

T.C.
FATİH ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
NEFROLOJİ BİLİM DALI

RATLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN SİKLOSPORİN
NEFROTOKSİSİTESİNDE ERDOSTEİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Nefroloji Yandal Uzmanlık Tezi

DR. EBRU UZ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. ALİ AKÇAY

ANKARA – 2010

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	1
TEŞEKKÜR	4
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Tanım	6
2.2 Etki mekanizması	6
2.3. Endikasyonları	7
2.3.1. Solid organ ve kemik iliği transplantasyonu	
2.3.2. Otoimmün hastalıklar	
2.4. Metabolizma ve ilaç etkileşimleri	9
2.5. Yan etkileri	10
2.5.1.Malignite gelişimi	10
2.5.2. Metabolik komplikasyonlar	10
2.5.3. Nörolojik komplikasyonlar	10
2.5.4. Enfeksiyonlara eğilim	11
2.5.5. Gingival hipertrofi ve hirsutizm	11
2.5.6. Hepatotoksisite	11
2.5.7. Nefrotoksisite	11
a) Kalsinörin inhibitörleri nefrotoksisitesinde suçlanan mekanizmalar	12
b) Akut renal toksisite	14
c) Kronik renal toksisite	17
2.4.9. Elektrolit bozuklukları	21

3. MATERYAL-METOD	22
3.1. İlaçlar	22
3.2. Hayvanlar ve çalışma grupları	22
3.3. Homojenizasyon ve proteinlerin belirlenmesi	23
3.4. Doku antioksidan enzim analizi	23
3.5. Histopatolojik İnceleme	25
3.6. İstatistiksel inceleme	26
4. SONUÇLAR	27
4.1. Histopatolojik Bulgular	27
4.2. Enzim aktivitesi sonuçları	30
4.2.1. Doku SOD aktivitesi ölçüm sonuçları	31
4.2.2. Doku CAT aktivite ölçüm sonuçları	32
4.2.3. Doku GSH-Px aktivite sonuçları	33
4.2.4. Doku MDA Düzeyleri	34
4.2.5. Doku NO düzeyleri	35
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇ	41
7. ABSTRACT	42
8. ÖZET	43
9. KAYNAKLAR	44

TEŞEKKÜR

Nefroloji yandal ihtisasi yaptığım dönemde bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen ve tezimin her aşamasında destek veren tez danışmanım Doç. Dr. Ali Akçay'a, Yandal ihtisasiım süresince birlikte çalıştığım tüm asistan, hemşire ve bölüm çalışanlarına, İhtisasiımın tüm aşamalarında desteğini hissettiğim anneme, babama, eşime ve çocuklarıma tezimde ve daha başka çalışmalarımda hep yanımda olan abime

Teşekkür Ederim

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik allograft nefropatisi fizyopatolojisinde immünolojik ve nonimmünolojik birçok faktörün rol oynadığı bilinmektedir. Nonimmünolojik faktörler arasında kalsinörin inhibitör toksisitesi son yıllarda ön plana çıkmaya başlamıştır. Özellikle Nankivel ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalar sonrasında uzun dönemde kalsinörin inhibitörü kullanan hastaların

neredeysede tamamında az ya da çok nefrotoksisitenin gelişmesi, bu konuyu ciddi bir biçimde transplantasyon pratiğinin önüne koymuştur (1,2).

Kalsinörin inhibitörlerine bağılı nefrotoksisite ile ilgili çalışmalarda renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi, platelet aktive edici faktör, endotelin ve eikosanoidler etkili bulunmuştur (3,4).

Ayrıca siklosporinin reaktif oksijen ürünlerini ve lipid peroksidasyonunu artırarak direkt olarak nefrotoksik, hepatotoksik ve kardiyotoksik olduğı ve antioksidan kullanımının siklosporin yan etkilerini azalttığı gösterilmiştir (5,6).

Bu çalışmadaki amacımız siklosporinin reaktif oksijen ürünlerinin üretimini ve membran lipid peroksidasyonunu artırarak renal fonksiyonları bozduğunu ve bir antioksidan olan erdosteinin siklosporin nefrotoksisitesi üzerindeki koruyucu etkisini araştırmaktı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.TANIM

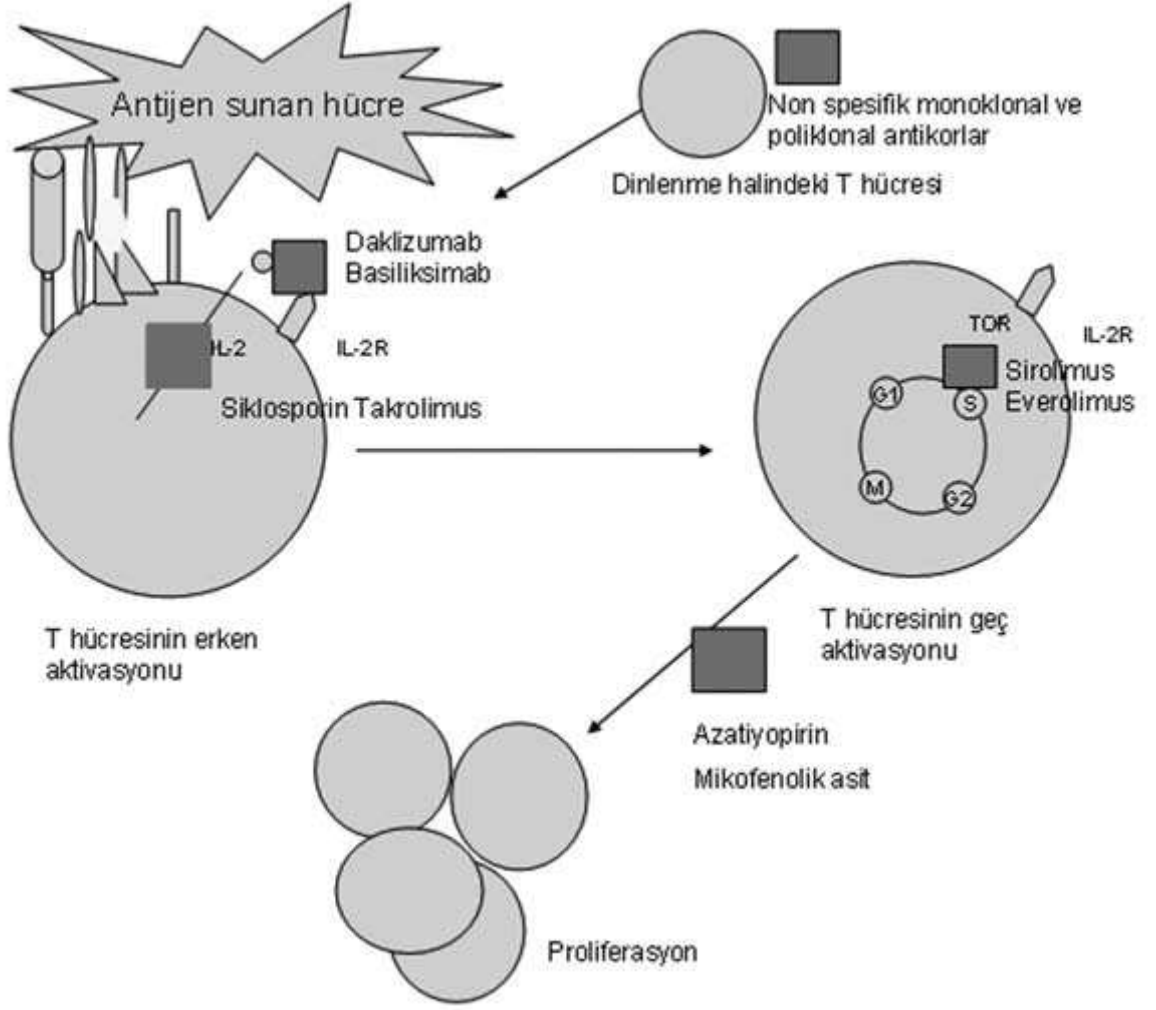
Kalsinörin inhibitörleri (siklosporin ve takrolimus) 1980'de kullanıma girdikleri günden beri solid organ transplantasyonunda immünsüpresif tedavinin temelini oluşturmuşlardır (7).

Kalsinörin inhibitörlerinden (KNİ) biri olan Siklosporin (Sandimmune®, Gengraf®,

Neoral®), funguslardan (*Tolypocladium inflatum*) elde edilen, organ transplantasyonu ve otoimmün hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan lipofilik siklik andekapeptid (alipopholic 11 amino-acid polypeptide) bir immünsüpresif ilaçtır. 1980'den beri klinik pratikte yerini almıştır. Mideden emilimi değişkendir, plazma proteinlerine, lipoproteinlere ve eritrositlere sıkı bağlanır. Büyük ölçüde karaciğerden metabolize edilir. Ortalama yarılanma ömrü 6.4-8.7 saat olduğu halde bireysel olarak büyük farklılıklar gösterir. Siklosporinin renal klirensi sadece 1 ml/dk dır (8).

2.2.ETKİ MEKANİZMASI

Kalsinörin, T hücrelerine antijen sunumundan sonra interlökin-2 ve diğer sitokinlerin salınımında rol oynayan bir sitoplazmik fosfatazdır. Kalsinörin inhibitörleri (CsA ve Tac) lenfositler tarafından üretilen ve bir T hücre lenfokini olan interlökin-2'nin üretimini selektif olarak bloke ederler. Sitotoksik hücrelerin çoğalmasını önler ve dolaylı olarak gama interferon, IL-1 ve makrofaj kemotaktik faktör ve monosit fonksiyonlarını inhibe ederler (şekil 1),(9). Prednisolone ile kombine kullanımda renal, kardiyak, karaciğer ve kemik iliği nakillerinde çok etkindirler ve akut rejeksiyon ve uzun dönem sağ kalımlarında önemli iyileşme sağlamışlardır.



Şekil 1. İmmünsüpresif İlaçların Etki Mekanizmaları

2.3. ENDİKASYONLAR

2.3.1. Solid organ ve kemik iliği transplantasyonu

Böbrek, karaciğer, kalp, akciğer, kalp-akciğer birlikte veya pankreasın allojenik transplantasyonlarında greft reddinin önlenmesinde ve önceden diğer immünosupresif ilaçlar verilmiş olan hastalardaki organ reddinin tedavisinde 1980'den beri yaygın olarak kullanılmaktadır. Greft reddini azaltıp, allograft yarı ömrü ve hasta yaşam süresini artırır (10).

Kemik iliği transplantasyonu ve sonrasında graft reddinin önlenmesinde, graft-versus-host hastalığının önlenmesinde veya tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (11).

2.3.2. Otoimmün Hastalıklar:

Nefrotik Sendrom

Yetişkin ve çocuklarda steroide bağımlı ve steroide dirençli nefrotik sendrom ve minimal lezyonlu nefropati, fokal ve segmental glomerülosklerozis gibi glomerüler hastalıklar veya membranöz glomerülonefrit olgularında kullanılmaktadır (12).

Romatoid Artrit

Siklosporin klasik, yavaş etkili antiromatizmal ilaçlarla sonuç alınamayan şiddetli, aktif romatoid artritli hastaların tedavisinde etkilidir (13).

Dermatolojik Kullanım

İmmün aracılı inflamatuvar dermatozlarda KNI'lerinin yeri vardır. Siklosporinin psöriazis, atopik dermatit, pyoderma gangrenozum, sweet sendromu, subkorneal püstüler dermatozis, liken planus, otoimmün büllöz hastalıklar (kortikosteroidlerle kombine olarak), sklerodermada, kronik idiopatik ürtiker, el ve ayaklardaki kronik dermatidlerde siklosporinin etkinliği gösterilmiştir (14).

Göz Hastalıkları

Konvansiyonel tedavinin başarısız olduğu veya istenmeyen yan etkilere yol açtığı, nonenfeksiyöz orijinli, aktif görme fonksiyonunu tehdit edici intermediyat veya posterior üveit, retinayı da kapsayan, tekrarlayıcı enflamatuvar ataklı Behçet üveiti, posterior blefaritis,

oküler rosasea, post-LASIK kuru göz, kontakt lens intoleransı, atopik keratokonjunktivit, graft-versus-host hastalığı, ve herpetik stromal keratitte CsA kullanılmaktadır (15,16).

Karaciğer Hastalıkları:

Otoimmün hepatitler, primer biliyer sirozda da etkinliği gösterilmiştir (17).

2.4. METABOLİZMA VE İLAÇ ETKİLEŞİMLERİ

Siklosporinin barsaktan emilimi P-glikoprotein ve sitokrom P450 3A4 (CYP3A4) aktivitesi tarafından etkilenir. P-glikoprotein CsA'nın intestinal hücrelerden intestinal lümene geçişini sağlar ve burada CYP3A4'ün intestinal aktivitesi ile metabolize edilir. CsA'nın hepatik metabolizasyonu da CYP3A4 aracılığıyla olmaktadır. P-glikoprotein ve CYP3A4 hem inhibitör hem uyarıcı etkileri siklosporin metabolizmasını, dolayısıyla ilaç seviyelerini değiştirmektedir. CsA'nın terapötik indeksi çok dardır, pek çok ilaçla etkileşerek toksik ve subterapötik seviyelere gelebilir. CsA düzeylerindeki yükselme nefrotoksik ve nörotoksik yan etkilere yol açarken subterapötik seviyeler ise transplant reddine neden olabilir. CYP3A4 inhibitörü olan pek çok ilaç CsA seviyelerini klinik olarak önemli ölçüde etkiler. Ketokonazol, flukonazol, klaritromisin, eritromisin, sertralin, fluvoxamin, verapamil, diltiazem, allopurinol, atorvastatin, simvastatin ve losartanın CYP3A4'ü inhibe ederek CsA seviyelerini artırdığı bildirilmiştir (18-20). P-glikoprotein inhibitörleri de CsA seviyesini değiştirebilir. Digoxin p-glikoproteini inhibe ederek CsA seviyelerini yükseltirken Karbamazepin, fenobarbital, fenitoin, rifampin, sülfonpirazon ve mayasıl otu 3A4 veya P-glycoprotein indükleyerek KNI seviyelerini azaltabilirler (21,22). 3A4 ve P-glikoproteini etkileyen ilaçlarla birlikte CsA kullanılacaksa CsA seviyesi sıkı kontrol edilmelidir.

2.5. YAN ETKİLERİ

2.5.1. Malignite Gelişimi

Renal transplant alıcılarında genel popülasyona göre kanser (kaposi, vulva veya vajina, servix, non-hodgkin lenfoma, karaciğer, böbrek, kolon gibi) insidansında artış görülmüştür. Özellikle lenfoma ve deri kanserleri transplant hastalarında dramatik olarak artar. Onkogenik virüslerin immünsüpresyon altında kontrolsüz çoğalması ve bununla ilişkili TGF- β üretimi malignite gelişiminde etkili olabilir. Siklosporin malign transformasyon için presipitan olan transkriptif faktör EA2 ve Pax8 ekspresyonunu artırır. CsA pek çok malign hücrenin daha invaziv seyreden fenotipe değişimine neden olur. Bu değişiklikler anti-TGF- β tedavisi ile kontrol altına alınabilir (23).

2.5.2. Metabolik Komplikasyonlar

KNİ'leri arteriyel hipertansiyon ve lipidler üzerinde bozukluklara neden olarak ve ayrıca glukoz intoleransı ve oksidatif strese katkıda bulunarak kardiyovasküler morbiditeyi artırır. Son yıllarda transplant hastalarında LDL oksidasyonunun kontrollere göre daha fazla olduğu bildirilmektedir (24). Diabetojenik özellikleri glukokortikoidlerle birlikte kullanıldıklarında daha fazla görülmektedir (25). Diğer metabolik komplikasyonları ise yüksek dönüşümlü kemik hastalığı ve osteoporozdur (26).

2.5.3. Nörolojik Komplikasyonlar

CsA ya bağlı baş ağrısı, uykusuzluk, ekstremitelerde tremor gibi nörotoksisite bulguları siktir fakat hayatı tehdit eden nörolojik komplikasyonlar da görülebilir (27).

2.5.4. Enfeksiyonlara Eğilim

Trans hastalarında CMV, EBV herpes simplex, herpes zoster, listeria monositogenezis, pnömositis karini ve nokardiya gibi fırsatçı enfeksiyonlar artmıştır. Antiviral profilaksi (3-6 ay) ve SMX-TMP (6-12 ay) profilaksisi önleyicidir. 6 ayın sonunda immünsüpresyonun azaltılmasından sonra enfeksiyon riski genel popülasyonla benzerdir. (23). Bir teoriye göre transplante organdaki fibrozisin nedeni uzun süreli immün sistem baskılanmasına bağlı oluşan kronik enfeksiyondur (28).

2.5.5. Gingival Hipertrofi ve Hirsutizm

CsA'ya bağlı gingival hipertrofi sık görülür ve genellikle bu durum kalsiyum kanal blokörü ve fenitoin alanlarda daha komplike olabilir. CsA yerine Tac kullanımı, antibiyotik tedavisi, gerekirse cerrahi eksizyon ve lazer uygulanabilir. CsA'ya bağlı hirsutizm renal greft alıcılarında %5 oranında görülmektedir. Arasına da olsa hastanın yaşam kalitesini bozan ve ilaç değişimi gerektiren boyutlara varabilmektedir (29,30).

2.5.6. Hepatotoksisite

Serum bilirubin ve transaminazlarında artışa neden olur. Bu değişiklikler tedavinin ilk iki ayında görülür ve ilaç doz azaltımıyla düzelir (31).

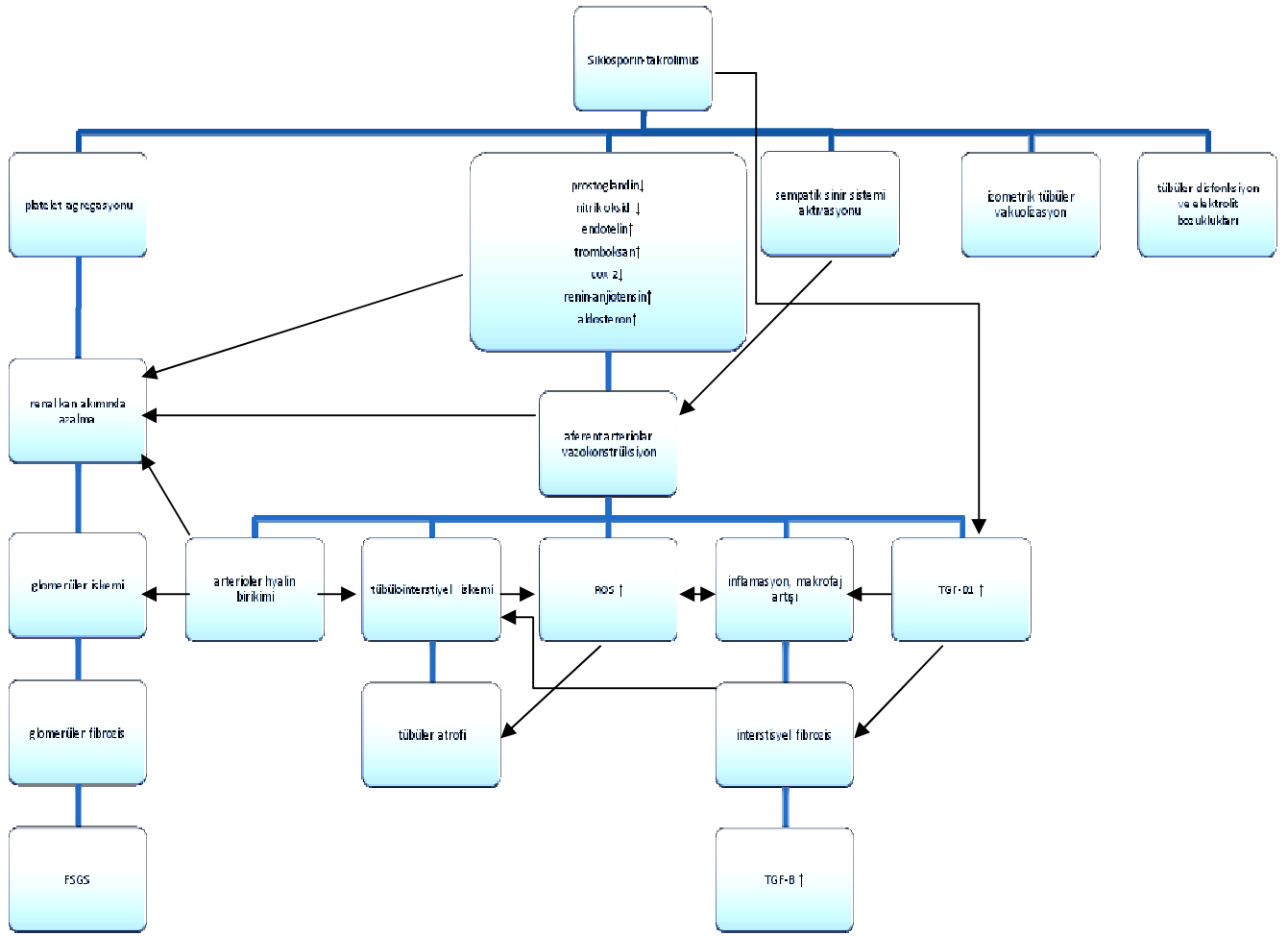
2.5.7. Nefrotoksisite

Kalsinörin inhibitörleri direkt ve indirekt yollardan nefrotoksiktir. KNİ nefrotoksisitesinden dolayı geç dönem greft böbrek kaybı %50'lere ulaşmaktadır. Nefrotoksisite sadece transplante böbrekte değil aynı zamanda diğer organ transplantasyonu yapılan veya otoimmün hastalıklar nedeniyle KNİ kullanan hastalarda nativ böbrekte de görülmektedir ve bu grupta KNİ toksisitesine bağlı renal yetmezlik oranı %7-21 arasında değişmektedir (32).

Kalsinörin inhibitörlerine bağılı direkt nefrotoksisite akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılır. İlacın serum seviyesinin renal hasarla doğrudan ilişkisi yoktur ve terapötik dozlarda bile nefrotoksisite görülebilir. Nefrotoksisitede çeşitli mekanizmalar suçlanmaktadır (Şekil 2). Afferent ve efferent arterlerde vazokonstriksiyona bağılı renal kan akımı ve glomeruler filtrasyon hızında (GFR) azalma, glomeruler kapiller hasar ve yaygın mikrovasküler trombozis; nitrik oksid sentezinin bozulmasına bağılı reaktif oksijen ürünlerinin, lipid peroksidasyonunun ve transforming growth faktör β -1 (TGF- β -1)'in artışı ile ilişkili fibrozis; ayrıca renin-anjiotensin-aldosteron sistemindeki değişiklikler nefrotoksisiteden sorumlu tutulmuşlardır (33,34). Pekçok insan ve hayvan çalışmasında Tac'un CsA'ya göre daha az nefrotoksik olduğu gösterilmişken son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu sonuç konfirme edilememiştir (35).

2.5.7.a) KNI Nefrotoksisitesinde Suçlanan Mekanizmalar

Kalsinörin inhibitörlerine bağılı nefrotoksisitede şekil 2'de gösterildiği gibi iç-içe giren pek çok mekanizma suçlanmaktadır.



Şekil 2. Akut ve kronik KNI nefrotoksitesinde suçlanan mekanizmalar. FSGS, fokal segmental glomerulosklerozis; ROS, reaktif oksijen ürünleri (36).

Klinik nonspesifiktir ve tanı sadece renal biyopsi ile konulabilir. Bazen oligoanüri ile akut seyredebileceği gibi bazen de böbrek fonksiyonlarında yavaş ve progresif bozulma ile sinsi seyredebilir.

2.5.7.b) Akut Renal Toksikite

Fonksiyonel toksisite

Akut renal hasar primer olarak fonksiyoneldir ve tedavinin ilk haftalarında ortaya çıkar. CsA'e bağılı araşidonik asid metabolizmasında değişiklikler olur. CsA tedavisi, vazodilatatör (PGE2 ve I2) ve vazokonstriktör eikosanoidler arasındaki dengeyi değiştirerek özellikle tromboksan (TX) düzeylerini artırarak proinflamatuvar ve vazokonstriktör etki gösterirler (37). Ayrıca KNI'leri selektif olarak COX-2 ekspresyonunu süprese ederler. Fonksiyonel toksisite, preglomeruler afferent arterioler vazokonstriksiyon sonucu renal kan akımında ve glomeruler filtrasyon hızında (GFR) azalma ile karakterizedir ve histolojik olarak yapısal değişiklikler yoktur. GFR'deki azalma potasyum ve sodyum retansiyonuna yol açar. Pek çok vakada ilaç dozunun azaltılmasıyla düzelir (38).

Ayrıca araşidonik asid metabolizmasında serbest radikal salınımı olur. Serbest radikaller pek çok intraselüler moleküllerle (fosfolipid, glikolipid, gliserid, steroller gibi) reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu ve membran poliansature yağ asitlerinin hasarını artırarak iyonik gradiyenti ve membran geçirgenliğini artırır. Dolayısıyla çeşitli membran fonksiyonlarını ve metabolik süreçleri bozar (39).

CsA ayrıca renin-anjiotensin-aldosteron (RAS) sistemini aktive ederek nefrotoksik etkisini gösterir. RAS'ni ya jukstaglomeruler hücelere direkt etki ederek veya vazodilatatör faktörlerin azalması ve endotelin seviyesinin artışına sekonder oluşan arterioler vazokonstriksiyondan dolayı indirekt olarak aktive eder (40).

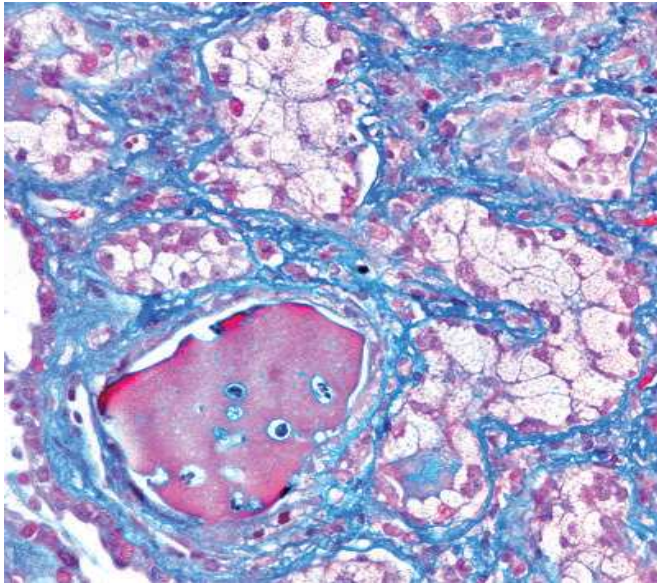
Posttransplantasyon Akut Tübüler Nekrozun (ATN) Düzelmesinde Gecikme

Soğuk ve sıcak iskeminin uzamasına bağılı ATN postop periodda renal allograftta oligoanüriye neden olur. Bu komplikasyon daha çok kadavradan nakillerde karşımıza çıkar.

Vazokonstrüksiyonun uzamasına bağlı akut túbüler nekroz ve histolojik olarak da túbüler vakuolizasyon meydana gelir (41).

Toksik Túbülopati

Toksik túbülopati genellikle serum ilaç seviyesindeki fazlalığa bağlıdır. Morfolojik olarak proksimal túbülleri etkileyen fokal izometrik túbüler vakuolizasyon vardır (Şekil 3).



Şekil 3. Kalsinörin-inhibitörlerine bağlı akut nefrotoksisite. Proksimal túbüllerde izometrik vakuolizasyon. Trikrom; $\times 200$.

Vakuolizasyon endoplazmik retikulumdaki genişlemeye ve lizozom artışına cevap olarak gelişir (42). Fokal túbüler kalsifikasyon görülebilir. Bu özellikleri ile akut toksik túbülopatiyi kontrast nefropati ve osmotik nefrozisten (mannitol, glukoz, sükroz, dextran infüzyonu gibi) ayırmak güçtür. Akut toksik túbülopati ilaç dozunun azaltılmasıyla düzelir. Túbüler disfonksiyon markerlarından Retinol bağlayıcı protein ve N-asetil-D-glukozaminidaz ölçümlerinden faydalanılabilir (43).

Vasküler Toksikite

KNİ'leri platelet agregasyonu yaparak veya direkt toksik etki ile endotelial hücre hasarı yaparlar. Vasküler toksisitenin akut arteriolopati ve trombotik mikroanjiyopati olmak üzere iki tipi vardır.

Akut arteriolopati

Akut allograft disfonksiyonu olarak karşımıza çıkar. Serum KNI seviyesi genel olarak yüksektir. Renal biyopside lezyonlar afferent arteriolde sınırlıdır. Endotelial hücrelerde şişme ve vakuolizasyon, nekrozis ve/veya myosit hasarı sonrası hyalinozisle karakterizedir. Akut arteriolopati ve toksik tübulopati birlikte olabilir. Bazı hastalarda doz azaltmaya bağlı renal fonksiyonlarda düzelme görülürken bazılarında ise renal hasar irreverzibldir. Klinik pratikte KNI'lerinin kesilmesi ile böbrek fonksiyonlarında düzelmeyin görülmesi akut arteriolopati tanısını koydurur (42).

Trombotik Mikroanjiyopati (TMA)

KNI bağlı vasküler nefrotoksitenin bu nadir şekli klinik pratikte hemolitik üremik sendroma benzer. Biyopside arteriol ve glomeruler kapillerde tromboz ile karakterize mikroanjiyopati görülür. CsA, platelet agregasyonu yaparak ve aktive protrombotik faktörü artırarak TMA gelişimine katkıda bulunur. İlacın zamanında kesilmesi gerekir. Çünkü eğer lezyonlar yaygın ve geniş ölçüde arteriyel mural nekrozis ve luminal tromboz varsa greft kaybı gelişir (44).

KNİ'lerine Bağlı Akut Nefrotoksitede Ayırıcı Tanı

Akut KNI'e bağlı nefrotoksitede ayırıcı tanıda yer alan başlıca durumlar akut rejeksiyon, posttransplant akut tübuler nekroz ve akut pyelonefrittir (42) (Tablo 1). Klinik ve patolojik değerlendirme ile doğru tanı konmalıdır.

Tablo 1: Akut KNİ'lerine bağlı nefrotoksisite, akut rejeksiyon ve posttransplant akut tübüler nekrozisde görülen lezyonlar.

Akut KNİ'bağlı nefrotoksisite

- Akut afferent arteriolopati: endotelial şişme/vakuolizasyon; nekroz ve myosit yerine erken dönemde hyalin birikimi.
- Tübülopati: proximal tübüllerde küçük, düzenli dağılmış vakuolizasyon
- Trombotik mikroanjyopati: nadir

Akut hüresel rejeksiyon

- Aktive lenfositlerle interstisyel infiltrasyon
- Lenfositik tübülitis; tübüllerde HLA-DR ekspresyonu
- Lenfositik intimal arteritis

Akut humoral rejeksiyon

- Küçük arterlerde ve/veya afferent arteriollerde fibrinoid nekroz
- Glomeruler mikrotrombi
- Peritübüler kapillerde nötrofil birikimi
- İskemik tübüler hasar
- Peritübüler kapiller boyunca kompleman 4d lokalizasyonu

Akut tübüler nekroz

- Tübüllerde dilatasyon ve düzleşme
- Fırçamsı kenarların kaybı
- Tübüler epitelyal hücrelerde yer yer nekroz ve düzleşme
- Genişlemiş, rejenere olmuş nükleus
- İnterstisyel ödem

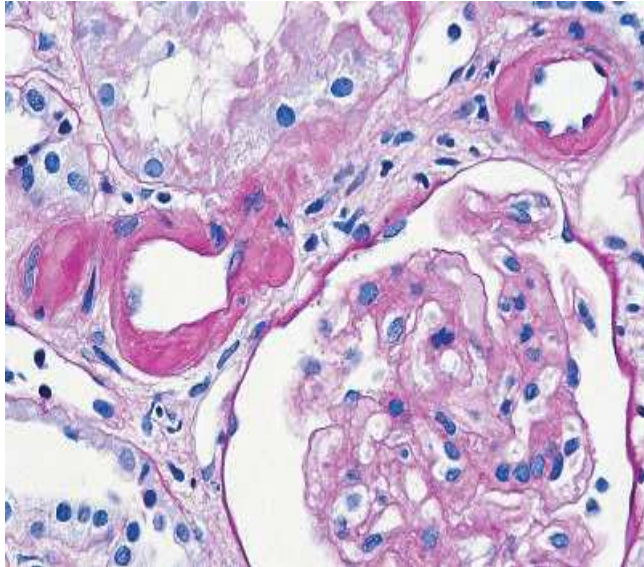
2.5.7.c) Kronik Nefrotoksisite

Kalsinörin inhibitörlerine bağlı kronik nefrotoksisite immünolojik ve nonimmünolojik hasara bağlıdır ve böbrek fonksiyonlarında progresif bozuklukla karakterizedir. Transplantasyondan birkaç ay sonra görülür. Serum kreatininde yavaş, sinsice artış ve klinik olarak hipertansiyon ve nonnefrotik proteinüri vardır. Hastaların bir kısmında serum KNİ düzeylerinde artış

görülebilmektedir (1). Histolojik olarak üç kompartmanın irreversibl olarak etkilendiği görülmüştür. Vasküler hasar (arterioller hyalinozis), tübülointerstisyum (tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis) ve glomerüler hasar (Bowman kapsülünde kalınlaşma ve fokal veya global sklerozis) görülür (42). Nankivell ve arkadaşlarının yaptığı protokol biyopsi çalışmasında transplantasyondan yaklaşık on yıl sonra KNİ'lerine bağlı lezyonlar tüm vakalarda görülmüştür (45).

Vasküler Hasar (Hyalin ArterioloPATI)

Hyalin arterioloPATI kronik siklosporin toksisitesinin markıdır. Afferent arterioller ve küçük interlobüler arterlerin distal kısımları etkilendir. Düz kas hücre hasarı ve bu hücrelerin hyalin depositlerle replasmanı sonucu adventisyaya doğru şişkinlikler görülür (Şekil 4).



Şekil 4. Kronik kalsinörin inhibitör nefrotoksisitesi.

Afferent arteriollerde tesbih tanesi şeklinde medial hyalinosis.

Periodic acid-Schiff; ×400.

İleri vakalarda, hyalin materyal birikimine bağlı vasküler lümende ciddi darlık olabilir. Arteriolar hyalinozis yaygın olarak irreversibl olarak kabul edilse de ilaç dozunun azaltılması veya kesilmesi ile CsA ilişkili arterioloPATI'nin tamamen gerilediği rapor edilmiştir (42,46).

İnterstisyel Fibrozis ve Tübüler Atrofi:

KNİ kullanımına bağlı interstisyel fibrozis, tübüler atrofi ve glomeruler skleroz gelişiminin başlıca sebebi arteriolopati ve daralmış arterioler lümenidir. KNİ kullanımına bağlı vazokonstriksiyon sonucu oluşan serbest radikaller ve ROS tübülointerstisyel kompartmanda lokal hipoksi ve iskemiye neden olur. Renal hipoperfüzyon ve hipoksi sonucu hipoksi-reoksijenasyon hasarı, apopitozis ve hücre ölümü meydana gelir (47).

Ayrıca CsA veya Tac tedavisinden sonra tübüler epitelyal hücreler tarafından TGF- β ekspresyonu da kronik KNI nefrotoksisitesinde önemli etiyolojik faktörlerden biridir. KNI'leri nitrik oksid sentezini ve endotelyum bağımlı NO-ilişkili renal vazodilatasyonu inhibe ederler ve vazokonstriksiyona sekonder hipoksiye bağlı serbest radikal ve süperoksid ürünlerinin artmasına sebep olurlar. NO sentezinin bozulması ayrıca growth faktör β -1 (TGF- β -1) artışını netice verir. TGF- β ekstraselüler matrix protein artışı yaparak interstisyel fibrozisi artırır (48).

Protein kinaz C (PKC- β) de KNI'e bağlı fibrozise sebep olur. CsA tedavisinin PKC- β mRNA ve protein üretimini artırdığı ve bir PKC- β inhibitörü hispidinin tedaviye eklenmesi ile proximal tübüler hücrelerde TGF- β 1 sentezinin inhibe edildiği gösterilmiştir (49).

Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemindeki değişiklikler kronik KNI toksisitesine katkıda bulunan diğer bir faktördür. Anjiyotensin II sadece akut nefrotoksisitede etkili olmayıp RAS aktivasyonuna sekonder olarak aldosteron artışını dolayısıyla ROS ve TGF- β üretimini artırarak ve ekstraselüler matriks yıkımını inhibe ederek interstisyel fibrozis gelişimine katkıda bulunur (50). Son yıllarda yapılan çalışmalar RAA sisteminin son ürünü olan aldosteronun KNİ tokisitesinde önemli bir rol aldığını, bu nedenle KNİ nefrotoksisitesini önlemede tedaviye spirinolakton eklenmesinin efektif olabileceğini göstermiştir (51).

Glomeruler Değişiklikler

KNİ toksisitesine bağlı glomeruler etkiler nonspesifiktir. Kompanzatuvar glomeruler hipertrofi, mesengial matrix artışı, kapiller kollaps, fokal segmental ve/veya global skleroz görülebilir. Fokal segmental glomeruloskleroz (FSGS), podosit ve endotelyal hücelere direkt toksik etkiden çok fonksiyonel nefron kaybına bağlı hiperfiltrasyon sonucu görülür. Kronik KNİ'lerine bağlı böbrek hasarı irreversibldir. Tedavi CsA dozunun azaltılması veya kesilerek alternatif immünsüpresif ajan başlanmasıdır (42).

Kronik CsA Nefrotoksitesinde Ayırıcı Tanı

Ayırıcı tanıda kronik rejeksiyon, kronik allograft nefropatisi (KAN), *de novo* veya rekürrent glomerulonefritis ve polyomavirüs nefropatisi akla gelmelidir. Tablo 2'de kronik KNİ toksisitesine bağlı nefrotoksiste, kronik rejeksiyon ve kronik allograft nefropatinin başlıca özellikleri verilmiştir (42).

Tablo 2. Kronik KNİ, kronik rejeksiyon ve kronik allograft nefropatideki lezyonların özeti:

Kronik KNİnefrotoksitesi:

- Hyalin arteriolopati: Myozitlerini yerini adventisyaya doğru çıkıntı yapan nodüler hyalin depozitlerin alması
- Nonspesifik segmental veya global glomeruler sklerozis
- Tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis

Kronik rejeksiyon

- Transplant arteriolopati: Yeni başlangıçlı intimal fibrozis, intimada mononükleer hücre infiltrasyonu
- Transplant glomerulopati: Glomeruler kapillerde çift kontur
- Transplant kapilleropati: Peritübüler kapillerde bazal membranda kompleman 4d (C4d) pozitifliği
- İnterstisyel fibrozis ve tübüler atrofi

Kronik allograft nefropati

- Arterlerde intimal fibroelastozis
- Arteriollerde subendotelyal hyalinozis
- Nonspesifik segmental veya global glomeruler sklerozis
- İnterstisyel fibrozis ve tübüler atrofi

2.5.8. Elektrolit Bozuklukları

KNİ'leri böbreklerde oluşturdukları yapısal ve fonksiyonel değişikliklerle hiperkalemi, hipomagnezemi, hiperkloremik metabolik asidoz (distal tübüler asidoz) ve hiperürisemi yaparlar. Tübüler fonksiyonlar üzerindeki bu etkileri tübüler epiteldeki $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}^-$ kotransportör ekspresyonundaki azalma ile açıklanabilir. Ayrıca CsA tedavisi alan ve hiperkalemiyle gelen hastaların %75'inde mineralokortikoid reseptör sayılarında azalmaya bağlı aldesteron rezistansı vardır. Son olarak CsA'nın ince çıkan kolda paracellin-1 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (52,53).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. İlaçlar

Deney süresi boyunca oral gavajla hergün CsA (sandimum, sandoz) 15 mg/kg ve erdostein (ilsan, Türkiye) 10 mg/kg dozlarında verildi. CsA dozu Rezzani ve arkadaşlarının (54) erdostein dozu ise Erdoğan ve arkadaşlarının (55) yaptığı çalışmalar baz alınarak ayarlandı.

Çalışmamızda Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi Rat Laboratuvarı ve Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı kullanıldı.

3.2. Hayvanlar ve çalışma grupları

Çalışmaya 32 adet Wistar tipi, erkek albino rat (180–200 g) dahil edildi. Hayvanlar Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi lokal etik komitesi tarafından kabul edilen Hayvan Laboratuvarı Bakım ve Kullanım şartlarına, uygun olarak siklik olarak 12 saat aydınlık 12 saat karanlık odalarda tutuldu.

Ratlar randomize olarak dört gruba ayrıldı:

Grup 1(kontrol); oral olarak günlük 2 ml ayçiçek yağı verilen grup.

Grup 2 (CsA grubu); oral gavajla 15 mg/kg CsA verilen grup

Grup 3 (Erdostein grubu); 10mg/kg oral erdostein verilen grup

Grup 4 (CsA+erdostein grubu); Oral CsA (15 mg/kg) ve erdostein (10mg/kg) verilen grup.

21 gün boyunca ratlara belirtilen tedaviler uygulandıktan sonra ratlara genel anestezi verilerek bilateral böbrekleri çıkartıldı. Sol böbrek enzimatik analizler için -80 °C de saklandı, sağ böbrekleri ise patolojik inceleme için %10 formalin içine kondu.

3.3. Homojenizasyon ve proteinlerin belirlenmesi

Biyokimyasal analizler için, derin dondurucudan çıkarılan rat böbrekleri üzerinde bulunan eritrositleri uzaklaştırmak için soğuk serum fizyolojik içinde yıkanarak altında buz aküsü bulunan süzgeç kağıdı üzerinde kurutuldu ve hassas terazi ile ağırlıkları ölçüldü. Doku ağırlığının (gr) 10 katı hacimde 0.2 mM pH 7,5 tris-HCl tamponu (56) () içinde 2 dakika 16.000 rpm de homojenize (Heidolph DİAX 900, Almanya) edildi. Homojenizasyon sırasında doku sıcaklığının yükselmemesi için doku bulunan tüp, homojenizasyon esnasında buz parçaları içinde tutuldu. Bir kısım homojenat, malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) ve protein analizleri için ependorf tüplere ayrıldı. Kalan homojenat 3220 rpm'de +6°C'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Ayrılan süpernatantlardan *katalaz* (CAT) aktivitesi ve protein tayini yapıldı. Süpernatant 1/1 (v/v) oranında kloroform / etanol (3/5, v/v) vorteksle karışımları sağlanarak 3220 rpm'de +4°C'de 40 dakika santrifüj edilerek üstteki etanol fazında *süperoksit dismutaz* (SOD) ve *glutasyon peroksidaz* (GSH-Px) aktiviteleri ve protein tayini yapıldı. Tüm kompartmanlardaki protein içeriği Lowry yöntemi ile saptandı. (57)

3.4. Doku antioksidan enzim analizi

3.4.1. Plazmada SOD aktivite tayini

Total (Cu-Zn ve Mn) SOD aktivitesi Sun ve ark. tarafından tanımlanan, NBT indirgeme yöntemiyle çalışıldı (58). Bu metotta, oluşan süperoksit radikalleri (O_2^-) ortamdaki NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda meydana gelen indirgenme mavi-mor renk oluşturur. Ortamda SOD olduğunda ise NBT indirgenmesi tam olmayıp enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşur, buradan aktivite hesabı yapılır. Sonuçlar \dot{U}/mg protein olarak değerlendirilmiştir.

3.4.2. Glutathione Peroxidase (GSH-Px) Ölçümü

GSH-Px aktivitesi Paglia ve ark.'nın metoduna göre çalışıldı (59). GSH-Px hidrojen peroksit varlığında redükte GSH, okside GSH (GSSG)'a yükseltgenmesini katalizler. Hidrojen peroksitin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, GSH redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH'in NADP⁺'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de okunmasıyla hesaplanır. GSH-Px aktivitesi Ü/g protein olarak değerlendirilmiştir.

3.4.3. Katalaz (CAT) Ölçümü

Böbrek dokularının katalaz aktivitelerinin tayini Aebi'nin geliştirdiği spektrofotometrik yöntemle yapılmıştır (60). Reaksiyon ortamı (1 ml), fosfat tamponu (50mM, pH 7) içinde hazırlanmış homojenat ve hidrojen peroksit (30 mM) içermekte ve yöntem, hidrojen peroksitin katalaz tarafından parçalanması ile orantılı olarak 240 nm'de absorbans azalmasının ölçümü esasına dayanmaktadır. Sonuçlar, mg protein/sn başına düşen 1. dereceden hız sabiti olarak verilmiştir($k g^{-1}$ protein.)

3.4.4. Malondialdehid (MDA) Ölçümü

Artan serbest radikal yapımının bir göstergesi olan ve lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeyleri, Draper ve Hadley'in çift ısıtma yöntemi ile belirlendi (61). Metodun prensibi MDA-TBA (Tiobarbitürik asit) kompleksinin 532 nm de verdikleri absorbansın ölçülmesi esasına dayanır. Sonuç proteinin miligramındaki nanomol olarak ifade edilmiştir.

3.4.5. Nitrik Oksit (NO) Ölçümü

Vücutta normalde endojen olarak üretilen nitrik oksitin doku ve vücut sıvılarındaki seviyeleri, çoğu çalışmada nitrit ve nitrat olarak ifade edilmiştir (62) Çünkü nitrik oksit, üretildiği

bölgede saniyeler içinde okside olmakta, önce nitrit (NO₂-) sonra da nitrata (NO₃-) dönüşmektedir. Numunelerdeki protein artefaklarını bertaraf etmek için önce numuneler deproteinize edilerek çalışıldı. Deproteinize edilen numunelerdeki total nitrit (nitrit + nitrat) miktarları Griess reaksiyonu ile belirlendi (63) Bu metoda göre bakır kaplı kadmiyum granülleri deproteinize numune ile inkübe edildikten sonra nitrat redüksiyonu sağlanmakta, üretilen nitrit ise sülfonilamid ve buna bağlı N-naftiletillen diamin (NNDA) diazotizasyonuna neden olmakta, sonuçta oluşan pembe renk 545 nm dalga boyunda spektrofotometride okunmaktadır. Sonuçta elde edilen nitrit konsantrasyonu ilk konsantrasyondan çıkarılarak nitrat miktarı belirlenmektedir. Sonuçlar gram protein başına mikromol olarak ifade edilmiştir.

3.5. Histopatolojik İnceleme

Böbrek dokuları %10 formalin solüsyonu içinde tespit edildi. Rutin doku takip işlemlerinin ardından, dokular parafine gömüldü ve elde edilen parafin bloklardan. Histolojik çalışma için de kalan böbrek dokuları mikrotomda 5 mm lik kesitler alındı. Alınan kesitler hematoksilin-eosin (HE), peryodik asid-Schiff (PAS) ve Masson- trikrom metodu ile boyandı ve ışık mikroskopunda değerlendirildi. En az 100'er glomerul değerlendirildi. Afferent arterioller arteriolopati, terminal arterioller düz kas hücrelerinde eozinofilik granüler PAS-pozitif sirküler veya inci tanesi şeklinde hyalin depozitleri incelendi ve bunların x40 objektif incelemede jukstaglomerüler afferent arteriollerin semikantitatif olarak yüzde kaçının etkilendiği değerlendirildi. Tübüler hasar için PAS boyama ile yapılan incelemede tübüler dilatasyon, tübüler kast, vakuolizasyon, dejenerasyon ve tübüler epitelyum hücrelerinde şişme, tübüler bazal membranda kalınlaşma semikantitatif olarak değerlendirildi ve şu skorlama sistemi kullanılarak skorlandı: 0 = tübüler hasar yok; 1 = <%10 tübler hasar; 2 = %10–25 tübüler hasar; 3 = %26–50 tübüler hasar; 4 = %51–75 of tübüler hasar; 5 = >% 75 tübüler hasar. En

az 250 tübül değerlendirildi. İnterstisyel fibrozis Masson trikrom boyası ile boyanarak değerlendirildi. 0 = normal interstisyum; 1 = tübüller arası interstisyumu ılımlı genişleten ılımlı fibrozis; 2 = tübüller arası interstisyumu orta derecede genişleten orta derecede fibrozis; 3=tbller arası interstisyumu ciddi şekilde genişleten ciddi fibrozis

3.6. İstatistiksel inceleme

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS for windows 15.0 istatistik paket programı kullanıldı. Üre, kreatinin ve histopatolojik parametreler median olarak verildi. Gruplar arası biyokimyasal ve histopatolojik faklılığın belirlenmesinde ANOVA ve post-hoc multiple komparison test (LSD) kullanıldı. Veriler ortalama \pm Standart hata (SH) olarak verildi. $P<0,05$ istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi.

4. SONUÇLAR

4.1. Histopatolojik Bulgular

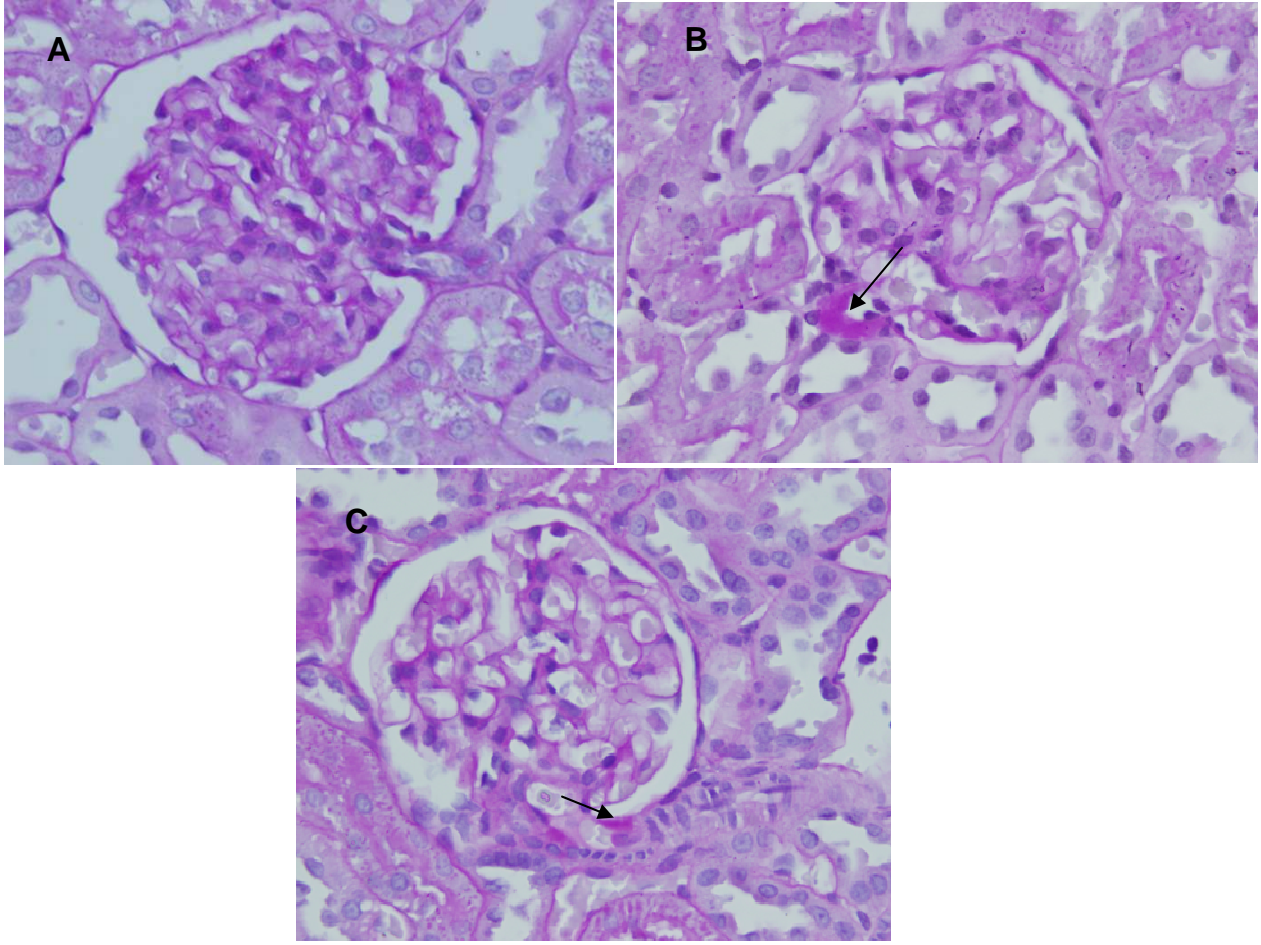
Kontrol, CsA alan grup ve CsA+erdosteine grubunda tübüler injuri, interstisyel fibrozis ve arteriolopati derecelendirmesi tablo 3' de verilmiştir.

Tablo 3. Kontrol, CsA alan grup ve CsA+erdosteine grubunda tübüler hasar, interstisyel fibrozis ve arteriolopatinin derecelendirmesi.

Gruplar	Tübüler hasar	İnterstisyel fibrozis	ArterioloPATI (en/100)
I-Kontrol (n=8)	0.500 [0.00-1.00]	0.000 [0.00-0.00]	3.875 [2.00-5.00]
II-CsA (n=8)	2.500 [2.00-3.00]	1.750 [1.00-3.00]	24.750[23.00-29.00]
III- Erd (n=8)	0.500 [0.00-1.00]	0.000 [0.00-0.00]	5.500 [4.00-7.00]
IV- CsA+Erd (n=8)	1.375 [1.00-2.00]	1.125 [0.00-2.00]	15.750[10.00-21.00]
P değerleri			
I-II	0.0001	0.0001	0.0001
I-III	A.D.	A.D.	A.D.
I-IV	0.003	0.0001	0.0001
II-III	0.0001	0.0001	0.0001
II-IV	0.0001	0.03	0.0001
III-IV	0.003	0.0001	0.0001

Ortalama [Minimum-Maximum], A.D.; anlamlı değil, en; etkilenen glomerul sayısı

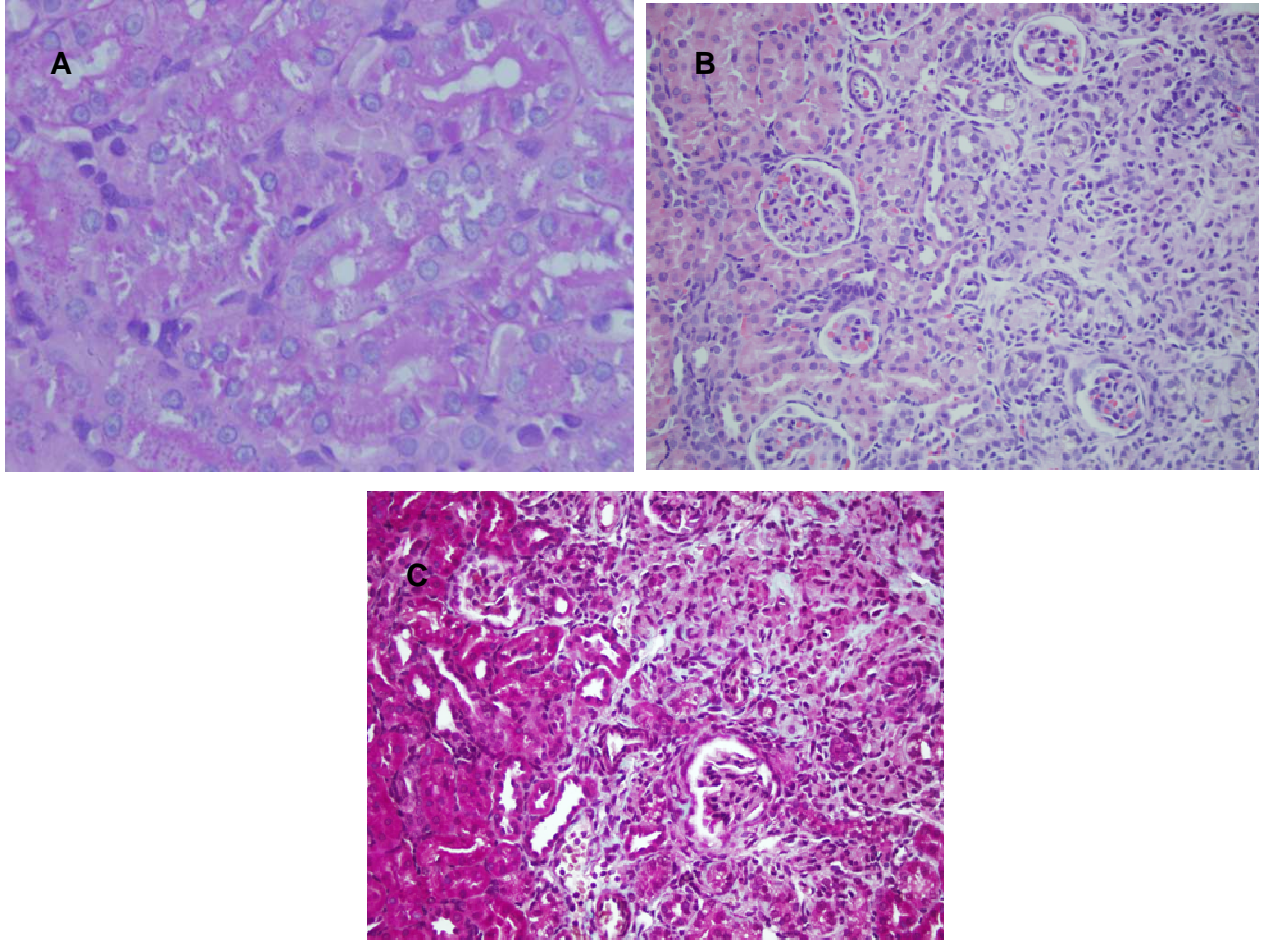
Kontrol grubu ve erdosteine grubu olarak alınan ratlara ait böbrek doku kesitlerinin histolojik incelenmesinde, bu organa has normal histolojik yapılar dışında herhangi bir bulguya rastlanmamıştır (şekil 5).



Şekil 5. Işık mikroskopisinde afferent arteriopatide. (A) Normal glomerulus. PAS X 1000 (B) CsA grubunda tipik PAS-pozitif granüler materyal birikimi PAS X 1000 (C) Erdosteine+CsA grubunda arteriopatide belirgin azalma PAS X 1000.

CsA verilen gruptaki ratların böbrek doku kesitleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında histolojik olarak kronik siklosporin nefrotoksisitesine ait tipik değişiklikler gözlemlendi. Bu değişiklikler afferent arteriopatide, interstisyumda band tarzında fibrozis, tübül atrofisi ve fokal inflamatuvar hücre artışı şeklindeydi. Afferent arteriollerde hücre sitoplazmalarında genişleme, terminal arterioller düz kas hücrelerinde eozinofilik, granüler, PAS-pozitif sirküler ve inci tanesi şeklinde hyalin depolanması görüldü. (şekil 10). Semikantitatif skorlama sistemimize göre arteriopatide CsA grubunda kontrol grubundan anlamlı olarak daha fazlaydı ($p=0.0001$). Glomerul ve tübüllerin hemen hemen tamamının CsA'dan etkilenmiş olduğu görüldü. Distal ve özellikle proksimal tübüllerin parankim hücre sitoplazmasında, artmış

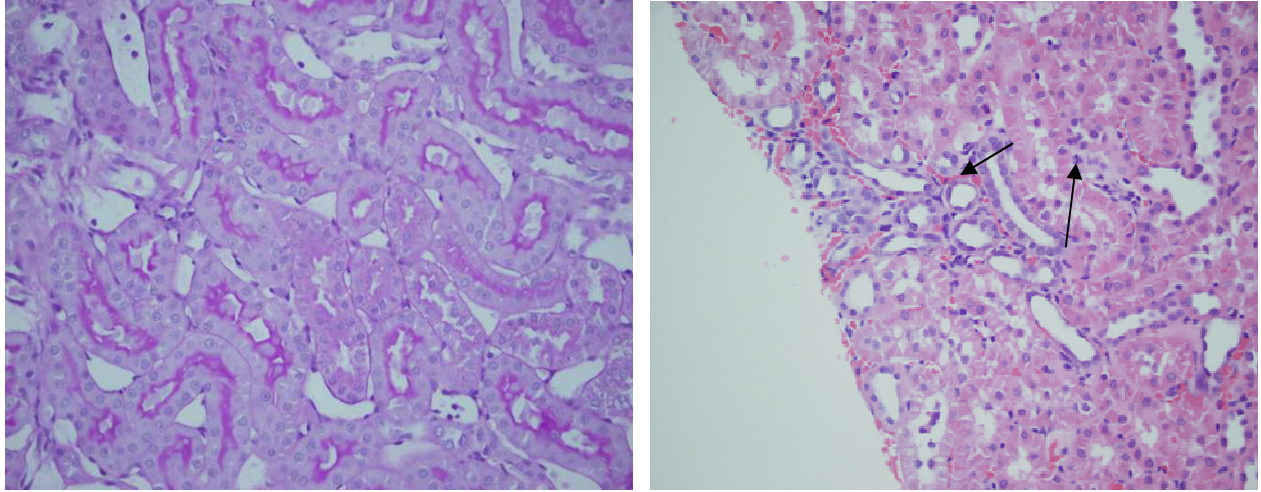
vakuoler dejenerasyonlar nedeniyle köpüğümsü görünümüler belirgindi. PAS-pozitif globuler depolanmalar, proksimal tübülde fırçamsı kenar kaybı ve desquamasyon görüldü. Subkapsüler korteksten medullaya doğru daralma ve genişlemeler gösteren band şeklinde interstisyel fibrozis, inflamatuvar hücre birikimiyle birlikte tübüler atrofi aşıkardı (Şekil 6).



Şekil 6. CsA alan grupta ışık mikroskopi bulguları. (A) Sitoplazmik vakuolizasyonla giden şiddetli proksimal tübül hücre hasarı, PAS-pozitif globüler depolanma, fırçamsı kenar kaybı ve desquamasyon. PAS X 1000. (B-C) Tipik interstisyel fibrozis, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve tübüler atrofi. HE (B) and Masson trikrom (C) X 400

CsA ile birlikte erdostein verdiğimiz rat grubunun böbrek dokusu histolojik olarak incelendiğinde; CsA uygulaması sonucunda oluşan yapısal değişikliklerin azaldığı görüldü.

Proksimal tübüler dejeneratif değişiklikler ve interstisyel fibrozis infiltrasyon alanları azalmış olup, peritübüler kapiller konjesyon sınırlıydı. Mononükleer hücre infiltrasyonu belirgin olarak azalmıştı (şekil 7).



Şekil 7. CsA+erdosteine alan grupta ışık mikroskopik bulgular. (A) Orta derecede proksimal tübül hücre hasarı. PAS X 400 (B) Çok az subkapsüler interstisyel fibrozis ile birlikte az atrofik tübüller ve mononükleer hücreler. HE X 400

CsA+ Erdosteine grubunda CsA grubuna göre arteriolopati ($p= 0.0001$), tübüler hasar ($p=0.03$) ve interstisyel fibrozis ($p=0.0001$) açısından anlamlı olarak düzelme saptanmıştır.

4.2. Enzim aktivitesi sonuçları

Tüm gruplarda süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), nitrik oksit (NO) ve malondialdehid (MDA) sonuçları ve gruplar arasındaki istatistiksel fark tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4: Kontrol, CsA, CsA+Erdostein gruplarındaki böbrek doku enzim aktiviteleri [Superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px)] ve malondialdehid (MDA) ve nitrik oksit (NO) seviyeleri.

Gruplar	SOD (U/mg protein)	CAT (k/g protein)	GSH-Px (U/g protein)	MDA (nmol/g protein)	NO (mikro mol / g protein)
I-Kontrol (n=8)	0.377 ± 0.012	22.89 ± 0.70	1.716 ± 0.029	11.49 ± 0.30	0.134 ± 0.004
II-CsA (n=8)	0.406 ± 0.009	12.99 ± 0.43	1.294 ± 0.019	16.00 ± 0.17	0.213 ± 0.005
III-Erd (n=8)	0.376 ± 0.010	23.52 ± 0.81	1.627 ± 0.026	11.77 ± 0.06	0.145 ± 0.003
IV-CsA+Erd (n=8)	0.376 ± 0.012	15.98 ± 0.85	1.699 ± 0.028	12.30 ± 0.19	0.139 ± 0.004
P değerleri					
I-II	A.D.	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
I-III	A.D.	A.D.	0.023	A.D.	A.D.
I-IV	A.D.	0.0001	A.D.	0.007	A.D.
II-III	A.D.	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
II-IV	A.D.	0.006	0.0001	0.0001	0.0001
III-IV	A.D.	0.0001	A.D.	A.D.	A.D.

A.D. anlamlı değil. Ortalama ± Standart hata

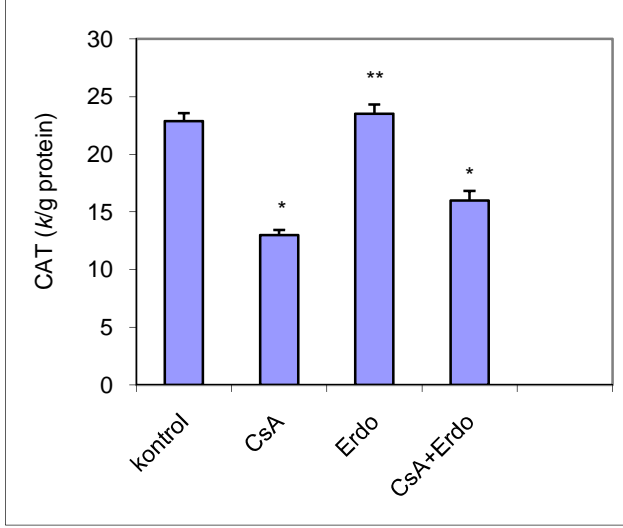
Serum SOD, CAT, MDA ve NO seviyeleri erdostein grubu ile kontrol grubu arasında benzerdir.

4.2.1. Doku SOD aktivitesi ölçüm sonuçları:

CsA alan ratlarda SOD enzim düzeylerinde artış oluken bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 4).

4.2.2. Doku CAT aktivite ölçüm sonuçları:

CsA verilen ratlarda CAT seviyesi belirgin olarak düşmüş olup erdosteinele birlikte CsA alan ratlarda bu seviye anlamlı olarak artmıştı ($p=0.0001$) (şekil 8).



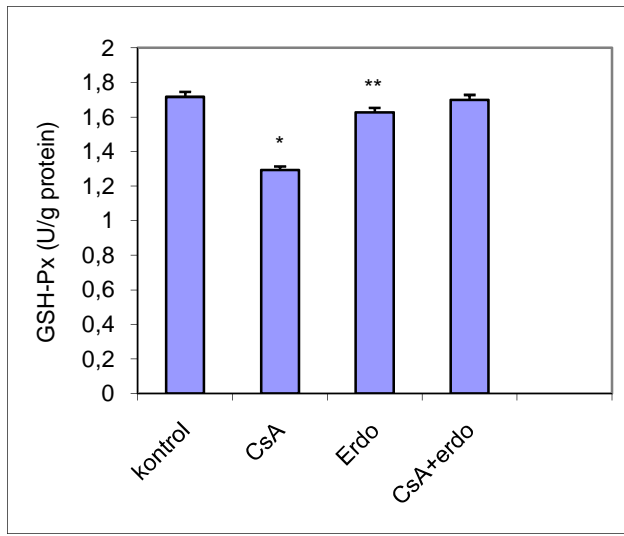
Şekil 8. CsA verilen ratlarla CsA+erdosteine alan ratlarda glomeruler CAT aktivite karşılaştırılması. CAT: Katalaz; CsA: Siklosporin; Erdo: Erdosteine; Ortalama \pm Standart hata

* $p < 0.05$ diğer gruplarla karşılaştırıldığında

** $p = 0.001$ CsA ve CsA+erdosteine grubuyla karşılaştırıldığında

4.2.3. Doku GSH-Px aktivite sonuçları:

CsA alan ratlarda doku GSH-Px enzim aktivitesinde belirgin olarak azalma varken, CsA+erdosteine alan ratlarda sadece CsA ratlarla karşılaştırıldığında bu antioksidan enzim seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış vardı ($p=0.0001$). Üstelik bu artış kontrol GSH-Px seviyelerine yakın hale gelmesini sağlamıştır (şekil 9).



Şekil 9. CsA verilen ratlarla CsA+erdosteine alan ratlarda glomeruler GSH-Px aktivite karşılaştırılması. GSH-Px: Glutasyon peroksidaz; CsA: Siklosporin; Erdo: Erdosteine; Ortalama \pm Standart hata

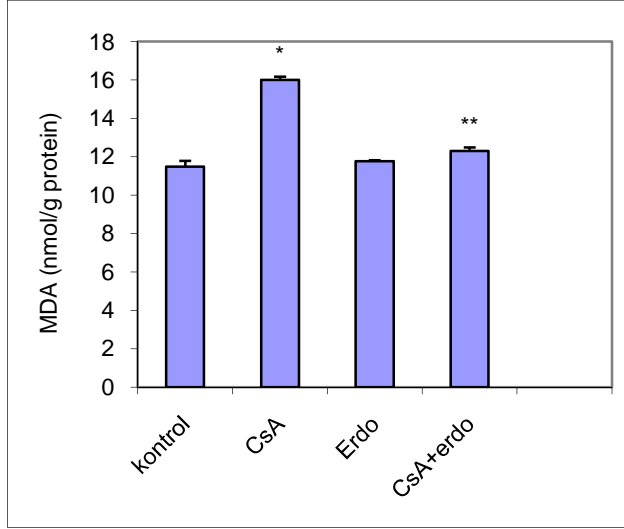
* $p=0.0001$ diğer gruplarla karşılaştırıldığında

** $p<0.05$ kontrol ve CsA grubuyla karşılaştırıldığında

4.2.4. Doku MDA Düzeyleri:

CsA alan ratlarda doku MDA seviyelerinde anlamlı artışlar tespit edildi ($p=0.0001$).

Erdosteinin MDA'daki CsA'ya bağlı artışı anlamlı olarak azalttığı görüldü ($p=0.0001$, şekil 10).



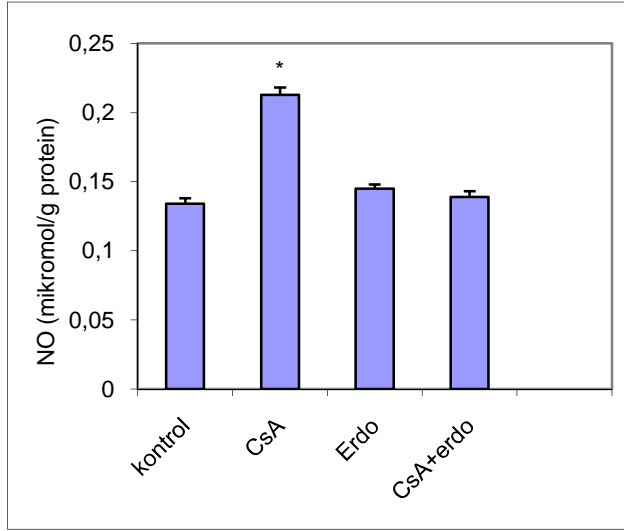
Şekil 10. CsA verilen ratlarla CsA+erdosteine alan ratlarda glomeruler MDA karşılaştırılması.

MDA: Malondialdehid; CsA: Siklosporin; Erdo: Erdosteine; Ortalama \pm Standart hata

* $p=0.0001$ diğer gruplarla karşılaştırıldığında

** $p<0.05$ Kontrol ve CsA grubuyla karşılaştırıldığında

4.2.4. Doku NO Düzeyleri:



Şekil 11. CsA verilen ratlarla CsA+erdostein alan ratlarda glomeruler NO karşılaştırılması.

NO: Nitrik oksid; CsA: Siklosporin; Erdo: Erdostein; Ortalama \pm Standart hata

* $p=0.0001$ diğer gruplarla karşılaştırıldığında

5. TARTIŞMA

Bir immünsüpresif olan CsA 1976 yılında bulunduğundan bu yana immünolojik pek çok hastalıkta ve transplant hastalarında önemli kullanım alanına sahip bir ajandır. Nefrotoksisite, kullanımını sınırlayan başlıca yan etkisidir. Renal hastalığı olmayan kardiyak transplantasyon hastalarında azotiopürin alan hastalarla karşılaştırıldığında 7.4 mg/kg/gün gibi düşük dozlarda bile, bir yılın üzerinde kullanıldığında inülin klirensi %45 ve PAH klirensi %33 daha düşük bulunmuştur (64).

Nefrotoksisite mekanizması tam olarak açıklığa kavuşmamakla birlikte reaktif oksijen ürünlerinin patogeneze rol oynadığı aşikardır. Pekçok çalışmada böbrekte ROS, tromboksan ve lipid peroksidasyon ürünlerini artırarak renal yetmezliğe yol açtığı gösterilmiştir.

CsA tedavisi ile ROS üretiminin artışına dair çeşitli hipotezler vardır; I) Sitokrom p-450'nin upregülasyonu II) Vazodilatasyon ve vazokonstriksiyon arasındaki dengenin bozulmasına

bağlı tübüler hipoksi-reoksijenasyon III) Renal TXA₂ üretiminde artış IV) Nitrik oksid üretimindeki değişiklikler (65-68).

Yapılan çalışmalarda CsA tedavisinin doz ve zamana bağlı olarak ROS ve TX sentezini dolayısıyla renal fonksiyon bozukluğunu artırdığı görülmüştür (69).

Dahası CsA, superoksid anyonların, hidrojen peroksid ve TX B₂'nin glomeruler sentezini artırmaktadır. CsA ile inkübe edilmiş insan mezenşimal hücre kültürlerinde kontrollere göre hidrojen peroksid sentezinde anlamlı artış görülmüştür (70).

CsA'nın reaktif oksijen ürünlerini ve lipid peroksidasyonunu artırarak hücrel oksidatif dengeyi bozduğu ve direkt olarak nefrotoksik, hepatotoksik ve kardiyotoksik olduğu bilinmektedir. Pekçok invivo ve invitro çalışmada CsA'nın böbrekte ROS, tromboksan (TX) ve lipid peroksidasyon ürünlerini (malondialehid gibi) artırarak glomeruler filtrasyon hızını (GFR) azalttığı gösterilmiştir (66,69,71-73).

Artan serbest radikaller pek çok intraselüler moleküllerle (fosfolipid, glikolipid, gliserid, steroller gibi) reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu ve membran poliansature yağ asitlerinin hasarını artırarak iyonik gradiyenti ve membran geçirgenliğini artırır. Dolayısıyla çeşitli membran fonksiyonlarını ve metabolik süreçleri bozar. ROS'lerinin sentezindeki değişiklikler irreverzibl hücre hasarına neden olabilir (74). CsA çok lipofilik bir bileşik olup hücrel zar yapılarına kolaylıkla bağlanabilir. Zarlar ve özellikle endoplazmik retikulum zarları fazla miktarda doymamış yağ asitleri içermeleri nedeniyle peroksidatif hasara karşı çok duyarlıdır (39). Bunun yanısıra zarlar geniş yüzey alanına sahip olduğu için oksidatif atağa maruz kalma olasılığı da sıktır (75).

Membran enzimi olan fosfolipaz A₂ okside olmuş yağ asitlerini metabolize ederek araşidonik asit ve eikosanoidlerin sentezini başlatır. Araşidonik asit metabolizmasında yer alan lipooksijenaz, siklooksijenaz gibi çeşitli enzimler serbest oksijen radikallerinin üretimine neden olur. Bu süreçte malondialdehid (MDA) üretilir. Lipid peroksidasyonun en önemli

ürünü MDA'dır. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur (61).

Endotelial NO üretimi vazodilatasyonun temelidir ve vazokonstriksiyona karşı temel koruyucu faktör olduğu bilinmektedir. Ancak son çalışmalarda akut böbrek yetmezliği patofizyolojisinde NO'nun rolü tartışılmaktadır. Peresleni ve arkadaşları epitelyal hücrelerdeki oksidan stresin NO ve nitrit sentezini artırarak hücre yaşamını azalttığını göstermişlerdir (76). NO üretimine bağlı sitotoksik etkinin nedeni diğer süperoksidlerin de etkisiyle hücrelerde NO metabolitlerinin ve peroksinitritlerin (ONOO⁻) artışı olabilir. Bizim çalışmamızda da CsA verilen ratlarda NO seviyelerinde artış tespit edildi ve tedaviye erdostein eklenen ratlarda ise bu artışın anlamlı olarak az olduğu görüldü.

Oksidatif stresin insandaki böbrek fonksiyonları üzerindeki etkisini göstermek zor olsa da Rabl ve arkadaşlarının böbrek alıcılarında yaptığı bir çalışmada çeşitli antioksidanların reperfüzyondan yarım saat önce (Vit C, Vit E, pro-vitamin A, Vitamin B1, Vitamin B2, niasin and pantotenat) intravenöz uygulaması ile tedavi verilmeyen hastalara göre serum MDA seviyelerini azaltarak plazma kreatininde daha erken düşüş sağladığı bulunmuştur (77).

Diğer bir klinik çalışmada 16 hafta boyunca CsA alan hastalarda tedavinin azotiopürinle değiştirilmesinden sonra okside LDL seviyelerinin düştüğü görülmüş ve CsA'nın LDL'yi oksidasyona daha duyarlı hale getirdiği tespit edilmiştir (78).

Oksidatif stres greft rejeksiyon patogenezinde de etkilidir. CsA ve steroidle tedavi edilen transplant hastalarında yapılan bir çalışmada rejeksiyona giden hastalarda oksidatif stres markırları daha yüksek bulunmuştur (MDA seviyelerinde artış, eritrosit alfa tokoferol ve SOD seviyelerinde azalma). Bütün bu bulgular böbrek rejeksiyonundaki vasküler lezyon gelişiminde oksidatif stresin de etkili olduğunu göstermektedir (79). Bizim çalışmamızda da

CsA tedavisine bağlı MDA'da anlamlı bir artış ve tedaviye erdostein eklenmesi ile de düzelme görölmüştür.

ROS'i fazla üretilirse antioksidan enzimler tarafından detoksifiye edilemez. Bununla birlikte antioksidan tedavi, endojen antioksidanların detoksifiye edemediği ROS'nin toksik etkisini engeller (80). Organizmada serbest radikalleri nötralize eden pek çok antioksidan mekanizma vardır. CsA ile tedavi edilen ratların böbreklerinde SOD, GsHPx, CAT gibi çeşitli antioksidan enzimlerin (ki bunların hücrede serbest radikal ve ROS metabolizasyonunda önemli rolleri vardır; peroksitlerin ve süperoksidin toksik olmayan türlerini katalizleyerek serbest oksijen radikali hasarını azaltırlar) tedavi boyunca anlamlı değişiklikler tespit edilmiştir. Ancak bu artışa rağmen CsA'ya bağlı ROS artışı nötralize edilememektedir (81). Bizim çalışmamızda da SOD aktivitesinde anlamlı değişiklik olmamasına rağmen GsHPx, CAT seviyelerinde CsA tedavisine bağlı azalma ve tedaviye erdostein eklenen grupta ise bu azalmada anlamlı bir düzelme tespit edilmiştir.

Antioksidan defans mekanizmaları enzimatik antioksidanlar (siklooksijenaz, süperoksid dismutaz, glutasyon peroksidaz ve katalaz) ve nonenzimatik antioksidanlar (tokoferol, karotenoidler, askorbik asid, poliaminler, melatonin, NADPH, adenzin, koenzim Q-10, urat, polifenoller, flavonoidler, fitoöstrojenler, sistein, homosistein, taurin, metionin, vb.) serbest radikalleri nötralize edebilirler. Oksidatif stres antioksidan defans tarafından karşılanamazsa lipid peroksidasyonu başlar (82).

Antioksidanların (vit E, C vb) alınması CsA'nın böbrek üzerindeki etkilerini kısmen nötralize edebilir. Antioksidanlar ROS, TX sentezi ve lipid peroksidasyon sürecini inhibe ederler. Antioksidanların CsA'ya bağlı renal fonksiyonlar ve histolojik hasar üzerinde iyileştirici etkisi de vardır. CsA'nın renal etkileri üzerinde eksojen antioksidanların rollerine dair çok geniş çalışmalar yapılmıştır. Durak ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Vit E (100 mg/kg/gün) ve vit C'nin (200 mg/kg/gün) CsA'ya bağlı histolojik hasarı düzelttiği ve

oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan TBARS'ı (Thiobarbituric acid reactive substances) ve antioksidan enzimlerden CAT ve GSH-Px aktivitesini artırdığı bulunmuştur (83). Başka bir çalışmada ise N-asetil sisteinle birlikte verildiğinde CsA'ya bağlı histolojik değişiklikleri azalttığı ve lipid hidroperoksid, konjugat dien ve glutatyon gibi oksidatif stres markırlarında iyileşme sağladığı görülmüştür (84). Bizim çalışmamızda da CsA verilen gruptaki ratların böbrek doku kesitleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında histolojik olarak kronik siklosporin nefrotoksisitesine ait tipik değişiklikler gözlemlendi. Bu değişiklikler afferent arteriolopati, interstisyumda band tarzında fibrozis, tübüler atrofi ve fokal inflamatuvar hücre artışı şeklindeydi. Afferent arteriollerde hücre sitoplazmalarında genişleme, terminal arterioller düz kas hücrelerinde eozinofilik, granüler, PAS-pozitif sirküler ve inci tanesi şeklinde hyalin depolanması görüldü. CsA ile birlikte erdostein verdiğimiz rat grubunun böbrek dokusu histolojik olarak incelendiğinde; CsA uygulaması sonucunda oluşan yapısal değişikliklerin azaldığı görüldü.

Proksimal tübüler dejeneratif değişiklikler ve interstisyel fibrozis infiltrasyon alanları azalmış olup, peritübüler kapiler konjesyon sınırlıydı. Mononükleer hücre infiltrasyonu belirgin olarak azalmıştı.

Ayrıca kalsiyum antagonistlerinin CsA nefrotoksisitesi üzerinde faydalı olduğuna dair çalışmalar da vardır (85,86).

Başka bir çalışmada antioksidan bir molekül olan melatonin verilmesi ile CsA'ya bağlı renal yetmezlikte iyileşme sağladığı, mikrokalsifikasyonu önlediği görülmüştür (87). Diğer çeşitli çalışmalar da antioksidanların CsA'nın toksik etkileri üzerinde faydalı olduğunu göstermiştir (81,88).

Erdostein [*N*-(carboxymethylthioacetyl)-homocysteine thiolactone] kronik pulmoner hastalıklarda 10 yıldan fazladır kullanılan mukolitik, ekspektoran anti-inflamatuvar bir

ajandır. Mukus viskozitesini ve trakeobronşial klirensi artırmasının dışında hepatik metabolizasyonu sonrasında suphidril grup blokajı ile serbest radikal savıcı ve antioksidan aktivite özelliği kazanır (89).

Oksidatif stres artışına bağlı çeşitli organ hasarlarına karşı erdosteinin koruyucu etkisini gösteren deneysel çalışmaların bazıları tablo 5’de özetlenmiştir (90).

Tablo 5. Erdosteinin oksidatif stres yoluyla oluşan ilaçlara bağlı doku hasarı üzerinde protektif etkisini gösteren bazı çalışmalar.

Araştırma konusu	Dozaj	Sonuçlar						
		SOD	CAT	GSH-Px	NO	XO	TBARS/MDA	Işık mikroskopi
Doxorubisin kardiyak toksisite	10 mg/ kg/ gün oral, rat	–	↑	↑	↓	↓	↓	Dokuda protektif etki
Sisplatin hepatik toksisite	50 mg/ kg/ gün oral, rat	↑	↑	↑	↓		↓	Dokuda protektif etki
Sisplatin nefrotoksitesisi	7–75 mg/kg/ gün oral, rat	↑	↑	↑	↓	↓	↓	Dokuda protektif etki
Paracetamol nefrotoksitesisi	150 mg/kg/ gün oral, rat	–	↑	↑	↓		↓	Dokuda protektif etki
Vankomisin nefrotoksitesisi	10 mg/kg/ gün oral, rat	↑	–				↓	Dokuda protektif etki
Renal iskemi/reperfüzyon hasarı	10 mg/kg/ gün oral, rat	↑	↑			↓	↓	Dokuda protektif etki

Süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), nitrik oksid (NO), ksantin oksidaz (XO), tiobarbitürik asid reaktif substans (TBARS), malondialdehid (MDA).

Literatürde erdosteinin CsA nefrotoksitesisi üzerine koruyucu etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bizim çalışmamızda CsA kullanımına bağlı antioksidan enzimlerden CAT, GSH-Px düzeylerinde azalma ve bir lipid peroksidasyon ürünü olan

MDA'daki artışta tedaviye erdostein eklenmesiyle düzelme tespit edilmiş, ayrıca böbrek dokularının histopatolojik incelemelerinde de belirgin iyileşmeler olduğu tespit edilmiştir.

6. SONUÇ

Özet olarak CsA'nın renal disfonksiyona sebep olduğu çok iyi bilinmektedir. Nefrotoksisite mekanizması tam olarak anlaşılammakla birlikte yapılan çalışmalarda mezenşial ve glomeruler ROS sentezini, lipid peroksidasyonunu artırarak bu sürece katkıda bulunduğu ispatlanmıştır. Bir egzojen antioksidan olan erdostein CsA'nın glomeruler ROS üretimi ve lipid peroksidasyonu üzerindeki etkisini azaltarak nefrotoksik etkilerini geri döndürebilir ve kronik CsA nefrotoksisitesini önlemede alternatif bir tedavi olabilir. Ancak daha çok hayvan ve insan çalışmalarına ihtiyaç vardır.

7. ABSTRACT

Background:

Cyclosporine (CsA) is an immunosuppressive agent used after solid organ transplantation, but its clinical use is limited by side effects, include nephrotoxicity, hypertension, cardiotoxicity, hepatotoxicity. The use of antioxidants reduces the adverse effects of CsA. The aim of this study is to determine the protective effects of erdosteine on CsA-induced nephrotoxicity.

Methods and results:

We investigated in rats for detecting the protective role of erdosteine and evaluated CsA-induced kidney damage using oxidative markers (SOD, CAT, GSH-Px, MDA, NO and PC levels), and the morphology of the renal tissue using light microscopy.

The rats were randomly allotted into one of the four experimental groups:

CsA nephrotoxicity was induced by administering an oral dose of 15mg/kg CsA daily for 21 days. The rats were divided into four groups: control (n=8), CsA (15mg/kg, n=8), erdosteine (10mg/kg day orally erdosteine, n=8), CsA+erdosteine (n=8) administrated group.

The results of our study showed that the activities of glutathione peroxidase (GSH-Px) were higher in CsA plus erdosteine group than CsA group and the levels of MDA, NO were lower in CsA plus erdosteine group than CsA group. Histological parameters significantly improved with erdosteine administration.

Conclusions: Erdosteine may protect against the CsA induced nephrotoxicity by reducing oxidative stress.

8. ÖZET

Çalışmamızda siklosporin nefrotoksisitesine karşı erdoesteinin koruyucu etkisini araştırdık.

Çalışmaya 32 adet Wistar tipi albino rat aldık ve randomize olarak 4 eşit gruba ayırdık. 21 gün boyunca oral gavajla bir gruba CsA (15 mg/kg), bir gruba erdoestein (10mg/kg), diğer gruba CsA+erdoestein ve kontrol grubuna da ayçiçeği yağı (2 ml/gün) verdik. 21 günün sonunda genel anestezi altında ratların böbreklerini çıkartarak biyokimyasal olarak dokularda oksidatif markırları, histopatolojik olarak da CsA nın renal dokuda yaptığı hasara karşı erdoesteinin nefroprotektif etkisine baktık.

Çalışmamızın sonunda CsA verilen ratlarda CAT ve GSH-Px seviyelerinde anlamlı azalma ve MDA ve NO seviyelerinde anlamlı artış tespit edilirken tedaviye erdoestein ilavesi ile bu artışlarda belirgin azalma tespit edildi. Histolojik olarak da CsA'nın oluşturduğu interstisyel fibrozis, arteriolopati ve tübüler hasar üzerinde istatistiksel olarak anlamlı derecelerde düzelme sağladığı görüldü.

Bir egzojen antioksidan olan erdoestein CsA'nın glomeruler ROS üretimi ve lipid peroksidasyonu üzerindeki etkisini azaltarak nefrotoksik etkilerini geri döndürebilir ve kronik CsA nefrotoksisitesini önlemede alternatif bir tedavi olabilir. Ancak daha çok hayvan ve insan çalışmalarına ihtiyaç vardır.

9. KAYNAKLAR

1. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, et al. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: Longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation*. 2004;78: 557-565.
2. Türkmen A. İmmünosüpresif Tedavi Protokollerinde Kalsinörin inhibitörleri ve Kortikosteroidlerin Azaltılması ya da Tedaviden Çekilmesi. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*. 2008;17 (Ek / Supplement 1) 29-32
3. Dos Santos OF, Boim MA, Barros EJ, et al. Nephrotoxicity of cyclosporine: the role of platelet activating factor and thromboxane. *Lipids* 1991;26:1320-1323.
4. Perico N, Zoja C, Benigni A, et al. Effect of short-term cyclosporine administration in rats on renin-angiotensin and thromboxane A2: possible relevance to the reduction in glomerular filtration rate. *J Pharmacol Exp Ther* 1986;239 (1): 229-235.
5. Rezzani R. Exploring cyclosporine A-side effects and the protective role-played by antioxidants: the morphological and immunohistochemical studies. *Histol Histopathol* 2006;21: 301-316.
6. Pérez de Lema G, Arribas-Gómez I, Ruiz-Gines JA, et al. Reactive oxygen species mediate the effects of cyclosporine A on human cultured mesangial cells. *Transplant Proc* 1997;29 (1-2): 1241-1243.
7. Merville P. Combating chronic renal allograft dysfunction: optimal immunosuppressive regimens. *Drugs* 2005: 65: 615-631.
8. Bennett WM, Norman DJ. Action and toxicity of cyclosporine. *Ann Rev Med* 1986; 37:215-224.
9. Ayna TK, Çiftçi HŞ, Tozkır H ve ark. İmmünosüpresif İlaçların Etki Mekanizmaları. *Gaziantep Tıp Dergisi* 2009;15(3):42-47.
10. de Jonge H, Kuypers DR. Pharmacogenetics in solid organ transplantation: current status and future directions. *Transplant Rev (Orlando)*. 2008;22(1):6-20.

11. Duncan N, Craddock C. Optimizing the use of cyclosporin in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2006;38(3):169-174.
12. Hayashi T, Saito N, Shoji T, Togawa M, Okada N, Tsubakihara Y. Cyclosporin A mono-therapy in nephrotic syndrome with contra-indication of steroid therapy. *Intern Med.* 1999;38(3):272-275.
13. Zhang C, Zhang J, Yang B, Wu C. Cyclosporin A inhibits the production of IL-17 by memory Th17 cells from healthy individuals and patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine.* 2008;42(3):345-352.
14. Madan V, Griffiths CE. Systemic ciclosporin and tacrolimus in dermatology. *Dermatol Ther.* 2007;20(4):239-250.
15. Díaz-Llopis M, Gallego-Pinazo R, García-Delpech S, Salom-Alonso D. General principles for the treatment of non-infectious uveitis. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2009;8(4):260-265.
16. Donnenfeld E, Pflugfelder SC. Topical ophthalmic cyclosporine: pharmacology and clinical uses. *Surv Ophthalmol.* 2009;54(3):321-338.
17. Czaja AJ. Progress in the diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. *Minerva Med.* 2008;99(6):549-568.
18. Levy GA: Long-term immunosuppression and drug interactions. *Liver Transplantation* 2001; 7:53-59.
19. Cohen E, Kramer M, Maoz C, Ben-Dayana D, Garty M: Cyclosporine drug-interaction-induced rhabdomyolysis. a report of two cases in lung transplant recipients. *Clin Transplant* 2000; 70:119–122.
20. Vella JP, Sayegh MH: Interactions between cyclosporine and newer antidepressant medications. *Am J Kidney Diseases* 1998; 31:320–323.

21. Lill J, Bauer LA, Horn JR, Hansten PD: Cyclosporine-drug interactions and the influence of patient age. *Am J Health Syst Pharm* 2000; 57:1579–1584.
22. Ruschitzka F, Meier PJ, Turina M, Luscher TF, Noll G: Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. *Lancet* 2000; 355: 548–549.
23. Magee CC, Pascual M. Update in Renal Transplantation. *Arch Intern Med.* 2004;164:1373-1388.
24. Ghanem H, van den Dorpel MA, Weimar W, et al. Increased low density lipoprotein oxidation in stable kidney transplant recipients. *Kidney Int.* 1996;49,488-493.
25. Lo A. Immunosuppression and metabolic syndrome in renal transplant recipients. *Metab Syndr Relat Disord.* 2004; 2: 263-273.
26. Bozkaya G, Nart A, Uslu A ve ark. Impact of calcineurin inhibitors on bone metabolism in primary kidney transplant recipients. *Transplant Proc.* 2008;40: 151-155.
27. Magnasco A, Rossi A, Catarsi P, e al. Cyclosporin and organ specific toxicity: clinical aspects, pharmacogenetics and prospectives. *Curr Clin Pharmacol.* 2008; 3: 166-173.
28. Meneghin A, Hogaboam CM. Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis. *J Clin Invest.* 2007; 117: 530-538.
29. Hood KA. Drug-induced gingival hyperplasia in transplant recipients. *Prog Transplant.* 2002;12(1):17-21.
30. Vergoulas G, Eleftheriadis T, Avdelidou A, et al. Body dysmorphic disorder due to hirsutism in a patient treated with cyclosporin. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20(2):473.

31. Tredger JM, Brown NW, Dhawan A Calcineurin inhibitor sparing in paediatric solid organ transplantation: managing the efficacy/toxicity conundrum. *Drugs*. 2008;68(10):1385-1414. Review.
32. Baczkowska T, Durlik M. Calcineurin inhibitor sparing immunosuppressive regimens in kidney allograft recipients *Pol Arch Med Wewn*. 2009;119(5):318-325.
33. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4: 481–508.
34. Baczkowska T, Durlik M.. Calcineurin inhibitor sparing immunosuppressive regimens in kidney allograft recipients. *Pol Arch Med Wewn*. 2009;119(5): 318-325.
35. O’Grady JG, Burroughs A, Hardy P, Elbourne D, Truesdale A: Tacrolimus versus microemulsified ciclosporin in liver transplantation: The TMC randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360: 1119–1125.
36. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(2):481-508. Review.
37. Parra Cid T, Conejo García JR, Carballo Alvarez F, de Arriba G. Antioxidant nutrients protect against cyclosporine A nephrotoxicity. *Toxicology*. 2003;15;189:99-111. Review
38. Burdmann EA, Andoh TF, Yu L, Bennett WM: Cyclosporine nephrotoxicity. *Semin Nephrol* 2003;23: 465–476.
39. Inselmann G, Blank M, Baumann K. Cyclosporin induced lipid peroxidation in microsomes of rat kidney. *Res. Commun. Chem Pathol Pharmacol*. 1988;62:207-220.
40. Wu M, Yu H, Yang C, Bens M, Huang C, Ko Y, Vandewalle A. Cyclosporine and tacrolimus alter renin-angiotensin system in mouse medullary-thick ascending limb cultured cells. *Transplant Proc*. 2001;33(1-2):1078-1079.

41. Olyaei AJ, de Mattos AM, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: new insight and preventive strategies. *Curr Opin Crit Care* 2001;7:384-389.
42. Liptak P, Ivanyi B. Primer: histopathology of calcineurin-inhibitor toxicity in renal allografts *Nat Clin Pract Nephrol*. 2006;2(7):398-404.
43. Stacchiotti A, Rezzani R, Angoscini P, Corsetti G, Bianchi R: Distribution of heat shock proteins in kidneys of rats after immunosuppressive treatment with cyclosporine A. *Acta Histochem* 2001;103:167–177.
44. Ponticelli C: De novo thrombotic microangiopathy. An underrated complication of renal transplantation. *Clin Nephrol*.2007;67:335–340.
45. Nankivell B, Richard J, Borrows R, et al. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349: 2326–2333.
46. Morozumi K, Thiel G, Albert FW, et al. Studies on morphological outcome of cyclosporine- associated arteriopathy after discontinuation of cyclosporine in renal allografts. *Clin Nephrol* 1992;38: 1–8.
47. Djamali A: Oxidative stress as a common pathway to chronic tubulointerstitial injury in kidney allografts. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293: 445–455.
48. Border WA, Noble NA: Interactions of transforming growth factor-beta and angiotensin II in renal fibrosis. *N Hypertension*. 1998 ;31:181-188.
49. Liu Y. Renal fibrosis: new insight into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int*. 2006; 69: 213-217.
50. Remuzzi G, Cattaneo D, Perico N: The aggravating mechanisms of aldosterone on kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2008;19: 1459–1462.
51. Perez-Rojas J, Blanco JA, Cruz C, et al. Mineralocorticoid receptor blockade confers renoprotection in pre-existing chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 292: 131-139.

52. Heering PJ, Klein-Vehne N, Fehsel K: Decreased mineralocorticoid receptor expression in blood cells of kidney transplant recipients undergoing immunosuppressive treatment: Cost efficient determination by quantitative PCR. *J Clin Pathol* 2004;57: 33–36.
53. Chang CT, Hung CC, Tian YC, Yang CW, Wu MS: Cyclosporin reduces paracellin-1 expression and magnesium transport in thick ascending limb cells. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22: 1033–1040.
54. Rezzani, R. Cyclosporine A and adverse effects on organs. *Histochemical studies. Prog. Histochem. Cytochem.* 2004;39: 85–128.
55. Erdogan H, Fadillioglu E, Yagmurca M, Uçar M, Irmak MK. Protein oxidation and lipid peroxidation after renal ischemia-reperfusion injury: protective effects of erdoosteine and N-acetylcysteine. *Urol Res.* 2006 ;34(1):41-46.
56. Prof.Dr. idris Mehmetoğlu. *Klinik Biyokimya Laboratuvarı El Kitabı. 3. Baskı, Dizgi Ofset, Konya 2004*
57. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
58. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988;34(3):497-500.
59. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967;70: 158–169.
60. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis.* Academic Press, New York and London, 1974;pp. 673–677.
61. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186:421-431.

62. Mueller AR, Platz KP, Langrehr JM, et al. The effects of administration of nitric oxide inhibitors during small bowel preservation and reperfusion. *Transplantation* 1994;58:1309-1316.
63. Cortas NK and Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36:1440-1443.
64. Myers BD, Ross J, Newton L, Luetscher J, Perlroth M. Cyclosporine associated chronic nephropathy. *N Engl J Med* 1984; 311:699-705.
65. Pérez de Hornedo J, de Arriba G, Calvino M, Benito S, Parra T. Cyclosporin A causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction in renal tubular cells. *Nefrologia*. 2007;27(5):565-573.
66. Galletti P, Di Gennaro CI, Migliardi V, et al. Diverse effects of natural antioxidants on cyclosporin cytotoxicity in rat renal tubular cells *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:1551–1558.
67. Krauskopf A, Buetler TM, Nguyen NS, Macé K, Ruegg UT. Cyclosporin A-induced free radical generation is not mediated by cytochrome P-450. *Br J Pharmacol*. 2002;135(4):977-986.
68. Parra T, de Arriba G, Arribas I, et al. Cyclosporine A nephrotoxicity: role of thromboxane and reactive oxygen species. *J Lab Clin Med*. 1998;131(1):63-70.
69. dos Santos OF, Boim MA, Barros EJ, et al. Nephrotoxicity of cyclosporine: the role of platelet-activating factor and thromboxane. *Lipids*. 1991;26(12):1320-1323.
70. Pérez de Lema G, Arribas I, Prieto A, et al. Cyclosporin A-induced hydrogen peroxide synthesis by cultured human mesangial cells is blocked by exogenous antioxidants. *Life Sci*. 1998;62:1745-1753.

71. Rezzani R. Exploring cyclosporine A-side effects and the protective role-played by antioxidants: the morphological and immunohistochemical studies. *Histol Histopathol.* 2006;21(3):301-316.
72. Inselmann G, Hannemann J, Baumann K. Cyclosporine A induced lipid peroxidation and influence on glucose-6-phosphatase in rat hepatic and renal microsomes. *Res. Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1990;68(2):189-203.
73. Preetha SP, Varalakshmi P. Oxidative and nitrosative stress mediated renal cellular damage induced by cyclosporine A: role of sulphated polysaccharides. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(7):1254-1259.
74. Yagi K, 1980. *Lipid Peroxides in Biology and Medicine.* Academic Press, New York.
75. Wang C, Salahudeen AK. Cyclosporin nephrotoxicity: attenuation by an antioxidant inhibitor of lipid peroxidation in vitro and in vivo. *Transplantation* 1994;58:940- 946.
76. Peresleni T, Noiri E, Bahou WF, Goligorsky MS. Antisense oligodeoxynucleotides to inducible NO synthase rescue epithelial cells from oxidative stress injury. *Am J Physiol.* 1996 Jun;270:971-977.
77. Rabl H, Khoschsorur G, Colombo T, et al. 1993. A multivitamin infusion prevents lipid peroxidation and improves transplantation performance. *Kidney Int.* 1993;43(4):912-917.
78. van den Dorpel MA, Ghanem H, Rischen-Vos J, et al. Conversion from cyclosporine A to azathioprine treatment improves LDL oxidation in kidney transplant recipients. *Kidney Int.* 1997;51(5):1608-1612.
79. Cristol JP, Vela C, Maggi MF, Descomps B, Mourad G. Oxidative stress and lipid abnormalities in renal transplant recipients with or without chronic rejection. *Transplantation.* 1998 ;65(10):1322-1328.

80. Lee JY, Kim HS, Park CS, Kim MC. Erdosteine in Renal Ischemia-Reperfusion Injury: An Experimental Study in Pigs. *J Vet Med Sci.* 2010;72(1):127-130.
81. Parra Cid T, Conejo García JR, Carballo Alvarez F, de Arriba G. Antioxidant nutrients protect against cyclosporine A Nephrotoxicity *Toxicology.* 2003;189:99-111.
82. Greene EL, Paller MS. Oxygen free radicals in acute renal failure. *Miner Electrolyte Metab.* 1991;17: 124-132.
83. Durak I, Karabacak HI, Büyükkoçak S, et al. Impaired antioxidant defense system in the kidney tissues from rabbits treated with cyclosporine. Protective effects of vitamins E and C. *Nephron.* 1998;78: 207-211.
84. Tariq M, Morais C, Sobki S, Al Sulaiman M, Al Khader A. N-acetylcysteine attenuates cyclosporin-induced nephrotoxicity in rats. *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14:923- 929.
85. Ural M, Özgüner M, Şenal D, Sütçü R, Delibaş N. Siklosporin A'nın sıçanlarda oluşturduğu nefrotoksisiteye Vitamin C ile Vitamin E nin ve verapamilin etkilerinin ışık mikroskopunda değerlendirilmesi *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* 2005;12(4):28-35 .
86. Naidu MU, Kumar KV, Shifow AA, Prayag A, Ratnakar KS. Lacidipine protects against cyclosporine- induced nephrotoxicity in rats. *Nephron.* 1999; 81: 60-66.
87. Kumar KV, Naidu MU, Shifow AA, Prayag A, Ratnakar KS. Melatonin: an antioxidant protects against cyclosporine-induced nephrotoxicity. *Transplantation.* 1999 Apr 15;67(7):1065-1068.
88. Özdemir M, Aktan Y, Dündar E, e al. Siklosporin A nefrotoksisitesine karşı vitamin E'nin etkisi *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 1998;23(2):67-71.

89. Inglesi M, Nicola M, Fregnan GB, Bradamante S, Pagani G. Synthesis and free radical scavenging properties of the enantiomers of erdosteine. *Farmacology*. 1994; 40: 703- 708.
90. Moretti M, Marchioni CF. An overview of erdosteine antioxidant activity in experimental research *Pharmacol Res*. 2007;55:249-254.