO	Dünya Sağlık Örgütü



ÖZET

Yazıcı, Ö. (2020). Metimazol İndüklü Pankreatit Oluşum Mekanizmalarının İn Vitro Şartlarda Değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Metimazol, özellikle hipertiroidi ve Graves hastalığının tedavisinde kullanılan antitiroid ajanların başında gelir. Metimazolün bulantı, kusma, ürtiker gibi bilinen advers etkileri yanında etkin madde ile ilişkili pankreatit vaka raporları literatür çalışmaları ile aktarılmıştır. İlaç kaynaklı akut pankreatit riskine dair veriler daha çok vaka raporları ile vaka kontrol, hayvan ve *in siliko* çalışmalar sonucu elde edilen bilgilere dayanmakla birlikte bu riskin oluşum mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik *in vitro* çalışmalar oldukça azdır. İlaçların pankreatit oluşturma mekanizmalarının aydınlatılması hususunda yapılacak *in vitro* çalışmaların bu alandaki eksikliğin giderilmesi anlamında oldukça yararlı olacağı öngörülerek tez çalışmamız ile metimazol indüklü pankreatit oluşumunun altında yatan toksik etki mekanizmalarının tanımlanması hedeflenmiştir. Çalışmada IC₃₀ değeri tespit edilmiş, reaktif oksijen türlerinin oluşumunun metimazol indüklü pankreatit riskini arttırabileceği düşünülmektedir. Elde edilen sonuçların literatüre katkı sağlaması ve konu ile ilgili ileri düzey yeni araştırmaların planlanmasına zemin oluşturmaları amaçlanmaktadır.

Anahtar kelimeler: Metimazol, Akut pankreatit, İlaç indüklü pankreatit, Toksisite, Reaktif oksijen türleri

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36298

ABSTRACT

Yazıcı, Ö. (2020). Evaluation of Methimazole Induced Pancreatitis Formation Mechanisms in In Vitro Conditions. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Toxicology. Master Thesis. Istanbul.

Methimazole is one of the first-choice antithyroid agent used especially in the treatment of hyperthyroidism and Graves disease. In addition to the known adverse effects of methimazole, such as nausea, vomiting, and urticaria, pancreatitis case reports related to the this active substance have been reported through literature studies. Although data on the risk of drug-induced acute pancreatitis are mostly based on case reports and information obtained as a result of case control, animal and *in silico* studies; *in vitro* studies to elucidate the mechanisms of formation of this risk are scarce. It is foreseen that *in vitro* studies to clarify the mechanisms of pancreatitis induced by drugs will be very useful in terms of eliminating the deficiency in this field, and our thesis study aimed to define the toxic effect mechanisms underlying methimazole induced pancreatitis. In this study, IC₃₀ value was determined and it is thought that the formation of reactive oxygen species may increase the risk of methimazole-induced pancreatitis. The results obtained are intended to contribute to the literature and provide a basis for the planning of further new researches on the subject.

Key words: Methimazole, Acute Pancreatitis, Drug induced pancreatitis, Toxicity, Reactive oxygen species

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 36298

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pankreas, retroperitoneal yerleşimli ve %80'i ekzokrin, %2'si endokrin faaliyetlerden sorumlu bir organdır. Eski Yunan hekimleri tarafından bilinen bir organ olmasına rağmen pankreasın akut inflamasyonu sonucu oluşan akut pankreatit ancak 1883 yılında Chiari tarafından tanımlanmıştır. Akut pankreatitte intersitisyel ödemden hemoraji ve nekroza kadar değişebilen hasarlar söz konusudur ve ciddi akut pankreatitte mortalite oranı %20-40 arasında değişim gösterir. Akut pankreatit olgularının %80'i safra taşına veya alkole bağlı olarak ortaya çıkar. Bununla birlikte daha az sıklıkta olmakla birlikte akut pankreatite neden olan faktörlerden biri de ilaçlardır. İlaça bağlı pankreatit insidansı %0,1-2 oranında iken son zamanlarda yapılan çalışmalarda, %5'e varan bir insidans bildirilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) veritabanında, yan etki olarak akut pankreatiti tetiklediğinden şüphelenilen 500'den fazla ilaç listelenmiştir. Çoğu inceleme, ilaca bağlı akut pankreatitin, tüm akut pankreatit vakalarının %3-5'ini oluşturduğunu rapor etmektedir.

İlaç kaynaklı akut pankreatit riskinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik *in vitro* çalışmalar oldukça azdır. Daha çok vaka raporları ile vaka kontrol, hayvan ve *in siliko* çalışmalar sonucu elde edilen verilere dayalı teoriler üzerinden gidilmektedir. İlaça bağlı akut pankreatitte gerek ilaç etken maddesi gerekse de metabolitlerinin başta sitotoksikite ve aşırı duyarlılık reaksiyonlarına sebep olması sonucu oluşabileceği bildirilmektedir. Dolayısıyla ilaçların pankreatit oluşturma mekanizmalarının aydınlatılması hususunda yapılacak *in vitro* çalışmalar oldukça literatüre katkı sağlayacak çalışmalardır.

Hipertiroidizm ve Graves hastalığının tedavisinde kullanılan antitroid etkili bir ilaç olan metimazol, tiroid peroksidaz enziminin antitroid aktivitesine sahip bir tioamid inhibitörüdür. Hipertiroidi veya aşırı aktif tiroid bezinin tedavisinde kullanılan metimazol, tiroid hormonlarının sentezini inhibe ederek etki gösterir. Subtotal tiroidektomi veya radyoaktif iyot tedavisi için hazırlıkta hipertiroidizmi iyileştirmek için de kullanılır.

Metimazol, tiroid peroksidaza bağlanır ve böylece iyodürün iyodine dönüşümünü engeller. Tiroid peroksidaz normalde iyodürü iyodine dönüştürür (bir kofaktör hidrojen peroksit yoluyla) ve ayrıca ortaya çıkan iyodür molekülünün,

tiroglobülinde bulunan tirozinin fenol halkalarının hem 3 hem de 5 pozisyonlarına eklenmesini katalize eder. Tiroglobulin, tiroid bezinin ürettiği ana hormonlar olan tiroksin (T4) ve tri-iodotironinin (T3) üretilmesi için indirgenir. Metimazol, yeni tiroid hormonlarının üretimini etkili bir şekilde önler.

Metimazolün bulantı, kusma, halsizlik, döküntü, kaşıntı, kas ağrısı gibi tanımlı advers etkileri mevcuttur. Ürün bilgilerinde yer alan advers etkilerin yanı sıra, etkin madde ile ilişkili pankreatit vakalarının bulunduğu literatür çalışmaları ile aktarılmıştır. Metimazol indüklü pankreatit oluşumu bazı vakalar ile bildirilmiş olmakla birlikte altında yatan toksik etki mekanizmaları henüz yeterince aydınlatılmamıştır. Teoriler arasında pankreas kanalı daralması, arteriyolar tromboz, hepatik tutulum, toksik metabolitlerin birikmesi, ozmotik, basınç veya metabolik etkiler, aşırı duyarlılık reaksiyonları ve otoimmün reaksiyonlar bulunur.

Çalışmamızda; metimazolün pankreas hücrelerinde inflamasyon, sitotoksik, apoptoz oluşturma potansiyeli ve oksidatif hasara etkisi araştırılmıştır. Elde edilen verilerin literatürde belirtilen akut pankreatit oluşum vakalarının altında yatan toksik etki mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Metimazol

Metimazol, tiyonamid grubu anti-tiroid bir ilaçtır. Graves hastalığında, cerrahi veya radyoaktif iyot tedavisinde zayıf aday olan toksik multinodüler guatrda, tiroidektomi veya radyoaktif iyot tedavisine hazırlıkta hipertiroidi semptomlarını iyileştirme amacıyla kullanımı FDA (Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından onaylanmıştır. Diğer bir kullanımı ise tirotoksikoz/tiroid fırtınasının tedavisi içindir (Singh ve Correa 2020).

Gastrointestinal sistemden hızla emilen tiyonamidler oral alımı takiben yaklaşık 1-2 saatlik süre içinde maksimum plazma seviyesine ulaşır. Tiroidal konsantrasyonu serumdaki seviyesinden fazladır. İntratiroidal devri yavaştır, oral alımı takiben 17-20 saat sonra serumdaki konsantrasyon seviyesi 3-6 saat sonra görülen değere benzerdir. Plazma yarılanma ömrü 6-8 saattir. Bununla birlikte, tek doz metimazol 24 saatten uzun bir süre antitroid etki gösterebilir (Azizi 2006). Metimazol tiroid bezinden tiroid hormonu üretimini engeller. Tiroid peroksidaz enziminin aracılık ettiği tiroglobulin içindeki tirozin kalıntılarının iyotlanmasına neden olan ve böylece tiroksin (T4) ve triiyodotironin (T3) sentezini önleyen adıma müdahale eder (Abraham ve Acharya 2010). Bu esnada oluşan iyodotirozil artıklarının oluşumunu da engeller. Ayrıca iyodür iyonunun ve iyodotirozil gruplarının oksidasyonuna müdahale eder ve tiroglobulini tüketir ve dolaşımdaki tiroid hormon seviyelerini azaltır. Metimazol genel bağışıklık sistemini etkileyerek hastalıkların kontrol altına alınmasına yardımcı olabilir. Yapılan çalışmalarda hücre içi adezyon molekülü 1 (intracellular adhesion molecule 1), çözünür interlökin 2 (soluble interleukin 2) ve anti-tirotropin reseptör antikoru (anti-thyrotropin receptor antibody) gibi bağışıklık moleküllerinin zamanla azaldığı, böylece bağışıklık ile ilişkili hipertiroidi sorunlarında iyileşme olduğu gözlenmiştir (Sonnet ve ark. 1999). Hasta profilindeki iyileşmelerin bundan kaynaklanıp kaynaklanmadığı veya tiroid fonksiyonunun iyileşmesi nedeniyle olup olmadığı henüz tam olarak netlik kazanmamıştır. Ancak, metimazolün dolaşımda veya tiroid bezindeki depolanan, mevcut T4 ve T3 seviyeleri üzerine etkisi yoktur (Singh ve Correa 2020).

Metimazol oral uygulanır. Başlangıç dozu, şiddetine bağlı olarak, günde 20-40 mg'dır. Günlük doz, 8 saatte bir olmak üzere 3 doza bölünür. "Titrasyon rejimine" göre

yüksek başlangıç dozu 4-8 hafta sonra azaltılır. İdame dozu 5-20 mg'dır ve yaklaşık 12-18 ay boyunca devam eden 4-6 aylık tedavi sonrasında uygulanır. "Blok değiştirme rejimi"ne göre ise normal tiroid fonksiyon durumu ancak antitiroid ilaçların yüksek dozu ile korunarak tedaviye devam edilir. Bu rejimde biraz daha fazla yan etki sıklığı ile, izleme için daha az tiroid fonksiyon testine ihtiyaç duyması gibi ilave yararları vardır. Tiroid fırtınasının tedavisi, kontrole ulaşana kadar 8 saatlik aralıklarla oral yoldan verilen 60-80 mg/gün başlangıç dozunu içerir. Sonraki dozları ve tedavi süresi hasta yanıtına göre ayarlanmalıdır. Metimazol dar terapötik aralığına sahiptir ve izin verilen maksimum dozun kontrolü önemlidir:

Yetişkin: 40 mg/gün ağızdan; şiddetli durumda 60 mg/gün'e kadar

Geriatrik: Ağızdan 40 mg/gün; şiddetli durumda 60 mg/gün'e kadar

Ergen: İdame dozları nadiren ağızdan 30 mg/gün'ü aşar. Şiddetli hipertiroidizmde 1 mg/kg/gün. Tam büyüme gösteren hastalarda doz yetişkin dozuna yaklaşabilir.

Çocuk: İdame dozları nadiren ağızdan 30 mg/gün'ü veya şiddetli hipertiroidizm varsa 1 mg/kg/gün'ü aşar.

Bebek: Şiddetli hipertiroidizm varsa 1 mg/kg/gün (Singh ve Correa 2020).

2.2. Metimazol Yan Etkileri ve Toksisitesi

Tiyonamid alan hastalarda, bağışıklık infiltrasyonunda azalma ve otoantikör seviyelerinde düşüş meydana gelir. Serum antitiroid uyarıcı hormon reseptör antikoru, hücre içi adezyon molekülü 1 ve interlökin-2 ve -6 reseptörleri (IL-2 and IL-6) zamanla azalır. Metimazol, tiroid epitel hücreleri üzerindeki Fas ligandının ekspresyonunu indükler, böylece Fas'ı eksprese eden T hücreleri gibi infiltre lenfositlerin apoptozunu indükler. Tiyonamid ajanları ile tedavi sırasında, dolaşan baskılayıcı T hücrelerinin sayısında artış ve yardımcı T hücrelerinin, doğal öldürücü hücrelerin ve aktive edilmiş intratiroidal T hücrelerinin sayısında azalma gözlenir. Bu etkilerin klinik önemi belirsizdir, çünkü sadece tiroid fonksiyonundaki değişikliklerden kaynaklanabilir. Yüksek dozlarda veya uzun süreli tiyonamidlerin kullanımı ile daha fazla immünoşüpresif etkiye sahip olabilmesi hedefiyle, prospektif çalışmalar yürütülmüş, ancak biri hariç diğerlerinde bu yönde bir etki tespit edilmemiştir (Azizi 2006).

Metimazol kullanımı ile bildirilen en yaygın yan etkiler ateş, kaşıntı ve bulantıdır (Taguchi ve ark. 1999). Yaygın yan etkiler arasında ise gastrointestinal

rahatsızlık, baş ağrısı, uyuşukluk, artralji, paresteziler, saç dökülmesi ve döküntü bulunur (LiverTox 2020). Metimazol kullanımı sırasında bu tür anormallikleri olan hastalarda granülositopeni, ilaca bağlı lupus, şiddetli artralji, nötropeni, lenfopeni, eozinofili, Steven-Johnson sendromu gibi daha az karşılaşılan advers etkilerden şüphelenilmelidir (Taguchi ve ark. 1999; Rivkees ve ark. 2010). Yaygın olmayan reaksiyonlar arasında granülositopeni, lenfadenit, artrit, kolestatik sarılık, metimazol aracılı lupus eritematozus ve insülin otoimmün sendromu bulunur (Yang ve ark. 2012). Metimazolün nadir komplikasyonları (<%1) agranülositoz, aplastik anemi, nefrit ve hepatiti içerir (LiverTox 2020).

Metimazol doz aşımının yaygın semptomları bulantı, kusma, epigastrik rahatsızlık, ateş, eklem ağrısı, kaşıntı, vücut ağrısı ve şişliktir. Agranülositoz veya aplastik anemi de saatler veya günler içinde ortaya çıkabilir. Daha az yaygın olarak, hepatit, nefrotik sendrom, sinir hasarı, dermatit ve sinir sisteminin uyarılması veya depresyonu meydana gelebilir. Vücuttaki toksisite ve/veya ölümle ilişkili medyan ölümcül doz veya metimazol seviyesi hala bilinmemektedir. Aşırı dozda ilaç kullanımı durumunda, hastanın durumuna göre destekleyici tedavi başlatılır (Singh ve Correa 2020). Metimazol, tipik olarak, indüksiyon tedavisinde yüksek doz sırasında, tedaviye başladıktan sonraki ilk 3 ay boyunca serum aminotransferaz düzeylerinde geçici, asemptomatik yükselmelerle ilişkilendirilmiştir. Bu yükselmeler nadiren klinik olarak anlamlıdır ve genellikle tedavinin devamı ile bile düzelir. Metimazol ayrıca klinik olarak belirgin, idiyosenkratik karaciğer hasarına neden olabilir (LiverTox 2020).

Metimazolün hepatotoksik etkisi genelde başlangıç dozundan itibaren 2-12 hafta sonra gözlenir ve enzim yükselmesi paterni tipik olarak kolestatik veya karışıktır, ancak hepatoselüler paternler de tarif edilmiştir. Metimazolün neden olduğu kolestatik hepatit uzayabilir, ancak ölüm nadirdir, semptomlar ve sarılık genellikle tedaviyi bıraktıktan sonraki 2-8 hafta içinde düzelir. Nadiren uzun süreli kolestaz örnekleri tanımlanmıştır, kaybolan safra kanalı sendromu örneği yoktur (LiverTox 2020).

Karaciğer hasarına neden olan metimazolün rolünün değerlendirilmesini karmaşıklaştıran, hipertiroidinin tek başına karaciğer testi anormalliklerine ve hatta sarılıklara neden olabilmesidir (LiverTox 2020).

Tedavi edilmeyen hipertiroidisi olan hastaların yarısından fazlasında serum enzim anormallikleri (genellikle normal aralığın üst sınırının en fazla 5 katı) bulunur ve

küçük bir kısmında sarılık ve kolestatik hepatit ile birlikte görülür. Karaciğer testi göstergelerindeki yükselmeleri, yüksek debili kalp yetmezliği olan hastalarda en sık görülür. Anormallikler, ameliyat, radyoaktif iyot veya antitiroid ilaçlarla hipertiroidi tedavisi ile kısa sürede çözülür (LiverTox 2020).

Antitiroid ilaçların neden olduğu hepatotoksisitenin altında yatan patojenik mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Reaktif metabolitlerin ilaca bağlı hepatotoksisite patogenezindeki önemi bildirilmiştir (Heidari ve ark. 2015a). Sitokrom P450 (CYP450) sistemi, metimazol metabolizmasının ana yoludur. CYP450 enzimleri yoluyla metimazol metabolizması, karaciğer hasarının temeli olduğu ileri sürülen iki ana metabolit olarak N-metiltiyöre ve glioksal ($C_2H_2O_2$) verir. Metimazol ile indüklenen hepatik hasarı olan hastalardan alınan biyopsi örnekleri, kolestatik bir süreçte tipik olan ve tipik kolestatik profili üreten intrakanaliküler kolestaz ile portal yolun ödemi ve iltihaplanmasını göstermiştir (Heidari ve ark. 2014b; 2015a).

Ek olarak, immün aracılı reaksiyonların antitiroidin neden olduğu hepatotoksisitede rol oynadığı ileri sürülmektedir (Heidari ve ark. 2014b). Antitiroid ilaçların neden olduğu karaciğer hasarına karşı artan duyarlılığa katkıda bulunan faktörler; ileri yaş, kadın cinsiyet, mevcut karaciğer hastalıkları ve diğer hepatotoksik ilaçların eş zamanlı kullanımıdır. Bu yan etkinin potansiyel şiddeti nedeniyle, tedaviye başlamadan önce başlangıç karaciğer fonksiyonunun belirlenmesi ve hastaların olası alarm semptomları hakkında bilgilendirilmesi önerilir. Transaminazların rutin olarak izlenmesinin, bu hastalarda (antiroid tedavisine sekonder olarak veya hipertiroidizm nedeniyle) karaciğer fonksiyon testlerinde hafif ve geri dönüşümlü değişiklikler yaygın olduğu ve ciddi ilaç hepatotoksisitesini öngörmediği için ciddi karaciğer toksisitesi vakalarını önlemek için maliyet etkin olup olmadığı değerlendirilmeye devam edilmektedir (Peralta ve ark. 2018).

Metimazole bağlı karaciğer hasarının şiddeti, hafif, geçici serum aminotransferaz yükselmelerinden orta derecede şiddetli kolestatik hepatite kadar değişir. Ölümcül vakalar nadirdir. Bazı vakalarda otoimmünite veya immünoalerjik hepatit özellikleri vardır ve kortikosteroidlerle tedavi edilmiştir, ancak kanıtlanmış yarar yoktur. Metimazol durdurulduktan sonra iyileşme genellikle hızlıdır ve öncelik klinik olarak belirgin karaciğer hastalığının ilk belirtisinde antitiroid tedavisinin derhal kesilmesi olmalıdır. Hipertiroidizmin varlığı, karaciğer fonksiyonunun kötüleşmesinde

rol oynayabilir ve akut karaciğer hasarı sırasında bile beta-blokerler veya diğer yaklaşımlarla geçici yönetim gerekebilir. Bununla birlikte, ciddi vakalarda, hipertiroidizmin radyoaktif iyodür veya cerrahi ile daha kesin tedavisi daha uygun olabilir (LiverTox 2020).

Metimazol kullanımı ile akut pankreatit oluşumundan nadiren bahsedilmektedir. Klinik olarak, potansiyeli ciddi morbidite ve mortaliteye yol açabilir. İsveç'teki Appelros ve Borgström çalışmalarında (1999), akut pankreatitin ilk saldırısının yıllık insidansı 100.000 kişi başına 23,4 vaka ve akut pankreatit için yıllık mortalite 100.000 nüfus başına 1,3 vakadır. Ocak 2019'da, metimazolün olası potansiyel ilaç reaksiyonları listesine akut pankreatit oluşumu da eklenmiştir. Bu karar, metimazol ile tedavi edilen hastalardan 6 akut pankreatit vaka raporuna dayanır (Tablo 2-1). Nüfusa dayalı bir vaka kontrol çalışmasında bu ilişki tespit edilmemesine rağmen, Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency, EMA) ilaç için bir uyarı yayınlamış ve metimazol için ürün bilgisi, ciddi bir yan etki olarak akut pankreatiti içerecek şekilde değiştirilmiştir (Brix ve ark. 2020).

Tablo 2-1: Metimazol kullanımı sonrası görülen akut pankreatit vakaları

Yayın yılı	Ülke	Yaş	Cinsiyet	Semptom başlangıç süresi	Referans
1998	Japonya	66	Kadın	3 hafta	(Taguchi ve ark. 1999)
2001	Çin	18	Kadın	4 gün	(Yang ve ark. 2012)
2012	Amerika	80	Kadın	3 ay	(Abraham ve ark. 2012)
2014	Kore	51	Erkek	2 hafta	(Jung ve ark. 2014)
2015	Amerika	51	Kadın	3 hafta	(Agito ve Manni 2015)
2017	Japonya	76	Kadın	19 gün	(Kikuchi ve ark. 2018)

2.3. Akut Pankreatit

Pankreas, retroperitoneal yerleşimli, %80'i ekzokrin, %2'si endokrin faaliyetlerden sorumlu bir organdır. Pankreas eski Yunan hekimleri tarafından bilinen bir organ olmasına rağmen akut pankreatit 1883 yılında peripankreatik doku ve uzak organların da değişik derecelerde olaya dahil olduğu, pankreasın akut inflamasyonudur.

Morfolojik görünüm, hafif akut pankreatitte intersitisyel ödemden, ciddi akut pankreatitte görülen hemoraji ve nekroza kadar değişebilir. Bu nedenle hastalığın prognozu da değişkendir. Birçok ciddi formunda mortalite oranı %20-40 oranında değişim gösterir (Dedeli ve Özütemiz 2007).

Pankreatik asini tarafından salgılanarak, pankreasın kendi kendini sindirmesine (otodigesyona) neden olan pankreatik ve lizozomal enzimler, makrofajlar ve nötrofillerin aşırı uyarılmasıyla salgılanan birçok sitokin, inflamatuvar mediyator (lökotrienler, prostaglandinler, platelet aktive edici faktör) ve serbest radikaller damar geçirgenliğinin artmasıyla ve mikrosirkülasyonun bozulmasıyla sonuçlanan, ciddi akut pankreatitin (nekrotizan pankreatit) patogenezi oluşturur. Bu faktörlerin birinin diğeri ile karşılıklı etkileşimi sonucu oluşan ürünler, pankreatik asiner ve intersitisyel epitelyal bariyerde fonksiyon bozukluğuna neden olur. Bu fonksiyonel bozukluklar, uygun bir biçimde düzeltilmediyse, barsak bariyerinde hasara neden olarak endotoksinlerin ve intestinal bakterilerin kana geçişi ve bunun sonucunda endotoksemi ve enfeksiyonun neden olduğu çoklu organ disfonksiyonu ve çoklu organ yetmezliği şeklinde görülen sekonder bir atakla sonuçlanır. Asiner hücre hasarı ile oluşan lokal ve sistemik enflamatuvar yanıt, akut atağın organizmayı etkileme şiddetini belirler (Dedeli ve Özütemiz 2007).

Akut pankreatit yaygın bir akut cerrahi durumdur. Dünya çapında yıllık insidans 100.000 kişi başına 4,9-73,4 vaka olup Avustralya'da spektrumun üst ucunda görülme sıklığı vardır. Epidemiyolojik çalışmalarda pankreatit için ölüm oranı %1,5-4,2 olarak bildirilmiştir, ancak pankreatitin şiddetine göre bu oran değişir ve enfekte pankreas nekrozu olanlarda %30'a kadar çıkabilir (Nesvaderani ve ark. 2015). Yapılan bir çalışmada (Nesvaderani ve ark. 2015) şiddetli pankreatitin erken tanısı ve yoğun bakım desteğinin uygun kullanımı nedeniyle %0,08'lik düşük bir mortalite oranı bildirmiştir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde, ölüm oranı %9-20 ile yılda yaklaşık 5000 yeni akut pankreatit vakası bildirilmektedir. Hastalık Kontrol Merkezleri (Centers for Disease Control, CDC) tarafından raporlanan ölüm nedeni ile ilgili çizelge verileri, 1999-2001 yılları arasında ABD'de akut pankreatitten 8660 ölüm olduğunu göstermektedir (Granger ve Remick 2005). Hafif akut pankreatit çok düşük bir mortalite oranına (<%1) sahipken, şiddetli akut pankreatit için ölüm oranı, steril ve enfekte nekroz varlığına bağlı olarak %10-30'dur. ABD'de her yıl 210.000'e kadar hasta akut

pankreatit nedeniyle hastaneye yatırılmaktadır (Carroll ve ark. 2007). Akut pankreatit dünya genelinde gastrointestinal sistemle ilgili en sık hastaneye yatış gerektiren hastalıktır (Uyanıkoğlu 2019).

ABD'de akut pankreatit nedeniyle hastaneye yatışların doğrudan tıbbi maliyetlerini belirlemek ve yatan hastaların demografik özelliklerini analiz etmek için Fagengolz ve ark. (2007) tarafından bir çalışmada, akut pankreatit için ortalama hastanede yatış başına maliyetin 9870 \$ olduğu tahmini rapor edilmiştir. Akut pankreatit, ABD sağlık bakım harcamalarının yıllık 2.2 milyar dolardan sorumludur. Akut pankreatitli bir hastada ortalama hastanede kalış süresi yaklaşık 5-6 gündür. Ek olarak, akut pankreatite, hayatı tehdit eden komplikasyonların yanı sıra önemli morbidite ve mortalite eşlik edebilir (VanWoerkom ve Adler 2009).

Akut pankreatitin klinik ve patolojik seyri genellikle hafif olmasına karşın olguların %15-25'inde ciddi komplikasyonlarla seyredebilir. Birçok yönden ciddi akut pankreatitin klinik seyri geniş termal yaralanmalara benzer. Hastalığın erken dönemi hasarlı alanda belirgin sıvı elektrolit kaybı ve sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (systemic inflammatory response syndrome, SIRS)'nın gelişimi ile karakterizedir. Pankreatit atağı nedeniyle kaybedilen hastaların yaklaşık 1/3'ü hastalığın erken döneminde ve bu kaybedilen hastaların 1/2'si de akut solunum sıkıntısı sendromu (acute respiratory distress syndrome, ARDS) şeklinde görülen ciddi akciğer hasarı ve diğer süreçlerle ilgili olarak gelişen şok, bakteriyemi, iskemi/reperfüzyon hasarı gibi komplikasyonlardan kaybedilmektedir (Dedeli ve Özütemiz 2007).

Akut pankreatitin etiyolojik nedeninin tespit edilmesi, uygun tedavi ve takip açısından önemlidir. Akut pankreatit nedenleri en sık biliyer olmak üzere, alkol, hipertrigliseridemi, hiperkalsemi, ilaç ilişkili, otoimmün, herediter/genetik ve anatomik anomalilerdir. Akut pankreatit olgularının ilk üç nedenini safra taşı (~%42), alkol (~%21) ve idiyopatik (%10-30) etkenler oluşturmaktadır. Diğer akut pankreatit nedenleri arasında hipertrigliseridemi, hiperkalsemi, ilaç ilişkili, otoimmün, herediter/genetik ve anatomik anomaliler gelir (Uyanıkoğlu 2019).

Akut pankreatitin gelişiminde pankreas asinar hücreleri merkezi rol oynar. Safra taşı veya alkol gibi tetikleyici faktörler, asinar hücreleri uyarak, sindirim enzimlerinin (tripsinojen, prokarboksipeptidaz A1) aktive olmasına neden olur. İnce bağırsağa ulaşmadan bu enzimlerin aktive olması anahtar rol oynar. Kolesistokininin aşırı

stimülasyonu sonucu, tripsinojen otoaktivasyonu olmakta ve katepsin B stimülasyonu sonucu erken dönemde tripsin aktivitesi artar. Hiperkalsemi ve asit pH tripsinojen otoaktivasyonunu arttırır. Aktive olan enzimler, zimojen granülünden kaçır ve asinar hücreleri parçalayarak inflamatuvar mediatörlerin ve vasküler permeabiliteyi arttıran ajanların salınımına yol açar. Erken dönemde aktive olan tripsin kompleman sistemini aktive ederek nötrofil ve makrofajlardan serum ve pankreatik doku içerisine daha fazla tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), interlökin-1 (IL-1), nitrik oksit ve platelet aktive edici faktör (PAF) salınımına yol açar. Bu salgılanan faktörler, pankreasta ödem ve iskemiye neden olarak nekroza kadar giden geniş bir pankreatit spektrumuna yol açar. Bu inflamatuvar faktörler, ayrıca sistemik etkilere de sahip olup kapiller damarlardan sızıntıya, ateş ve hipotansiyona neden olabilir. Tüm bu olayların sonucunda pankreasta apoptozis ve nekroz ortaya çıkabilir. Bu sitokinlerin mekanizmasının tam anlaşılması ile gelecekte yeni terapötik ajanların elde edileceği ümit edilmektedir (Keşkek ve Hamaloğlu 2002).

2.4. İlaç İndüklü Pankreatit

İlaça bağlı pankreatit nadir görülür, tahmini insidansı %0,1-2 oranında olup 2010 yılı verilerine göre %5'e kadar artan bir insidans bildirilmiştir. WHO tarafından yan etki olarak akut pankreatiti tetiklediğinden şüphelenilen 500'den fazla ilaç listelenmiştir (Fathallah ve ark. 2015). İlaça bağlı ilk pankreatit vakaları 1950'lerde klortalidon ve kortizon ile bildirilmiştir. Balani ve Grendell (2008) 1950-2007 yılları arasındaki çalışmaları MEDLINE taraması ile belli kriterlere dayanarak pankreatite neden olan ilaçların bir listesini oluşturmuşlardır. Tracie Kaurich (2008) yaptığı çalışma ile pankreatite neden olan ilaçların daha geniş bir listesini oluşturmuştur (Tablo 2-2).

Tablo 2-2: Akut pankreatit ile ilişkili ilaç ve ilaç grupları

ACE inhibitörleri	Etakrinik asitler	Fenolftalein
Asetaminofen	Eksenatid	Pilokarpin
Alendronat	Ezetimib	Prazosin
Trans-retinoik asit	Fibratlar	Prokainamid
Alfa-metildopa	Finasterid	Propofol
Aminosalisilatlar	Florokinolonlar	Propoksifen
Amiodaron	5-Fluorourasil	Proton pompa inhibitörleri
Amlodipin	Furosemid	Kinopristin/Dalfopristin
Ampisilin	Gabapentin	Ranitidin
Antiviraller	Altın	Repaglinid
Aspirin	HAART ajanları	Rifampisin
Atipik antipsikotikler	İfosfamid	Rifapentin
Azatioprin	İndometazin	Rivastigmin
Bupropion	İnterferon/Ribavirin	Ropinirol
Kalsitriol	İnterlökin-2	Cüce palmye
Kenevir	İrbesartan	Seçici serotonin reseptör antagonistleri
Kapesitabin	İsoniazid	Sirolimus
Karbamazepin	İzotretinoin	Sodyum stiboglukonat
Seftriakson	Lamotrijin	Somatropin
Simetidin	L-asparaginaz	Sülfametoksazol
Sisplatin	Makrolidler	Sülfasalazin
Klomifen	Mefenamik asit	Sumatriptan
Kodein	6-Merkaptopürin	Takrolimus
Kolşisin	Mesalamin	Tamoksifen
Kortikosteroidler	Metformin	Tetrasiklinler
COX-2 inhibitörleri	Metimazol	Tiazid diüretikleri
Siklofosfamid	Metildopa	Trombolitik ajanlar
Siklosporin	Metronidazol	TNF- α inhibitörleri
Siproheptadin	Mirtazapin	Topiramate
Sitozin	Montelukast	Trimetoprim-Sulfametizol
Danazol	Mikofenolat	Valproik asit
Dapson	Nitrofurantoin	Venlafaksin
Diazoksit	NSAIDs	Vinkristin
Diphenoksilat	Oktreotid	Vorikonazol
Dipiridamol	Paklitaksel	Zolmitriptan
Dokserkalsiferol	Pegaspargaz	HMG-CoA redüktaz inhibitörleri
Doksorubisin	Penisilin	Adrenokortikotropik hormonlar
Ertapenem	Pentamidin	Pergolid
Östrojenler		

Badalov ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışma ile her bir ajan için yayınlanmış kanıt ağırlığına ve klinik sunum paternine dayanarak akut pankreatite neden olduğu bildirilen ilaçlar sınıflandırılmıştır. Akut pankreatitli tüm vakalar için, MEDLINE üzerinden tarama yapılmış (1955-2006), 120 ilacın sınıflandırılmasına izin veren 1214 vaka raporunu ortaya koymuştur. Arama terimleri arasında “pankreatit” ve “ilaca bağlı” veya “tedaviye bağlı”, “ilaç” ve “tedavi” yer alır. Tarama insan çalışmaları

ile sınırlandırılmıştır. En son arama tarihi 1 Temmuz 2006'dır. FDA verileri bu analiz için kullanılmamıştır.

Kanıt düzeyi analizine dayanarak, 4 ilaç sınıfı tanımlanabilmiştir (Tablo 2-3):

- Sınıf I ilaçlar: en az 1 vaka raporunda, ilaçla yeniden mücadele ile akut pankreatit nüksünü tanımlayan ilaçları içerir. Sınıf I ilaçlar ayrıca sınıf Ia ve sınıf Ib'ye bölünmüştür. Sınıf Ia ilaçları, safra taşı, hipertrigliseridemi, alkol, hiperkalsemi ve diğer ilaçların akut pankreatitinin tüm potansiyel nedenlerinin akut pankreatitin bir nedeni olarak göz ardı edildiği ilaçlardır. Sınıf Ib ilaçlar, pankreatit nüksünü tanımladığı ilaçlardır, ancak akut pankreatitin potansiyel nedenleri göz ardı edilmemiştir veya açıkça mevcut değildir.

- Sınıf II ilaçlar, bildirilen vakaların %75 veya daha fazlasında tutarlı bir gecikmenin olduğu ilaçları içerir. Bu kategoriye en az 4 vaka raporunun eklenmesi gerekir.

- Sınıf III ilaçlar arasında, herhangi bir yeniden sataşmaya veya tutarlı bir gecikme süresine sahip olmayan ilaçlar yer alır. Bu sınıfa en az 2 vakanın dahil edilmesi gerekmektedir.

- Sınıf IV ilaçlar sınıf III ilaçlara benzerdir, ancak sadece 1 olgu sunumu mevcuttur (Badalov ve ark. 2007).

Tablo 2-3: İlaç indüklü pankreatitin sınıflandırma sistemi

Kategori	Tanım	Örnekler
Sınıf Ia	En az 1 vaka raporu, pozitif yeniden sataşma kanıtı ve kolelitiazis, alkol ve hipertrigliseridemi gibi akut pankreatitin diğer nedenlerinin dışlanması.	Sitarabin, dapson, kodein, pentamidin, pravastatin, prokainamid, enalapril, furosemid, izoniazid, sülfametoksazol, sulindak, tetrasiklin, mesalamin, metronidazol, simvastatin, valproik asit
Sınıf Ib	En az 1 vaka raporu, pozitif yeniden sataşma kanıtı ancak diğer akut pankreatitin nedenlerinin dışlanması mevcut değil.	Lamivudin, losartan, amiodaron, azatiyoprin, deksametazon, TMP-SMZ, ifosfaid, 6-MP, premarin
Sınıf II	En az 4 vaka raporu ve gecikme periyodu vakaların en az %75'inde tutarlı	Östrojen, l-asparaginaz, asetaminofen, klozapin, propofol, DDI, eritromisin, tamoksifen
Sınıf III	En az 2 vaka raporu ancak yeniden sataşma verisi ve tutarlı gecikme periyodu mevcut değil	Hidroklorotiyazid, seftriakson, alendronat, interferon/ribavirin, metformin, minosiklin, karbamazepin, klaritromisin, siklosporin, prednizon, prednizolon, naproksen, paklitaksel.
Sınıf IV	Yalnızca 1 vaka ve yeniden sataşma verisi mevcut değil	İnterlökin-2, oktreotid, ampisilin, sisplatin, kolşisin, propoksifen, sertralin, rifampisin, risperidon, siklofosfamid, takrolimus, diklofenak, doksorubisin, vinkristin

İlaça bağlı akut pankreatit mekanizmaları, genel olarak vaka raporları, vaka kontrol çalışmaları, hayvan çalışmaları ve diğer deneysel verilere dayanır. İlaça bağlı akut pankreatit için potansiyel mekanizmalar arasında pankreatik kanal daralması, sitotoksik ve metabolik etkiler, toksik bir metabolit veya aracı birikimi ve aşırı duyarlılık reaksiyonları bulunur. Hipertrigliseridemi ve kronik hiperkalsemi gibi ilaçların olumsuz etkileri de yine ilaca bağlı akut pankreatit sebeplerindendir. Diğer olası etki mekanizmaları ise lokal anjiyoödem etkisi ve arteriyolar trombozudur (Kaurich 2008; Jones ve ark. 2015).

İlaça bağlı akut pankreatit tanısı için öncelikle akut pankreatit tanısı gerekir (Jones ve ark. 2015). İlaça bağlı pankreatitte döküntü, lenfadenopati ve/veya eozinofili gibi ilaç reaksiyonlarına nadiren klinik veya laboratuvar kanıtlarının eşlik etmesi nedeniyle, ilaca bağlı akut pankreatit tanısının konması zordur, tanıya yardımcı olmak için birkaç yan veri mevcuttur (Tenner 2014). İlaça bağlı pankreatit, özellikle

kolelitiazis, alkolizm, daha az olası karın travmatizmaları, tümör, hiperlipidemi, endoskopik retrograd kolanjiyopankreatografi, enfeksiyonlar ve diğer birçok diğer neden dışlandıktan sonra teşhis edilmelidir (Fathallah ve ark. 2015). Pankreas asınar hücreleri tarafından toplu olarak salgılanan ve bu nedenle en yaygın olarak ölçülen serum lipaz ve amilaz dahil olmak üzere çeşitli biyobelirteçlerdeki yükselmeler pankreatitin göstergesidir. Teşhis sonuçları olan diğer laboratuvar testleri arasında serum tripsininojen, pankreatik proteazlar, C-reaktif protein, IL-6 ve IL-8 bulunur. İlaça bağlı pankreatit teşhisinde bir sonraki adım, safra taşı pankreatiti ve etanol kaynaklı akut pankreatit gibi daha yaygın etiyolojilerin ortadan kaldırılmasını gerektirir. Kapsamlı bir tıbbi öykü ve hastanın ilaçları kaydedilmelidir. Geçmiş, önceki semptomlara ve safra taşı, etanol kötüye kullanımı, hiperkalsemi, hipertrigliseridemi ve travma kayıtlarına odaklanılmalıdır. Serum amilaz, lipaz, trigliserit seviyesi, kalsiyum seviyesi ve karaciğer fonksiyon testleri düzenlenmelidir. Safra taşı ve pankreas başı tümörleri gibi diğer obstrüktif olasılıkları değerlendirmek için karın ve endoskopik ultrasonlar yapılmalıdır. Görüntüleme veya kimyasal koledokolitiaz kanıtı yokluğunda akut pankreatit dönemi sonrası endoskopik retrograd kolanjiopankreatografi (endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP) yapılmamalıdır (Jones ve ark. 2015).

Akut pankreatit ile ilişkili sürekli genişlemekte olan bir ilaç listesi vardır ve bu olumsuz olayın ortaya çıkmasında bir ilacın nedenselliğini değerlendirmek için çeşitli nedensellik yöntemleri önerilmiştir. Şu anda, ilaca bağlı pankreatit sınıflandırma sistemi, pankreatotoksistide nedenselliğin üniform bir şekilde değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Fathallah ve ark. 2015).

Mallory ve Kern (1980) yaptıkları bir çalışmada, bir ilacın birden fazla kritere dayanarak pankreatit ile kesin, muhtemel veya olası bir ilişkiye sahip olarak sınıflandırıldığı bir sistem önermiştir. İlaç geri çekildikten sonra hastalık iyileşir ve ilacın yeniden kullanımıyla geri dönerse, ilaç grubunun pankreatit ile kesin bir ilişkisi vardır. İlaç ve pankreatit arasında bir ilişkinin muhtemel olduğu düşünülüyorsa ve kesin bir ilişkisi olanların bazı kriterlerine uyulursa muhtemel bir ilişkisi olan ikinci bir gruptur. İlişkilendirme kanıtı yoksa ilaçlar şüpheli bir ilişkilendirme olarak sınıflandırılır. Bu sistemden sonra, birkaç inceleme makalesi bu 3 gruplu sınıflandırma sistemini kullanmıştır. Bununla birlikte, Mallory ve Kern her grup için kanıtları açıkça

tanımlamamaktadır. Ayrıca, makalelerinde “kesin” olan kanıtlar “genellikle” yeniden ilaç verilmesinin varlığına bağlanmıştır. 2005 yılında, Trivedi ve Pitchumoni, uyarlanmış 3 gruplu bir sınıflandırma sistemi başlatmış ve bildirilen vakaların sayısı ile ilacın yeniden verilmesi ile olayın tekrarlamasına daha fazla ağırlık vermiştir. Bu incelemeler, pankreatite neden olan belirsiz kategorilerde yer alan ilaçlarla, çeşitli kategorilere yerleşen ilaçlar için kanıtları tanımlamaktadır. Nedensel kanıt sağlamak için önemli olabilecek tutarlı bir gecikmenin önemini kısaca ele almaktadır.

İlaca bağlı pankreatit sınıflandırmalarının çoğu, pozitif yeniden sataşmayı nedensellik değerlendirmesinde belirleyici kriterler olarak kabul eder. Pozitif bir yeniden sataşma, şüpheli ilacın kasıtlı veya yanlışlıkla uygulanması üzerine pankreatit özelliklerinin tekrarlanmasıdır. Teorik olarak, yeniden sataşma bir ilacın varsayılan katılımını doğrulayabilir ve ilaca bağlı pankreatite işaret eden en güçlü tek kanıt olarak kabul edilir. Yeniden sataşma tehlikeli olmasına rağmen, ilaca bağlı pankreatit tanısı oldukça şüpheli ise yapılmalıdır. Hasta, şüpheli ilaçtan belirgin şekilde iyileşirken, ciddi bir hastalığı tedavi etmek için başka bir ilaç yoksa da yapılmalıdır. Yeniden sataşma, ilaca bağlı pankreatitin olası tanısını güçlendirir. Bununla birlikte, vakaların çoğunda yeniden sataşma uygulanmaz. İlaca bağlı pankreatitte, hastalarda en az bir pankreatit atağına neden olan herhangi bir ilaçla asla yeniden sataşma yapılmaması gerektiği düşünülmektedir. İlk ilaç reaksiyonunun şiddetli veya hafif olmasına bakılmaksızın, advers ilaç reaksiyonunda yeniden sataşmanın tipik olarak daha ciddi bir reaksiyonla karşılandığına dair genel bir inanç vardır. İlaca yeniden sataşmada ölüm, hastaneye yatışın gecikmesi ve iyileşmenin gecikmesinde artış yaşanmadığı bulunmuştur. (Fathallah ve ark. 2015)

Mevcut epidemiyolojik çalışmalar, belirli spesifik popülasyonların veya diğer bazı hastalıkları olan hastaların ilaca bağlı pankreatit olma olasılığının daha yüksek olduğunu göstermiştir (Zheng ve ark. 2019). Balani ve Grendell (2008) ilaca bağlı pankreatit için risk faktörlerinin şunları içerdiğini öne sürmüştür: Çoklu ilaç alan yaşlı hastalar, Farklanma kümeleri (cluster of differentiation, CD4) <200 hücre/mm³ olan ileri AIDS hastaları, inflamatuvar bağırsak hastalığı olanlar (özellikle Crohn hastalığı), kemoterapötik ajan uygulanan hastalar, cinsiyetin kadın oluşu, hastanın çocuk olması. Yaşlı hastalar daha fazla komorbiditeye sahip olma ve çoklu ilaç kullanma

eğilimindedir, ilaçların metabolik eliminasyonu azalmıştır ve ilaca bağlı pankreatitten muzdarip olma riski daha yüksektir (Zheng ve ark. 2019).

İlaca bağlı pankreatitin patogenezi henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. Esas olarak vaka kontrol çalışmaları, vaka raporları, hayvan çalışmaları ve diğer deneysel verilerden yola çıkılarak üretilen teorilere göre (Zheng ve ark. 2019);

(1) Doğrudan toksik etkiler: statinler, diüretikler, yüksek derecede aktif antiretroviral ilaçlar ve valproik asit gibi. Barbosa ve ark. (2019) bu doğrudan toksik etkinin temel olarak, katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi oksijen radikallerini temizlemekten sorumluların tükenmesiyle, serbest oksijen radikaller tarafından oluştuğuna inanmışlardır. Eisses ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada, histon deasetilazların (histone deacetylase, HDAC) pankreas gelişimine aracılık ettiğini ve bir yaralanmadan sonra iyileşmesine katkıda bulunduğunu; valproik asitin, HDAC'yi inhibe ederek ve pankreatik iyileşmede bir dengesizliğe neden olarak pankreatite yatkınlık oluşturduğunu bildirmiştir.

(2) Toksik metabolitlerin veya ara maddelerin birikmesi.

(3) İmmün yanıt: Ben Kridis ve ark. (2013) kemoterapötik ilaçların bağışıklık tepkilerini indüklemek ve pankreatik dokunun hasarına aracılık etmek için in vitro T lenfositlerini aktive edebileceğine inanıyordu.

(4) Aşırı duyarlılık reaksiyonu. Son yıllarda, bazı ilaçların ilaca bağlı pankreatiti indüklemek için bir mekanizma olarak hipertrigliseridemi veya hiperkalsemiye neden olabileceği öne sürülmüştür. Ek olarak, pankreasın lokal anjiyoödem etkileri ve arteriyel tromboz da ilaca bağlı pankreatitin olası patogenezidir.

Aşırı duyarlılıkla ilaca bağlı pankreatit genellikle uygulamadan 4-8 hafta sonra ortaya çıkar. Toksik metabolit birikimi ve hipertrigliseridemi ile ilaca bağlı pankreatit patogenezi, genellikle uygulamadan birkaç ay sonra ortaya çıkar. İlaçların intrinsik toksisitesi ile ilaca bağlı pankreatit patogenezi genellikle uygulamadan hemen sonra ortaya çıkar ve intrinsik toksisite aşırı dozla ilişkili olabilir (Zheng ve ark. 2019).

Elkhouly ve ark. (2019) hipertrigliseridemiye sekonder olarak ilaca bağlı pankreatite neden olan 24 ilaç bulunduğunu tespit etmişlerdir. Belirgin hipertrigliseridemi (genellikle 1.000 mg/dL'den fazla) sıklıkla akut pankreatite neden olur. Hipertrigliseridemi oksidatif stresi, endotel disfonksiyonunu ve inflamasyonu

şiddetlendirebilir, böylece prognozu kötüleştirme olasılığını artırabilir. Trigliseritlerin akut pankreatitteki rolü şunları içerir (Elkhouly ve ark. 2019):

1- Trigliserit içeren lipoproteinler, özellikle şilomikronların birikmesi, pankreatik mikrosirkülasyon iskemisine neden olabilir.

2- Şilomikron trigliseritin esterleştirilmesi sırasında üretilen esterlenmemiş serbest yağ asidi, iltihap önleyici bir etkiye sahiptir, enflamatuvar araçların ve serbest oksijen radikallerinin salınmasını teşvik eder ve pankreatik dokunun hasarını daha da ağırlaştırır. Şilomikronlar ve çok düşük yoğunluklu lipoproteinler tarafından taşınan trigliseritler, pankreasın kılcal damarlarında bol miktarda pankreatik lipaz ile hidrolize edilir ve büyük miktarda toksik serbest yağ asidi üreterek pankreatik dokuya zarar verir.

Lipoprotein lipaz ve hepatik trigliserit lipaz, trigliseritlerin parçalanmasında rol oynar. Bu nedenle, ilaca bağlı hipertrigliseridemi esas olarak aşağıdaki şekillerde ortaya çıkar (Zheng ve ark. 2019):

- 1- Trigliserit üretimi ve karaciğer tarafından salgılanması artar ve hidroliz azalır.
- 2- Endojen çok düşük yoğunluklu lipoprotein sentezinin artması.
- 3- Lipoprotein lipaz (LPL) ve hepatik trigliserit lipazın aktivitesi azalır.
- 4- Ekzojen şilomikronlar artar.

5- Apolipoprotein apoCIII/apoCII oranı artar, çünkü bunlar sırasıyla LPL inhibitörleri ve agonistleridir. İndüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSC) üzerinde yapılan bir çalışma, hastanın iPSC'sindeki ekzokrin pankreatik hücrelerin, ilaca bağlı pankreatitin patogenezi için daha da araştırmaya yardımcı olabilecek, ilaca bağlı pankreatitin patogenezi için bir model olabileceğini göstermiştir.

2.5. İlaça Bağlı Pankreatit Oluşumunun Önlenmesi

İlaça bağlı pankreatitin önlenmesi, büyük ölçüde pankreatit ile nedensel ilişki için güçlü kanıtları olan ilaçların tanınması, en yüksek risk gruplarının belirlenmesi, yüksek bir şüphe indeksinin sürdürülmesi ve pankreatit şüphesi olduğunda rahatsız edici ajanın derhal geri çekilmesi ile sağlanabilir. İlaça bağlı pankreatitin olası mekanizmalarının bilinmesi, bu advers reaksiyonun önlenmesinde yardımcı olabilir. Örneğin, hipertrigliseridemiye indüklediği bilinen ilaçlar için serum trigliserit seviyelerinin izlenmesi yararlı olabilir. Önerilen diğer mekanizmalar arasında aşırı

duyarlılık reaksiyonu, pankreatik kanal daralması, immünosupresyon, ozmotik veya metabolik etkiler, vasküler tromboz, doğrudan hücresel toksisite, toksik metabolitlerin birikmesi ve hepatik tutulum yer alır. İdiyosenkratik ilaç reaksiyonuna bağlı olduğuna inanılan vakaların önlenmesi zordur, çünkü bunlar öngörülemez, doza bağımlı değildir, sadece duyarlı hastalarda görülür ve ilaçların bilinen bir etki mekanizması ile açıklanamaz. Bu tür reaksiyonlar genellikle ilacın genel kullanım için onaylanmasından sonra tespit edilir. İlaça bağlı pankreatitten şüphelenildikten sonra bir ilacın yeniden başlatılıp başlatılmayacağı sorusu, ilacın ve hastanın tıbbi durumunun yarar-risk analizini gerektirir (Balani ve Grendell 2008).

Yeniden satışma, pek çok kemoterapötik ajanda olduğu gibi ve/veya potansiyel yararlar risklerden daha ağır basarsa, alternatif ilaçlar mevcut değilse, etik olarak ayarlanabilir. Bu gibi durumlarda, yeniden satışma öncesinde bilgilendirilmiş onam alınmalıdır. Riskler faydalardan daha ağır basarsa, aynı sınıftaki rahatsız edici ajan ve ilaçlar tekrar kullanılmamalıdır (Balani ve Grendell 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik dispenser pipet	Eppendorf
Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik pipet	Eppendorf
Ayarlanabilir otomatik pipet	Eppendorf
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik
Derin dondurucu (-20 °C)	Bosch
Derin dondurucu (-80 °C)	Nuaire Ultralow Freezer
Etüv	Heraeus
Faz-kontrast invert mikroskop	Olympus (CX41)
Hassas terazi	Sartorius, Mettler
Flowsitometri	Novocyte 1000 (Acea)
Karbondioksitli inkübatör	Thermo Scientific (Heracell 150i)
Laminar akımlı kabin (Biyogüvenlik seviyesi 2)	Tezsan
Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre	Biotek (Epoch)
Mili-Q saf su cihazı	Merck Millipore
Orbital çalkalayıcı	Stuart (SSM1)
Otoklav	Hirayama (HV-50L)
Otomatik hücre sayma cihazı	Luna (L10001-Logos Biosystems)

pH metre	Hanna (PH 211)
Soğutmalı mikrosantrifüj	Hettich (Micro 200)
Soğutmalı santrifüj	Hettich (Universal 32)
Ultrasonik banyo	Ultrasonic LC 30 H
Vorteks	Ika (NC 28405)

3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Antibiyotik çözeltisi	Multicell (450 201EL)
Apoptoz hasar tespit enzim-bağı immun test (ELISA) kiti (Annexin V-FTIC/PI)	Biolegand (640914)
Sığır serum albümini (BSA)	Sigma-Aldrich (A1933)
Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA)	Multicell (625 060 CG)
Fosfat tampon çözeltisi (PBS) (pH 7,4; 10X)	Multicell (311415CL)
Fötal sığır serum (FBS) (inaktive edilmemiş)	Capricon (FBS-12A)
GSH ELISA kiti	YH Biosearch laboratory (YHB1373Hu)
Ham's F-12 / DMEM besiyeri karışımı (DMEM F-12)	Multicell (319 075 CL)
Metimazol	Chemie Eutikon GmbH
MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür)	Biomatik (A3338)
Tripsin (1: 250)	Multicell (625-035-TG)

3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

Falkon tüp	50 mL'lik, vida kapaklı	Interlab
Hücre kültür kabı	25 ve 75 cm ² 'lik	Nest, Corning
Kriyo vial	1,5 mL'lik, vida kapaklı	Axygen
Mikroplaka	6, 24 ve 96 kuyulu	Nest
Mikrosantrifüj tüpü	1000 µL	Eppendorf
Pastör pipeti	3 mL'lik, plastik, steril	Interlab
Pipet ucu	(10-100 µL; 100-1000 µL)	Axygen T
Santrifüj tübü	15 mL'lik, vida kapaklı	Interlab
Steril enjektör ucu filtre	0,22 µm'lik	Millex-G

3.4. Kullanılan Yöntemler

Tez çalışması İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.4.1. Hücre Dizisi ve Kültür Koşulları

Hücre dizisinin temini

İnsan pankreas hücre dizisi; PANC-1 (ATCC® CRL-1469™) Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu (American Type Cell Culture, ATCC) bankasından satın alındı. Hücre dizileri, kriyo vialler içerisinde -196°C sıcaklıkta sıvı azot tankı içerisinde muhafaza edildi.

Hücre dizisinin açılması

FBS çözeltisi: İnaktive edilmemiş FBS 56°C sıcaklıkta 30 dk ve 37°C sıcaklıkta 10 dk inkübe edilerek inaktive hale getirildi.

Antibiyotik çözeltisi: 9 mL steril suda, 1 mL penisilin/streptomisin (10.000 U/10.000 µg/mL) çözülerek hazırlandı.

FBS ve antibiyotik çözeltileri hazırlandıktan sonra 0,22 µm çapındaki steril filtrelerden geçirilerek sterilize edildi.

Hücre kültür besiyeri (Serumlu): 10 mL FBS çözeltisi ve 1 mL antibiyotik çözeltisi (%1) 89 mL DMEM F-12 (4,5 g/L glukoz) besiyerine ilave edildi. Hücre besiyeri +4°C sıcaklıkta muhafaza edildi.

Sıvı azot buharında soğuğa dayanıklı vial içerisinde muhafaza edilen hücrelerin, 37°C'lik su banyosunda 1-2 dk süre ile bekletilerek çözünmeleri sağlandı. Hücrelerin 15 mL'lik falkona alınması sonrası, 5 mL serumlu besiyeri eklenmesiyle pipetajlama yapıldı. Hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 3 dk süre ile santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. İşlem ikinci kez tekrar edilerek, üzerine 5 mL serumlu besiyeri eklenen hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan hücre pelletine 1 mL serumlu besiyeri eklendi ve pipetajlama yapıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu 25 cm²'lik ya da 75 cm²'lik flasklar içerisinde 5-10 mL serumlu medyumda ekilerek 37°C sıcaklık, %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat süreyle inkübe edildi. Faz-kontrast invert mikroskobu yardımıyla hücre yoğunluğu düzenli olarak kontrol edildi ve yoğunluğun yaklaşık %70 konfluent (sıkışık) duruma geldiği tespit edildiğinde hücreler kültürün devamlılığının sağlanması adına pasajlandı ya da testlerde kullanıldı.

Hücrelerin pasajlanması

PBS çözeltisi (1X): 10 mL PBS çözeltisi (10X) 90 mL steril su ile seyreltilti.

Trypsin - EDTA çözeltisi (%0,2 - %0,04): 0,04 g EDTA ve 0,2 g Trypsin 100 mL PBS çözeltisi (1X)'nde çözöldü.

Hücrelerin pasajlanması işleminde; ilk olarak hücre kültür flaskındaki süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı. Hücresel atıkların ve serum kaynaklı artıkların uzaklaştırılması amacıyla PBS (1X) çözeltisi ile hücrelerin yüzeyi yıkandı. Tutundukları yüzeyden ayrılmalrı için kültür ortamına tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek, hücreler 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂'li inkübatörde 5-10 dk sürede bekletildi ve tripsinize edildi. Yüzeyden ayrılması sağlanan hücrelerin üzerine serumlu besiyeri eklenmesinin ardından, hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 3 dk ile santrifüj edildi. İşlem bir defa daha tekrarlandı. Otomatik hücre sayma cihazı ile sayılan hücreler yaklaşık 10⁵ hücre/mL

olacak şekilde yeni kültür ortamlarına aktarıldı ve serumlu besiyeri eklenerek 37°C sıcaklıkta %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edildi.

Hücrelerin stoklanması

Hücre stok besiyeri (DMSO'lu): 1 mL DMSO ve 1 mL FBS çözeltisine, 100 µL antibiyotik çözeltisi (%1) ve 7,9 mL hücre kültür besiyeri eklenerek hazırlandı.

Hücre kültüründe meydana gelebilecek risklere karşı hücreler, belli aralıklarla dondurularak saklandı. Hücre stoklaması yapılması için flaskadaki hücreler tripsin uygulanarak yapıştıkları yüzeyden kaldırıldı. Serumlu medyum eklenmesi sonrası hücreler 1200 rpm'de 3 dk santrifüj edildi ve ardından süpernatant uzaklaştırıldı. Saklanacak hücre pelletinin üzerine hazırlanmış olan hücre stok besiyeri 1 ml eklenip, pastör pipeti kullanılarak pipetleme yapılarak karıştırıldı. Yaklaşık 10⁶ hücre/mL olacak şekilde hazırlanan hücre stoklarının soğuğa dayanıklı kriyo viallere aktarılarak, sırasıyla 30 dk -20°C'de, 16-24 saat -80°C'de bekletilmesinin ardından sıvı azot tankına kaldırılarak saklandı.

3.4.2. Maruziyet Ortamı

Çalışmamızda kullanılan metimazol etkin maddesi (C₂H₆N₂S; Molekül ağırlığı: 114,2 g/mol; beyaz veya hemen hemen beyaz kristal toz; CAS No: 60-56-0) Chemie Eutikon GmbH (Almanya) firması tarafından üretilmiştir.

İki farklı metimazol stok çözeltisi hazırlandı ve çalışıldı.

1. stok çözeltisi (400 mM): 20 mg metimazol 400 µL DMEM-F12'de çözülerek hazırlandı.

2. stok çözeltisi (2000 mM): 100 mg metimazol 400 µL DMEM-F12'de çözülerek hazırlandı.

Toksisite testleri için maruziyet süresi 48 saat ve maruziyet konsantrasyonları 0,625; 1,25; 2,5; 5 ve 25 mg/mL (5; 10; 20; 40 ve 200 mM) olarak belirlendi. Maruziyetlerde 96 kuyulu mikropłaka kullanıldı.

3.5. Sitotoksisitenin Tespiti

MTT testi

MTT çözeltisi (5 mg/mL): 250 mg MTT 50 mL PBS (1X) içerisinde hazırlandı. Çözelti +4 °C’de ve karanlıkta saklandı.

Testin yapılışı

96 Kuyulu mikropalakalara yaklaşık 10^3 - 10^4 hücre/100 µL/kuyu olacak şekilde dağıtılan hücreler 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildi. Etkin madde için 48 saatlik maruziyet yapıldı. İnkübasyon sonrası ortamdaki süpernatant uzaklaştırıldı ve kuyular 100 µL PBS (1X) ile yıkandı. Taze serumlu besiyeri ilavesini takiben etkin madde için hazırlanan çözelti ortama eklendi. MTT ile sitotoksisite tespitinde 5-200 mM maruziyet konsantrasyonları tercih edildi. 48 saatlik maruziyet sonrası her kuyuya 25 µL MTT çözeltisi eklendi ve 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 2 saat bekletildi. Süpernatantın uzaklaştırılmasını takiben her kuyuya 100 µL DMSO eklendi. Mikropalakalar orbital çalkalayıcıda 150 rpm’de 5 dk süre ile çalkalandı. Çözeltinin 590 nm’de absorbansı -690 nm referansa karşı- mikropalaka okuyuculu spektrofotometre yardımıyla ölçüldü. Deneyler, her konsantrasyon için en az 2 tekrar ve aynı koşullarda farklı 2 günde çalışmak üzere toplam en az 4 tekrar olacak şekilde yapıldı. Negatif kontrol olarak etkin maddeye maruz bırakılmamış hücreler benzer şekilde analize hazırlandı.

Değerlendirme

Negatif kontrol hücrelerindeki enzim aktivitesine uygun olarak gözlenen absorbans değeri (optik dansite, OD) %100 canlılığa eşdeğer olarak kabul edildi. Enzim aktivitesindeki inhibisyon derecesine bağlı olarak etkin madde çözeltisine maruz kalan hücrelerdeki ölüm oranı negatif kontrolün yüzdesi şeklinde aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ inhibisyon konsantrasyonu (IC)} = 100 - (\text{ort. OD}_{\text{madde}} \times 100 / \text{ort. OD}_{\text{negatif kontrol}})$$

Sitotoksik etki potansiyeli %30 inhibisyon konsantrasyonu (IC₃₀) üzerinden değerlendirildi. Ölüm-konsantrasyon ölçü eğrisinin elde edilmesinin ardından IC₃₀ değeri eğri üzerinden hesaplandı.

3.6. Apoptoz Potansiyelinin Anneksin V-FITC/PI Apoptoz Testi İle Tespiti

Kit içeriği

Anneksin V-FITC	0,5 mL
Propidium iyodür	1 mL
Bağlayıcı tampon (10X)	30 mL

Testin yapılışı

6 kuyulu mikrolakalara yaklaşık 2.5×10^5 /mL/kuyu hücre yoğunluğu olacak şekilde dağıtılan hücreler 37°C sıcaklıkta %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ortamdaki süpernatant uzaklaştırıldı ve kuyular 1 mL PBS (1X) ile yıkandı. Kuyulara 20; 30 ve 40 mM konsantrasyonlarda metimazol çözeltisi eklenmesi sonrası 48 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, 1 mL PBS (1X) ile kuyular 2 kez yıkandı. 0,5 mL %0,2'lik tripsin çözeltisinden eklenerek hücreler tripsinize edildi. 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılan hücreler 1200 rpm'de 3 dk süre santrifüj edildi. Hücre pelleti 1 mL PBS (1X) ile yıkandı. Distile su kullanılarak 1/10 oranında seyreltilen bağlayıcı tampon, 1 mL eklenerek hücreler yıkandı ve 1200 rpm'de 3 dk süre ile santrifüj edildi. $1-5 \times 10^6$ /mL olacak şekilde hücre pelleti bağlayıcı tampon (1X) uygulanarak süspande edildi. 100 µL hücre süspansiyonunun üzerine 5 µL Annexin V-FITC eklenmesinin ardından 15 dk süre ile karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildi. 1 mL bağlayıcı tampon (1X) ile hücre pelleti tekrar yıkandı ve 200 µL bağlayıcı tampon kullanılarak süspande edildi. Süspansiyonun üzerine 5 µL propidium iyodür eklendi. Flowsitometri cihazında Annexin V-FITC için Ex/Em: 494/518 nm, PI için Ex/Em: 535/617 nm olarak okutuldu.

Değerlendirme

Flowsitometri cihazında NovoExpress Software bilgisayar programı kullanılarak analiz edilen hücreler FSC/SSC grafiğinde belli alanlara düşer ve incelenecek hücrelerin bu alanlardan yeri belirlenerek kapılama yapılır. Grafikte oluşan 4 bölgeye düşen hücrelerden her bir bölümü farklı özellikteki hücreleri göstermektedir. Canlı hücreler Annexin V (negatif)/PI (negatif), erken apoptotik hücreler Annexin V (pozitif)/PI (negatif), geç apoptotik hücreler Annexin V (pozitif)/PI (pozitif), nekrotik hücreler Annexin V (negatif)/PI (pozitif) ekspresyonu ile belirlenir. Çalışmada her tüpte 20.000

hücre değerlendirilerek, sonuçlar toplam hücre miktarının yüzdesi (% P1) olarak bildirilmiştir.

3.7. Oksidatif Hasar Potansiyelinin Tespiti

GSH testi

Çalışmada ELISA kiti kullanılmıştır. Biotin ile işaretli GSH monoklonal antikorlarla kaplı kuyucuklarda inkübasyonun ardından streptavidin-horseradish peroksidaz (HRP) ilavesi ile kombinasyonu takiben immün kompleks oluşturuldu. Bağlı olmayan enzimler yıkanması sonrası ortama kromojenik reaktif A ve kromojenik reaktif B ilave edildi ve sıvının rengi maviye, asit ortamın etkisiyle de son renk olarak sarıya dönüşüm gözlemlendi.

Kit içeriği

Kaplanmış ELISA 96'lık mikrolaka

Standart çözelti (80 nmol/mL)	0,5 mL
Streptavidin-HRP	6 mL
Stop çözeltisi	6 mL
Kromojenik reaktif A	6 mL
Kromojenik reaktif B	6 mL
Biotin ile işaretlenmiş anti-GSH antikor	1 mL
Standart seyreltme çözeltisi	3 mL
Yıkama çözeltisi (X30)	20 mL

Testin yapılışı

Yaklaşık 5×10^5 hücre/5 mL yoğunluğunda 25 cm²'lik kültür kabına aktarılan hücreler 37°C sıcaklıkta %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından ortamdan süpernatant uzaklaştırıldı. 2 mL PBS (1X) kullanılarak kültür yıkandı. Taze serumlu besiyeri eklenmesinin ardından metimazol çözeltisi ortama ilave edildi. Oksidatif hasar tespiti için 20 ve 40 mM maruziyet konsantrasyonları tercih edildi. 24 saatlik maruziyetin ardından 2 mL PBS (1X) kullanılarak kültür ortamı 3 defa yıkandı ve 1 mL %0,2 tripsin çözeltisi ilave edilerek hücreler tripsinize edildi. Hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 3 dk süreli santrifüj sonrası 1 mL PBS (1X) kullanılarak 2

defa yıkandı ve her yıkamada 1200 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Tripan mavi boyası ile renklendirilen hücreler otomatik hücre sayma cihazı kullanılarak sayıldı ve 1×10^6 hücre/mL hücre yoğunluğu olacak şekilde ayarlandı. Hücre pelleti böylece metimazolün oksidatif hasar potansiyellerinin tespiti için hazır hale getirildi.

Kit protokolüne uygun olarak 1×10^6 hücre/mL olacak şekilde hücre süspansiyonlarının hazırlanmasının ardından testin yapılacağı zamana kadar $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Hücre duvarını parçalamak ve enzimleri açığa çıkartmak amacıyla hücreler birkaç defa derin dondurucudan ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) çıkartılıp tekrar donduruldu. Testin 30 dk öncesinde derin dondurucudan çıkarılan örnekler 2500 rpm'de 20 dk süre ile santrifüj edildi. GSH monoklonal antikor içeren 96 kuyulu mikrolakalara 40 μL süpernatant ilave edildi. Her bir kuyuya 10 μL biotin ile işaretlenmiş antikor ile 50 μL streptavidin-HRP ilave edilerek karıştırıldı. 37°C sıcaklıkta 60 dk süreyle inkübe edilen mikrolaka kuyuları üzerine 50 μL kromojenik reaktif A ve 50 μL kromojenik reaktif B eklendi. Dikkatlice karıştırılan kuyu içeriği 37°C sıcaklıkta 10 dk süre ile inkübe edildi. Stop çözeltisinden 50 μL ilave edilerek inkübasyon sonlandırıldı. Çözeltinin mikrolaka okuyuculu spektrofotometrede 450 nm'de absorbansı ölçüldü.

Deneyler, her maruziyet konsantrasyonu için en az 2 tekrar ve aynı koşullarda farklı 2 günde çalışmak üzere toplamda en az 4 tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi. Negatif kontrol olarak metimazol çözeltisine maruz bırakılmamış hücreler benzer şekilde analize hazırlandı. Metimazol çözeltisine maruz bırakılan hücreler ve negatif kontroller için her hücre kültür ortamında GSH tayini gerçekleştirildi. Kit içeriği olarak tedarik edilen GSH standart çözeltiler kit protokolüne uygun analizler gerçekleştirildi. Standart çözelti için 3 ayrı konsantrasyon kullanıldı. Her konsantrasyon için en az 2 tekrar ve farklı 2 günde çalışılarak toplam en az 4 tekrar olacak şekilde analiz edildi. Sonuçların ortalaması alınarak standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi hazırlandı.

Değerlendirme

Her bir örnek için GSH miktarı, GSH standart çözeltileri ile hazırlanan ölçü eğrisine göre hesaplandı. GSH standart çözeltilerinin konsantrasyon aralığı kit protokolüne uygun olarak 1,5-100 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edildi. Ölçü eğrisi üzerinden yapılan hesaplamalarda ng olarak elde edilen sonuçlar μmol 'e çevrildi. 10^4 hücrede bulunan protein miktarının belirlenmesinin ardından, seyreltme faktörleri de dikkate alınarak sonuçlar $\mu\text{mol}/10^4$ hücre olarak hesaplandı.

Diklorofluoressein (DCF) testi

2',7'-diklorodihidrofluoressein diasetat (H₂DCF-DA) (stok çözeltisi): 20 mM olacak şekilde DMSO'da çözündürülerek hazırlandı.

BSA çözeltisi: 3 mL PBS içerisinde 30 mg BSA çözündürülerek hazırlandı.

Testin yapılışı

6 kuyulu mikrolakalara yaklaşık $2,5 \times 10^5$ /mL/kuyu olacak şekilde dağıtılan hücreler, 37°C sıcaklıkta %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından ortamdaki süpernatant atılarak, 1 mL PBS (1X) kullanılarak kuyular yıkandı. 20, 30 ve 40 mM konsantrasyonlarda metimazol çözeltisi eklendi ve 48 saat süre inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kuyular 1 mL PBS (1X) ile 2 defa yıkandı. 0,5 mL %0,2'lik tripsin çözeltisi eklenerek hücreler tripsinize edildi ve 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Hücre süspansiyonunun 1200 rpm'de 3 dk süre ile santrifüj edilmesinin ardından 1 mL PBS (1X) kullanılarak 3 kere yıkandı. Hücre pelleti 1 mL PBS (1X) ile süspande edildi. Hücre süspansiyonuna 1 µL 20 mM olacak şekilde H₂-DCFDA eklenerek 37°C sıcaklıkta %5 CO₂'li inkübatörde 30 dk inkübe edildi. Hücreler PBS (1X) ile yıkanıp, 150 µL BSA ile süspande edildi. Ardından flowsitometri cihazında Ex/Em: 488/535 nm'de okutuldu. Flowsitometri cihazı ile hücrelerin floresans yoğunluğu ölçüldü ve her tüpte 20.000 hücre değerlendirildi.

Değerlendirme

NovoExpressSoftware bilgisayar programı ile analiz edilen hücrelerden elde edilen FSC/SSC grafiğindeki alanlardan DCF floresanı gösteren hücreler tespit edilerek kapılama yapıldı (M2 kapısı). Alınan sonuçlarda, serbest oksijen radikallerinin varlığı, toplam hücre miktarının yüzdesi olarak (M2 %) ifade edildi. Negatif kontrol olarak PBS kullanıldı.

3.8. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS 17.0 for Windows paket programı kullanılarak tek yönlü varyans (ANOVA) analizi (Post Hoc-Tukey ve Dunnet testi) uygulandı. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Standart eğriler doğrusal regresyon analizi yapılarak saptandı.

4. BULGULAR

Çalışmada metimazolün akut pankreatit oluşturma potansiyelinin değerlendirilebilmesine yönelik olarak insan pankreas PANC-1 hücre dizisi üzerinde sitotoksiste (MTT test), oksidatif hasar (ROS tespiti için DCF test, GSH tespiti için ELİSA test) ve apoptoz (Anneksin V-FTIC/PI apoptoz test) indüksiyon testleri uygulandı.

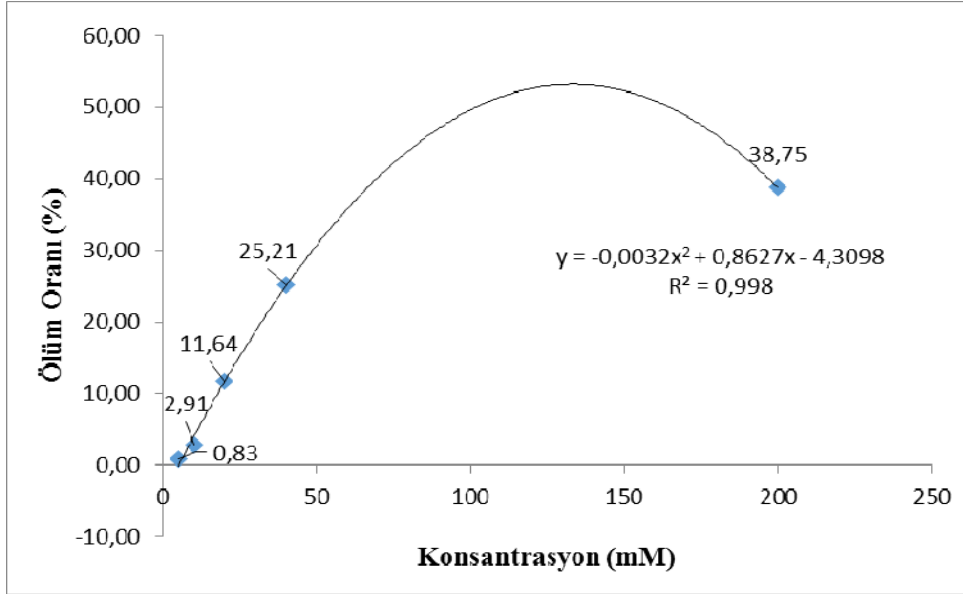
4.1. Sitotoksiste Bulguları

Metimazolün PANC-1 hücre dizisi üzerine sitotoksik etki potansiyeli 48 saat süre ile 5-200 mM konsantrasyon aralığında maruziyeti takiben MTT test ile değerlendirildi. MTT sitotoksiste testi ile elde edilen sonuçlar Tablo 4-1 ve Şekil 4-1’de verildi.

PANC-1 hücreleri üzerine 48 saat süreli maruziyeti takiben gözlenen metimazol indüklü sitotoksik etki için IC₃₀ değeri MTT testi sonucunda tespit edilmiş olup IC₃₀ değeri 53 mM olarak belirlendi.

Tablo 4-1: Metimazolün 5-200 mM maruziyet konsantrasyon aralığında gözlenen maksimum hücre ölüm yüzdeleri

Konsantrasyon (mM)	Ölüm (%)
200	38,75
40	25,21
20	11,64
10	2,91
5	0,83



Şekil 4-1: Metimazolün PANC-1 hücre dizisi üzerine sitotoksik etkilerinin MTT testi ile tespiti

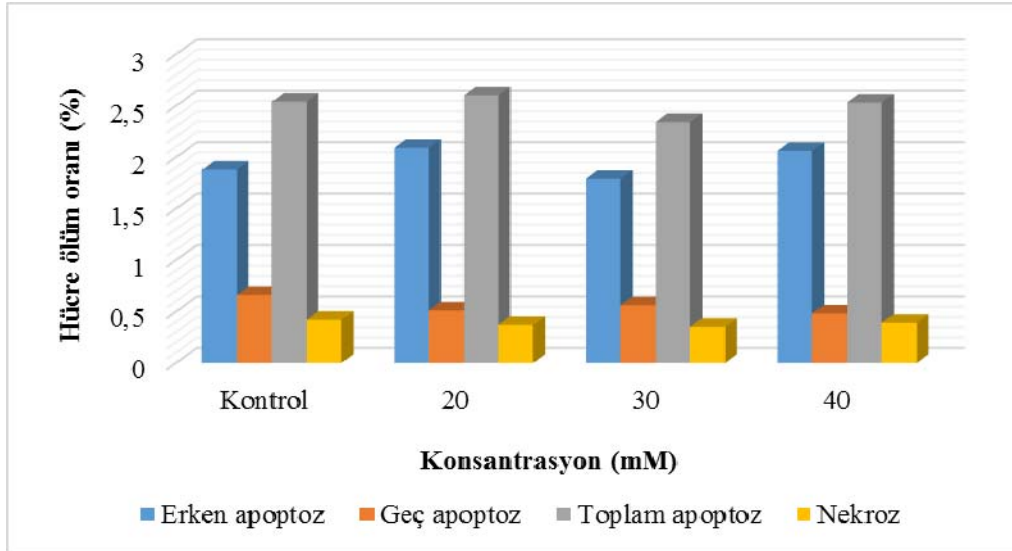
4.2. Apoptoz Bulguları

Metimazolün PANC-1 hücre dizisi üzerine apoptotik etki potansiyelleri için 48 saat süre ile 20; 30 ve 40 mM konsantrasyon aralığında maruziyeti takiben Anneksin V-FITC/PI yöntemi kullanılarak değerlendirildi (Tablo 4-2 ve Şekil 4-2).

Metimazole maruz kalan PANC-1 hücrelerinde gözlenen ölümlerde toplam hücreye oranla erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz görülme yüzdeleri, sırasıyla, maksimum %2,09; 0,56 ve 0,39 olarak tespit edildi.

Tablo 4-2: Metimazolün apoptotik ve nekrotik etkileri

Konsantrasyon (mM)	Hücre ölüm oranı (%)			
	Erken apoptoz	Geç apoptoz	Toplam apoptoz	Nekroz
Kontrol	1,88±0,23	0,66±0,09	2,54±0,3	0,42±0,08
20	2,09±0,3	0,51±0,08	2,60±0,28	0,37±0,09
30	1,79±0,3	0,56±0,13	2,34±0,2	0,35±0,07
40	2,06±0,18	0,48±0,14	2,53±0,25	0,39±0,04



Şekil 4-2: Metimazolün apoptotik ve nekrotik etkileri

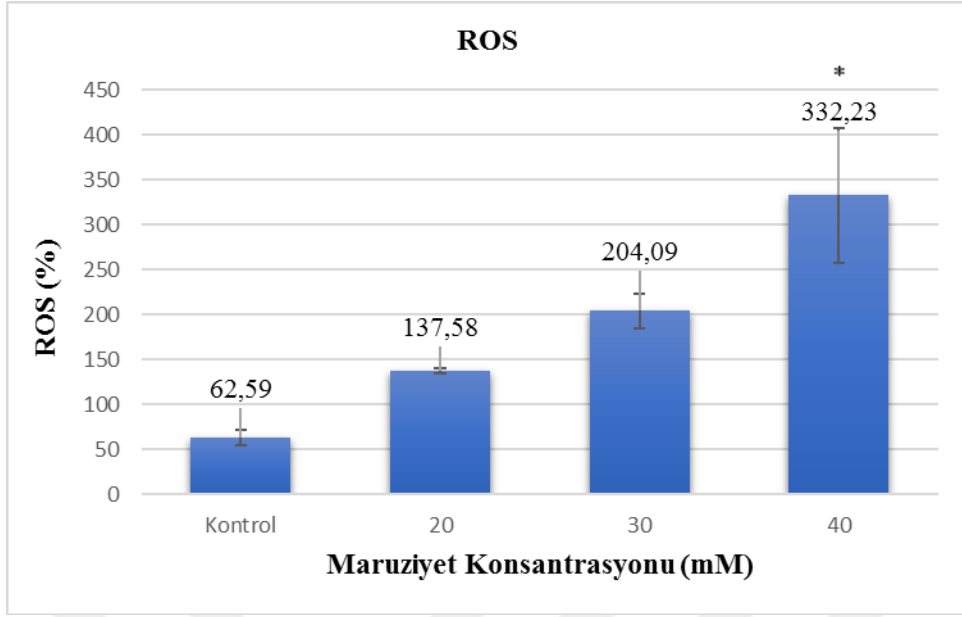
4.3. Oksidatif Hasar Bulguları

Metimazolün PANC-1 hücre dizisi üzerine ROS oluşturma potansiyeli 48 saat süre ile 20, 30, 40 mM konsantrasyonlarında maruziyeti takiben flowsitometrik yöntem ile test edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-3 ve Şekil 4-3’de gösterildi.

Metimazolün 20; 30 ve 40 mM maruziyet konsantrasyonlarında ROS seviyelerinde kontrole kıyasla elde edilen değerler sırasıyla 137,58; 204,09 ve 332,23’tür. Veriler istatistiksel düzeyde incelendiğinde p değerlerinin sırasıyla 0,43; 0,08 ve 0,003 olduğu gözlemlendi. 40 mM konsantrasyon için elde edilen değer sadece anlamlılık düzeyinde ($p < 0,05$) olduğu görülmektedir.

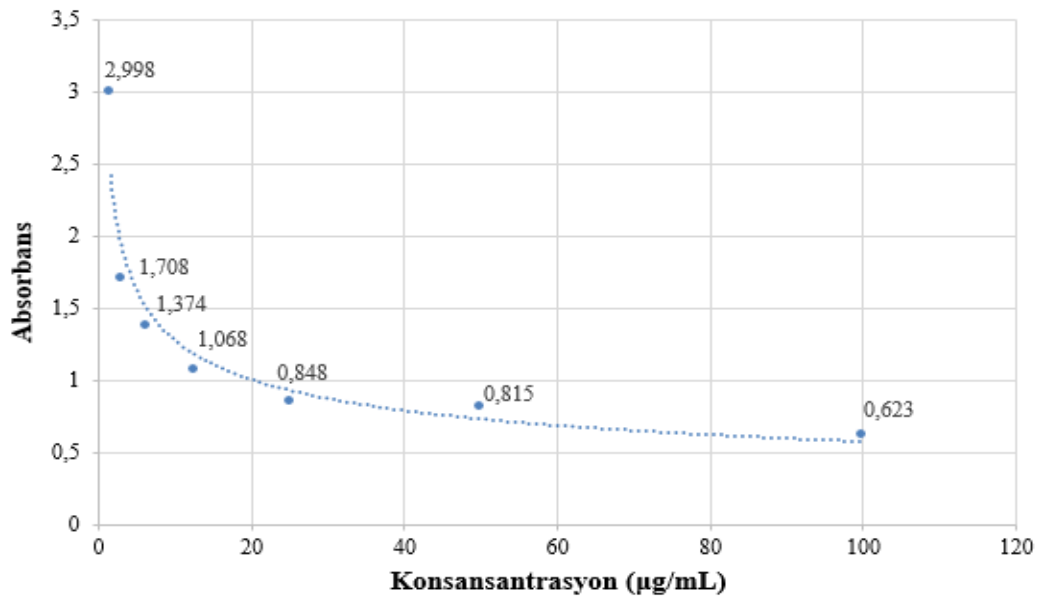
Tablo 4-3: Metimazolün oksidatif hasar etkileri

Konsantrasyon (mM)	ROS değeri (%)
Kontrol	62,59
20	137,58
30	204,09
40	332,23*



Şekil 4-3: Metimazolün PANC-1 hücreleri üzerine oksidatif hasar oluşturma potansiyelinin flowsitometrik yöntem ile değerlendirilmesi

GSH standart çözeltileri (1,5; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$) ile çizilen ölçü eğrisi Şekil 4-4’de verildi. Tekrarların ortalaması alınarak hazırlanan ölçü eğrisinde sonuçlar $\mu\text{g/mL}$ olarak gösterildi.



Şekil 4-4: GSH standart ölçü eğrisi

Metimazolün PANC-1 hücre dizileri üzerine oksidatif hasar oluşturma potansiyelleri 24 saat süre ile 20 ve 40 mM konsantrasyonlarda maruziyetini takiben GSH düzeyinin ELISA aracılığıyla tayin edilmesi suretiyle gerçekleştirildi. Absorbansların ölçümü sonrası elde edilen veriler ile GSH standart ölçü eğrisi kullanılarak GSH miktarı belirlendi (Tablo 4-4). 20 ve 40 mM maruziyet sonrasında GSH miktarında kontrol grubuna kıyasla azalma vardır ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

Tablo 4-4: Metimazolün PANC-1 hücreleri üzerinde oksidatif hasar etkileri

Konsantrasyon (mM)	GSH miktarı ($\mu\text{mol}/10^4$ hücre)
Kontrol	4,32
20	3,31
40	3,24

5. TARTIŞMA

Metimazol, günümüzde özellikle hipertiroidizm ve Graves hastalığının tedavisinde tercih edilen ajanların başında gelmektedir. Literatür çalışmaları ile bildirilen metimazol indüklü pankreatit oluşum vakaları bulunmakla birlikte altında yatan toksik etki mekanizmaları henüz yeterince aydınlatılmamıştır ve ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu bağlamda yürütülen çalışmamızda; metimazolün pankreas hücrelerinde sitotoksik etki, apoptoz oluşturma potansiyeli ve oksidatif hasara etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Heidari ve ark. (2013b) tarafından yapılan çalışmada, erkek Spraque-Dawley cinsi sıçanlardan izole edilen hepatositlerin 2 saat süre ile 1-15 mM konsantrasyon aralığında maruziyeti durumunda metimazolün sitotoksik etkisi tripan mavisi testi ile incelenmiş, konsantrasyon bağımlı sitotoksik etki ile IC₅₀ değerinin 10 mM olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, metimazol kaynaklı sitotoksik etkiye neden olduğu düşünülen metaboliti N-metiltiyoyüre için de IC₅₀ değeri 1 mM olarak ölçülmüştür. Heidari ve ark. (2012; 2013a) tarafından yapılan iki ayrı çalışmada, Spraque-Dawley cinsi erkek sıçanlardan izole edilen hepatositlere 3, 6 ve 10 mM konsantrasyonlarda metimazol uygulanmasının ardından sitotoksik etki tripan mavisi testi ile farklı zamanlarda (60., 120. ve 180. dk) değerlendirilmiş ve IC₅₀ değeri 10 mM olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde, 10 mM metimazol uygulanmasının ardından sitotoksik etki potansiyeli tripan mavisi testi ile değerlendirildiğinde 60., 120. ve 180. dk'larda metimazol maruziyet grubunda sırasıyla, % ölümün 43±2, 55±3 ve 68±4 olduğu rapor edilmiştir ($p<0,05$). Niknahad ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada metimazolün BALB/c cinsi erkek farelerde *in vivo* koşullarda 100-400 mg/kg (i.p) doz aralığında maruziyeti sonrası 5 saat sonunda izole edilen hücrelerde ve farelerden izole edilen karaciğer mitokondrileri üzerine *in vitro* koşullarda 0,010-100 mM konsantrasyon aralığında 30-150 dk intervalinde maruziyeti sonrası MTT testi ile metimazolün sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Kontrole kıyasla mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesinde *in vitro* değerlendirmede 1 mM ve üzeri konsantrasyonlarda anlamlı artış olduğu, *in vivo* değerlendirmede ise 100 mg/kg (i.p) ve üzeri dozlarda anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir ($p<0.001$). Mevcut çalışmada araştırılan iki model arasındaki farklılıkların ilaç biyoaktivasyonu ve reaktif metabolit oluşumu ile ilişkili olabileceği aktarılmıştır.

Tez çalışmamızda PANC-1 hücre dizisi üzerine metimazolün 48 saat maruziyeti sonrası MTT testi ile belirlenen IC_{30} değeri 53 mM olarak tespit edilmiştir. Yukarıda tartışılan çalışmalarda tespit edilen sitotoksosite düzeyleri ile farklılık kullanılan hücre ve yöntemlerin farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

Heidari ve ark. (2013b) tarafından yapılan çalışmada, Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlardan izole edilen hepatositlerin 2 saat süre ile 1-15 mM konsantrasyon aralığında metimazol maruziyeti durumunda hücresel GSH rezervuarlarındaki etkisi değerlendirilmiştir. Metimazol ve metaboliti N-metiltiyöüre'nin kontrole kıyasla hücresel GSH içeriğinde önemli bir azalmaya neden olabileceği rapor edilmiştir. Hepatositler GSH tüketeci bir ajan olan 1-bromoheptan (200 mM) ile tedavi edildiğinde metimazolün IC_{50} değeri 5 mM iken GSH düzeyi tükenmiş olan hepatositlerde 10 mM metimazol veya 1 mM N-metiltiyöüre düzeylerinde tüm hücrelerin öldüğü gözlenmiştir. Bu bulgu ışığında metimazole bağlı hasara karşı hepatositlerin korunmasında GSH'ın kritik bir rolü olabileceği rapor edilmiştir. Benzer şekilde, Heidari ve ark. (2015b) tarafından yapılan bir çalışmada erkek Swiss albino fare karaciğer hücrelerinde metimazol maruziyeti sonrası oluşan toksik etki mekanizmaları araştırılmıştır. Metimazolün 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarının oral uygulanmasının ardından karaciğer hasarına neden olan dozun 200 mg/kg olduğu, 200 mg/kg dozda 5 saat süreli maruziyet sonrası hücrelerdeki GSH içeriğinin kontrole kıyasla anlamlı düzeyde yaklaşık 2,5 kat azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Aynı dozda lipid peroksidasyonun indüklendiği ve kontrole kıyasla anlamlı derecede yükseldiği belirlenmiştir (yaklaşık 1,7 kat; $p<0,05$). Vickers ve ark. (2017) aralarında metimazolün de bulunduğu 8 ilacı *ex vivo* 3 boyutlu çok hücreli insan karaciğer kesit modelinde karşılaştırmışlardır. Metimazolün 500 μ M maruziyetinde GSH düzeylerini 24 saatte %15-37, 48 saatte %11-49 ve 72 saatte %30-49 oranında arttırdığını gözlemişlerdir. Heidari ve ark. (2014a) tarafından, metimazol ve metabolitlerinin indüklediği hepatoktoksisite ve muhtemel koruyucu olabilecek ajanlar üzerine yapılan çalışmada, erkek albino farelere öncelikle 100 mg/kg metimazol (ip) uygulanmıştır. Bir saat sonrasında kontrol grubuna yalnızca %0.9 serum fizyolojik çözeltisi uygulanırken, diğer gruplara 100 mg/kg metimazol ve muhtemel koruyucu ajan olduğu düşünülen metformin, n-asetilsistein ve karnosin (ip) olarak uygulanmıştır. Karaciğer GSH miktarı kontrol grubunda $99.5\pm6.3 \mu$ M, metimazol uygulanan grupta ise $36.66\pm9.65 \mu$ M ölçülmüş ve kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Niknahad ve ark. (2016)

tarafından BALB/c cinsi erkek farelerden elde edilen karaciğer mitokondrileri üzerine *in vitro* koşullarda 10 μ M–100 mM konsantrasyon aralığında GSH içeriği ölçülmüş ve kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. GSH içeriği kontrol grubunda 8 ± 1 , 1 mM konsantrasyonda 11 ± 3 , 10 mM konsantrasyonunda 15 ± 6 ve 20 mM konsantrasyonda ise 9 ± 3 nmol/mg protein olarak ölçülmüştür. Kobayashi ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada BALB/c cinsi dişi farelerde 450 mg/kg metimazol (oral) maruziyetinden 6 saat sonra hepatik dokudaki GSH miktarında kontrole kıyasla yaklaşık 1.5 kat anlamlı düzeyde azalma olduğu saptanmıştır. Sefi ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada selenyumun Wistar cinsi yetişkin ve yavru dişi sıçanlarda metimazolün neden olduğu karaciğer hasarı ve oksidatif stres üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Altışar sıçandan oluşan dört gruba ayrılarak: grup I standart diyet alan kontrol grubu olarak oluşturulmuş; grup II içme suyunda 250 mg/L metimazol ve standart diyet almış; grup III, hem oral 250 mg/L metimazol hem de 0.5 mg/kg/L Se diyet almış; IV. grup sodyum selenit olarak 0.5 mg/kg/L Se diyet almıştır. Tedavilere gebeliğin 14. gününden doğumdan sonraki 14. güne kadar devam edilmiştir. GSH miktarı kontrol grubunda 10.15 ± 0.96 , metimazol uygulanan 2. grupta 5.82 ± 0.05 ölçülmüştür ($p<0,001$). Çalışmamızda metimazolün PANC-1 hücre dizileri üzerine maruziyeti ile GSH miktarı 20 mM konsantrasyonda $3,31 \mu\text{mol}/10^4$ hücre ve 40 mM konsantrasyonda $3,24 \mu\text{mol}/10^4$ hücre olarak ölçülmüştür

Heidari ve ark. (2013b) tarafından yapılan çalışmada, Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlardan izole edilen hepatositlerin 2 saat süre ile 1-15 mM konsantrasyon aralığında metimazole maruziyet sonrası ROS oluşumu değerlendirilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla 10 mM metimazol maruziyette ROS oluşumunda ~1.8 kat artış ile anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p<0,05$). Niknahad ve ark. (2016) tarafından BALB/c cinsi erkek farelerde 100, 200 ve 400 mg/kg metimazole maruziyet sonrası izole edilen karaciğer mitokondrilerinde ROS seviyesinin 2,7-diklorofluoresein diasetat testi ile ölçümünde kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde artış olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$). *In vivo* değerlendirmede mitokondriyal ROS miktarının kontrol hayvanlarına kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmiştir ($p<0,001$). Çalışmamızda da, metimazolün 40 mM maruziyet konsantrasyonunda ROS seviyesinde kontrole kıyasla ~5.3 kat anlamlı düzeyde artış tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Sakamoto ve ark. (2007) tarafından sıçan koku alma reseptör nöronları üzerinde yapılan çalışmada, bilinen metimazol maruziyetine bağlı hücre ölümünün apoptoz veya nekroz yoluyla olup olmadığı ve ekstrinsik veya intrinsik yolu içerip içermediği araştırılmıştır. Sıçanlara 300 mg/kg metimazol i.p. uygulanmış, maruziyet gruplarına ayrıca 30 dk önce vehikül olarak 0,01 PBS veya bir kaspaz-3 veya kaspaz-9 inhibitörü verilmiş ve TUNEL test ile apoptoz tayini yapılmıştır. Metimazol uygulaması, ağırlıklı olarak olgun koku alma reseptör nöronlarında hücre ölümüne ve sıçanlarda koku alma hassasiyetinin kısmen azalmasına neden olmuştur. Çalışmada gözlenen apoptotik hücre ölümünün esas olarak mitokondriyal sitokrom c aracılı kaspaz-3 aktivasyon yolu ile tetiklendiği ve hem kaspaz-3 hem de kaspaz-9 inhibitörlerinin, bu reseptörler ile metimazole bağlı hücre ölümünü önleyebileceği rapor edilmiştir. Metimazole bağlı hücre ölümünün bir kaspaz-3 veya kaspaz-9 inhibitörü ile ön işleme tabi tutulması yoluyla inhibisyonu, mevcut çalışmada nekrotik morfolojik değişikliklere dair bir kanıt oluşturmamıştır. Bu bulgunun aynı zamanda nöronlarda metimazole bağlı hücre ölümünün ağırlıklı olarak apoptotik olduğu fikrini de desteklediği belirtilmiştir. Ancak, çalışmamızda, metimazole maruz kalan PANC-1 hücrelerinde gözlenen ölümlerde toplam hücreye oranla erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz görülme yüzdelerinde, sırasıyla, maksimum %2,09; 0,56 ve 0,39, kontrole kıyasla anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Metimazolün karaciğer/pankreas hücreleri üzerine apoptotik ve nekrotik etki potansiyelinin değerlendirildiği bir çalışma literatürde mevcut olmadığından tez çalışmamızda gözlenen pankreas hücrelerinde maruziyet sonrası apoptoz ya da nekroz oluşum potansiyeli ile ilişkili anlamlı bir fark gözlenmemesi sonucu kıyaslanamamıştır.

Sonuç olarak; metimazolün PANC-1 hücrelerinde *in vitro* şartlarda IC₃₀ değerinin 53 mM olduğu, 40 mM maruziyetinin ROS oluşumunu indüklediği, dolayısıyla da metimazolün toksik etki oluşturma mekanizmalarından birinin ROS oluşumu olabileceği gösterilmiştir. Metimazol indüklü akut pankreatit riskinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik temel değerlendirmelerin yapıldığı tez çalışmamızdan elde edilen verilerin ileri çalışmalar ile desteklenmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Farklı mekanizmaların ve hatta *in vivo* çalışmaların yapılması ile gerek metimazolün gerekse de metabolitlerinin pankreatit oluşum riski ile ilişkisinin tespiti öncelik verilmesi gereken bir konudur.

KAYNAKLAR

Abraham A., Raghavan P., Patel R., Rajan D., Singh J., Mustacchia P. (2012). Acute Pancreatitis Induced by Methimazole Therapy. *Case Reports in Gastroenterology*, 6, 223-231.

Abraham P., Acharya S. (2010). Current and Emerging Treatment Options for Graves' Hyperthyroidism. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 6, 29-40.

Agito K., Manni A. (2015). Acute Pancreatitis Induced by Methimazole in a Patient With Subclinical Hyperthyroidism. *Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports*, 3, 1-4.

Appelros S., Borgström A. (1999). Incidence, Aetiology and Mortality Rate of Acute Pancreatitis Over 10 Years In A Defined Urban Population In Sweden. *British Journal of Surgery*, 86, 465-470.

Azizi F. (2006). The Safety and Efficacy of Antithyroid Drugs. *Expert Opinion on Drug Safety*, 5, 107-116.

Badalov N., Baradarian R., Iswara K., Li J., Steinberg W., Tenner S. (2007). Drug-Induced Acute Pancreatitis: An Evidence-Based Review. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 5, 648-661.

Balani A.R., Grendell J.H. (2008). Drug-Induced Pancreatitis: Incidence, Management and Prevention. *Drug Safety*, 31, 823-837.

Barbosa S.C., Cabrera P., Guerra B., Roman C.F. (2019). Valproic Acid Induced Necrohemorrhagic Pancreatitis: Case Report and Diagnostic Approach in Uncommon Pancreatitis. *International Journal of Surgery Case Reports*, 60, 126-129.

Ben Kridis W., Khanfir A., Frikha M. (2013). Acute Pancreatitis Induced by Anticancer Chemotherapy. *Acta Clinica Belgica*, 68, 309-310.

Brix T.H., Lund L.C., Henriksen D.P., Folkestad L., Bonnema S.J., Hallas J. ve ark. (2020). Methimazole and Risk of Acute Pancreatitis. *The Lancet*, 8, 187-189.

Burch H.B., Cooper D.S. (2015). Management of Graves Disease: A Review. *JAMA*, 314, 2544-2554.

Carroll J.K., Herrick B., Gipson T., Lee S.P. (2007). Acute Pancreatitis: Diagnosis, Prognosis, and Treatment. *American Family Physician*, 75, 1513-1520.

Dedeli Ö., Özütemiz A.Ö. (2007). Akut pankreatit ve akut akciğer hasarı. *Genel Tıp Dergisi*, 17, 59-66.

Eisses J.F., Criscimanna A., Dionise Z.R., Orabi A.I., Javed T.A., Sarwar S. ve ark. (2015). Valproic Acid Limits Pancreatic Recovery After Pancreatitis by Inhibiting Histone Deacetylases and Preventing Acinar Redifferentiation Programs. *The American Journal of Pathology*, 185, 3304-3315.

Elkhouly M.A., Salazar M.J., Simons-Linares C.R. (2019). Hypertriglyceridemia-Associated Drug-Induced Acute Pancreatitis. *Pancreas*, 48, 22-35.

Fagenholz P.J., Fernandez-del Castillo C., Harris N.S., Pelletier A.J., Camargo C.A. (2007). Direct Medical Costs of Acute Pancreatitis Hospitalizations in the United States. *Pancreas*, 35, 302-307.

Fathallah N., Slim R., Larif S., Hmouda H., Sakhri J., Salem C.B. (2015). Drug-Induced Acute Pancreatitis Confirmed By Positive Re-challenge. *Pancreatic Disorders & Therapy*, 5, 1-6.

Granger J., Remick D. (2005). Acute Pancreatitis: Models, Markers and Mediators. *Shock*, 24, 45-51.

Heidari R., Babaei H., Eghbal M.A. (2012). Ameliorative Effects of Taurine Against Methimazole-Induced Cytotoxicity in Isolated Rat Hepatocytes. *Scientia Pharmaceutica*, 80, 987-999.

Heidari R., Babaei H., Eghbal M. (2013a). Cytoprotective Effects of Organosulfur Compounds against Methimazole Induced Toxicity in Isolated Rat Hepatocytes. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3, 135-142.

Heidari R., Babaei H., Eghbal M. (2013b). Mechanisms of Methimazole Cytotoxicity in Isolated Rat Hepatocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 36, 403-411.

Heidari R., Niknahad H., Jamshidzadeh A., Azarpira N., Bazyari M., Najibi A. (2014a). Carbonyl Traps as Potential Protective Agents against Methimazole-Induced Liver Injury. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 1-9.

Heidari R., Niknahad H., Jamshidzadeh A., Abdoli N. (2014b). Factors Affecting Drug-Induced Liver Injury: Antithyroid Drugs as Instances. *Clinical and Molecular Hepatology*, 20, 237–248.

Heidari R., Niknahad H., Jamshidzadeh A., Eghbal M.A., Abdoli N. (2015a). An Overview On The Proposed Mechanisms of Antithyroid Drugs-Induced Liver Injury. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5, 1–11.

Heidari R., Jamshidzadeh A., Keshavarz N., Azarpira N. (2015b). Mitigation of Methimazole-Induced Hepatic Injury by Taurine in Mice. *Scientia Pharmaceutica*, 83, 143-158.

Jones M.R., Hall O.M., Kaye A.M., Kaye A.D. (2015). Drug-Induced Acute Pancreatitis: A Review. *The Ochsner Journal*, 15, 45-51.

Jung J.H., Hahm J.R., Jung J., Kim S.K., Kim S., Kim K.Y. ve ark. (2014). Acute Pancreatitis Induced by Methimazole Treatment in a 51-Year-Old Korean Man: A Case Report. *Journal of Korean Medical Science*, 29, 1170-1173.

Kaurich T. (2008). Drug-Induced Acute Pancreatitis. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 21, 77-81.

Keşkek M., Hamaloğlu E. (2002). Akut Pankreatit. *Yoğun Bakım Dergisi*, 2, 185-197.

Kikuchi I., Miyata N., Yoshimura Y., Miyamoto K., Tachikawa N. (2018). Methimazole-induced acute pancreatitis: a case report. *Clinical Journal of Gastroenterology*, 12.

Kobayashi M., Higuchi S., Ide M., Nishikawa S., Fukami T., Nakajima M. ve ark. (2012). Th2 Cytokine-mediated Methimazole-induced Acute Liver Injury in Mice. *Journal of Applied Toxicology*, 1-11.

Mallory A., Kern F. (1980). Drug-Induced Pancreatitis: A Critical Review. *Gastroenterology*, 78, 813-820.

Nesvaderani M., Eslick G.D., Cox M.R. (2015). Acute pancreatitis: update on management. *The Medical Journal of Australia*, 202, 420-423.

NIH. *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Methimazole (İnternette) 2020, Ocak. Erişim 06.04.2020, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548406/pdf/Bookshelf_NBK548406.pdf.

Niknahad H., Jamshidzadeha A., Heidaria R., Hosseinib Z., Mobinib K., Khodaei F. ve ark. (2016). Paradoxical Effect of Methimazole on Liver Mitochondria: *In vitro* and *In vivo*. *Toxicology Letters*, 259, 108-115.

Peralta F.G., Martinez P.V., Abreu C., Cepeda M., Puente M.F. (2018). Hepatotoxicity In Hyperthyroid Patient After Consecutive Methimazole and Propylthiouracil Therapies. *Endocrinology, Diabetes & Metabolism Case Reports*, 1-4.

Rivkees S.A., Stephenson K., Dinanuer C. (2010). Adverse Events Associated withMethimazole Therapy of Graves' Disease in Children. *International Journal of Pediatric Endocrinology*, 1-4.

Sakamoto T., Kondo K., Kashio A., Suzukawa K., Yamasoba T. (2007). Methimazole-Induced Cell Death in Rat Olfactory Receptor Neurons Occurs Via Apoptosis Triggered Through Mitochondrial Cytochrome c-Mediated Caspase-3 Activation Pathway. *Journal of Neuroscience Research*, 85, 548-557.

Sefi M., Amara I.B., Troudi A., Soudani N., Hakim A., Zeghal K.M. ve ark. (2012). Effect of Selenium on Methimazole-induced Liver Damage and Oxidative Stress in Adult Rats and Their Offspring. *Toxicology and Industrial Health*, 1-17.

Singh G., Correa R. (2020). *StatPearls*. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; 2020

Sonnet E., Massart C., Gibassier J., Allannic H., Maugeudre D. (1999). Longitudinal Study of Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) In Sera of Patients with Graves' Disease. *Journal of Endocrinological Investigation*, 22, 430-435.

Taguchi M., Yokota M., Koyano H., Yuzo Endo., Ozawa Y. (1999). Acute Pancreatitis and Parotitis Induced by Methimazole In A Patient With Graves' Disease. *Clinical Endocrinology*, 51, 667-670.

Trivedi C.D., Pitchumoni C.S. (2005) Drug-Induced Pancreatitis: An Update. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 39, 709-716.

Uyanıkoğlu A. (2019). Akut Pankreatit. *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*, 23, 118-125.

VanWoerkom R., Adler D.G. (2009). Acute Pancreatitis: Review and Clinical Update. *Hospital Physician*, 9-19.

Vickers A.E.M., Ulyanov A.V., Fisher R.L. (2017). Liver Effects of Clinical Drugs Differentiated in Human Liver Slices. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1-33.

Yang M., Qu H., Deng H.C. (2012). Acute Pancreatitis Induced by Methimazole in a Patient with Graves' Disease. *Thyroid*, 22, 94-96.

Zheng J., Yang Q.J., Dang F.T., Yang J. (2019). Drug-Induced Pancreatitis: An Update. *Arab Journal of Gastroenterology*, 1-6.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

METİMAZOL İNDÜKLÜ PANKREATİT OLUŞUM MEKANİZMALARININ İN VİTRO ŞARTLARDA DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 11	% 10	% 4	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.geneltip.com İnternet Kaynağı	% 3
2	yogunbakimdergisi.org İnternet Kaynağı	% 2
3	www.scribd.com İnternet Kaynağı	% 2
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
5	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
6	Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University Öğrenci Ödevi	<% 1
7	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

- 09.2018 - TÜFAM Farmakovijilans Yetkilileri Eğitimi Sertifikası
Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu
- 02.2018 - Coding with MedDRA
Maintenance and Support Services Organization (MSSO)
- 02.2018 - MedDRA: Safety Data Analysis and SMQs
Maintenance and Support Services Organization (MSSO)
- 11.2017 - 3. Ulusal Farmakovijilans Kongresi Katılım Belgesi
Farmakovijilans Derneği
- 07.2017 - TÜFAM Farmakovijilans Yetkilileri Eğitimi Sertifikası
Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu
- 04.2017 - İVEK 3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi Katılım Belgesi
İlaç, Eczacılık, Sağlık Bilim ve Teknolojileri Vakfı
- 11.2015 - İVEK 2. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi Katılım Belgesi
İlaç ve Eczacılık Kurumu Derneği
- 11.2015 - Motivasyon ve Verimli Çalışma Yöntemleri Eğitim Sertifikası
Aşkım Kapaşmak Akademisi
- 11.2015 - İnsanları Etkileme ve İkna Etme Sanatı Eğitim Sertifikası
Aşkım Kapaşmak Akademisi
- 11.2015 - Etkili İletişim Stratejileri ve Beden Dili Eğitim Sertifikası
Aşkım Kapaşmak Akademisi
- 12.2014 - 1.Serbest Eczacılık Zirvesi Katılım Sertifikası
İstanbul Üniversitesi
- 10.2010 - Bilgisayar Kullanımı (Bilgisayar İşletmeciliği - Operatör) Programı
İstanbul-Küçükçekmece Halk Eğitim Merkezi

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Tiyatroya gitmek, film izlemek, kitap okumak.