T.C.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları
Anabilim Dalı

RATLARDA VANKOMİSİN İLE İNDÜKLENEN RENAL HASARA KARŞI N-ASETİLSİSTEİN VE E VİTAMİNİNİN KORUYUCU ETKİLERİ

Dr. MELTEM KOYUNCU ARSLAN

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. FARUK ÖKTEM

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından "837-TU–04" proje numarası ile desteklenmiştir.

2006-ISPARTA

KKABUL VE ONAY

Tıp Fakültesi Dekanlığına,

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanlığı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Uzmanlık Tez Savunma Tarihi: 12 / 05 / 2006

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Faruk Öktem
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.

Üye : Prof Dr. Ahmet Rıfat Örmeci
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.

Üye : Prof Dr Ali Ayata
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.

Üye : Doç Dr. Bumin Dündar
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hasan Çetin
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.

ONAY: Bu uzmanlık tezi, Fakülte Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nevres Hürriyet Aydoğan
DEKAN

ÖNSÖZ

Öncelikle asistanlığım boyunca çalışmalarımda ve bu tezi tamamlamamda büyük ilgi ve desteğini gördüğüm, bilgi ve görüşlerinden yararlandığım, değerli hocam Doç. Dr. Faruk Öktem'e içtenlikle teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Ali Ayata ve Prof. Dr. Bahattin Tunç'a teşekkür ederim.

Asistanlık eğitimimde her zaman daha iyi olmam için beni destekleyen sevgili hocam Prof. Dr. İnci Ergürhan İlhan'a teşekkürü bir borç bilirim.

Eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Anabilim Dalı Başkanımız sayın hocam Prof. Dr. Ahmet Örmeci ve diğer tüm öğretim üyesi hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma destekleri için teşekkür ederim.

Hiçbir zaman esirgemediği sonsuz destek ve özverilerinden ötürü sevgili eşime, manevi desteği için oğluma ve bu günlere gelmemde bana karşı maddi manevi yardımlarını esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Meltem Koyuncu ARSLAN
2006-ISPARTA

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY ..... **ii**
ÖNSÖZ ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
KISALTMALAR ..... **v**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. Vankomisin 3
2.2. N-asetil-β-D-glukozaminidaz 5
2.3. Serbest Oksijen Radikalleri 6
2.3.1. Serbest Oksijen Radikalleri-Oksidatif Stres 8
2.3.2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Böbrek 10
2.3.3. Serbest Oksijen Radikalleri-Antioksidan Savunma Sistemleri 11
2.3.3.1. Superoksit Dismutaz 13
2.3.3.2. Katalaz 14
2.3.3.3. N-asetilsistein 15
2.3.3.4. E vitamini 17
3. MATERYAL VE METOD **20**
3.1. Deney Hayvanları 20
3.2. Kullanılan İlaçlar 20
3.3. Hayvan Çalışmaları ve Uygulama Şemaları 20
3.4. Histopatolojik Değerlendirme 22
3.5. İstatiksel Analiz 23
4. BULGULAR **24**
4.1. Biyokimyasal Sonuçlar 24
4.2. Histopatolojik Değerlendirme 25
5. TARTIŞMA **29**
ÖZET **35**
SUMMARY **37**
KAYNAKLAR **39**

KISALTMALAR

MRSA	: Metisiline dirençli Staphylococcus aureus
NAS	: N-asetilsistein
RNA	: Ribonükleik asit
İv	: İntravenöz
HICPAC	: Hospital Infection Control Practices Advisory Committee
NAG	: N-asetil- β -D-glukozaminidaz
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
ROT	: Reaktif oksijen türevleri
MDA	: Malonildialdehit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
SOD	: Süperoksit dismutaz
PMNL	: Polimorfonükleer lökosit
CAT	: Katalaz
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
$ROO^{\bullet}$	: Lipit peroksil radikali
İp	: İntraperitoneal
BUN	: Kan üre azotu
TBA	: Tiyobarbitürik asit
NBT	: Nitroblue tetrazolium

1. GİRİŞ

Stafilokoklar tüm dünyada problem olarak nitelenen mikroorganizmaların başında gelir. Antimikrobiyal tedavi konusunda yıllar içerisinde hızlı gelişmeler olmasına karşın, stafilokoksik enfeksiyonların tedavisinde halen güçlüklerle karşılaşılmaktadır. Metisiline dirençli Staphylococcus aureus (MRSA) sadece beta-laktam antibiyotiklere değil kinolonlar, kloramfenikol, klindamisin, tetrasiklin ve aminoglikozidler gibi diğer antibiyotiklere de direnç gösterir (1). Hastane epidemilerine yol açabilmesi nedeniyle tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu oluşturur. MRSA enfeksiyonlarında tedavi seçeneği bir glikopeptid antibiyotik olan vankomisin veya teikoplanindir. Teikoplaninin serum düzeyleri ile klinik etkinliği arasındaki korelasyon tüm MRSA infeksiyonları için yeterince incelenmediğinden, özellikle ciddi MRSA infeksiyonlarında tercih edilen antimikrobiyal ajan vankomisindir (1). Ancak klinik kullanımı nefrotoksisitesi nedeni ile sınırlanmaktadır. Vankomisin kullanımı ile ortaya çıkan nefrotoksisite çeşitli yayınlarda % 5–25 oranında bildirilmektedir (2, 3).

Vankomisine bağlı gelişen böbrek hasarının mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte literatürde vankomisine bağlı gelişen nefrotoksisite patogenezinde altta yatan faktörün, oksidatif stres olabileceğine dair çalışmalar yer almaktadır (4-6). Aminoglikozitler ve sisplatin gibi çeşitli nefrotoksik ilaçlara bağlı gelişen böbrek hasar modellerinde, serbest oksijen radikallerinin hücre ölümüne neden olabildiği ve nefrotoksik etki oluşumunda oksidatif stresin ön planda olduğu gösterilmiştir (7-13). Keza yakın zamanda vankomisinle yapılan bir çalışmada, böbreklerde gelişen hasardan oksidatif stres sorumlu tutulmaktadır ve bir antioksidan olan superoksit dismutaz aracılığı ile böbrek toksisitesinin azaldığı gösterilmiştir (14). Vankomisin nefrotoksisitesi ilaçların en önemli emilim alanı olan proksimal tubüler hücreler ve çevre dokularda yoğunlaşmış olabilir (14). Yapılan çok sayıda çalışmada E vitamini ve N-asetilsistein (NAS) gibi antioksidan etkisi olan çeşitli maddelerin kullanımı ile vankomisin dışı nefrotoksik ilaçlara, toksik maddelere ve böbreklerdeki iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı gelişen oksidatif hasarın azaldığı ortaya konmuştur (15-21). Ancak vankomisin nefrotoksisitesinin

patogenezi üzerine ve antioksidanların kullanımının etkileri ile ilgili az sayıda deneysel çalışma vardır.

Bu nedenle biz bu çalışmada, kullanım gerekliliği yaygın olmasına rağmen özellikle nefrotoksik etkileri nedeni ile kullanımı sınırlanan vankomisine bağlı olumsuz renal etkilerin oluşmasında, oksidatif tubüler hasarın rolünün belirlenmesini ve NAS, E vitamini gibi antioksidanların kullanımının histopatolojik ve biyokimyasal düzeylerdeki olası koruyucu etkilerini saptamayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Vankomisin

Antienfektif özelliğe sahip maddeler binlerce yıldır medikal alanda kullanılmaktadır. "Antibiosis" iddiasının ilk olarak 1871'de Pasteur tarafından ortaya atılmasının ardından, kemoterapinin modern çağının, 1930'larda penisilin ve sülfanamidlerin keşfi ve klinikte kullanımıyla başladığı kabul edilir. Son 10 yıl içinde gram-pozitif bakteriler (stafilokoklar, enterokoklar, piyojenik streptokoklar) giderek artan oranlarda karşılaşılan nozokomiyal patojenler haline gelmiştir (1). Beta-laktam antibiyotiklere dirençli stafilokoklar ve enterokoklardaki artış nedeniyle glikopeptid antibiyotikler (vankomisin ve teikoplanin) klinikte yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (22).

Vankomisin dar spektrumlu bir antibiyotik olup ilk olarak 1956'da bulunmuş ve penisilin dirençli stafilokoklara karşı 1958'de klinik kullanıma girmiştir. Daha sonra toksisitesi nedeniyle ve dirençli stafilokoklara karşı etkili alternatiflerin (metisilin gibi) geliştirilmesiyle önemi azalmış, ancak MRSA'un ortaya çıkması ile yeniden önem kazanmıştır (1). En sık kullanılan glikopeptid antibiyotik vankomisindir. İlk kez Borneo topraklarında bulunan Streptomyces orientalisten izole edilmiştir. Moleküler ağırlığı yaklaşık 1500 dalton olan trisiklik polipeptiddir. İki klorürlenmiş beta-hidroksi tirozin, 3 fenil-glisin kökü taşır. Fenil-glisin köklerinden biri glikoz ve özel bir aminoşeker olan "vancosamine" den oluşan bir disakkarid ile değişmiştir. Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarını oluşturan peptidlerin terminal D-ala-D-ala dizisine bağlanarak transglikozilasyon reaksiyonunu ve peptidoglikan oluşumunu inhibe eder. Hücre duvarı sentezini engeller ve çoğalmakta olan bakteriler üzerinde bakterisidal etki gösterir. Ayrıca sitoplazmik membran geçirgenliğini değiştirerek protoplast hasarı yapar. Ribonükleik asit (RNA) sentezini de etkileyerek antibakteriyel etkiye katkıda bulunur. Bu etki mekanizmalarından en önemlisi D-ala-D-ala'ya bağlanarak hücre duvarı sentezinin önlenmesidir (23). Birden çok antibakteriyel etki mekanizması, vankomisine karşı direnç gelişmesinin beklenenden az olmasına yol açar. Vankomisin konsantrasyonu,

minimal inhibisyon konsantrasyonu değerlerinin altına düşse bile antibakteriyel etkisi (post antibiyotik etki) 2 saat kadar devam eder (1).

İlk elde edildiğinde vankomisin içinde yüksek oranda (% 30' a yakın) yabancı madde varken son yıllarda geliştirilen preparatlar büyük ölçüde saflaştırılmış ve bugünkü vankomisin hidroklorür haline getirilmiştir. Steril suda çözüldükten sonra yavaş intravenöz (iv) infüzyonla verilmelidir. Gastrointestinal kanaldan emilimi çok azdır. Tamamına yakını glomerüler filtrasyon yolu ile atılır. Çok az bir kısmı karaciğerde metabolize edilir ve aktif formda safraya geçer. Yarı ömrü böbrek fonksiyonları normal olan erişkinlerde 6-8 saat, yenidoğanlarda 5-10 saat, çocuklarda 4 saattir. Proteine bağlanma % 10-55 kadardır ve önemli bir klinik farklılık yaratmaz. Tavsiye edilen doz çocuklarda her 6 saatte bir 10 mg/kg'dır. Böbrek yetmezliği olanlarda vankomisin dozu glomerüler filtrasyon oranı ve dializ uygulanıp uygulanmamasına göre düzenlenmesi önerilir. Vücut sıvılarına dağılımı (plevral, asit, sinoviyal, perikardiyal gibi) iyidir, verilen dozun % 80-90'ı ilk 24 satte idrarla atılır. Meninks inflamasyonu yoksa beyin omurilik sıvısına geçmez, menenjitte yüksek dozlarda (15 mg/kg/doz, günde dört kez) yeterli konsantrasyonlar sağlanır. Glikopeptid grubu antibiyotiklerin yaygın kullanımının vankomisin dirençli enterokok kolonizasyonu ve infeksiyonu için önemli bir risk faktörü olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (22). Amerika Birleşik Devletleri' nde enterokoklardaki vankomisin direncinde gözlenen dramatik artış nedeniyle "Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC)" tarafından uygun vankomisin kullanım ilkeleri belirlenmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'ide klinik kullanımda olan tek glikopeptid antibiyotik vankomisindir. Parenteral vankomisinin primer olarak MRSA infeksiyonlarında kullanılması gerekir ve MRSA'larla meydana gelen ciddi infeksiyonlarda yada herhangi bir nedenle metisilin veya 1. kuşak sefalosporinlerin kullanılamadığı stafilokokal infeksiyonlarda ilk tercih edilecek antibiyotiktir (22). Ayrıca iv katater ya da yabancı cisimlerle ilişkili kogülaz-negatif stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde en güvenilir ajandır.

Vankomisinin en sık rastlanılan yan etkileri ateş, titreme ve infüzyon yerinde flebittir (23). Özellikle dozun hızlı verilmesini takiben baş, boyun, toraks bölgelerini içine alan "red man" ya da "red neck" (flushing) sendromu görülebilir. Hipersensitiviteye bağlı makülopapüler ya da difüz eritamatöz döküntü gelişebilir.

Özellikle cerrahi sırasında hızlı iv infüzyonu takiben şok gelişebilir. Reversibl lökopeni, trombositopeni, eozinofili ve lakrimasyon nadiren bildirilen yan etkileridir. İntravenöz vankomisin kullanımını takiben gelişen Clostridium Difficile koliti olguları vardır. Vankomisinin diğer önemli bir yan etkisi nörotoksisitedir. Vankomisine bağlı nörotoksisite kendini 8. sinir (işitme) hasarı ve işitme kaybı ile gösterir. Tinnitus ve yüksek tonlarda işitme kaybı ilk bulgulardır. İlacın kesilmesini takiben işitmede düzelme olabilir. Ancak işitme kaybı genellikle progresif ve kalıcıdır.

Vankomisine bağlı gelişen en önemli istenmeyen etki nefrotoksisitedir. Daha saf olan yeni vankomisin preparatları ile daha az görülmekle birlikte, nefrotoksisite önemli yan etkilerinden biridir ve sıklığı % 5-25 oranında bildirilmektedir (2). Özellikle aminoglikozidler ve etakrinik asit nefrotoksisite riskini arttırır (3, 7, 24). Sık tekrarlayan kullanım öyküsü, yüksek dozlara ulaşma ve aminoglikozidlerle kombine kullanım olmadığı sürece genellikle toksisite geriye dönüşümlüdür. Önlem için parenteral yoldan yüksek dozda vankomisin kullanımından kaçınılması ve diğer nefrotoksik ilaçlarla beraber kullanıldığında serum düzeylerinin yakın takibi gerekir (25). Vankomisin ile indüklenen nefrotoksisitenin mekanizması hala tam olarak bilinmez.

2.2. N-asetil-β-D-glukozaminidaz

Böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesi ve izlenmesinde standart testlerin yanı sıra enzimürilerin tayini giderek önem kazanmaktadır. İdrardaki tubüler kaynaklı enzimlerin atılımındaki artış böbrek hasarının duyarlı bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (26). Bu enzimlerin ölçümünün kolay yapılması ve duyarlılığının fazlalığına karşın özgüllüğünün düşük olması, enzimürilerin tanısal açıdan değerlerini düşürmektedir. Ancak böbrek hasarı olasılığı olan kişilerin taranması, nefrotoksik ajanların etkilerinin ve hastalık aktivitelerinin araştırılmasında yararlı olmaktadır (27). Bu amaçla, günümüzde lösin, aminopeptidaz, g-glutamil transferaz, a-glukozidaz gibi çeşitli proksimal tubülus fırçamsı kenar enzimi kullanılmış olmakla beraber literatürdeki çalışmaların çoğu N- asetil-β-D-glukozaminidaz (NAG) ile ilgilidir (27, 28).

Proksimal tubülus lizozomlarında bulunan 130.000-140.000 molekül ağırlığındaki NAG, normal ve hatta artmış permeabilite koşullarında bile glomrüllerden filtre olamayacak kadar büyüktür (27). NAG idrarda stabil olması ve laboratuvarda tayininin kolay olması nedeniyle klinik pratikte tercih edilen bir enzimdir (26, 27, 29). Böbreklerde tubüler hasarın duyarlı bir göstergesi olan NAG enzimürisi, çeşitli böbrek hastalıklarında ve nefrotoksik ilaçlara maruziyette tubüler hasarın da erken bir parametresi olarak kabul edilmektedir (26,30). Üriner NAG aktivitesinin glikopeptid antibiyotiklere bağlı gelişen nefroksisitede duyarlı bir indikatör olarak arttığı bildirilmektedir (30).

2.3. Serbest Oksijen Radikalleri

Kimyasal bileşikler iki veya daha çok elementin kimyasal bağ yapmasıyla meydana gelir. Kimyasal bağlar tek moleküler yörüngeyi paylaşan ve birbirine zıt yönde dönen bir çift elektrondan oluşan kararlı yapılardır. Bu bağ negatif yüklü elektronlarla sarılmıştır. Elektronların düzeni bileşiğe kararlılık sağlar. Dış yörüngesinde bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektrona sahip element veya bileşiklere "serbest radikaller" adı verilir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden türeyen serbest oksijen radikalleridir. Oksijen atomu toplam sekiz elektron içerir. Bu elektronlar öyle dağılmışlardır ki bunlardan dış yörüngede bulunan iki tanesi eşleşmemiştir. Bu yüzden oksijen bazen diradikal olarak değerlendirilir. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar.

Çok reaktif olan bu yapılar, kararlı duruma geçme eğiliminde oldukları için, tek elektronlarını çiftlemek üzere başka moleküllerle reaksiyona girdiklerinde, onların yapılarını değiştirebilirler. Bir serbest radikal çiftlenmemiş elektronunu radikal olmayan bir moleküle verebilir veya tek elektronunu çiftlemek üzere, diğer molekülden bir elektron alabilir. Böylece bu bileşiği yeni bir serbest radikal haline dönüştürür. Bu olay, bir zincir reaksiyon olarak, radikalin başka bir radikalle birleşmesi veya antioksidanlar tarafından kırılana kadar devam eder (31).

Serbest oksijen radikallerine ek olarak, serbest elektronları bulunmadığı halde reaksiyonlarda bu şekilde davranabilen maddelerde bulunmaktadır. Kimyasal reaksiyonlar sırasında serbest radikalleri serbestleştirir (hidrojen peroksit (H_2O_2)

yada hipoklorik asit) yada doğrudan sitotoksik etki (hipoklorik asit yada kloramin R-NHCl) gösterir. Tablo 1' de radikal olan ve olmayan reaktif oksijen türevleri (ROT) yer almaktadır.

Tablo1: Serbest oksijen radikalleri

Radikaller	**Radikal olmayanlar**
Superoksit radikali	Hidrojen peroksit
Hidroksil radikal	Lipidhidroperoksit
Alkoksil radikal	Hipoklorik asit
Peroksil radikal	R-NH2

Oksijen merkezli serbest radikaller veya serbest radikallerin indirgenme ürünleri olan ROT hücrelerde dopamin ve adrenalin oksidasyonu, pürin katabolizması, aerobik metabolizma gibi normal kimyasal reaksiyonlar sırasında üretilen oldukça toksik bileşiklerdir. Ayrıca radyasyon, sigara gibi çevresel faktörler ve hiperglisemi gibi normal metabolizmada gözlenen bazı değişiklikler de ROT bileşik sentezinde artışa neden olmaktadır. Superoksit radikali oksijenin kendisine bir elektron transferiyle redüksiyonu sonucu oluşur. Superoksit radikali doğada genellikle redüktiftir ve belirgin özelliği H_2O_2 kaynağı olmasıdır. Süperoksit dismutaz enzimi tarafından katalitik olarak H_2O_2'e indirgenir. H_2O_2 düşük toksisiteye sahip, oksidan ancak reaktif olmayan bir üründür, fakat kolayca hücresel membranlara penetre olabilir. Özellikle geçiş metal iyonlarının (demir, bakır) varlığında O^{2-} ve H_2O_2 ferik demiri ferröz hale getirerek, serbest oksijen radikallerinden en reaktif ve hasar verici özelliğie sahip olan OH radikalini oluşturmak için kolayca parçalanabilir. Bu reaksiyon "Fenton Reaksiyonu" olarak bilinir (32).

Organizmada serbest radikaller hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak, hem de radyasyon, ilaçlar ve diğer zararlı kimyasal maddelerin etkisi ile endojen ve eksojen kaynaklardan oluşabilmektedir. Tablo 2'de serbest oksijen radikallerinin endojen ve eksojen kaynaklarından bazıları sıralanmıştır. Endojen kökenli oksijen radikalleri normalde insan organizmasında oldukça az miktarlarda bulunur ve immün sistem içinde önemli işlevler görürken, organizmada oksidatif

strese neden olan eksojen kökenli oksijen radikallerinin sayısında son yıllarda önemli ölçüde artış saptanmıştır.

Tablo 2 : Serbest oksijen radikalleri kaynakları

Endojen kaynaklar	**Eksojen kaynaklar**
Mitokondriler (solunum zinciri)	Radyasyon
Hücre zarı (prostoglandin sentezi)	İlaçlar
Sitokrom P-450	Sigara, Alkol, Uyuşturucu
Aktive lökositler (fagositoz)	
Mikrozomal elektron taşıma zinciri	
Oksidan enzimler	

2.3.1. Serbest Oksijen Radikalleri-Oksidatif Stres

Serbest oksijen radikalleri yapısal özellikleri nedeni ile lipid, protein ve nükleik asit gibi hücre bileşenlerini okside etme kapasitesine sahiptir. Özellikle hücre membran yapısında bulunan doymamış yağ asitleri oksidasyona duyarlıdır ve bunların oksidasyonu lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarının başlamasına neden olur. Bir reaksiyon zincirinin başlaması, diğer reaksiyon zincirlerinin başlamasına ve şiddetlenmesine neden olur ve bunun sonucunda yaygın peroksidasyon, membran lipid tabakasının yapısal bütünlüğünde bozulma, membran geçirgenliğinde artma, iyon transportunda bozulma ve son olarak lizis ortaya çıkar. Hücre ölümüne kadar giden bir süreç bu şekilde tamamlanır. ROT bileşiklerinin neden olduğu oksidan stresin diyabet, kanser, ateroskleroz, ilaçlara bağlı nefrotoksisite gibi birçok olayın patogenezinde ve komplikasyonların gelişmesinde önemli rol oynadığı kabul edilmektedir(33).

Membran Lipitlerine Etki

Membran lipidleri oksidanların en önemli hedeflerindendir. Membran lipid peroksidasyonu sonucu membran bütünlüğü bozulması ile membran proteinleri, reseptörleri ve ayrıca bunlara bağlanan enzimler inaktive olurlar. Sitotoksik olarak bilinen malonildialdehid (MDA), konjuge dienler gibi yan ürünler de oluşur. Lipid peroksidasyonu, yağların özellikle poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif oksijen bağımlı yıkımı olarak tarif edilir ve dallanan bir zincir reaksiyonudur. Olayda genelde bir enzim varlığı gerekli olmamasına rağmen demir, bakır gibi metaller

tarafından katalizlenir. Lipid peroksidasyonu, hücre zarında bulunan poliansatüre yağ asitlerinin alfa-metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla başlatılmaktadır (31-33). Hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla yağ asidi lipid radikali halini alır. Yapıda molekül içi çift bağların yer değiştirmesi sonucu konjuge dienler oluşur. Ardından moleküler oksijenle etkileşim sonucunda lipid peroksil radikali ortaya çıkar. Bunlar da yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de lipid hidroperoksitlerine dönüşmektedirler. Lipid hidroperoksitleri yıkılarak biyolojik olarak aktif yapılar olan aldehit ve karbonil bileşiklerine dönüşürler. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda MDA oluşur. Oluşan MDA membran yapılarını etkileyerek çapraz bağlanma ve polimerizasyona sebep olabilir. Sonuç olarak da iyon transport bozuklukları, enzim aktivite değişiklikleri, hücre bileşenlerinin agregasyonu gibi değişiklikler ortaya çıkabilir.

Proteinler Üzerine Etki

Serbest radikaller proteinler üzerine olan hasar yapıcı etkilerini proteinlerde serbest radikal birikimi yaparak gösterir. Doymamış bağ ve sülfüt içeren moleküllerin serbest radikaller ile reaktivitesi yüksek olduğundan fenilalanin, tirozin, triptofan, histidin, metionin gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Bunun sonucunda özellikle sülfür ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bu reaksiyon sonucu albümin ve immünglobulin gibi fazla sayıda disülfit bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur ve normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (34).

DNA Üzerine Etki

Serbest radikaller deoksiribonükleik asiti (DNA) etkileyerek hücrede mutasyona yol açarlar. Hidroksil gibi serbest radikal bileşikleri DNA bazları üzerinede geri-dönüşümsüz değişikliklere neden olurlar. Bunlardan en önemlileri timin ile hidroksil radikalinin oluşturduğu ürün olan timin glikol ve guanin ile hidroksil radikalinin oluşturduğu ürün olan 8-hidroksi guanindir. Bu DNA ürünleri onarım enzimleri ile elimine edilir ve idrarla atılır.

Karbonhidratlar Üzerine Etki

Özellikle monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Bir okzoaldehit olan gliokzil de DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliğinden dolayı antimitotik etki gösterir. Yine superoksit ve hidrojen peroksitin in vitro olarak hyaluronik asidi parçaladıkları gösterilmiştir (35). Serbest radikaller prostoglandin oluşumu gibi hücresel reseptör fonksiyonlarını da değiştirmektedir (36).

2.3.2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Böbrek

Son yıllarda yapılan hayvan çalışmalarında serbest oksijen radikallerinin akut-kronik ve/veya immün ve immün olmayan böbrek hastalarında patofizyolojik önemi saptanmıştır. Tablo 3'de patogenezde serbest oksijen radikallerinin rolü gösterilmiş böbrek hastalıkları yer almaktadır (37).

Tablo 3: Patogenezinde serbest oksijen radikallerinin rolü olduğu düşünülen böbrek hastalıkları

Glomerüler hastalık
• Minimal değişim hastalığı
• Membranöz glomerülopati
• Nötrofil bağımlı hasar, antiglomerüler bazal membran nefriti
Akut böbrek yetmezliği
• Postiskemik
• Toksik: sisplatin, gentamisin, vankomisin, amikasin
• Kontrast nefropati, miyoglobinüri/hemoglobinüri, radyasyon
Obstruktif nefropati
Pyelonefrit
İlerleyici böbrek yetmezliği

Önceki çalışmalarda böbrek dokusu veya idrarda artmış oksidan hasar ürünlerinin saptanması ve/veya serbest oksijen radikalleri inhibitörleri verilmesi ile koruyuculuğun deneysel olarak gösterilmesi ile serbest oksijen radikallerinin nefropati patogenezinde rolü olduğu gösterilmiştir (37). Çeşitli iskemi ve

inflamasyon modellerinde reaktif oksijen partiküllerinin glomerüler hasara neden olduğu bilinmektedir (37).

2.3.3. Serbest Oksijen Radikalleri-Antioksidan Savunma Sistemleri

ROT' lerinin düzeylerini ve bunların meydana getirdiği hasarı sınırlandırmak için vücutta birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Bunlar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipit peroksidasyonunu inhibe ederler. Kontrol mekanizmasının temel amacı serbest radikallerin aşırı yapılmasını önlemek, aynı zamanda da sağlam olan komşu hücreleri korumaktır. Antioksidanlar endojen ve ekzojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabildiği gibi serbest radikalin meydana gelişini engelleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler. Ayrıca enzim olanlar ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılabilirler. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler (38, 39).

A) Endojen Antioksidanlar:

1. Enzimler

- Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi
- Superoksit dismutaz
- Katalaz
- Glutatyon peroksidaz

2. Enzim olmayanlar

- Lipid fazda bulunanlar
- Alfa-tokoferol, Beta-karoten
- Sıvı fazda (hücre sitozolünde veya kan plazmasında) bulunanlar
- Askorbikasit, Ürat, Sistein, Seruloplazmin, Transferin, Laktoferrin, Miyoglobin,
- Hemoglobin, Ferritin, Albumin, Bilirubin, Glutayon
- Hem sıvı hem de lipid fazda bulunanlar
- Melatonin

B) Ekzojen Antioksidanlar

- Ksantin Oksidaz İnhibitörleri: Allopürinol, oksipürinol, folik asit, pterin, aldehit, tungsten
- İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz inhibitörleri: Adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflamatuar ilaçlar
- Rekombinant superoksit dismutaz
- Diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları: Mannitol, albumin
- Demir redoks döngüsünün inhibitörleri: Desferrioksamin, seruloplazmin

Normalde oksidan stres mevcut antioksidanlar tarafından dengelenmektedir. Dengenin bozulması durumunda doku hasarı ve/veya hastalık gelişebilir. Oksidanlarla mücadelede temel stratejiler oksidanları arttırıcı etkenlerden uzaklaşmak, tetiklenen biyokimyasal olayları engellemek, oksidan salgılayan hücreleri etkisizleştirmek ve antioksidan kullanmaktır. Oksidan moleküllerle mücadelede en önemli mekanizma, belirli düzeyi aşmış oksidanlara doğrudan etki ederek onları inaktif hale getiren antioksidanlardır. Tablo 4' de tedavide kullanılabilen antioksidanlar yer almaktadır (37).

Tablo 4: Tedavide kullanılabilen antioksidanlar

• Rekombinant Superoksit dismutaz (SOD)
• Demir şelatörleri: Desferrioksamin
• Ksantin oksidaz inhibitörleri: Allopurinol
• E, C, A vitamini-Beta karoten
• Tiol grubu. NAS, metionin, glutathion,
• Probukol
• Trimetazidin
• Anjiyotensin enzim inhibitörleri

ROT bileşiklerinin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma sistemlerini kullanırlar. Antioksidan bileşenlerin bazıları hücre tarafından sentez edilirken, bazıları da dışarıdan, diyetle alınmaktadır.

2.3.3.1. Superoksit Dismutaz

İlk olarak 1968 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanan SOD yapısında bakır, çinko ve manganez içerdiğinden metalloenzim olarak adlandırılır. Superoksidin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler ve superoksit düzeylerini kontrol etmede önemli bir rol oynar. Katalizlediği bu reaksiyon spontan olarak meydana gelebilir. Fakat SOD aracılığı ile reaksiyon hızı 4000 kat artar. Sitoplazmada dimerik, bakır ve çinko içeren (Cu-Zn-SOD) ve mitokondride tetramerik, manganez içeren (Mn-SOD) izomeri mevcuttur. Cu-Zn-SOD 21 no' lu kromozomda, Mn-SOD 6 no' lu kromozomda lokalizedir (40). Cu-Zn-SOD siyanidle inhibe edilirken, Mn-SOD inhibe olmaz. Her iki SOD'ın katalizlediği reaksiyon aynıdır (41). Enzimin fizyolojik fonksiyonu, oksijeni katabolize eden hücreleri superoksit serbest radikalinin zararlı etkilerine karşı korumaktadır. Böylece lipid peroksidayonunu inhibe eder (42). SOD aktivitesi yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO_2 artışı ile artar. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda superoksit üretimi olmasına rağmen, intraselüler superoksit düzeyleri düşük tutulur. SOD'ın ekstraselüler aktivitesi çok düşüktür (43). SOD' un süperoksit anyonuna etkisi şu şekilde olmaktadır; süperoksit anyonu, Cu^{2+} ve bir arginin rezidüsünün guanido grubuna bağlanır, bu bağlanma sonucunda süperoksitten bir elektron Cu^{2+} 'a transfer olurken Cu^{1+} ve moleküler oksijen meydana gelir, ikinci bir süperoksit anyonu Cu^{1+} 'dan bir elektron, bağlanma ortağından ise iki proton alarak H_2O_2 oluştururken, enzim tekrar Cu^{2+} formuna dönmüş olur (44).

$$SOD\text{-}\ Cu^{2+} + O_2^{-} \quad \rightarrow \quad SOD\text{-}\ Cu^{1+} + O_2$$

$$SOD\text{-}\ Cu^{1+} + O_2^{-} + 2H^{+} \quad \rightarrow \quad SOD\text{-}\ Cu^{2+} + H_2O_2$$

SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intraselüler öldürülmesinde de rol oynar. Bu nedenle, SOD granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de granülositlerden daha fazla miktarda SOD bulunmaktadır (45). SOD aktivitesindeki genetik ya da sonradan meydana gelmiş değişiklikler ile hastalığa karşı hassasiyet ya da direncin birbiriyle ilişkili olabileceği bazı araştırmacılar tarafından kaydedilmiştir.

Bazı araştırmacılara göre, polimorfonükleer lökosit (PMNL) tarafından artmış süperoksit salınımı, PMNL' lerin azalmış süperoksit toplayıcı aktivitesinden sorumlu olabilir. Cu-Zn-SOD aktivitesi prematürelerin ve yaşlıların eritrositlerinde, psöriazisli hastaların lökositlerinde düşük bulunmuştur (46, 47).

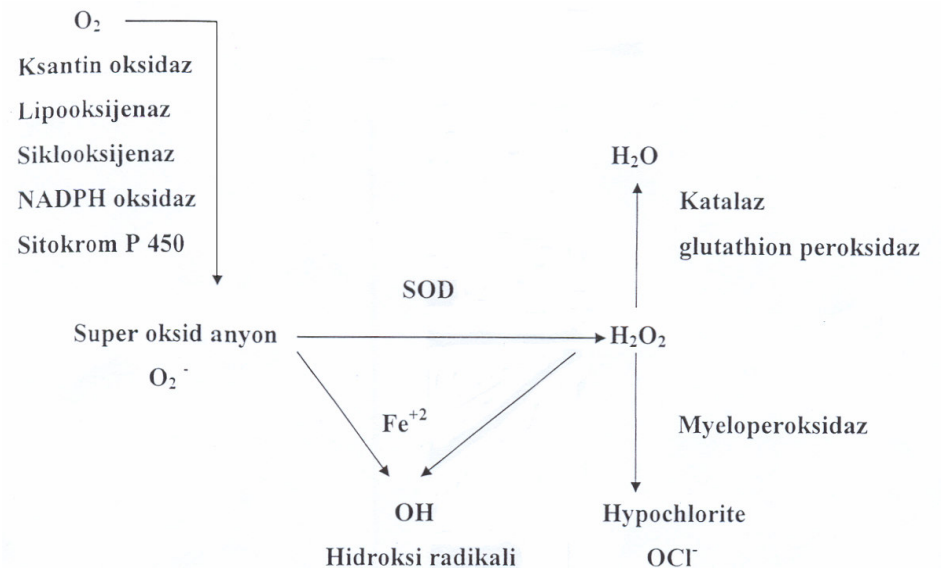
2.3.3.2. Katalaz

Leew ve arkadaşları (48) tarafından ilk kez 1901 yılında tabiatta saptanmasının ardından, 1937 yılında Sumner ve Dounce (49) tarafından karaciğerde bulunduğu gösterilmiştir. Dört adet hem grubu içeren bir hemoprotein yapısında olan katalazın (CAT) doku aktiviteleri farklılıklar gösterir. En yüksek aktivite karaciğer ve böbrekte saptanırken, en düşük aktivite destek dokusunda izlenmektedir. Dokularda esas olarak mitokondri ve peroksizom partiküllerine bağlı olarak bulunurken, sitoplazma ve endoplazmik retikulumda da aktivitesi mevcuttur. Hidrojen peroksitin aşırı arttığı ortamalarda aktivite göstererek, moleküler oksijen ve suya parçalanmasını sağlar.

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

Serbest oksijen radikali oluşum ve yıkımında temel enzimatik reaksiyonlar şekil 1'de gösterilmektedir.

Şekil 1: Serbest oksijen radikali oluşum ve yıkımında temel enzimatik reaksiyonlar

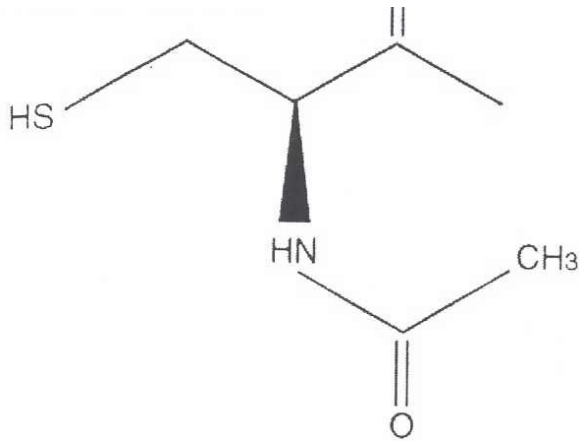


2.3.3.3. N-asetilsistein

NAS mukolitik bir ilaç olarak 1960' lardan itibaren kullanılmaktadır. Klasik mukolitikler serbest sülfhidril (tiol) grubu içerirler. Mukustaki disülfit bağlarını kırarak, mukoproteinleri parçalar ve mukusun vizkositesini azaltırlar. Başlıcaları NAS, karbosistein ve erdosteindir. NAS iv, inhalasyon ve oral yol ile diğerleri ise yalnız oral yoldan uygulanırlar. Zamanla bu ilaçların hücre içinde sistein miktarını arttırarak glutatyon üretimini ile antioksidan özellik gösterdikleri keşfedilmiştir.

Sülfidril grubu içeren bir molekül (C5H9NO3S) olan NAS' nin molekül ağırlığı 163 gr/mol'dür. Molekül yapısı şekil 2'de görülmektedir.

Şekil 2: NAS' nin moleküler yapısı



Oral alım sonrası çeşitli dokular tarafından hızla emilir (% 97). Karaciğer ve bağırsaklarda ileri derecede ilk geçiş eliminasyonuna uğrar ve deasetillenerek protein peptid zinciri yapılarına katılır ve bir dizi NAS metaboliti oluşur. Oral alınan NAS' ın yalnızca az bir miktarı değişmeden plazma ve dokulara ulaşır. Plazma tepe değerlerine oral dozdan 1 saatten önce ulaşılır. Yarılanma ömrü yaklaşık 2 saattir. Oral dozdan yaklaşık 12 saat sonra plazmada tespit edilemez. Alınan dozun % 13-38' i 24 saatte idrarla atılır. İntravenöz yolla uygulandığında NAS nadiren alerjik reaksiyonlara neden olabilir. Asetominofen entoksikasyonu gibi yüksek oral dozlar halinde uygulandığında bile nadiren bulantı kusma, gastrointestinal yakınmalar, döküntü, kaşıntı, anjioödem bronkospazm, taşikardi, hipotansiyon ve hipertansiyona neden olabilir (50).

NAS L-cystein ve redükte glutathionun asetillenmiş öncülüdür. Hücre içi sülfhidrid birikimine sebep olup indirgenmiş glutatyonun öncü maddesi olarak rol oynamaktadır. Düşük moleküler ağırlıklı olan bileşik, glutatyon prekürsörüdür. Glutatyon stoklarını yeniden doldurmakta, superoksit-dismutaz aktivitesini arttırmakta, hidroksil radikallerini azaltmakta ve otokatalitik lipid peroksidasyonunu engellemektedir (51, 52). Glutatyon serbest oksijen radikallerinin destrüktif etkilerini azaltmaktadır. Mukolitik etkileri nedeniyle kronik akciğer hastalıklarında ve karaciğer toksisitesi antagonizması nedeniyle asetominofen toksisitesinde rutin olarak kullanılmaktadır (53). Başlangıçta ideal bir mukolitik olarak kullanılan bu ajan üzerinde *in vivo* yapılan çalışmalarda NAS'ın T lenfosit koloni üretimi ile lenfoproliferasyon regülasyonunu sağladığı, kemotaksis ve oksijen ara ürünlerini azaltarak makrofajlar ve PMNL'lerin davranışlarına olumlu etkileri olduğunu bildirir sonuçlar elde edilmiştir. Birçok deneysel adult respiratuar distres sendromu modelinde *in vitro* olarak, hipoklorik asiti temizlediği ve hidrojen peroksit ve hidroksil radikalini oksidanlara bağlı doku hasarını önlediği gösterilmiştir (54, 55). Bu özeliklerini hem içerdiği sülfidril gruplarının oksijen radikalleri ile tepkimeye girme yeteneğine, hem de dolaylı olarak antioksidan sistemleri indükleyici etkisine bağlı olduğu düşünülmektedir. Antioksidan ve immünmodülatör özellikleri göz önünde bulundurularak klinik uygulamalarda oksidatif stres, akut respiratuar distress sendromu ve bazı kardiyovasküler hastalık durumlarında kullanılmaktadır. Bu özeliklerine ek olarak antiinflamatuar özellikleri de vardır ve sitokinlerin salınımını

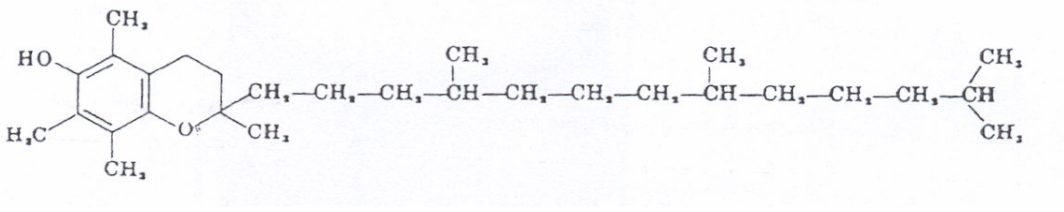
baskılayarak, adezyon moleküllerinin serbestleşmesini ve nükleer faktör kapa B' yi inhibe etmektedir (56, 57). Son çalışmalar vazodilatatör etkileri de olduğunu ortaya koymaktadır. Bu etkilerini nitrik oksit ile birleşerek daha stabil ve guanilat siklazı daha potent olarak aktive eden bir molekül olan S-nitrosithiol oluşturarak yapar (58, 59).

Tariq ve arkadaşları (60) yaptıkları bir çalışmada değişen dozlarda siklosporin ve NAS verdikleri rat gruplarını karşılaştırdıklarında, yalnızca siklosprin verilen gruplarda BUN ve kreatinin değerlerinde yükselme gözlerken, NAS verilen grupta değişim gözlemediklerini, histolojik incelemede de siklosporin ile oluşan değişikliklerin NAS ile engellendiğini ve NAS'ın koruyucu etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

2.3.3.4. E vitamini

Vitamin E ilk kez Evans ve Bishop tarafından 1922 yılında tanımlanmıştır. Önceleri X, daha sonra antisterilite vitamini, 1936 yılında buğday tohumundan elde edildikten sonra ise tokoferol olarak isimlendirilmiştir. E vitamini hidroksi 6-kroman türevidir. Bunlar doğada yan zinciri doymuş olan tokoferoller (alfa, beta, gamma, lambda) ve yan zinciri doymamış olan tokoferoller halinde bulunur.

Şekil 3: E vitamininin moleküler yapısı



Tokoferoller içinde en geniş doğal dağılımı ve en büyük biyolojik aktiviteye sahip olan D-α-tokoferoldür. Çözülebilir bir lipit fenolik antioksidandır ve özellikle doymamış bitkisel yağlarda, fındık, badem, ceviz ve yeşil sebze ve meyvelerde zengin olarak bulunur. Kızartma, kaynatma ve saklama sırasında önemli ölçüde parçalanır. Anne sütünde oldukça fazla miktarda bulunur. Diyette yağda çözünmüş olarak bulunduğu için, yağ sindirimi sırasında açığa çıkar ve emilir. Emilebilmesi için yağ emiliminin ve safra asitlerinin normal olması gereklidir. Emiliminde selenyumun da yeterli miktarda olması gerekmektedir. E vitamini selenyum kaybını

önleyerek veya onu aktif şekilde tutarak selenyum ihtiyacını azaltır. Bağırsaktan absorbsiyonu ince bağırsak epitel hücrelerince herhangi bir taşıyıcı protein olmadan kolaylaştırılmış difüzyon yoluyla olur. Önce şilomikron yapısına dahil olur. Şilomikronlar lipoprotein lipaz aracılığı ile hidroliz olurken E vitaminin bir bölümü dokulara taşınır. Kalan E vitamini ise, şilomikron kalıntıları ile birlikte karaciğer tarafından alınıp, hepatik kökenli çok düşük dansiteli lipoprotein aracılığı ile tekrar dolaşıma salınır veya yüksek dansiteli lipoproteine transfer olur. E vitamini sıklıkla LDL' nin (düşük dansiteli lipoprotein) dış tabakasında ve kromonal halkası sulu faza yönelmiş şekilde lokalizedir. Ortalama bir LDL partikülünde 6 tane α-tokoferol molekülü vardır. E vitamini yağ dokusunda depolanır. Normal durumunda plazma konsantrasyonu 0.4-0.5 mg/dl kadar olup plazmadaki total lipid düzeyinde meydana gelen değişiklikler E vitamini oranının yükselmesine neden olur. E vitaminin yarılanma ömrü 44 saat olarak belirlenmiştir ve dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur (61). En yüksek E vitamini konsantrasyonları, mitokondri ve mikrozomlar gibi membrandan zengin hücre fraksiyonlarında bulunur. Sitozol ve peroksizomda ise daha az miktarlarda bulunur (36).

Biyolojik sistemlerde önemli bir antioksidan olan alfa tokoferol, membranların lipid tabakaları arasında bulunur ve bu bölgede yapısal rol oynar. Hücre solunumu ve nükleik asit sentezinde yer alır. E vitamini zincir kırıcı bir antioksidan olarak bilinir. Yapısındaki fenolik hidroksi grubuna sahip aromatik halka kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği buradan kaynaklanır. Lipit peroksil radikalini ($ROO^{\bullet}$) parçalayarak lipit peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırır. Otooksidasyonun başlatıcısı olan peroksit ve hidroperoksit radikallerini inhibe eder. Lipid peroksidasyonunu engelleyerek, hücre zarında oluşacak olan hasarı ve LDL' in modifikasyonunu önler.

$$ROO^{\bullet} + \text{alfa-tokoferol-OH} \rightarrow ROOH + \text{alfa-tokoferol-O}^{\bullet}$$

Oluşan tokoferoksil radikali glukronik asitle konjuge edilerek safra yoluyla atılır. E vitamini okside olduktan sonra askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilmektedir. Lipid peroksidasyonunun bir ölçüsü olarak solunum havası ile atılan pentan miktarı kullanılır. Diyetle E vitamini verilişinin pentan çıkışını, yani lipit peroksidasyonunu önemli oranda azalttığı kaydedilmiştir.

Tokoferolün antioksidan etkisi, yüksek oksijen konsantrasyonlarında daha belirgindir. En yüksek oksijen kısmi basıncına maruz kalan lipit yapılarında, örneğin eritrosit membranları ve solunum sistemi membranlarında yoğunlaşma eğilimindedir. Eritrositleri de hemolize karşı korur. Prematür bebeklerde eksikliğine bağlı hemolitik anemi gösterilmiştir. Antioksidan etki ile DNA hasarını ve maling değişimleri azaltır. Antioksidanların diyetle alınmasının birçok hastalığın riskinin azalmasıyla ilişkili olduğuna dair epidemiyolojik çalışmalardan, hayvan deneylerinden ve *in vitro* deneylerden elde edilmiş kanıtlar her geçen gün artmaktadır. E vitamini diğer yağda eriyen vitaminler kadar depolanamaz, bu sebeple gereğinden fazla alındığında birkaç gün içerisinde dışkı ve idrar yoluyla vücuttan atılır. Ancak yüksek dozlarda alındığında bulantı ve ishal yapabilir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada ağırlıkları 140-230 gram arasında değişen, 2 aylık erkek Wistar albino cinsi ratlar Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvan Laboratuvarları'ndan temin edilerek kullanılmıştır (n=30). Ratlar standart laboratuvar şartları olan 23 ± 2 ^{o}C sabit oda sıcaklığında, % 60 ± 5 nem oranında ve 12 saat gece, 12 saat gündüz şartlarında, standart yem (Yem Kurumu Standart Sıçan Yemi) ve su ile deneye başlanmadan önce 1 hafta süre ile beslendi. Daha sonra bu deneysel çalışma için ratlar randomize olarak iki adet yedili (kontrol grubu) ve iki adet sekizli (çalışma grubu) dört gruba ayrıldı.

3.2. Kullanılan İlaçlar

Vankomisin: Lilly İlaç Şirketi (Vancocin-CP flakon 0.5 g İstanbul, Türkiye)

N-asetilsistein: Bilim İlaç Şirketi (Asist ampul 300 mg/3ml)

E vitamini: Ersan İlaç Şirketi (Evigen ampul 300 mg/2ml)

Vankomisin steril distile suda çözüldükten sonra, NAS ve E vitamini direk enjektöre çekilerek intraperitoneal (ip) olarak uygulandı.

3.3. Hayvan Çalışmaları ve Uygulama Şemaları

Grup 1: (Tam kontrol): Steril apirojen serum fizyolojik günde iki kez ip olarak 7 gün uygulandı

Grup 2: (İlaçlı kontrol): Vankomisin 200 mg/kg günde iki kez ip olarak 7 gün süre ile uygulandı.

Grup 3: (NAS + Vankomisin): NAS 100 mg/kg vankomisin dozundan yarım saat önce ip olarak uygulandı.

Grup 4: (E vitamini + Vankomisin): E vitamini 150 mg/kg vankomisin dozundan yarım saat önce ip olarak uygulandı.

7 gün uygulanan enjeksiyonlar sonrasında ratlar iki gün dinlendirildi. Kesim öncesi, ratlar plastik zeminlere konularak, spontan idrar yapımı beklendi ve enjektör

aracılığı ile idrar örnekleri toplandı. Ketamin 50 mg/kg intramuskuler enjeksiyon ile anestezi uygulanmasının ardından yapılan kesimde, vena cava inferiordan kan örnekleri alındı. Her iki böbrek dokusu hızlıca eksize edilerek, yarısı ışık mikroskobunda rutin histopatolojik inceleme için formaldehit solusyonuna, diğer yarısı da dokuda MDA, CAT, SOD ve vankomisin düzeyi ölçümünde kullanılmak üzere serum fizyolojik içine kondu. Doku örnekleri 0.25 M sukroz içeren pH 7.3 olan 3 ml tris-HCl buffer içinde, kan örnekleri de kan üre azotu (BUN) ve kreatinin değerleri saptanmak üzere santrifüj edildikten sonra -80 °C' de saklandı

Böbrek dokusunun 1 gramı doku homojeneratöründe (IKA Ultra-Turrax T 25 Basic) pH 7.4' de fosfat buffer ile homojenize edildikten sonra, 2000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek supernatan plastik tüplere alınıp -80 °C' de ve idrar örnekleri 1500 devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatan analiz için +4 °C' de saklandı.

BUN, serum kreatinin ve idrar kreatinin değerleri standart spektrofotometrik ölçümler kullanarak (Otoanalizör, Abbott, Aeroset, IL, USA) Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda saptandı. İdrarda NAG aktivitesi 580 nm'de analiz edildi (62). NAG ekskresyonu üriner dilüsyon veya konsantrasyondan etkilenmemesi için üriner kreatinine oranlanarak değerlendirildi.

Vankomisinin böbrek kortikal akümülasyonu floresan immunoassay (1-877-4 ABBOTT; AxSYM system, USA) kullanılarak ölçüldü.

Böbrek dokusunda MDA düzeyleri spektrofotometrik olarak saptandı. Draper ve Hadley'in çift ısıtma metodu kullanıldı (63). Bu amaçla her 0.5 ml. homojenat içine 2.5 ml. 100 gL^{-1} trikloroasetik asit solusyonu eklenerek 15 dakika sıcak su banyosunda bekletildikten sonra soğutulup 1000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatanın 2 ml' si içine 6.7 gL^{-1} TBA solusyonundan 1 ml eklenerek 15 dakika su banyosunda bekletildi. Soğutulmasının ardından spektrofotometrik olarak (Shimadzu UV-1601, Japan) 532 nm. dalga boyunda ölçüm yapıldı. MDA konsantrasyonu MDA-TBA kompleksinin absorbans etkisi (absorbans etki = 1.56 x 10^5 $cm^{-1}M^{-1}$) kullanılarak hesaplandı ve böbrek dokusunun her gram proteini için nanomol olarak ifade edildi ($nmolg^{-1}$ protein).

Total SOD aktivitesi Sun ve arkadaşlarının (64) metoduna göre hesaplandı. Bu metod ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanır. Oluşan superoksit radikalleri NBT' yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm' de maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda bu indirgenme meydana gelip mavi-mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise NBT indirgenmesi olmayıp mavi-mor renk meydana gelmemekte ve enzim ve miktar aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır.

Enzimin % inhibisyonu = (Abskör – Absnum) / Abskör x 100

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

CAT aktivitesi Aebi'nin metoduna göre çalışıldı (65). H_2O_2 240 nm' de maksimum absorbans verir. Deney ortamına ilave edilen H_2O_2 CAT tarafından su ve oksijene parçalanmakta, bu ise kendini ultraviyole spektrumda absorbans azalması şeklinde göstermektedir. Absorbanstaki bu azalma CAT enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır. Fosfat tamponu (pH 7.50 mM), absorbansı 0.500 nm' ye tampon ile ayarlanmış olan H_2O_2'li fosfat tamponu (H_2O_2 çözeltisi) kullanılır. Fosfat tamponuna göre 240 nm dalga boyunda sıfırlanan köre karşı H_2O_2 çözeltisinin absorbansı 0.500'e ayarlanır. Numune ilavesi ile absorbans azalması her 15 saniyede bir defa olmak üzere 5 dakika süre ile kaydedilerek, 1 dakikalık lineer absorbans azalmasının değerleri esas alınarak hesaplama yapıldı. Aktivite düzeyleri k/g protein olarak ifade edildi.

$$k = \{[\ 2.3 \times \log (OD1/OD2)\ ] / \Delta t(sn)\}$$

$$k/mg\ protein = k / [(\ mg/mL\ protein) \times 1000]$$

3.4. Histopatolojik Değerlendirme

Işık mikroskobunda değerlendirme için böbrek dokusu %10 formaldehit içinde fikse edildikten sonra parafine gömüldü. Doku kesitleri 5µm inceliğinde alınarak hematoksilen-eosin ile boyandı. Her gruptan 5 kesit tedavi rejimlerinden habersiz, kör, olarak bir patolog tarafından değerlendirildi. Işık mikroskobu olarak Olympus BH-2 marka mikroskop kullanıldı. Dokular tubüler epitelyal değişiklikler

(dilatasyon, desquamayon, vakuolizasyon, nekroz, atrofi, silendir), interstisyel inflamatuar hücre infiltrasyonu, ödem ve glomerüler değişiklikler açısından değerlendirildi. Tüm histopatolojik parametreler Tablo 5' de görüldüğü gibi derecelendirildi.

Tablo 5: Histopatolojik değerlendirme

Histopatolojik bulgular	Derece
Değişiklik izlenmedi	-
Hafif dejeneratif değişiklikler, tek hücre nekrozu, az sayıda dilatasyon, silendir, inflamatuar infiltrasyon ve ödem	+
Orta derecede değişiklikler	++
Ciddi derecede etkilenme	+++

3.5. İstatiksel Analiz

İstatiksel analizler Statistical Package for Social Sciences 11.0 (SPSS 11.0) paket programı kullanılarak yapıldı. Değerler ortalama ± standart deviasyon olarak verildi. Biyokimyasal değişkenlerde gruplar arasında ki farklılıkları değerlendirmek için nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney kullanıldı. İstatiksel anlamlılık için $P<0.05$ olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma boyunca rat kaybı olmadı. Ratların çalışma başlangıcında vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında tüm gruplar benzer olarak ölçüldü. Çalışma bitiminde, kesimden hemen önce yapılan tartı kontrolünde ağırlık artışları yine benzerdi.

4.1. Biyokimyasal Sonuçlar

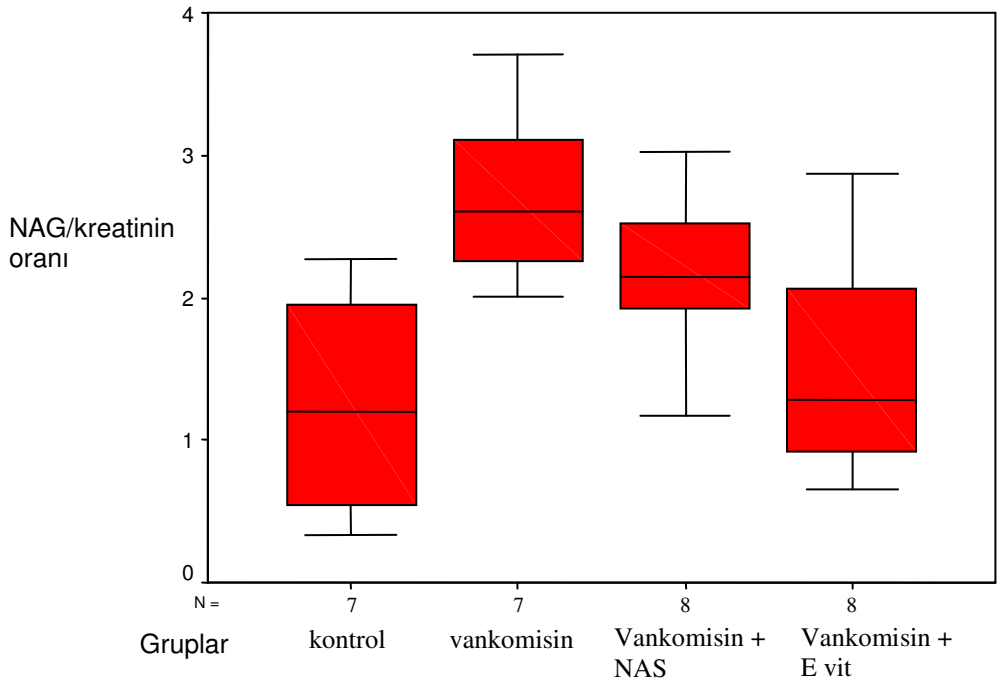
Böbrek dokusunda vankomisin düzeyleri tam kontrol grubu hariç tüm gruplarda yüksek olarak bulundu. Serum BUN ve kreatinin değerleri normal sınırlarda bulundu ve gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Böbrek MDA düzeyi ve idrar NAG aktivitesi vankomisin verilen ilaçlı kontrol grubunda serum fizyolojik uygulanan kontrol grubuna göre yüksek bulundu (Tablo 6, Grafik 1, sırasıyla $P<0.0001$, $P<0.05$). E vitamini verilmesi ile böbrek MDA ve idrar NAG düzeylerinde azalma saptandı (sırasıyla $P<0.0001$, $P<0.05$). NAS uygulanan grupta idrar NAG aktivite düzeyindeki azalma istatiksel olarak anlamlı bulunmazken ($P>0.05$), böbrek MDA düzeylerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı idi ($P<0.005$). Böbrek dokusunda SOD ve CAT aktiviteleri değerlendirildiğinde, vankomisin uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalma saptandı (sırasıyla $P<0.0001$, $P<0.005$). E vitamini ve NAS uygulaması ile SOD aktivitesi anlamlı olarak artarken ($P<0.0001$), katalaz aktivitesinde anlamlı düzeyde artış saptanmadı (Tablo 6, $P>0.05$).

Tablo 6: Serum fizyolojik veya vankomisin alan, vankomisin ile birlikte E vitamini veya NAS alan ratlarda böbrek dokusunda vankomisin düzeyleri, oksidatif ve biyokimyasal parametrelerdeki değişiklikler

	Kontrol	Vankomisin	Vankomisin + NAS	Vankomisin + E vitamini
SOD (U/g protein)	70.1±3.6	52.7±3.9[a]	78.4±5.5[c]	67.3±4.3[c]
CAT (k/g protein)	1.19±0.12	1.02±0.10[b]	0.92±0.08	1.11±0.12
MDA (nmol/g protein)	3.49±0.26	4.34±0.31[a]	3.74±0.33[c]	3.90±0.29[d]
BUN (mg/dL)	1.87±1.8	21.1±1.5	28.6±5.5	27.4±5.4
Kreatinin (mg/dL)	0.43±3.1	0.41±1.8	0.82±0.21	0.69±0.22
Vankomisin (μg/g)	0.39±0.38	128±2.7[a]	124±3.8[a]	120±2.6[a]
NAG/kreatinin	1.25±0.80	2.7±0.67[b]	2.1±0.61	1.5±0.77[e]

kontrol grubu ile karşılaştırıldığında [a]: $P<0.0001$, [b]: $P<0.005$
vankomisin grubu ile karşılaştırıldığında [c]: $P<0.0001$, [d]: $P<0.005$, [e]: $P<0.05$

Grafik 1: Gruplar arası NAG/kreatinin oranları

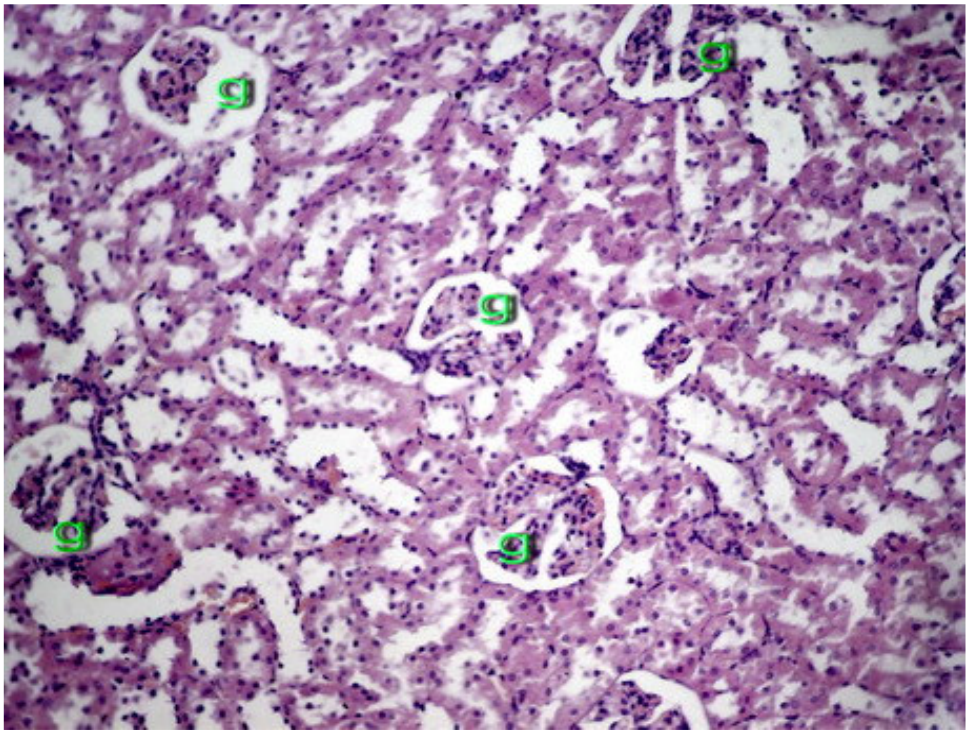


4.2. Histopatolojik Değerlendirme

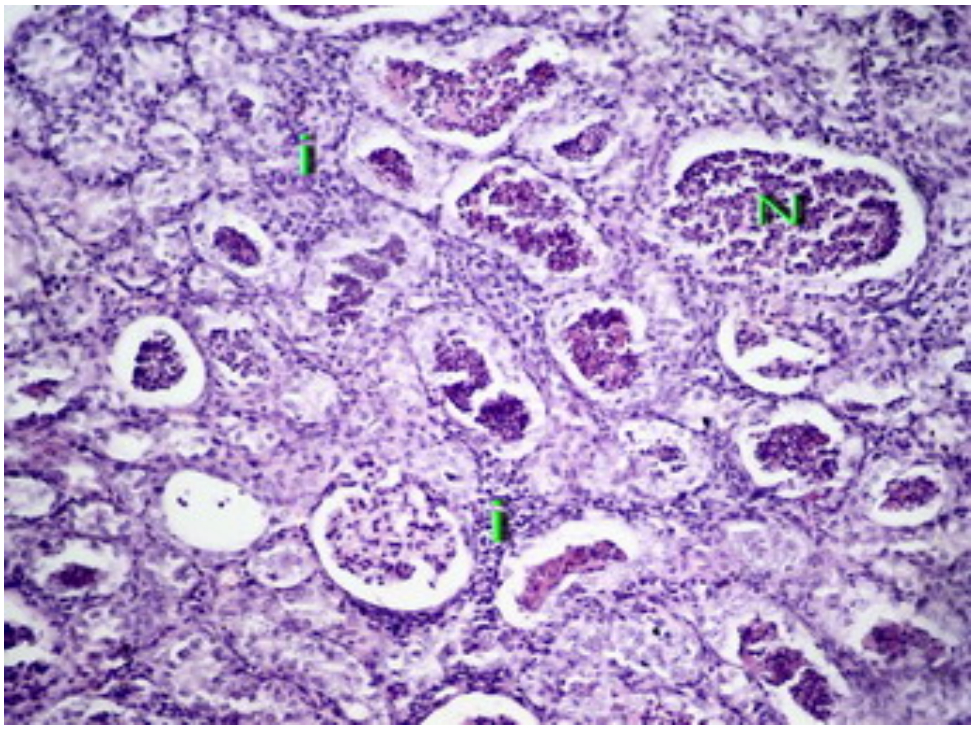
Tam kontrol grubu olarak alınan ve serum fizyolojik uygulanan ratlara ait böbrek doku kesitlerinin histolojik incelemesinde, bu organa ait histolojik yapılar dışında bir bulgu saptanmadı (Resim1). Vankomisin uygulanan ilaçlı kontrol grubunda belirgin yapısal değişiklikler, tubüler epitelyal nekroz, dejenerasyon, vakuolizasyon, atrofi ve interstisyel hücre infiltrasyonu, ödem izlendi (Resim 2). E vitamini uygulaması ile histopatolojik değişikliklerin belirgin azaldığı gözlenirken (Resim 3), NAS uygulamasında düzelmenin daha az olduğu izlendi (Resim 4). Histopatolojik değişiklikler Tablo 8'de özetlenmektedir.

Tablo 8: Histopatolojik değişiklikler

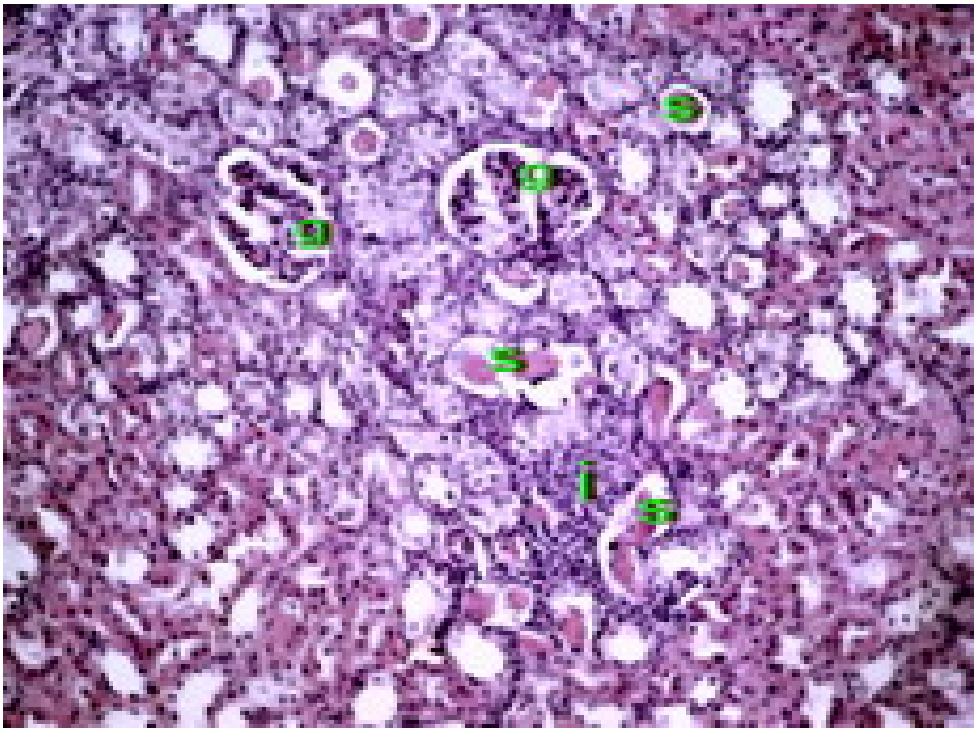
Histopatolojik parametreler	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
Tubüler nekroz	-	+	+	-
Tubüler dilatasyon	-	++	+	+
Tubüler epitelyal desquamasyon	-	+	+	-
Tubüler vakuolizasyon	-	++	+	+
Tubüler atrofi	-	+	+	-
Tubüler silendir	-	+	+	+
İnterstisyel inflamasyon	-	++	+	-
İnterstisyel ödem	-	++	+	-



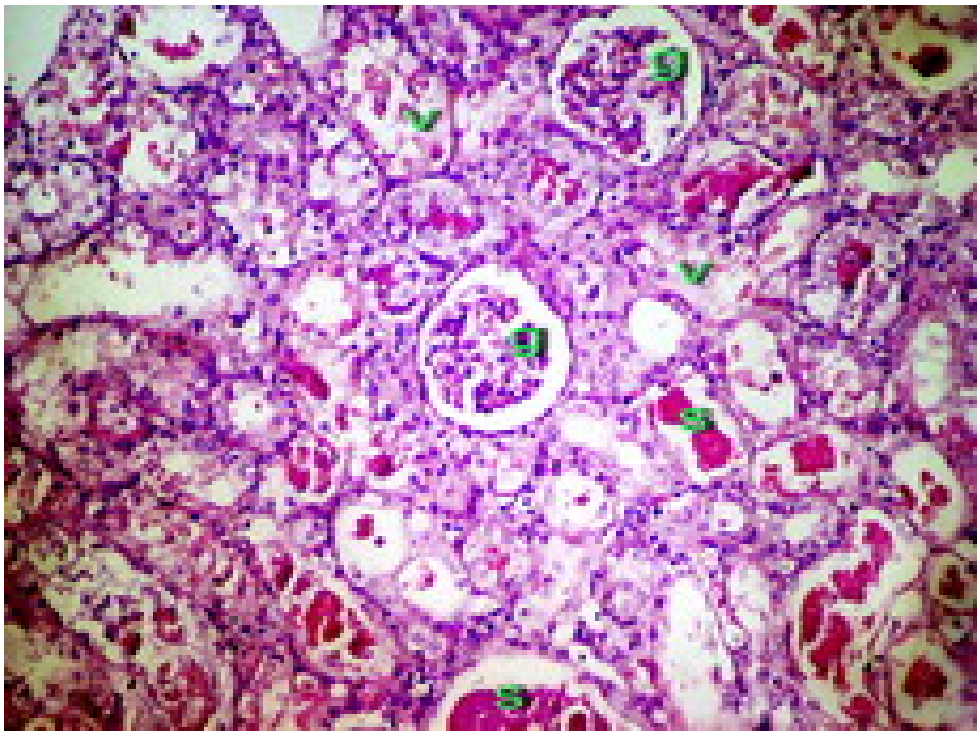
Resim1(Kontrol): Böbrek normal görünümde (HE, 40X).
g: glomerül



Resim 2 (Vankomisin): İnterstisyel alanda yoğun iltihabi hücre infiltrasyonu ve tübüler nekroz görülmekte (HE, 40X).
N: Dilate tübüllerde nekrotik hücre kümeleri, i: İnterstisyel inflamasyon



Resim 3 (Vankomisin + NAS): Tübüllerde hafif dilatasyon, çok sayıda hyalinize silendirler, interstisyumda fokal alanda inflamasyon ve normal yapıda glomerüller görülmekte (HE, 40X).
i: İnterstisyel inflamasyon, s: Silendir, g: Glomerül



Resim 4 (Vankomisin + E vitamini): Tübüllerde minimal dilatasyon, proksimal tübüllerde vakuolizasyon, silendir yapıları ve normal yapıda glomerüller görülmekte. İnterstisyel alanda inflamasyon ise yok (HE, 40X).
v: Vakuolar dejenerasyon, s: Silendir, g: Glomerül

5. TARTIŞMA

Günümüzde çeşitli antibiyotiklerin toplumda tüketiminin giderek artması, gıda endüstrisinde antibiyotik kullanımı, immün sistemi bozulmuş hastaların ve yoğun bakım ünitelerinin sayısının artması gibi nedenlerle mikroorganizmalardaki antibiyotik direnci giderek artmaktadır. Beta-laktam antibiyotiklere dirençli stafilokoklar ve enterokoklardaki artış nedeniyle bir glikopeptid antibiyotik olan vankomisin, klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Vankomisinin klinik kullanımı nefrotoksisitesi nedeni ile sınırlanmaktadır. Fakat vankomisine bağlı böbrek hasarının mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir. Biz bu deneysel çalışmada, vankomisine bağlı gelişen nefrotoksisitede oksidatif tubüler hasarın rolünü belirlemeyi ve antioksidan etkileri bilinen NAS ve E vitamininin vankomisin ile birlikte kullanımının histolojik ve biyokimyasal düzeylerdeki etkilerini saptamayı planladık. Bu amaçla, biyokimyasal ve oksidatif parametreleri (BUN ve kreatinin, MDA, SOD, CAT), proksimal tubüler hasar ölçümünde sıklıkla kullanılan üriner NAG ekskresyonunu ve histopatolojik etkilerini göstermek için ışık mikroskobunda böbrek morfolojisini değerlendirdik.

Toksik, iskemik ve immün aracılı böbrek doku hasarlarında sorumlu mekanizma olarak giderek artan oranlarda serbest oksijen radikalleri suçlanmaktadır. Vankomisin toksisitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada oksidatif strese bağlı böbrek doku hasarının, sorumlu patogenetik mekanizma olabileceği belirtilmektedir (14). Sisplatin ve aminoglikozitler gibi çeşitli ilaçların kullanımı ile oluşturulan böbrek hasar modellerinde serbest oksijen radikallerinin hücre ölümüne neden olabileceği gösterilmiştir (7-13). Vankomisin selüler ATP konsantrasyonlarını arttırır ve oksijen tüketimini stimüle eder. Böylece oksidatif fosforilasyonu arttırır ve serbest radikal üretimini destekler (4). Vankomisin kullanımı ile oluşan serbest radikal hasarı direk veya indirek olabilir (14). Serbest oksijen radikalleri hücrelerde lipid peroksidasyonunu indükler ve oksidatif dejenerasyon sırasında lipid peroksidasyonunun bir indikatörü olarak tanımlanan MDA oluşur (66-68). Park ve arkadaşları (68) yaptıkları bir çalışmada doksorobisin kullanımı ile ortaya çıkan nefrotoksisitede NAS ve selenyumun koruyucu etkilerini araştırmış, böbrek MDA düzeylerinde anlamlı derecede azalma saptandığını ve histopatolojik değişikliklerin

gelişiminin engellendiğini göstermişlerdir. Yaptığımız bu çalışmada da lipid peroksidasyonu, hücre membran komponentlerinin serbest radikal hasarı sonucu ortaya çıkan MDA ölçümü ile monitorize edilmiştir (68). Sadece vankomisin uygulanan ratların böbrek dokularında MDA konsantrasyonlarının anlamlı olarak yükseldiği saptanmıştır. E vitamini ve NAS uygulamaları ile böbrek dokusunda MDA düzeylerindeki artışın anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir. Bu azalma muhtemelen serbest oksijen radikalleri için eliminasyon kapasitesini arttırıcı etkisine bağlı olabilir. Çalışmamızda gösterildiği üzere, vankomisin alımı ile böbrek MDA düzeyinin artması ve iki önemli antioksidan madde alımı ile böbrek MDA'sında azalma olması, vankomisin nefrotoksisitesinden sorumlu mekanizmalardan birinin oksidatif strese bağlı doku hasarı olduğunu güçlü bir şekilde destekler.

Geniş fırçamsı kenar ve bazal kanalları olan proksimal tubül epiteli vankomisini de içeren birçok maddenin reabsorbsiyonunda major bölgedir (24, 69). Proksimal tubül epitelindeki filtrasyon ve enerji bağımlı transport mekanizmaları, böbrek dokusunu toksik maddeler ile indüklenen hasara karşı duyarlı hale getirir (69). Çeşitli moleküller böbrek proksimal tubül hücrelerindeki selüler fonksiyon ve transport mekanizmalarını bozarak böbreklerde disfonksiyona neden olabilirler. Vankomisin nefrotoksisitesi üzerine çalışmalar, ilacın böbrek tubüler hücrelerden ekskresyonu üzerine yoğunlaşmıştır. Vankomisin uygulandıktan sonra, kandaki düzeyi giderek azalmakta ve proksimal tubüler epitelde yoğunlaşmaktadır. Bundan dolayı vankomisine bağlı gelişen nefrotoksisite, proksimal tubül hücrelerinde ve çevresinde olabilir (7, 14). Hayvan modellerinde vankomisin uygulanmasının ardından, proksimal tubül hücrelerinin üriner ekskresyonda artış gösterilmiştir (70, 71). Vankomisinin proksimal tubül hücreleri içinde yoğun bir şekilde konsantre olmaları nefrotoksisitesi ile ilişkilidir (4). Üriner NAG ekskresyonunda artış, böbrek proksimal tubül hücre hasarını gösteren en duyarlı parametrelerden biridir (72). Yapılan bir çalışmada üriner NAG aktivitesinin glikopeptid antibiyotikler ile indüklenen nefroksisitede de duyarlı bir indikatör olduğu bildirilmiştir (30). Bu çalışmada biz vankomisin uygulanan ratlarda NAG ekskresyonunda belirgin artış olduğunu bulduk. Üriner NAG ekskresyonunundaki bu artış, vankomisine bağlı böbrek tubüler hücre hasarını göstermektedir. Yaptığımız çalışmada her ne kadar glomerüler fonksiyon göstergeleri olan serum BUN ve kreatinin düzeyleri normal

olsa da, üriner NAG aktivitesi yüksek olarak saptanmış olması vankomisinin böbrek proksimal tubüler hücrelerde zararlı etki oluşturabileceğini gösterir. Ayrıca hem üriner NAG ekskresyonunda ve hem de böbrek MDA düzeylerindeki birlikte artış, vankomisine bağlı proksimal tubüler hücre hasarının oksidadif stres ile ilişkili olabileceğine de işaret edebilir. Keza güçlü bir antioksidan ilaç olarak bilinen E vitamini uygulamaları ile üriner NAG ekskresyonunda ve böbrek MDA düzeylerinde azalma olması, vankomisin nefrotoksisitesinden oksidatif hasarın sorumlu olduğu hipotezini desteklediği gibi, E vitamininin vankomisin nefrotoksisitesinde oluşan tubülointerstisyel hasarda olumlu etkisi olabileceğine de işaret etmektedir. NAS uygulanması sonu böbrek MDA düzeyleri normale yaklaşırken, üriner NAG aktivitesinde azalmanın istatiksel düzeyde olmaması, NAS' in böbrek tubüler düzeydeki oksidatif hasar üzerine daha az etkili olabileceğini düşündürür. Keza histopatolojik incelemede NAS' in olumlu etkileri E vitamini kadar olamamıştır. NAS alımının böbrek MDA üzerine yaptığı olumlu etkiye rağmen, üriner NAG aktivitesinin normalleşmemesi ve histopatolojik düzelmenin sınırlı kalmasının nedeni bilinmemektedir.

Vankomisine bağlı gelişen böbrek hasarı ile antioksidan enzimler üzerine literatürde çok sayıda çalışma yoktur. Çelik ve arkadaşları (5) vankomisin ile indüklenen nefrotoksisite üzerine, çeşitli antioksidanların etkilerini araştırdıkları çalışmada, alfa-lipoik asit, gingko biloba ürünü, melatonin ve amrinon uygulamalarının, serbest oksijen radikal inhibisyonu ile ilişkilendirdikleri nefrotoksisite üzerine, koruyucu etkilerini göstermişlerdir. Yaptığımız bu çalışmada, vankomisin uygulanan ratlarda böbrek dokusunda antioksidan enzim düzeyleri SOD ve CAT aktivitelerinde azalma, oksidatif stres göstergesi olarak saptanmıştır. Vankomisin uygulanan ratlarda böbrek korteksindeki serbest radikaller, SOD ve CAT inaktivasyonunu ve tüketimini indükleyebilirler. Ayrıca peroksinitrit anyonlarının SOD aktivitesini bozduğu ve oksijenin CAT'ı inaktive ettiği bilinmektedir. Inoue ve arkadaşları (69) artmış oksidatif stresi önlemek için proksimal tubüler hücrelerde SOD ve CAT enzimleri ve mRNA düzeylerinin artmış olduğunu göstermişlerdir. Literatürde vankomisin dışı ilaçlara bağlı gelişen nefrotoksisitenin engellenmesi ve böylece ilaçların kullanılabilirliğinin arttırılmasına yönelik çalışmalar yer almaktadır. Özellikle aminoglikozitlere bağlı nefroksisitede

oksidatif hasarın rolü araştırılarak, kullanılan çeşitli antioksidanlarla bu olumsuz etkiler önlenmeye çalışılmaktadır. Aminoglikozitlerin ve vankomisinin benzer patogenetik mekanizmalarla nefrotoksik etki gösterdiği belirtilmektedir (7). Parlakpınar ve arkadaşları (9) yaptıkları bir çalışmada, gentamisin uygulaması ile böbrek MDA düzeylerinde artış, CAT, SOD ve glutatyon peroksidaz düzeylerinde azalma saptamışlar, antioksidan özelliği olan chelerythrine uygulamasının ardından bu olumsuz etkilerin azaldığı hem biyokimyasal hem de histolojik olarak göstermişlerdir. Gentamisin nefrotoksisitesine yönelik yapılan başka bir çalışmada, oksidatif hasarın melatonin uygulaması ile azaldığı saptanmış ve melatoninin koruyucu etkisi süperoksit anyon radikallerini inhibe etmesi ile ilişkilendirilmiştir (73). Yine Parlakpınar ve arkadaşlarının (74) amikasin ile indüklenen böbrek hasarına karşı melatonin koruyucu etkisi üzerine yaptıkları çalışmada, bir pineal sekretuar ürün olan melatoninin çeşitli antioksidan enzim düzeylerini arttırdığı ve lipid peroksidasyonunu azalttığı desteklenmektedir. Kadkhodaec ve arkadaşları (15), gentamisin ile indüklenen böbrek hasarında, vitamin E tedavisi ile glomerüler filtrasyon hızı ve glutatyon düzeylerinde azalmanın engellendiğini göstermişlerdir.

Antioksidan özellikleri bilinen NAS ve E vitaminin, böbreklerdeki oksidatif hasar üzerine etkilerini araştıran deneysel çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada adriamisin ile indüklenen rat böbreklerindeki oksidatif hasarda, NAS ve E vitamini uygulamaları ile lipid peroksidasyonu azalttığı ve nekrozdan koruduğu belirtilmiştir (16). Deneysel olarak indüklenen endotoksemik ratlarda, vitamin E'nin böbrek doku hasarına karşı koruyucu etkilerinin değerlendirildiği başka bir çalışmada, lipid peroksidasyonunu azalttığı ve antioksidan enzim aktivitesininde artış saptanarak klinikte kullanılabilirliğinden sözedilmektedir (17). Bizim yaptığımız bu çalışmada NAS ve E vitamini uygulamaları ile antioksidan enzimlerden SOD düzeyinde istatiksel olarak anlamlı artış sağlanmıştır. Her iki ilacın enzim aktivite artışı üzerindeki inhibitör etki mekanizması net olmasa da SOD aktivite düzeyindeki artış serbest radikal yakalama ve antioksidan aktivitesine bağlı olabilir. Aynı zamanda NAS ve E vitamini direk olarak vankomisin nefrotoksisitesi sırasında ROS için genel bir radikal uzaklaştırıcı olarak etki gösterebilir. NAS ve E vitaminin koruyucu etkileri rat böbreklerinde tubüler hücrelerin lipid peroksidayonunu azaltıcı etkisine de bağlı olabilir. Böylece bu çalışma NAS ve E vitamini uygulmalarının

vankomisin ile indüklenen nefrotoksisiteyi inhibe ettiğini ve bu mekanizmanın patogenezinde süperoksit radikalerinin rol aldığını desteklemektedir.

Vitamin E ve NAS uygulamasının oksidatif hasar ilişkili böbrek hasarında faydalı etkiler gösterdiği farklı toksik ve ilaç çalışmalarında gösterilmiştir. Bu çalışmalardan birinde, vitamin E ve selenyum uygulamasının sisplatin ile indüklenen böbrek dokusundaki oksidatif hasarı engellediği, klinikte bu ilaca bağlı nefropati gelişimine karşı koruyucu olabileceği belirtilmektedir (18). Beytut ve arkadaşları (75) yaptıkları bir çalışmada ise yüksek doz glukokortikoid ile tedavi edilen rat böbreklerinde E vitamini ve selenyum desteği ile antioksidan defans mekanizmaları üzerine etkileri değerlendirdiklerinde, böbrek hasarına karşı koruyucu olduğunu saptamışlardır. Çevresel toksinlerden krom ve kadmiyum ile yapılan iki ayrı çalışmada yine E vitaminin oksidatif hasara karşı renoprotektif etkilerinden bahsedilmektedir (76, 77).

Antioksidan olarak hücre içinde glutatyon üretimini arttırarak glutatyon stoklarını doldurduğu, SOD aktivitesini arttırdığı, hidroksil radikallerini azalttığı ve lipid peroksidasyonunu engellediği bilinen NAS, bu olumlu etkileri nedeni ile literatürde son zamanlarda sıklıkla oksidatif hasardaki koruyucu etkileri açısından araştırılmaktadır (78-81). Massola ve arkadaşları yaptıkları ilaç dışı bir çalışmada kronik böbrek yetmezliğinde NAS'ın lipid peroksidasyononu azalttığı, böbrek fonksiyonları, proteinüri, glomeruloskleroz ve kan basıncı üzerine de olumlu etkilerini göstermişlerdir (82). Ratlarda yapılan başka bir çalışmada gliserol ile indüklenen akut böbrek yetmezliğinde NAS uygulaması ile antioksidan aktivitede düzelme sağlandığı ve bu formda gelişen Akut böbrek yetmezliği tedavisindeki rolü desteklenmektedir (83). Lityum, arsenik, kadmiyum ve kurşun gibi çevresel toksinlerle yapılan çalışmalarda da yine NAS'ın oksidatif hasardaki renoprotektif etkilerinden sözedilmektedir (84-88). Böbreklerde oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarında da potent bir antioksidan olan NAS'ın arjinaz aktivitesini ve ornitin düzeylerini arttırdığı, nitrik oksit üretimini azalttığı ve böbrek, karaciğer dokularında koruyucu etki gösterdiği bildirilmektedir (21). Deneysel olarak Akut böbrek yetmezliği oluşturulan ratlarla yapılan başka bir çalışmada ise NAS'ın serbest oksijen radikali oluşumunu engelleyerek koryucu etki göstermesinin yanında kan basıncı, total böbrek kan akımı, selektif bölgesel kortikal ve medüler kan akımı

monitorizasyonu ile mikrosirkülasyonu düzenleyerek de yararlı etki gösterdiği belirtilmektedir (89).

Vankomisine bağlı gelişen nefrotoksisite üzerine yapılan az sayıda çalışmada, histopatolojik etkiler değerlendirilmiştir. Hodoshima ve arkadaşları (6) yaptıkları bir çalışmada, vankomisin uygulamasının ardından histopatolojik olarak tubüler dilatasyon, hücre dejenerasyonu ve nekrozu göstermişlerdir. Nishino ve arkadaşları (14) yaptıkları bir çalışmada vankomisin ile birlikte bir antioksidan olan hekzametilendiamin ile konjuge SOD uygulaması ile BUN, kreatinin düzeyleri ve histopatolojik bulgularla olumlu etkileri göstermişlerdir. Mazzon ve arkadaşları (90) gentamisin ve NAS ile yaptıkları ilaç toksisistesine yönelik başka bir çalışmada, gentamisin ile oluşturulan böbrek hasarında NAS uygulaması ile tubüler nekroz gelişiminin azaldığını göstermişlerdir. Bu çalışmada vankomisin grubunda interstisyel ödem, tubüler epitelyal atrofi, tubüler epitelyal hücre vakuolizasyonu ve deskuamasyonu açık morfolojik değişiklikler olarak izlendi. Bu bulgular vankomisin uygulamasının kortikal tubüler hücrelerin ağır dejenerasyonuna neden olduğunu göstermektedir. Bu aynı zamanda vankomisinin yüksek oranda böbrekler tarafından ve temel olarak da proksimal tubüler seviyede tutulumu ile açıklanabilir. Tubüler hasar direk toksik etki göstergesi olan artmış üriner NAG ekskresyonu ile de konfirme edilebilir. Bu değişikliklerin vankomisin ile birlikte E vitamini uygulanan ratlarda belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir. Örneğin bu ratlarda dejenerasyon ve tubüler atrofi hafif düzeyde gözlenmektedir. NAS uygulaması ile histopatolojik olarak iyileşme saptansa da E vitamini uygulanan grup kadar belirgin düzelmeler saptanamamıştır. Bu E vitaminin daha potent bir antioksidan olması ile ilişkilendirilebilir. Bizim bulgularımıza göre vankomisine bağlı gelişen oksidatif hasarı destekleyen MDA düzeyinde ki artış, SOD ve üriner NAG aktivite düzeylerinde ki azalmaya paralel olarak histopatolojik bulgular, renal oksidatif hasarı desteklemektedir.

Sonuç olarak vankomisin nefrotoksisitesi patogenezinden sorumlu önemli mekanizmalardan biri, böbrek MDA ve üriner NAG aktivitesindeki artış ile ilişkili olarak, oksidatif strese bağlı gelişen tubülointerstisyel hasardır. Bu sonuç diğer antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ve histopatolojik bulgular ile desteklenmektedir. NAS ve E vitamini gibi antioksidan maddeler vankomisine bağlı gelişen nefrotoksisitenin ve oksidatif hasarın azaltılmasında rol oynayabilir.

ÖZET

Ratlarda vankomisin ile indüklenen renal hasara karşı N-asetilsistein ve E vitamininin koruyucu etkileri

Ciddi MRSA infeksiyonlarında tercih edilen antimikrobiyal ajan genellikle vankomisindir. Ancak klinik kullanımı nefrotoksisitesi nedeni ile sınırlanmaktadır. Vankomisinin böbrek hasar mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Deneysel çalışmalar serbest oksijen radikallerinin toksisitede rol oynadığını ve çeşitli antioksidan maddelerin renal etkilenmeyi önleyebileceğini ileri sürmektedir. Bu çalışmada vankomisin nefrotoksisitesinde oksidatif tubüler hasarın rolünün belirlenmesi ve antioksidanların kullanımı ile histopatolojik ve biyokimyasal etkilerin saptanması amaçlanmıştır.

Çalışmada 30 adet, 2 aylık erkek Wistar Albino cinsi ratlar kullanıldı ve randomize olarak iki adet yedili (kontrol grubu), iki adet sekizli (çalışma grubu) dört gruba ayrıldı. Tam kontrol grubuna steril apirojen serum fizyolojik, ilaçlı kontrol grubuna ise vankomisin 200 mg/kg, üçüncü gruba vankomisin dozundan yarım saat önce 100mg/kg NAS, dördüncü gruba ise vankomisin dozundan yarım saat önce 150 mg/kg E vitamini günde iki kez intraperitoneal olarak 7 gün süre ile uygulandı. Enjeksiyonların bitiminden iki gün sonra anestezi uygulanarak kesim yapıldı. Kesim öncesi plastik zeminde toplanan idrar örneklerinden NAG ve kreatinin, kesim sırasında vena cava inferiordan alınan kan örneklerinden BUN ve kreatinin, böbrek dokularında SOD ve CAT enzim aktiviteleri ile MDA ve vankomisin düzeyleri saptandı. Ayrıca böbrek dokusunun histopatolojik incelemesi yapıldı.

Serum BUN ve kreatinin değerleri normal sınırlarda bulundu ve gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı. MDA ve idrar NAG düzeyi sadece vankomisin verilen ilaçlı kontrol grubu ile serum fizyolojik uygulanan tam kontrol grubunda anlamlı olarak yüksek bulundu. E vitamini ve NAS uygulamaları ile böbrek MDA ve idrar NAG düzeylerinde azalma saptandı. Bu azalma NAS alan grupta idrar NAG aktivitesinde istatiksel olarak anlamlı bulunmadı. Böbrek dokusunda SOD ve katalaz aktiviteleri değerlendirildiğinde, vankomisin uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalma saptandı. E vitamini ve NAS uygulaması ile SOD aktivitesi

anlamlı olarak artarken, katalaz aktivitesinde anlamlı artış saptanmadı. Böbrek dokusunda vankomisin düzeyleri, tam kontrol grubu hariç tüm gruplarda yüksek olarak bulundu. Vankomisin uygulanan ilaçlı kontrol grubunda belirgin yapısal değişiklikler, tubüler epitelyal nekroz, dejenerasyon, vakuolizasyon, atrofi ve interstisyel hücre infiltrasyonu ve ödem izlendi. E vitamini uygulaması ile belirgin histopatolojik değişikliklerin azaldığı gözlenirken, NAS uygulaması ile düzelmenin daha az olduğu izlendi

Sonuç olarak vankomisin nefrotoksisitesinden sorumlu önemli mekanizmalardan biri oksidatif strese bağlı gelişen tubülointerstisyel hasardır. Bu sonuç biyokimyasal ve renal histopatolojik bulgular ile desteklenmiştir. NAS ve E vitamini gibi antioksidan maddeler vankomisine bağlı gelişen nefrotoksisitenin azaltılmasında rol oynayabilir.

Anahtar sözcükler: Vankomisin, N-asetilsistein, E vitamini, oksidatif hasar

SUMMARY

Protective Effects of N-acetyl Cysteine and Vitamin E for Vancomycine Induced Nephrotoxicity in Rats

Vancomycin is the treatment choice at severe MRSA infections. Clinical usage is restricted because of nephrotoxicity. Mechanism of vancomycine caused renal dysfunction is not well known. Experimental studies had suggested that free oxygen radicals play role at toxicity and might be prevented with several antioxidants. We aimed to investigate the effects of N-acetyl cysteine and vitamin E on the renal toxicity of vancomycine.

We had taken 30 Wistar Albino rats those are eight week old and groupped into four as two control goups each consistig seven rats and two study groups each consisting eight rats. Intraperitoneal serum pyhsiological was administered to placebo controls and 200 mg/kg vancomycine to control group. N-acetyl cysteine of 100 mg/kg was given intraperitoneally to third group before 30 minutes from the administration of vancomycine twice daily and 150 mg/kg vitamine E to the fourth group in the same way for seven days. After two days from the injections finished rats were cut down after anesthesia. Urine was collected from the plastic floor before the surgical procedure for NAG and creatinine levels. Blood were collected from inferior vena cava for BUN and creatinine levels during the surgical procedure. Histopathological evaluation and tissue SOD, catalase, MDA, vancomycine levels were studied from the kidneys.

Serum BUN and creatinine levels were in normal ranges and there were no difference between groups. MDA and NAG levels were higher in control group that was vancomycine administered and placebo controls. MDA and urinary NAG activity levels were decreased with the administration of vitamin E and N-acetyl cysteine. But there were statistically significant difference only in N-acetyl cysteine group. Catalase and SOD activity levels were decreased in renal tissue of vancomycine treated control group when compared with placebo controls. SOD activity levels were increased with vitamin E administration while catalase levels were not changed. SOD and catalase levels were also not changed in N-acetyl

cysteine group. Tissue vancomycine levels were elevated at all groups other than the placebo controls. Clear histomorphological changes were seen as tubular epithelial necrosis, degeneration, vacuolisation, atrophy, interstitial cell infiltration and edema at only vancomycine treated group. Histopathological changes were decreased with vitamin E administration but not clearly with N-acetyl cysteine.

In conclusion; one of the important mechanisms of vancomycine nephrotoxicity is tubulointerstitial injury related to oxidative stress. This finding was supported with biochemical and renal histopathological evidences. Antioxidant agents such as Vitamine E and N-acetyl cysteine, may be useful for decreasing nephrotoxicity caused by vancomycine.

Key Words: Vancomycine, N- acetyl cysteine, Vitamine E, oxidative injury

KAYNAKLAR

1. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 293-311, 2003.

2. Iwamoto T, Kagawa Y, Kojima M.Clinical efficacy of therapeutic drug monitoring in patients receiving vancomyin. Biol. Pharm. Bull.;26(6):876-879, 2003.

3. Toyoguchi T, Takahashi S, Hosoya J, Nakagawa Y, Watanabe H. Nephrotoxicity of vancomycin and drug interaction study with cilastatin in rabbits. Antimicrobial Agents and Chemotherapy Sept;41(9):1985-1990, 1997.

4. King DW, Smith MA. Proliferative responses observed following vancomycin treatment in renal proximal tubüle epithelial cells. Toxicol In Vitro. Dec;18(6):797-803, 2004.

5. Çelik I, Cihangiroğlu M, Ilhan N, Akpolat N, Akbulut HH. Protective effects of different antioxidants and amrinone on vancomycin-induced nephrotoxicity. Basic Clinical Pharmocology Toxicology Nov;97(5):325-332, 2005.

6. Hodoshima N, Nakano Y, Izumi M, Miromi N, Nakamura Y, Aoki M, Gyobu A, Shibasaki S, Kurosawa T. Protective effect of inactive ingredients against nephrotoxicity of vancomycin hydrochloride in rats. Drug Metab. Pharmacokin. Feb;19(1):68-75, 2004.

7. Rybak MJ, Frankowski JJ, Edwards DJ, Albrecht LM. Alanine aminopeptidase and β2-microglobulin excretion in patients receiving vancomycin and gentamicin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy Oct;31(10):1461-1464, 1987.

8. Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Di Paola R, Britti D, De Sarro A, Pierpaoli S, Caputi A, Masini E, Salvemini D. A role for superoxide in gentamicin –mediated nephropathy in rats. Eur. J. Pharmacol. Aug;450(1):67-76, 2002.

9. Parlakpınar H, Taşdemir S, Polat A, Bay-Karabulut A, Vardı N, Uçar M, Acet A. Protective role of caffeic acid phenethyl ester (cape) on gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. Toxicology Feb 14;207(2):169-177, 2005.

10. Özen S, Akyol O, Iraz M, Söğüt S, Özügürlü F, Özyurt H, Odacı E, Yıldırım Z. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. J. Appl. Toxicol.Jan-Feb;24(1):27-35, 2004.

11. Maldonado PD, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Pedraza-Chaverri J. Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. Free Radical Biology Medicine Aug;35(3):317-324, 2003.

12. Parlakpınar H, Taşdemir S, Polat A, Bay-Karabulut A, Vardı N, Uçar M, Yanılmaz M, Kavaklı A, Acet A. Protective effect of chelerythrine on gentamicin-induced nephrotoxicity. Cell Biochem Funct. Jan-Feb;24(1):41-8,2006.

13. Yanagida C, Ito K, Komiya I, Horie T. Protective effect of fosfomycin on gentamicin-induced lipid peroxidation of rat renal tissue. Chemico-Biological Interactions July 20;148(3):139-147, 2004.

14. Nishino Y, Takemura S, Minamiyama Y, Hirohashi K, Ogino T, Inoue M, Okada S, Kinoshita H. Targeting superoxide dismutase to renal proximal tubüle cells attenuates vancomycin-induced nephrotoxicity in rats. Free Radical Research Apr;37(4):373-379, 2003.

15. Kadkhodaec M, Khastar H, Faghihi M, Ghaznavi R, Zahmatkesh M. Effects of co-supplementation of vitamins E and C on gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. Exp Physiol. Jul;90(4):571-6, 2005.

16. Kalaiselvi P, Pragasam V, Chinnikrishnan S, Veena CK, Sundarapandivan R, Varalakshmi P. Counteracting adriamycin-induced oxidative stress by administration of N-acetylcysteine and vitamin E. Clin Chem Lab Med.;43(8):834-40, 2005.

17. Coşkun O, Armutçu F, Kanter M, Kuzey GM. Protection of endotoxin-induced oxidative renal tissue damage of rats by vitamin E or/and EGb 761 treatment. J Appl Toxicol. Jan-Feb;25(1):8-12, 2005.

18. Naziroğlu M, Karaoğlu A, Aksoy AO. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. Toxicology Feb; 195(2-3):221-30, 2004.

19. Sehirli AO, Sener G, Satıroğlu H, Ayanoğlu-Dülger G. Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. J Nephrol. Jan-Feb;16(1):75-80, 2003.

20. Dobashi K, Singh I, Orak JK, Asayama K, Singh AK. Combination therapy of N-acetylcysteine, sodium nitroprusside and phosphoramidon attenuates ischemia-reperfusion injury in rat kidney. Mol Cell Biochem. Nov;240(1-2):9-17, 2002.

21. Erbaş H, Aydoğdu N, Kaymak K. Effects of N-acetylcysteine on arginase, ornithine and nitric oxide in renal ischemia-reperfusion injury. Pharmacol Res. Nov;50(5):523-7, 2004.

22. Mandell GL, Benett JE, Mandell RD. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Sixth Edition, Volume 1,USA, 417-423, 2005.

23. Murray PR, Pfaller MA, Jorgensen JH, Yolken RH. Manuel of Clinical Microbiology 8th Edition Volume I, USA, 1053-1054, 2003.

24. Beauchamp D, Pellerin M, Gourde P, Pettigrew M, Bergeron MG. Effects of daptomycin and vancomycin on tobramycin nephrotoxicity in rats. Antimicrobial Agents and Chemotherapy Jan;34(1):139-147, 1990.

25. Kayaalp O. Kayaalp Rasyonel Tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji. 25. yıl onuncu baskı, Ankara, Feryal Matbaacılık, 282-283, 2002.

26. Price RG. Urinary enzymes, nephrotoxicity and renal disease. Toxicology;23(2-3):99-134, 1982.

27. Price RG. The role of NAG (N-acetyl-B-D- glucosaminidase) in the diagnosis of kidney disease including the monitoring of nephrotoxicity. Clin Nephrol.;38(1):14-19, 1992.

28. Price RG. The excretion of urinary N-acetyl-B-D- glucosaminidase and Beta-galactosidase following surgery to the kidney. Clin Chim Acta.;27:65-72, 1970.

29. Süleymanlar G, Sonel A, Ertuğ E. Esansiyel hipertansiyonda böbrek zedelenmesinin göstergesi olarak idrar N-asetil-B-D-Glukozaminidaz'ın değeri. Akd Üni Tıp Fak Dergisi;2:107-112, 1988.

30. Yoshiyama Y, Yazaki T, Wong PC, Beauchamp D, Kanke M. The effect of fosfomycin on glycopeptide antibiotic-induced nephrotoxicity in rats. J Infect. Chemother. Dec;7(4):243-246, 2001.

31. Del Maestro R. Trace elements, micronutrients and free radicals. Dreosti IE(ed). Humano Press Inc. Cliton, 25-51, 1991.

32. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. Mayo Clin Proc. Apr;63(4):381-9, 1988.

33. Young SG, Parthasarathy S. Why are low density lipoproteins atherojenic?. West J Med. Feb;160(2): 153-64, 1994.

34. Freeman BA, Crapo TD. Biology of disease free radicals and tissue injury. Laboratory Invest.Nov;47(5):412-25, 1982.

35. Maxwell SRJ. Prospect for use of antioxidant therapies. Drugs;49(3):345-61, 1995.

36. Kazanç MB. Antioksidan vitaminler. Sendrom. Temmuz:14-23, 1997.

37. Ichikiawa I, Kiyama S. Renal antioxidant enzymes: Their regulation and function. Kidney Int. Jan;45(1):1-9, 1994.

38. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. Br. Med. Bull. July;49(3): 479-80, 1993.

39. Isbir T. Antioksidan sistemler. Endotel. İzmir Tabip Odası Tıpta Temel Bilimler Kolu Sonbahar Okulu:92-98, 1994.

40. Flohe L, Otting F. Superoxide dismutase assays. Methods Enzymol.;105:93-104, 1984.

41. Salin ML, Mccord JM. Superoxide dismutasesin polymorphonuclear leukocytes. J. Clin. Invest. Oct;54(4):1005-9, 1974.

42. Niwa Y, Ishimato K, Kanoh T. Induction of superoxide dismutase in leukocytes by paraquat: Correlation with age and possible predictor of longevity. Blood; 76:835-41, 1990.

43. Lunec J, Blake D, Oxygen Free Radicals : Their relevance to disease processes. In : Cohen RD, Lewis B, Albert KGMM. The Metabolic and Moleculer Basis of Acquired Disease. Balliere Tindall, London, 189-212, 1990.

44. Stryer L, Biosynthesis of Amino Acids and Heme. In : Biochemistry 3. ed. WH Freeman and company, NewYork,422-3, 1988.

45. Kobayashi Y, Ishigame K, Ishigame Y, Usui T. Superoxide dismutase activity of human granulocytes and lymphocytes. Lancet;16:865-6, 1977.

46. Doğan P, Soyuer Ü, Tanrıkulu G. Superoxide dismutase and myeloperoxidase activity in polymorphonuclear leukocytes and serum ceruloplasmin and coper levels in psoriasis. Br. J. Dermatol. Feb;120(2):239-44, 1989.

47. Ceballos-Picot I, Trivier JM, Nicole A. Age correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. Clin Chem.;38(1): 66-70, 1992.

48. Aebi H. Catalase In: Bergmeyer U, ed. Methods of enzymatic analysis. New York and London: Academic Press, 673-677, 1974.

49. Deisseroth A, Dounce AL. The purification and crystallization of beef erythrocyte catalase. Arch Biochem Biophys.;131:18-29, 1969.

50. Jones AL, Jarvie DR, Simpson D. Pharmokokinetics of N-acetylcysteine are altered in patients with chronic liver disease. Aliment Pharmacol Ther.;11:787-791, 1997.

51. Yogesh T. Effect of N-acetylcysteine on myocardial infarct size following ischemia and reperfusion in dogs. Indian J Physiol Pharmacol.;42:50-6, 1998.

52. Vecchiorelli A, Dotterini M, Pietrella D. COPD in patient N-acetylcysteine with macrophage activation. Chest.;105:806-11, 1994.

53. Kelly GS. Clinical applications of N-acetylcysteine. Alternative Medicine Review;3(2): 114-27, 1998.

54. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Beutler J. The antioksidan action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochloric acid. Free Radic Biol Med.;6(6):593-7, 1989.

55. Zhang H, Spapen H, Nguyen DN, Benlabed M, Baurman WA, Vincent JL. Protective effects of N-acetyl-L-cysteine in endotoxemia. Am J Physiol. May;266(5):1746-54, 1994.

56. Tsuji F, Miyake Y, Aono H, Kawashima Y, Mita S. Effects of bucillamine and N-acetylcysteine on cytokine production and collagen-induced arthritis. Clin Exp İmmunol. Jan;115(1):26-31, 1999.

57. Verhasselt V, Vanden Berghe W, Vanderheyde N. N-acetylcysteine inhibits primary human T cell responses at the dendritic cell level: association with NF-kB inhibition. J Immunol.Mar 1;162(5): 2569-74, 1999.

58. Jones AL, Haynes W, MacGilchrist AJ, Webb DJ, Hayes PC. N-acetylcysteine (NAC) is a potent peripheral vasodilator. Gut ;35(5): 10-10, 1994.

59. Zhang H, Spapen H, Nguyen DN, Rogiers P, Bakker J, Vincent JL. Effects of N-acetylcysteine on regional blood flow during endotoxic shock . Eur Surg Res.;27(5):292-300, 1995.

60. Tariq M, Morais C, Sobki S, Sulaiman MA, Khader AA: N-acetylcysteine attenuates cyclosporin induced nephrotoxicity in rats. Nephrol Dial Transplant.;14:923-929, 1999.

61. Bertino JR. Antineoplastic drugs. In: Text Book of Pharmacology, Ed: Smith CM, Reynard AM, Saunders Company, 941-964, 1992.

62. Yakata M, Sugita O, Sakai T, Uchiyama K, Wada K. Urinary enzyme determination and its clinical significance. C. Enzyme derived from the kidney epithelium N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. 4. Preclinical evaluation of the urinary NAG activity and changes in the renal disease. Rinsho. Byori.;56:90-101, 1983.

63. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol.;186: 421-431, 1990.

64. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem. Mar;34(3): 497-500, 1988.

65. Aebi Y. Catalase in vitro. Methods Enzymol.;105:121-126, 1984.

66. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdeyde as biomarker for oxidative stres: reference interval and effects of life-style factors. Clin. Chem. July;43(7):1209-1214, 1997.

67. Vardı N, Parlakpınar H, Öztürk F, Acet A. Gentamicin-induced nephrotoxicity and protective effect of caffeic acid phenethyl ester in rats. Fundamental Clinical Pharmacology.Apr;19(2):173-177, 2005.

68. Park ES, Kim SD, Lee MH, Lee HS, Lee IS, Sung JK, Yoon YS. Protective effects of N-acetylcysteine and selenium against doxorubicin toxicity in rats. J Vet Sci. Aug;4(2):129-36, 2003.

69. Inoue M, Hishikawa M, Sato E, Matsuno K, Sasaki J. Synthesis of superoxide dismutase derivative that specifically accumulates in renal proximal tubüle cells. Arch. Biochem. Biophys.Aug 15;368(2):354-360, 1999.

70. Marre R, Schulz E, Anders T, Sack A. Renal tolerance and pharmacokinetics of vancomycin in rats. J. Antimicrob. Chemother. Sep;14(3):253-260, 1984.

71. Appel GB, Given DB, Levine LR, Cooper GL. Vancomycin and the kidney. Am J. Kidney Dis. aug;8(2):75-80, 1986.

72. Bosomworth MP, Aparicio SR, Hay AWM. Urine N-acetyl-beta-D-glucoseaminidase a marker of tubülar damage? Nephrol. Dial. Transplant. Mar;14(3):620-626, 1999.

73. Sener G, Sehirli AÖ, Altunbaş HZ, Ersoy Y, Paskaloğlu K, Arbak S, Ayanoğlu-Dülger G. Melatonin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. J. Pineal Res. May;32(4):231-236, 2002.

74. Parlakpınar H, Özer MK, Sahna E, Vardı N, Cigremiş Y, Acet A. Amikacin-induced acute renal injury in rats: protective role of melatonin. J. Pineal Res. Sep;35(2):85-90, 2003.

75. Beytut E, Erişir M, Aksakal M. Effects of additional vitamin E and selenium supply on antioxidative defence mechanisms in the kidney of rats treated with high doses of glucocorticoid. Cell Biochem Funct. Jan-Feb;22(1):59-65, 2004.

76. Choi JH, Rhee SJ. Effects of vitamin E on renal dysfunction in chronic cadmium-poisoned rats. J Med Food Fall;6(3):209-15, 2003.

77. Dey SK, Nayak P, Roy S. Alpha-tocopherol supplementation on chromium toxicity: a study on rat liver and kidney cell membrane. J Environ Sci. (China) May;15(3):356-9; 2003.

78. Varma PS, Aruna K, Rukumani R, Menon VP. Alcohol and thermally oxidized pufa induced oxidative stress: role of N-acetyl cysteine. Ital J Biochem. Mar;53(1):10-15, 2004.

79. Odetti P, Pesce C, Traverso N, Menini S, Maineri EP, Cosso L, Valentini S, Patriarca S, Cottalasso D, Marinari UM, Pronzato MA. Comparative trial of N-acetylcysteine, taurine and oxerutin on skin and kidney damage in long-term experimental diabetes. Diabetes. Feb;52(2): 499-505, 2003.

80. Fernandez-Funez A, Polo FJ, Broseta L, Valer J, Zafrilla L. Effects of N-acetylcysteine on myoglobinuric-acute renal failure in rats. Ren Fail. Nov;24(6):725-33, 2002.

81. Conesa EL, Valero F, Nadal JC, Fenoy FJ, Lopez B, Arregui B, Salom MG. N-acetyl-L-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. Sep;281(3):730-7, 2001.

82. Massola Shimizu MH, Coimbra TM, de Araujo M, Menezes LE, Seguro AC. N-acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal failure. Kidney Int. Nov;68(5):2208-17, 2005.

83. Polo-Romero FJ, Fernandez-Funez A, Broseta Viana L, Atienza MP, Sanchez Gascon F. Effect of N-acetylcysteine on antioxidant status in glycerol-induced acute renal failure in rats. Ren Fail. Nov; 26(6):613-8, 2004.

84. Flora SJ, Pande M, Kannan GM, Mehta A. Lead induced oxidative stress and its recovery following co-administration of melatonin or N-acetylcysteine during chelation with succimer in male rats. Cell Mol Biol.;50:543-551, 2004.

85. Efrati S, Averbukh M, Berman S, Feldman L, Dishy V, Kachko L, Weissgarten J, Golik A, Averbukh Z. N-acetylcysteine ameliorates lithium-induced renal failure in rats. Nephrol Dial Transplant. Jan;20(1):65-70, 2005.

86. Pal S, Chatterjee AK. Drug Chem. Toxicol. May;27(2):179-89, 2004.

87. Tandon SK, Singh S, Prasad S, Srivastava S, Siddiqui MK. Reversal of lead-induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant, or their combination in the rat. Environ Res. Sep;90(1):61-6, 2002.

88. Shaikh ZA, Zaman K, Tang W, Vu T. Treatment of chronic cadmium nephrotoxicity by N-acetylcysteine. Toxicol Lett. Jan 11;104(1-2):137-42, 1999.

89. Heyman SN, Goldfarb M, Shina A, Karmeli F, Rosen S. N-acetylcysteine ameliorates renal microcirculation: studies in rats. Kidney Int. Feb;63(2):634-41, 2003.

90. Mazzon E, Britti D, De Sarro A, Caputi AP, Cuzzocrea S. Effect of N-acetylcysteine on ediated nephropathy in rats. Eur J Pharmacol. Jul 13;424(1):75-83, 2001.