

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PARAKUAT'IN NEFROTOKSİK ETKİSİNE
ASETAMİNOFEN'İN KATKISININ
SIÇANLARDA ENZİMÜRİ İLE İZLENMESİ**

T 91578

Biyokimya (Eczacılık) Programı

DOKTORA TEZİ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM AKADEMİSİ
DOKÜMANİSTON MERKEZİ

Uzman Eczacı Sevdie ÇAVUŞOĞLU

İZMİR – 2000

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PARAKUAT'IN NEFROTOKSİK ETKİSİNE
ASETAMİNOFEN'İN KATKISININ
SIÇANLARDA ENZİMÜRİ İLE İZLENMESİ**

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

T 91578

Biyokimya (Eczacılık) Programı

DOKTORA TEZİ

Uzman Eczacı Sevdiye ÇAVUŞOĞLU

Danışman Öğretim Üyesi : Prof. Dr. Abdullah ÖZYER

İZMİR – 2000

Çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım emekli Hocam Yrd. Doç. Dr. Şükran KOCAOĞLU'na, bana gerekli desteği her zaman sağlayan Prof. Dr. Abdullah ÖZYER'e, değerli katkıları ile yön veren Doç. Dr. Ayfer YALÇIN ve Doç. Dr. Aysun PABUÇCUOĞLU'na, histopatolojik çalışmaları büyük bir özveriyle gerçekleştiren E. Ü. Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Gülçin BAŞDEMİR'e, çalışma materyallerimin sağlanmasındaki katkılarından dolayı Ömer GÜL'e, bilgisayar konusundaki en büyük destekçim, her zaman yanımda olan sevgili dostum Uzm. Ecz. Mehmet Ali EGE'ye, tezimin yazım ve tamamlanması aşamasında her konuda görüş ve desteğini aldığım sevgili dostum Dr. Emrah KILINÇ'a, varlıklarıyla bana destek olan tüm sevdiklerime ayrıca "onlarsız olmayan" sevgili AİLEME ve Firdevs YAMAN'a teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM I.....	1
GİRİŞ ve AMAÇ.....	
BÖLÜM II.....	5
GENEL BİLGİLER.....	
II.1. Böbrek Anatomi ve Fizyolojisi.....	5
II.1.1. Böbreğin Anatomo – Histolojik Yapısı.....	6
II.1.1.1. Nefron.....	6
II.1.1.1.1. Malpigi Korpüskülü (Renal Korpüskül).....	7
II.1.1.1.2. Böbrek Tüpleri.....	8
II.1.2. Böbreğin Fizyolojik Fonksiyonları.....	9
II.2. Böbrek Hasarı (Nefrotoksisite).....	10
II.2.1. Böbreğin Toksik Bileşiklere Duyarlı Olmasının Nedenleri.....	11
II.2.2. Nefrotoksik Maddelerin Temel Etkileri.....	12
II.2.3. Nefrotoksisitede Üriner Enzim Tayinlerinin Değeri.....	13
II.2.4. Nefrotoksisitede Kreatinin Tayininin Değeri.....	16
II.2.5. Nefrotoksisitede Kan Üre Azotu (BUN) Tayininin Değeri.....	17
II.2.6. Nefrotoksisitede Üriner Total Protein Tayininin Değeri.....	18
II.3. Gamma-Glutamil Transpeptidaz (GGTP).....	20
II.3.1. GGTP'nin Organizmadaki Dağılımı.....	21
II.3.2. GGTP'nin Yapısal Özellikleri ve İzoenzimleri.....	21
II.3.3. İdrar GGTP Aktivite Tayininin Klinik Önemi.....	22
II.4. N-Asetil-β-D-Glukozaminidaz (NAG).....	23
II.4.1. NAG'nin Yapısal Özellikleri ve İzoenzimleri.....	24
II.4.2. İdrar NAG Aktivite Tayininin Klinik Önemi.....	28
II.5. Parakuat.....	30
II.5.1. Parakuat'ın Herbisidal Aktivitesi.....	31
II.5.2. Parakuat Maruziyeti.....	32
II.5.3. Parakuat Farmakokinetikleri.....	33
II.5.4. Parakuat'ın Toksik Etkileri.....	35
II.6. Asetaminofen.....	37
II.6.1. Farmakolojik Etkileri.....	38
II.6.2. Absorbsiyon ve Farmakokinetiği.....	38
II.6.3. Toksikolojik Özellikleri.....	39
BÖLÜM III.....	48
ARAÇ, GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	
III.1. Kullanılan Maddeler.....	48
III.2. Kullanılan Aletler.....	48
III.3. Kullanılan Çözeltiler.....	49
III.3.1. GGTP Aktivite Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler.....	49
III.3.2. NAG Aktivite Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler.....	50
III.3.3. Kreatinin Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	51
III.3.4. BUN Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	52
III.3.5. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	53
III.3.6. Böbrek Dokusunun Histolojik İncelemesinde Kullanılan Çözeltiler.....	53
III.3.6.1. Yıkama Çözeltileri.....	53
III.3.6.2. Saklama Çözeltileri.....	54
III.4. Çalışma Materyali.....	54
III.4.1. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması.....	55
III.4.2. İdrar ve Kan Örneklerinin Alınması.....	57

III.4.3. Böbrek Dokusunun Histolojik İncelemeye Hazırlanması.....	57
III.5. Yöntemler.....	58
III.5.1. GGTP Aktivitesinin Tayini.....	58
III.5.2. NAG Aktivitesinin Tayini.....	59
III.5.2.1. Jel Filtrasyon Kromatografisi.....	60
III.5.3. Kreatinin Miktar Tayini.....	62
III.5.3.1. İdrarda Kreatinin Miktar Tayini.....	62
III.5.3.2. Serumda Kreatinin Miktar Tayini.....	62
III.5.3.3. Kreatinin Standart Çözeltilerinin Hazırlanması ve Standart Eğrisinin Çizimi.....	63
III.5.4. Serumda Üre Azotu (BUN) Miktar Tayini.....	63
III.5.4.1. Üre Azotu Standart Çözeltilerinin Hazırlanması ve Standart Eğrisinin Çizimi.....	64
III.5.5. Üriner Total Protein Miktar Tayini.....	64
III.5.5.1. Sığır Serum Albumini (BSA) İle Standart Çözeltilerin Hazırlanması ve Protein Standart Eğrisinin Çizimi.....	65
III.5.6. Böbrek Dokusunun Histolojik Değerlendirmesi.....	65
III.5.7. İstatistiksel Değerlendirmeler.....	66
BÖLÜM IV.....	67
BULGULAR	
IV.1. Standart Eğri Çizimleri.....	67
IV.1.1. Kreatinin Standart Eğrisi.....	67
IV.1.2. Üre Azotu Standart Eğrisi.....	68
IV.1.3. Sığır Serum Albumin (BSA) Standart Eğrisi.....	69
IV.2. İdrar ve Serum Parametrelerine İlişkin Bulgular.....	70
IV.3. Böbrek Dokularına Ait Histolojik Bulgular.....	70
BÖLÜM V.....	80
TARTIŞMA ve SONUÇ	
V.1. İdrarın Toplanması İlişkin Tartışma.....	80
V.2. Santrifügasyon İşlemi İle İlgili Tartışma.....	81
V.3. Üriner GGTP İle İlgili Tartışma.....	81
V.3.1. Üriner GGTP Aktivitesinin Stabilitesi İle İlgili Tartışma.....	82
V.3.2. Üriner GGTP Aktivitesinin İfade Edilişi İle İlgili Tartışma.....	82
V.4. Üriner NAG İle İlgili Tartışma.....	84
V.4.1. Üriner NAG Aktivitesinin Stabilitesi İle İlgili Tartışma.....	85
V.4.2. Üriner NAG Aktivitesinin İfade Edilişi İle İlgili Tartışma.....	86
V.5. Kontrol Grubuna İlişkin Tartışma.....	87
V.6. Uygulanan İlaçlara İlişkin Tartışmalar.....	88
V.6.1. Parakuat (PK) İle İlgili Tartışma.....	88
V.6.2. Asetaminofen (APAP) İle İlgili Tartışma.....	93
V.6.3. Parakuat + Asetaminofen (PK + APAP) İle İlgili Tartışma.....	99
ÖZET.....	103
SUMMARY.....	105
KAYNAKLAR.....	107
ÖZGEÇMİŞ.....	128
ŞEKİL LİSTESİ.....	129
TABLO LİSTESİ.....	130
RESİM LİSTESİ.....	131

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

Böbrekler zedelendiği zaman böbrek dokusundan idrara birçok enzim saliverilir (81). Hayvanlarda ve özellikle sıçanlarda yapılan toksikolojik araştırmalarda, ilaç nefrotoksitesinin üriner enzim aktivitelerindeki değişiklikler ile gözlemlendiği birçok araştırma mevcuttur (81, 87, 176).

Gamma-Glutamil Transpeptidaz (EC 2.3.2.2; GGTP), glutatyon ve diğer gamma-glutamil bileşiklerindeki glutamil grubunun çeşitli amino asitlere, peptidlere veya suya transferini katalizleyerek glutatyon metabolizması ve amino asit transportunda rol oynayan, glikoprotein yapısında zarsal bir enzimdir (130). Böbrekler, vücuttaki diğer dokular arasında en yüksek GGTP miktarına sahip dokudur (5). Böbrek dokusundaki proksimal tübüllerin fırçasal kenarları ve henle lobu yüksek enzim aktivitesine sahiptir (207). İdrar aktivitesi insanda serumdaki aktivitenin yedi katı (166), sıçanda ise dört katı (125) olarak saptanmıştır.

N-Asetil- β -D-Glukozaminidaz (EC 3.2.1.30; NAG), molekül ağırlığı 140 kDa olan glikoprotein, glikozaminoglikan ve glikolipit metabolizmasında görevli lizozomal bir enzimdir (163, 164). Hemen hemen tüm memeli hücre lizozomlarında bulunur. Vücuttaki diğer dokularla kıyaslandığında, özellikle böbrek dokusu proksimal tübülüs hücrelerinin lizozomlarında yüksek aktivitede bulunduğu gösterilmiştir (91, 107, 116). Enzim, molekül ağırlığının yüksekliğinden dolayı glomerüllerden geçemez ve idrarda saptanan NAG, böbrek tübülüslerinden enzimin sızması ya da böbrek tübülüs hücrelerinin hasarı ile ilişkilidir (53, 91, 116, 236).

Böbrekler, toksik kimyasalların başlıca hedef organıdır. Böbrekler zedelendiği zaman çeşitli enzimler böbrek dokusundan idrara saliverildiklerinden (176), son yıllarda

nefrotoksisite işaretçileri ("marker"ları) listesinde idrar enzimlerine özellikle önem verilmiş, insanlarda veya deney hayvanlarında toksik kimyasallar ve ilaçlarla indüklenen nefrotoksisitede (7, 37, 43, 71, 73, 81, 133) ya da böbreği ilgilendiren hastalıklarda, klinik tanıda yararlanmak üzere (87, 109, 114, 116, 120, 185), GGTP ve NAG'ın idrar aktivitelerindeki değişikliklerinin izlendiği çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Nefrotoksisitenin izlenmesi amacıyla aktiviteleri tayin edilen üriner enzimlerden olan GGTP ile NAG'ın, boşaltım fonksiyonlarında herhangi bir anormallik meydana gelmeden önce renal hasarın erken bir döneminde idrarda yükseldikleri ve tübüler toksisitenin hassas bir göstergesi oldukları vurgulanmıştır (81, 87, 104, 230).

Parakuat (Metil Viologen; 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilyum diklorür), tarımda yaygın olarak kullanılan etkili bir herbisit (yabancı otları öldürmede kullanılan madde)'tir. Kazayla ya da bilerek yutulması durumunda insanlarda kalp, akciğer, böbrek, karaciğer ve beyin gibi çeşitli organlarda önemli toksik etkiler oluşturabilir (19, 143, 148, 178, 187, 216). Otopsi vakalarında veya deney hayvanlarında yapılan toksikolojik incelemeler sonucunda parakuat'ın, kandan hızlı bir şekilde uzaklaştırılarak belirgin bir şekilde böbrek ve akciğer dokusunda biriktiği ve bu dokularda uzun süre tespit edildiği gösterilmiştir (34, 82, 143, 181, 193).

Deney hayvanlarına intravenöz olarak uygulanan parakuat'ın ilk toksik etkisi, vücuttan başlıca atılım yolu olan böbrekler üzerinde görülür. Uygulanan dozun yüksekliğine bağlı olarak böbrek fonksiyonlarında bozukluklar meydana getirdiği, proksimal renal epitel hücre hasarına ve akut renal yetmezliğe neden olduğu bildirilmiştir (9, 80, 85, 143, 221, 222).

Bus ve ark. (33), parakuat'ın toksisite mekanizmasında, oksijen serbest radikal reaksiyonlarının yer aldığını bildirmişlerdir. Oksijen serbest radikalleri bir ya da daha fazla çiftleşmemiş elektron taşıyan türler olarak tanımlanabilir. Parakuat'ın tek bir elektron redüksiyonu ile başlayan siklik redüksiyon-oksidasyon reaksiyonları sonucunda meydana gelen bu reaktif oksijen türlerinden süperoksit anyon (O_2^-), hidroksil radikal ($\cdot OH$), singlet oksijen (1O_2) ve toksik lipid peroksitlerinin üretiminin, ayrıca indirgenmiş NADPH'nin tüketilmesinin parakuat toksisitesinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Bilindiği gibi oksijen serbest radikalleri, lipid peroksidasyonunun ve yaygın hücre ölümünün başlıca

sorumludur. Ayrıca NADPH/NADP⁺ oranının azalması yaşamsal hücresel fizyolojik prosesleri zayıflatabilir.

Parakuat, tüm dünyada tarımda kullanılan en güvenilir herbisitlerden biri olmasına rağmen, kazara ya da suistimalden kaynaklanan zehirlenmelerden ötürü her yıl 400'den fazla insanın ölümüne yol açmaktadır. Epidemiyolojik araştırmalar sonucunda, parakuat'ın çok tercih edilen bir intihar maddesi olduğu, morbidite-mortalite riskinin yüksek olduğunun gözlenmesi, *in vivo* çalışmaların parakuat'ın böbreklerdeki tutulumu ve nefrotoksitesisi üzerine yoğunlaşmasına neden olmuştur (51, 122, 221, 222). Ancak, yaptığımız araştırmalarda parakuat zehirlenmesi nedeniyle takip altına alınmış hastalarda ya da deney hayvanlarında, parakuat'ın indüklediği nefrotoksitesinin üriner GGTP ve/veya NAG aktivitesiyle izlendiği bir yayına rastlanmamıştır.

Dünya üzerinde oldukça yaygın olarak kullanılan ilaçlardan bir tanesi de asetaminofen'dir. Asetaminofen (Parasetamol; N-asetil-p-aminofenol; APAP), antiinflamatuar etkinliği olmayan ancak güçlü analjezik ve antipiretik etkisi olan non-steroidal antiinflamatuar (NSAİ) grubu ilaçların bir üyesidir (110).

Asetaminofen'in aşırı dozda alınması durumunda karaciğer ve böbrek yetmezliği geliştiği bildirilmiştir (28, 30).

İnsanlarda asetaminofen'in uzun süre yüksek dozlarda kullanımı sonucu (kronik toksisite), renal papiller nekroz ve kronik interstisiyel nefrit ile karakterize, kronik renal yetmezliğe kadar ilerleyen analjezik nefropatisine neden olduğu bildirilmiştir (188). Yılda 104 tablet (0.5 g'lık) alanlarda riskin 1.4 kez, 105-366 tablet veya daha fazla kullananlarda 2.1 kez arttığı tahmin edilmiştir. Diyaliz tedavisi gerektiren ve böbreğin morfolojik yapılarının tamamının hasardan etkilendiği "end-stage" denilen terminal dönem böbrek hastalıklarının yüzde 8-10'unun kronik asetaminofen kullanımı ile ilgili olduğu bildirilmiştir (169).

Newton ve ark. (151), asetaminofen'den deasetilasyon ile böbrekte oluşan metaboliti p-aminofenol (PAP)'ün güçlü, özgül bir nefrotoksik bileşik olduğunu, PAP'ün renal glutatyon (GSH) konsantrasyonunu azalttığını, renal makromolekülleri arılandığını ve yüksek dozda asetaminofen'in indüklediği renal nekrozdan bu bileşiğin sorumlu

olabileceğini öne sürmüşlerdir. Asetaminofen-bağımlı renal hasarın böbreklerde ilacın metabolik aktivasyonuna bağlı olduğu, genel bir düşünce olarak kabul edilmektedir (134). Yaptığımız araştırmalarda asetaminofen nefrotoksisitenin, üriner GGTP ve/veya NAG aktivitesiyle izlendiği bir yayına rastlanmamıştır.

Sonuçta, parakuat ve asetaminofen insan sağlığı açısından nefrotoksik etkiye sahip kimyasal maddelerdir. Bu iki bileşiğin birlikte alınması ya da yaygın olarak asetaminofen kullanan kişilerin bir şekilde parakuat'a maruz kalması durumu ise bilinen toksik metabolik yolların çakışması nedeniyle böbrekler için potansiyel bir toksisite riskini aklı getirmektedir.

Bu çalışmada; parakuat ve asetaminofen'in hem tek başlarına oluşturdukları nefrotoksik etkilerinin hem de her iki ilacın kombine nefrotoksisitesinin sıçanlarda enzimüri aracılığı ile izlenilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında; sıçanlara, 40 mg/kg dozda intraperitoneal (i.p.) yoldan parakuat veya farklı dozlarda (250, 500, 750, 900 mg/kg, i.p.) asetaminofen uygulanmış ve olası nefrotoksik etkiler duyarlı tübüler işaretçi enzimler olan GGTP ve NAG enzimürisi ile izlenmiştir. İdrarda bu iki enzimin aktivite tayinlerine ek olarak, bazı biyokimyasal parametrelerin (kan üre azotu, serum ve idrar kreatinini ve idrarda total protein) de ölçümleri yapılmış ve sonuçlar böbrek dokusunun histopatolojik bulguları ile birlikte değerlendirilmiştir.

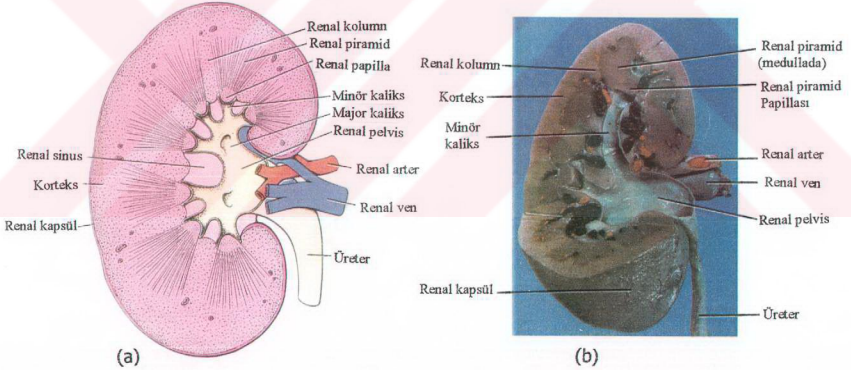
Çalışmanın ikinci aşamasında; 40 mg/kg, i.p. parakuat uygulanan deney sıçanlarına yarım saat sonra farklı dozlarda olmak üzere (250, 500, 750, 900 mg/kg, i.p.) asetaminofen uygulanmış, parakuat ve asetaminofen'in kombine indüklediği nefrotoksik hasar, enzimüri ve diğer parametreler yardımı ile değerlendirilmiştir.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

II.1. Böbrek Anatomi ve Fizyolojisi

Böbrekler karın boşluğunda retroperitoneal olarak kolumna vertebralis'in iki tarafında Th.12-L.3 düzeyinde çift taraflı bulunurlar. Şekil olarak fasulyeye benzerler. Uzunlukları 10-12 cm, genişlikleri 5-6 cm, kalınlıkları ise 4 cm kadardır. Kişi ve cinse göre ağırlıkları 120-200 g arasında değişmektedir. Ortalama olarak vücut ağırlığının % 0.4'ünü oluştururlar (1, 79).



Şekil 1. Böbrek Yapısı (a): Sağ böbreğin boyuna kesit şeması (Tortora, G.J., *Principles of Human Anatomy*, 5nd. Ed., 1989, HarperCollinsPublishers, New York), (b): Sağ böbreğin boyuna ve enine kesitinin fotoğrafı (Yokochi, C., Rohen, J.W., *Photographic Anatomy of the Human Body*, 2nd. Ed., 1978, IGAU-SHOIN, Ltd., New York).

Böbrek, anatomik ve fonksiyonel bakımdan oldukça kompleks bir organdır. Metabolizma artıklarının vücuttan atılması dışında, su ve tuz atılımını kontrol ederek ekstrasellüler aralığın hacim ve osmolaritesinin düzenlemesinde ve böylece hayatın şartı olan iç ortam bileşiminin sabit tutulmasında (Homeostasis) hayatı önemi olan, aynı zamanda sistemik metabolik fonksiyonları etkileyen bazı hormonların yapıldığı temel yerdir (1, 79). Homer Smith'ın "Kanın (İç ortamın) kimyasal yapısı, ağızdan giren şeylerle değil, böbreklerin tuttuğu şeylerle tayin edilir" diyerek böbreklerin vücut homeostaz'ının sabit tutulmasındaki önemini vurgulamıştır (160).

II.1.1. Böbreğin Anatomo – Histolojik Yapısı

Böbrek dokusunda korteks denilen bir dış bölge, bir de medulla denilen iç bölge ayırt edilir. Böbrek dokusu piramid'lerden yapılmıştır. Piramid'lerin sivri uçları böbrek boşluğuna doğrudur (Şekil 1). Basal durumda kalbin 1 dakikada bütün vücuda gönderdiği kanın yaklaşık yüzde 25'i böbreklerden geçer. Böbreklere giden bu bol kanı taşıyan renal arter (arteria renalis) doğrudan doğruya aorta abdominalis'den çıkar ve kısalır. Arteria renalis böbreğe gelince 7 ila 9 kola ayrılır. Bu arterlere arteria interlobaris denir. Bu arterler ikiye ayrılarak , iki uç karşı karşıya gelecek şekilde arklar yaparak arteria arcuata'yı oluşturur. Bu arterlerden de arteria interlobularis kök alır. Arteria interlobularis'ten ayrılan kısa kan damarları glomerülün aferent arteriyolunu oluşturarak glomerüllere girerler (160).

II.1.1.1. Nefron

Böbrekler, çok küçük, nefron denilen fizyolojik ünitelerden oluşmuştur. İdrar oluşumunu gerçekleştiren fonksiyonel birim nefrondur. Her bir nefron, Malpighi'nin bulduğu, kılcıl damar yumağını içeren Malpighi Korpüskülü (Malpighi Cisimciği) ile böbrek tübllerinden oluşur (Şekil 2). Her böbrekte ortalama olarak 1-1.25 milyon kadar nefron vardır. İnsanda nefronun uzunluğu 5 cm kadardır (1).

II.1.1.1.1. Malpigi Korpüskülü (Renal Korpüskülü)

Bu yapılar böbreğin kabuk kısmında, serpişmiş kırmızı noktacıklar şeklinde adeta bir ağacın dallarından sarkan elmaları andırırlar. İnsanda bir Malpigi cisimciğinin ortalama çapı 100 μ kadardır. Korpüskül, glomerül denen kılcal damar yumağından ve bunu saran kupa şeklindeki Bowman Kapsülü'nden ibarettir (Şekil 2).

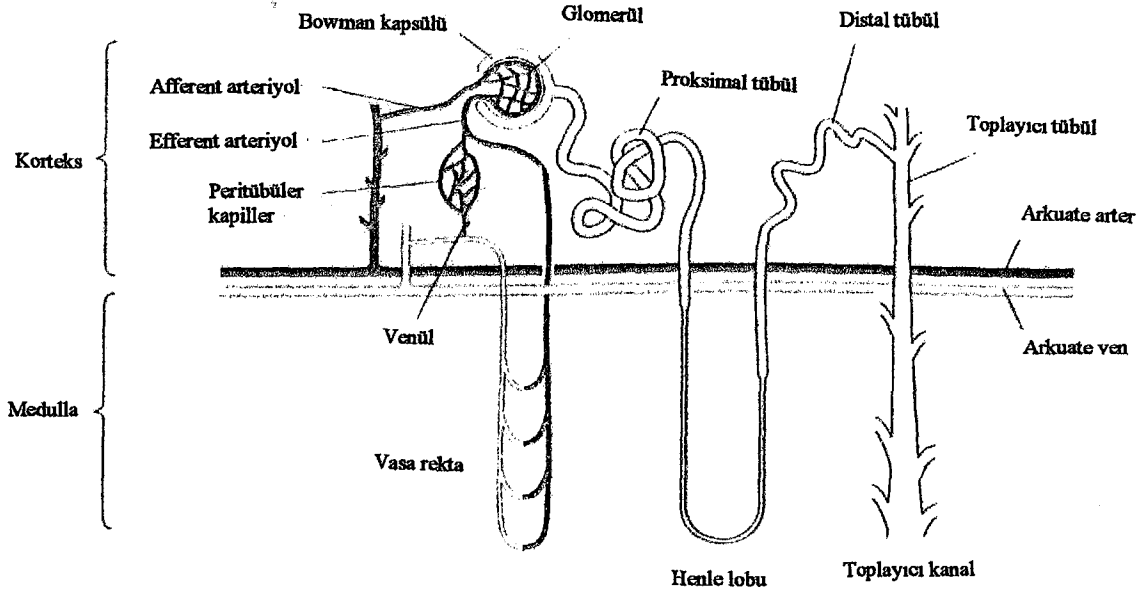
Bowman kapsülünün iç ve dış iki yaprağı vardır. Kılcal damar ağını örten iç yaprak; visseral yaprak, dışta bulunan fibröz yaprak; paryetal yaprak adını alır ve tübüllerin basal membranı ile devam eder. Paryetal ve visseral yapraklar arasında kalan boşluk Bowman kapsülü aralığı adını alır. Burası primer idrarın filtre edildiği yer olup, böbrek tübülleri boşluğuna açılır. Malpigi cisimciğinin bir kutbundan böbrek tübülleri çıkar, karşı kutbundan ise bir arter dalı girer ve çıkar. Cisimciğe giren artere aferent arter denir. Aferent arter Malpigi cisimciğine girdikten sonra 5-8 kola ve bu kollar da yine birçok küçük dallara ayrılarak birbirleriyle kısa anastomotik kanallarla bağlanmış bir kapiller yumağı oluştururlar. Bu ince kılcal damar yumağına glomerül adı verilir (Şekil 2) (26, 79).

Glomerül, vazoaktif arteriyoller arasında bulunan, plazmanın selektif süzülmesinde rol oynayan vasküler-epitelyal bir yataktır. Plazmanın seçici olarak filtrasyonuna olanak verir. Molekül büyüklüğü, net yükü ve konfigürasyonuna göre dolaşımdaki moleküllerin bir kısmı seçici-geçirgen kapiller duvardan tübülüs lümenine süzülürken, diğerleri dolaşımda kalır (1).

Malpigi korpüskülüne giren aferent arteriyol daha sonra eferent arteriyol şeklinde korpüskülü terk ederek böbrek tübleri etrafında aralarında zengin anastomozlar yapan peritübüler kılcal damar ağını oluşturur. Aferent ve eferent arteriyolleri içeren vasküler element, oksijen ve metabolik maddeleri nefrona taşır ve geri emilen maddeleri sistemik dolaşıma verir (1).

Malpigi cisimciğine giren ve çıkan damarların arteriyol özelliğinde olması, kapillerlerde yüksek hemostatik basınç oluşturacak şekilde giren arteriyol çapının çıkan arteriyolden büyük olması, glomerül kapiller yumağının iki arteriyol arasında bulunması ve yüksek bir permeabilite özelliğine sahip olması, glomerül kılcal damar ağının en önemli özelliğidir. Böyle bir yapı vücudun başka hiç bir yerinde yoktur (1, 79, 160).

II.1.1.1.2. Böbrek Tüpleri



Şekil 2. Nefron ve kan damarlarının şekli (177).

Böbrek tüpleri 3 tiptir (Şekil 2). :

1. Proksimal Tüb :

Malpigi cisimciğinden ilk çıkan kısma proksimal tüb denir. Nefronun en uzun kısmı olan proksimal tüb, başlangıçta bir kıvrım gösterir ve sonra henle kulpunun inen dalına kadar düz bir kısımla devam ederek medullanın dış katlarına kadar iner. Proksimal tüb yaklaşık 55 μ çapında, 12-24 mm uzunluğundadır. Ortalama olarak 1 milyon civarında nefron içeren bir böbrekte, proksimal tübün gösterdiği yüzey alanı 1 m²'ye yakındır. Proksimal tüb hücrelerinin diğer kısımlardan farklı olarak, lümene bakan yüzleri fırçasal kenarlıdır. Fırçasal kenarı mikrovilliler oluşturur ve bu sayede absorpsiyon yüzeyi artırılmış olur. Tübüler geri emilim ve salgılama (sekresyon) olaylarının büyük bir kısmı proksimal tübüllerde olur (1, 26, 160).

2. Henle Kulpu (İntermediyer Kısım) :

Proksimal t b n düz inen kısmı ile distal t b n düz çıkan kısmı arasında yer alır. Henle kulpu "U"  eklinde bir kıvrım yapmıştır.  nce ince bir inici sonra da kalın bir çıkıcı kısım bulunur. Nefronun yerine göre henle kulpunun durumu de i ir. Kortikal nefronların henle kulpu kısa, medullada bulunanların (juxtamedullar nefronlar) ise uzundur ve böbrek piramidinin alt ucuna kadar iner. Henle kulpunun uzunluğu 14 mm'ye kadar varır, çapı ise 14-22   kadardır. B bre in bu kısmı daha çok difüzyon olaylarına uygun bir yapıya sahiptir (1, 26, 79, 160).

3. Distal T b :

Proksimal t b böbreğin kabuk kısmında medullanın derinliklerine doğru henle kulpu ile uzandıktan sonra tekrar gerisin geriye korteks kısmına çıkar ve distal t b ile devam eder.  apı 20-50  , uzunluğu 2-9 mm arasında değişen bu t bler önce düz, sonra kıvrımlı yapı gösterirler. Her bir nefronun distal t b  toplayıcı kanallara (kollektör tübüllere) açılır. Toplayıcı kanallar medullaya doğru gittikçe aralarında birle e birle e daha büyük toplayıcı kanalları oluştururlar ve bunlarda Ductus Papillares'ı (Bellini'nin Papilla Kanalları) meydana getirirler. Distal t bler proksimallerden daha kısadır ve fırçasal kenar göstermezler (1, 26, 79, 160).

II.1.2. B bre in Fizyolojik Fonksiyonları

1. Metabolizma sonucu meydana gelen artıkları, zehirli maddeleri atar.
2. Organizmanın su ve plazma volümünü düzenler.
3.    ortamın iyon (elektrolit) dengesini düzenler.
4. Plazmanın ozmotik basıncını düzenler.
5. Detoksifikasyon  devi görür.
6. Sentezledi i enzim ve hormonları kana vererek kan basıncının düzenlenmesinde rol oynar.

7. Organizmanın asit-baz dengesinin düzenlenmesinde önemli rolü vardır. Böylece kan pH'sının sabit kalmasında rol oynar (1).

II.2. Böbrek Hasarı (Nefrotoksisite)

Toksisite; canlı organizmanın kimyasal ajan ya da ajanlarla etkileşmesi sonucu oluşan organizma hasarı, fonksiyon bozukluğu ve/veya ölümü olarak tanımlanır. Endojen ya da eksojen olarak maruz kalındığında zehirlenmeye neden olan kimyasal ajanlar ise "zehir" (toksik madde) olarak tanımlanır (72).

Böbrekler, anatomik ve fonksiyonel bakımdan oldukça kompleks bir organdır. Böbreklerde glomerül filtrasyon hızında (GFR) değişikliğe yol açabilecek düzeyde zedelenme yapan maddeler, geleneksel olarak, "nefrotoksik" kabul edilirler. GFR, serum kreatinin derişimi ya da daha duyarlı olarak kreatinin klerensi ölçümü ile saptanır. Ancak, serum kreatinini ile GFR arasında doğrusal olmayan bir ilişki bulunduğundan, serum kreatinin düzeyi, GFR normalin yüzde 30-50'sine düşünceye kadar yükselmeyebilir. Diğer taraftan birçok nefrotoksin öncelikle renal tübül hücreleri üzerinde toksik etki gösterir ve renal dokuya özgü enzimlerin idrara salınımında önemli artışlar gözlenebilir (72).

Tedavide kullanılan bazı ilaçların ve bir kısım kimyasalların böbrekleri zedelediği bilinmektedir. Bunların bir çoğu, bilinen veya bilinmeyen mekanizmalar aracılığı ile hücreler üzerinde direk toksik etki gösterirlerken, bir kısmı da indirek mekanizmalar aracılığı ile böbrek hasarı meydana getirebilirler (26).

Fonksiyonel olarak toksisite, transport kapasitesindeki küçük değişiklikler (geçici glikozüri, aminoasidüri), azalmış konsantre etme kapasitesiyle birlikte poliüri veya anüri ve artmış kan üre azotu düzeyleri ile birlikte renal yetmezlik şeklinde gözlenebilir. Toksik saldırının boyutuna bağlı olarak bu değişiklikler reversibl ya da kalıcı olabilir ve sonuçta hücre ölümüne neden olabilir (72).

II.2.1. Böbreğin Toksik Bileşiklere Duyarlı Olmasının Nedenleri

Böbreğin, zararlı kimyasal maddelerin toksik etkilerine duyarlı olmasının sebebi, fizyolojik ve anatomik özelliklerine bağlıdır. Schreiner ve Maher, böbreklerin toksik maddelere duyarlı olmalarının nedenlerini şu şekilde sıralamışlardır (186) :

1. Böbrekler vücut kütlelerinin yüzde 0.4'ünü oluştururlar ve istirahat halindeki kardiyak kanın dakikada yüzde 20-25'i böbreklerce alınır. Böbrek kan akımının fazla olması böbrek perfüzyonunu ve glomerüler filtrasyonu etkiler. Yüksek kan akımından dolayı, sistemik dolaşımdaki ilaç ya da kimyasal ajanlar böbrek parankimasına yüksek konsantrasyonda ve süratle ulaşır.
2. Böbrekler fazla oksijen kullandıkları için, hücrenin oksijen alımını ve kullanımını bozan ajanlara karşı duyarlıdırlar.
3. Lüminal sıvıdan su ile birlikte geri emilen çözülmüş maddeler, böbrek parenkima hücreleri içinde toksinin derişimini artırır.
4. Lüminal sıvıya aktif olarak salgılanan toksik maddenin derişimi ise lüminal membranlar (proksimal tübül) civarında artar.
5. Bu bileşiklerin lüminal sıvıdaki derişimleri, antidiüretik hormon ve karşı akım mekanizması ile daha da artırılır.
6. Renal hücreler tarafından alınan bazı bileşikler, uzun zaman tutulurlar ve böylece hem derişimleri hem de toksik ajana maruz kalma süreleri artmış olur.
7. Nefron sayısında azalmanın söz konusu olduğu durumlarda, bütün çözülmüş maddeler az sayıdaki işlev gören nefrondan itrah edilir ve sonuçta nefron başına düşen yüklenme artmış olur.
8. İdrar hacminde azalma ya da idrar akışında tıkanıklık, toksik ajanın geri emiliminin daha fazla olmasına veya duyarlı dokunun bu ajana daha uzun süre maruz kalmasına yol açabilir. Bu sayede renal fonksiyonlardaki değişiklikler toksinin atılım oranını ve böylece etki süresini belirgin olarak etkileyebilir.

Bu sayılanlara ek olarak, böbreklerde ara metabolizmanın önemli biyosentez ve katabolik yollarının olması (77), ayrıca proksimal tübüler hücrelerde lokalize olan sitokrom

P450 sisteminin renal ksenobiyotik metabolizmasında ve nefrotoksisitede son derece önemli bir rolü olduğu da eklenebilir (72, 134, 183).

Böbrek dokusunun önemli bir bölümünü korteks oluşturur ve besleyici kan akımının çoğunluğunu burası sağlar. Bu nedenle nefrotoksik maddelerin primer hedef bölgesi sıklıkla proksimal tübüllerdir. Böbreklerden tek bir geçişte, kimyasal maddelerin çoğu medulladan çok, kanla böbreğe taşınan toksik maddelerin yüksek miktarlarına maruz kalan korteksi etkiler. Böylece kan dolaşımındaki toksik bir madde böbreklere ulaştığı zaman proksimal tübüllerde oldukça yüksek konsantrasyonlara ulaşabilir. Böbreğe ulaşan kimyasalın daha küçük bir yüzdesi medulla ulaşır. Ancak medulla, bu bölgede kan akımının az olması nedeniyle daha az toksik maddeye maruz kalmakla birlikte, henle lobunun anatomik yapısından dolayı bu bileşikler burada karşı akım mekanizması ile yakalanabilir ve toksik bileşikler medullada da tutularak yüksek konsantrasyonlara ulaşabilirler (72).

II.2.2. Nefrotoksik Maddelerin Temel Etkileri

Nefrotoksik maddeler yapısı, etki şekli ve maruz kalınma süresine göre böbrek üzerinde biyokimyasal değişikliklerden hücre ölümüne kadar gidebilen toksik etkilere neden olabilirler :

1. Nefrotoksik maddeler, vazokonstriksiyona neden olarak böbrek kan akımını ve glomerüler filtrasyon hızını azaltabilir. Azalmış idrar akımı, kan üre azotunda artışa neden olabilir. Vazokonstriksiyon aynı zamanda doku iskemisi ve buna bağlı olarak böbrekte fonksiyon kaybı ile doku hasarına yol açabilir.
2. Nefrotoksik maddeler, glomerülleri direkt olarak etkileyerek permeabiliteyi değiştirir ve filtrasyonu bozabilir.
3. Nefrotoksik maddeler, tübüler fonksiyonları direkt olarak etkileyebilirler. Spesifik reabsorbsiyon ya da salgılama mekanizmaları toksik maddelerden etkilenebilir veya tübülüslerin genel permeabilitesi etkilenecek difüzyona karşı normal bariyer özellikleri değişebilir.

4. Nefrotoksik maddeler, tübülüs lümeninde çökebilir ve idrar akımını bloke ederek intratübüler basıncın artması sonucu glomerüler filtrasyon hızını azaltabilir (72).

II.2.3. Nefrotoksisitede Üriner Enzim Tayinlerinin Değeri

Böbrekler zedelendiği zaman bazı enzimler böbrek dokusundan idrara salıverildikleri için nefrotoksisite işaretçileri listesine idrar enzimleri de dahil edilmiştir. İdrarda böbrek dokusundan kaynaklanan özgül enzimlerin aktivitelerinin ölçümü, nefrotoksik etkinin lokalizasyonunu ve renal fonksiyonlardaki bozulmayı gösterir (232).

Böbrekler, toksik kimyasalların başlıca hedefi olduğu için, böbrek dokusundan kaynaklanan enzimlerin atılımının artması, kimyasalların indüklediği nefropatilerin erken bir işaretçisi olarak görülmektedir (157, 232).

Toksikolojik araştırmalarda ve tıpta renal hasarın "non-invasive" testi olarak üriner enzimlerin aktivite tayinleri giderek değer kazanmaktadır (174).

İdrardaki enzim düzeyleri birçok patolojik durumda, özellikle böbrek hastalıklarında ve böbrek hasarlarında, bu dokuya özgü enzimlerin atılımının artması ile değişiklikler gösterir. Bu nedenle, böbrek-orjinli enzimlerin idrardaki miktar tayinlerinin yapılması klinik tanı ve tedavinin yönlendirilmesi açısından oldukça önemlidir (176).

Renal hasarın belirlenmesinde kullanılan enzimlerin tanı açısından değer taşımaları bakımından şu kriterlerin gözönünde bulundurulması gerekmektedir (116) :

1. Enzim böbrek parankiminde yüksek konsantrasyonda bulunmalı, aşağı üriner traktüste hiç olmamalı ya da çok az konsantrasyonda bulunmalıdır.
2. Enzimin moleküler kütlesi, böbrek dokusu dışındaki diğer organlardan derive olabilecek enzim için, glomerüler permeabilite artışına karşın, idrara geçemeyecek büyüklükte olmalıdır.
3. İdrardaki enzim aktivitesi bakterilerden, idrar sedimentinden etkilenmemeli ve stabil olmalıdır.

4. Enzimatik aktivite buzdolabında veya dondurucuda en az birkaç gün stabil kalabilmelidir.
5. Enzim inhibitörleri ya da aktivatörleri idrardan çeşitli yöntemlerle uzaklaştırılabilmelidir.
6. Tayin yöntemi kolay ve güvenilir olmalıdır.
7. Günlük atılım hakkındaki bilginin, 24 saatlik yerine porsiyon idrarda edinilebilmesi, enzim atılımının değerlendirilmesinde pratiklik sağlayacaktır.

Diğer proteinler gibi üriner enzimler de prerenal, renal ve postrenal kaynaklı olabilmektedir. Normal şartlarda üriner enzim aktiviteleri plazmadan, renal parankimden veya ürogenital traktüsten kaynaklanmaktadır (176).

Raab (176), böbreklerin patolojik durumlarda üriner enzim aktivitesine katkısını aşağıdaki şekillerde açıklamıştır :

1. Renal proksimal tübüler hasar sonucunda, tübüler reabsorbsiyonun bozulması sonucu plazma menşeli düşük molekül ağırlıklı enzimlerin atılımı artar (Tübüler Enzimüri).
2. Renal tübüllerdeki anatomik bir hasar sonucunda, tübüler hücre menşeli enzimlerin (tübüler işaretçi enzimlerin) atılımı artar (Parankimatöz Enzimüri).
3. Glomerüler filtrasyonun bozulması sonucunda, normalde plazmada bulunan enzimlerin atılımı artar.

Nefrotoksik etkili ilaçların veya kimyasalların neden olduğu böbrek hasarının erken bulgusu; genellikle renal tübüler hasar şeklinde ortaya çıkar. Daha ileri safhalarda glomerüler fonksiyon bozukluklarına dair bulgular da ortaya çıkabilir. Bu durum gözönüne alındığında, böbrek hasarının erken tanısında glomerüler bozukluğu ortaya koyan parametrelerden ziyade, tübüler bozukluğu ortaya koyan parametrelerin ölçülmesi daha hassas ve güvenilir olmaktadır. Bu amaçla spesifik tübüler işaretçi enzimlerin idrardaki miktar tayinleri yararlı görülmektedir. Spesifik tübüler işaretçi enzimlerin idrarda artması renal fonksiyonlardaki bir azalmadan daha önce, böbrek dokusuna özgü bir hasarın erken bir habercisi olarak kabul edilmektedir (8, 107, 213, 215).

Tübüler işaretçi enzimlerden GGTP, proksimal tübüllerin fırçasal kenarlarında lokalize olmuştur. NAG ise, proksimal tübüllerin lizozomlarında bulunan yüksek molekül

ağırlığında bir enzimdir. Her iki enzim, proksimal tüb hücrelerinin dejeneratif hasarlarında yüksek konsantrasyonlarda idrarda atılırlar (176).

Üriner enzimlerin çoğu böbrek kaynaklıdır. Renal tübüler hücreler çeşitli biyokimyasal fonksiyonları yerine getirmek için birçok enzim içerirler. Tübüler hücrelerin turnover'ı veya hücresel permeabilite artışı, bu enzimlerin idrara sızmalarına neden olabilir. Ancak, böbrek parankimasından bu enzimlerin atılımlarının artması, tübüler hücrelerin anatomik lezyonlarının varlığını gösterir. Hasara uğrayan tübüler hücrelerden sızan enzimlerinin idrardaki aktiviteleri artar (4).

Üriner enzim analizleri, renal hasarın oldukça duyarlı işaretçileridir. Nefrotoksisite çalışmalarında toksik maddelerin böbrek fonksiyonlarına etkisinin incelenmesi amacıyla ölçümleri yapılan kan üre azotu, serum kreatinin ve total üriner protein tayinleri klasikleşmiş "renal fonksiyon testleri" olarak kabul edilmektedir. Ancak, böbreklerin fonksiyonel rezervi geniş olduğu için, fonksiyonel bozukluk ortaya çıkmadan önce hasar gelişir ve renal fonksiyonlarda bozukluk olsa bile bu değerler normal sınırlarda seyredebilir. Hatta BUN ve serum kreatinin düzeyleri ancak böbrek fonksiyonlarının üçte iki'si bozulduğu zaman artabilir. Bu nedenle, nefrotoksine bağlı erken ya da ılımlı renal fonksiyon kayıplarının belirlenmesinde pek yararlı görülmezler. Oysa idrar enzim düzeylerinin, renal hastalıkların birçoğunda (glomerüler, interstisyel, tübüler) sıklıkla renal yetmezlik gelişmeden önce, hatta böbrek fonksiyonlarında tespit edilebilir bir anormallik ortaya çıkmadan önce (serumda kreatinin ve üre yükselmeden) yükseldiği ve tek başına olsa bile bir enzimdeki artışın hassas ve anlamlı olduğu bildirilmiştir (133).

Klinikte nefrotoksik yan etkilli ilaçların kullanıldığı hastalarda veya toksik kimyasal maddelerle çalışan endüstri işçilerinde olası bir nefropatinin varlığını tespit edebilmek için üriner enzimlerin (özellikle GGTP ve NAG) aktivite tayinlerine sıklıkla başvurulmaktadır (174).

Meslekleri nedeniyle kurşun, civa, kadmiyum gibi metallere yoğun biçimde maruz kalan işçilerde yapılan epidemiyolojik araştırmalar, enzimüri ve tübüler proteinüri gibi hücre zedelenmesinin duyarlı işaretçileri ile bu etkenlere maruz kalma arasında korelasyon olduğunu ortaya koymuştur (223). Benzer şekilde, genellikle sıçanların kullanıldığı toksikolojik araştırmalarda, çeşitli ilaçlar veya kimyasalların indüklediği nefrotoksisite,

GGTP ve NAG'ın da izlendiği bazı üriner enzimlerin aktivitelerinde meydana gelen değişikliklerle ortaya konulmaktadır (81, 87). En önemli nefrotoksinler; bazı antibiyotikler, non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ), antineoplastikler, ağır metaller, halojenli hidrokarbonlar, herbisit ve pestisitlerdir (72).

II.2.4. Nefrotoksisitede Kreatinin Tayininin Değeri

Kreatinin, kreatin fosfatın defosforilasyonu sonucunda salınan serbest kreatinden spontan olarak (non-enzimatik hidroliz) oluşan bir anhidrit olup, kas enerji metabolizmasının normal bir atılım ürünüdür (139).

Kas kreatin miktarının yüzde 1-2'si günlük olarak kreatinin'e çevrilir. Meydana gelen endojen kreatinin miktarı kas kütlesi ile orantılı olduğu için, sağlıklı ve böbrek fonksiyonları normal olan erişkin idrarında 24 saat içinde atılan kreatinin miktarı dikkate değer şekilde sabit kalır (1, 139).

Günlük kreatinin atılımı, diyetle protein ya da azotlu madde (eksojen kreatinin) alınımına bağlı olarak yüzde 10-30 oranında artabilir. Bununla birlikte diyetle alınan kreatinin, plazma kreatinin düzeylerinde ve günlük kreatinin atılımı üzerinde çok az bir değişikliğe neden olur. Böbrek hastalığı olmayan bir kişide, kreatinin atılım oranı oldukça sabittir ve endojen üretimle paraleldir (139).

Doku yıkımında bir artış bulunması halinde serum kreatinin düzeyinde bir artış olacağına düşünülmesine karşın, bu artış ürede görülen artışın çok altındadır. Dolayısıyla, teorik olarak kreatinin, renal işlevin bir göstergesi olarak üreden daha değerlidir. Plazma üre ya da kreatinin konsantrasyonunda anlamlı bir artış olması halinde böbrek hastalığından şüphe edilir. Böyle bir artışın görülmesi, böbreğin yüzde 60'ından fazlasının tahrip olduğu anlamına gelmektedir. Bu kanı, genel bir biyokimyasal ilke olarak kabul edilir (6, 235).

Doğal koşullarda endojen kreatinin eşiksiz bir maddedir ve sadece glomerüler filtrasyon mekanizması ile atılır. Pratik olarak tübüler boşaltıma uğramaz ve tübülüslerden geri emilmez. Bu yüzden "kreatinin klerensi", glomerüler filtrasyon hızı (GFR)'nin bir göstergesi olarak kabul edilir (1, 139). Kreatinin, akut ve kronik renal

yetmezlikte, üriner traktüs tıkanmalarında, bazı ilaçlar tarafından indüklenen fonksiyonel böbrek hasarlarında serumda yükselir (144).

II.2.5. Nefrotoksisitede Kan Üre Azotu (BUN) Tayininin Değeri

Üre, insanlarda protein katabolizmasının başlıca azot içeren metabolik ürünüdür ve itrah edilen non-protein azot'un yüzde 75'inden daha fazlasından sorumludur. Vücuttan atılımı hemen tamamen böbrekler yoluyla olur. Amino asit azotundan kaynaklanan amonyaktan ürenin biyosentezi, karaciğerde üre siklusu (Krebs Henseleit Döngüsü) enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Üre oluşumu, aminoasitlerin dezaminasyonu ile oluşan ve organizma için toksik bir madde olan amonyağı zararsız hale getiren bir mekanizma olarak düşünülebilir (1, 144).

Amino asit katabolizmasının son ürünü olan üre, başlıca gıdasal ve dokusal proteinlerden meydana gelir. Üretim hızı, yüksek proteinli bir diyetle beslenmede veya açlık ve doku harabiyeti gibi endojen katabolizmanın yükseldiği hallerde artar. Sağlıklı bir bireyin üreyi itrah etme kapasitesi oldukça yüksektir. Böbrek işlevleri normal iken plazma üre düzeylerinin "normal" sınırları aşması, aşırı proteinli diyet alınmasına bağlıdır. Ağır doku harabiyeti veya akut açlığa bağlı olarak doku katabolizmasında artış olan durumlarda, renal işlevler de çoğunlukla bozulduğu için, kan üre düzeyleri normalin üzerine çıkabilir. Bu ayrıcalıklar bir yana bırakılacak olursa, plazma üre düzeyinde görülecek önemli derecede yükselmeler hemen daima böbrek fonksiyonlarındaki azalmaya bağlı renal işlev bozukluğunu gösterir (6, 139, 235).

Kan üre azotu (BUN), protein alımı ile direkt, üre atılım hızı ile zıt biçimde değişiklik gösterir. Renal hastalıkların geniş bir kısmında (glomerüller, tübüller, interstisyel veya vasküler) plazma üre konsantrasyonlarının arttığı gözlenmiştir. Ayrıca akut ve kronik nefrit, akut renal yetmezlik, üriner kanal tıkanmaları, renal fonksiyon bozuklukları ve adrenal yetmezlikte plazma üre azotu yükselir (144).

Serumda, "üre azotu/kreatinin" oranının normal bir diyetle beslenen sağlıklı bir kişide sabit olduğu belirtilmiştir. Akut tübüler nekroz, düşük protein alımı, açlık ve şiddetli karaciğer hastalıklarında (üre sentezi azalır) bu oran önemli bir şekilde düşer. Yine

çeşitli hastalıklarda kreatinin düzeyleri yükselmiş veya normal iken, bu oranda önemli bir artış olabilir (139).

Yayınlarda, serum veya plazmada yapılan üre azotu miktar tayinleri için, "Kan Üre Azotu" (Blood Urea Nitrogen; BUN) teriminin sıklıkla kullanıldığı görülmektedir. Üre analizlerinde kan örneklerinin kullanılmasından vazgeçilmiş olmasına rağmen, BUN tabirinin kullanılması da yanlış olmaz çünkü; serum (plazma) veya tam kandaki üre miktarları birbirine yakındır (139, 235).

Protein metabolizmasının son ürünü olan üre, böbreklerden atılıma uğrar. Glomerül filtrattaki üre konsantrasyonu plazmadakinin aynıdır. Glomerül filtrattaki ürenin yüzde 40-70 kadarı tübülerde (başlıca proksimal tübülerde) pasif olarak geri emilir. Bu difüzyon distal tübülerde sınırlıdır. Ürenin geri difüzyonu idrar akış hızı ile ters orantılıdır. Tübüler sıvı akımının yavaşladığı dehidrasyon durumunda filtre edilen ürenin interstisyuma geçişi artar, bu durum kreatinin için geçerli değildir. Glomerül filtrasyon miktarı azaldığı veya tamamen kesildiği zaman idrarla üre atılımı azalır, kanda üre miktarı artar. Ayrıca, kronik renal yetmezlikte, sağlam kalan nefronların ozmotik diürezis ürenin geri difüzyonunu sınırlandırır (1, 15, 139, 144).

Patolojik hallerde kanda ürenin yükselmesi, glomerüler fonksiyonların bozulduğunu gösterir. BUN, glomerüler fonksiyonların bir ölçütü olarak kullanılır. Plazma kreatinin düzeyleri de genellikle BUN'a paralel değişiklikler gösterir ve sıklıkla glomerüler filtrasyonun bir işaretçisi olarak kullanılır. BUN ve kreatinin analizleri, hem renal yetmezlik durumlarında, hem de insanlarda veya deney hayvanlarında nefrotoksik bileşiklerin neden olduğu renal fonksiyon bozukluklarını ortaya koymaları açısından değerlidirler (15).

Patolojik durumlarda kanda ürenin artması, genel olarak kreatinin miktarının artması ile birlikte seyreder. Ancak kanda ürenin arttığı durumlarda kreatinin artışı, ürenin önemli derecede artışından sonra görülür (6, 235).

II.2.6. Nefrotoksisitede Üriner Total Protein Tayininin Değeri

İdrarda protein ölçümü, glomerüler bütünlüğün tespiti açısından önemli bir analizdir. Glomerül membranın seçici geçirgenliği, normal renal fonksiyonlar için önemli bir

esas teşkil eder. Glomerül, plazma proteinleri için ultrafiltrasyon görevi görür. Normalde idrarda önemsenmeyecek derecede protein bulunur; bu, albuminden ve distal tübüllerden salgılanan düşük molekül ağırlıklı proteinlerden oluşur (139).

Genel olarak nefronların selektif permeabilitesi renal hastalıklar ve çeşitli nefrotoksik bileşiklerin etkisi ile artar. Bu sebeple, renal yetmezlik geliştiği durumlarda aşırı miktarlarda plazma proteinini idrara geçer. Deney hayvanlarına nefrotoksin uygulandıktan sonra idrarla önemli miktarda protein atıldığı gözlenmiştir (15).

Bununla birlikte tüm proteinüriler glomerüler fonksiyon bozukluğunun göstergesi değildir. Glomerüler proteinürilerde, glomerül zedelenmesine bağlı permeabilite artışının ilk sinyali idrarda albumin atılımının artması ve daha sonra molekül ağırlığı yüksek proteinlerin de idrara çıkmasıdır. Tübüler proteinürilerde ise, tübüler geri emilim mekanizmalarının bozulmasına bağlı reabsorbsiyon kusurunun ilk sinyali, düşük molekül ağırlıklı plazma proteinlerinin idrarda atılımının artmasıdır (235). Tübüler proteinüriye, genellikle reno-toksik ilaçların neden olduğu bildirilmiştir (139).

Proteinürilerin genellikle en ciddi ve en genel olanı glomerüler proteinürilerdir. Glomerül lezyonların şiddeti ve görüntüsüyle orantılı olarak glomerüllerden farklı büyüklükteki proteinlerin atılımı artarken, proteinürinin patofizyolojisi çok farklı olabilir. Bu değişiklikler, elektron mikroskobu ile incelenen renal biyopsi örneklerindeki histolojik bulgularla da paralellik gösterir. Hasarın son evresinde glomerüllerin çoğu işlev kaybına uğradığından, proteinüri azalır ve renal yetmezlik ortaya çıkar (139).

Az miktarda albumin normal olarak glomerüllerden filtre edilir. Reabsorbsiyon prosesi maksimuma yakın bir kapasite ile çalışarak ultrafiltrattaki proteinin yüzde 97-99'unu proksimal tübüllerden geri emer. Filtre edilen proteindeki orta dereceli artışlar, üriner protein atılım oranında önemli bir yükselme ile kendini gösterir (139).

Plazma proteinlerinin idrara çıkması özellikle böbrek hastalıklarının tanısında klinik öneme sahiptir. Böbrek dokusundaki bir hasardan ileri gelen bu proteinüriler "böbreksel" ya da "gerçek proteinüriler" olarak adlandırılır (235).

Protein tayinlerinde genellikle, random idrar örneklerinde protein miktarının oldukça değişken olması nedeniyle, 24 saatlik idrardaki total protein miktarının tayin

edilmesi tercih edilir. 24 sa.'lık idrar toplanmasının uğraştırıcı olduğu durumlarda ise, protein indeksi denilen "İdrar protein/İdrar kreatinin" oranı, proteinürinin derecesi hakkında nümerik bir bilgi verir. Lemann ve ark. (119), sağlıklı kişilerde, 24 sa.'lık ve porsiyon idrardaki protein/kreatinin oranlarının yakından ilişkili olduğunu saptamışlardır.

İdrarda total protein miktarının belirlenmesi, renal hastalığın/hasarın varlığını ortaya koyar. Proteinürilerin tipini belirlemede ise, spesifik proteinlerin kantitatif tayinlerinin yapılması önerilir (139). Ayrıca, üriner proteinlerin elektroforetik görüntüsü, glomerüler ya da tübüler defektleri tayin etmede yarar sağlar (235).

II.3. Gamma-Glutamil Transpeptidaz (GGTP)

Gamma-Glutamil Transpeptidaz (EC 2.3.2.2; γ -Glutamil-Peptit : Amino Asit γ -Glutamiltransferaz; GGTP) aktivitesinin varlığı ilk kez 1950 yılında Hanes ve ark. tarafından koyun böbreğinde saptanmış ve enzimin protein sentezinde rol alabileceği öne sürülmüştür. Bu araştırmacılar GGTP'ı substrat hidrolizi ya da gamma-glutamil grubunun transferini yapan, glutatyon üzerinde etkili ve gamma-glutamil peptitler için özgül bir enzim olarak tanımlamışlardır. Enzimi, glutatyon üzerindeki hidrolitik etkisinden dolayı "glutatyonaz" olarak isimlendirmişlerdir. GGTP'in aminoasit transportunda rol oynadığı 1954 yılında Hird ve Springel tarafından bildirilmiştir. Bu enzimin insan dokularındaki varlığı ise ilk kez 1960 yılında Szewczuk ve Orlowski tarafından sentetik gamma-glutamil sübstratları kullanılarak ortaya konmuştur (180).

Gamma-glutamil döngüsünde görev yapan tüm enzimlerin belirlenmesinden sonra Meister (130), amino asitlerin transportunu sağlamak üzere hücre zarlarında gamma-glutamil döngüsü (Meister Döngüsü)'nün yer aldığını açıklamış ve bu döngünün ilk enzimi olan GGTP'in hücre içi glutatyonun yıkımından sorumlu olduğunu bildirmiştir.

GGTP'in doğal sübstratı glutatyon'dur. Bu enzim, gamma-glutamil bileşiklerindeki gamma-glutamil grubunun, akseptör olarak bir L-amino aside veya peptide (transfer tepkimesi) veya suya (hidroliz tepkimesi) ya da substratın kendisine (ototransfer tepkimesi) transferini katalizleyen glikoprotein yapısında zarsal bir enzimdir (131, 180).

Enzim orjinal olarak "transpeptidaz" şeklinde isimlendirilirse de aslında katalitik özelliklerinden dolayı "transferaz" denmesi daha uygundur (139).

II.3.1. GGTP'in Organizmadaki Dağılımı

Gamma-glutamil transpeptidaz, kas hücreleri hariç (139), renal proksimal tübüller, safra, pankreas kanalları, seminal veziküller, prostat, fallop tüpleri, bronş, bronşioller gibi salgı ve emilim fonksiyonu gösteren bir çok dokunun epitel hücrelerinde yüksek düzeylerde, karaciğer, dalak, plasenta, santral sinir sistemi ve kalp gibi organlarda ise daha az miktarlarda bulunmaktadır (180, 206).

GGTP, böbrekte proksimal tübüllerin ve henle kulbunun fırçasal epitel hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Az bir kısmı sitozolde, büyük kısmı hücre membranında bulunur; membranda "γ-glutamil peptid"i oluşturarak amino asit ve peptitlerin hücreye transferini sağlar (107, 139).

Böbrekler, amino asit transportunun ve gamma-glutamil döngüsündeki enzimlerin yüksek aktivitede bulunduğu organlardır. Histokimyasal çalışmalar izole böbreğin fırçasal kenar fraksiyonunda zar proteinlerinin yaklaşık yüzde 1.5'ünü GGTP'in oluşturduğunu ve amino asitlerin reabsorbsiyonunun gerçekleştirildiği proksimal tübülüslerde lokalize olduğunu göstermiştir (130, 180, 206).

İnce barsak epitel hücreleri (130, 131, 180), beyindeki "choroid plexus" ve nöronlar, gözdeki "ciliary body" (130), periferik kanın hücresel elementleri ve bunların öncülü olan hücrelerin çoğunda (180), GGTP aktivitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir.

Enzim vücut sıvıları içinde en yüksek aktivitede safra ve seminal sıvıda bulunurken, en düşük aktivitede ise beyin omurilik sıvısında saptanmıştır. GGTP serum ve idrarda da bulunur (180).

II.3.2. GGTP'in Yapısal Özellikleri ve İzoenzimleri

Hücre zarına yerleşmiş olan bu enzim glikoprotein yapısındadır ve iki alt birimden oluşmaktadır (68).

Çeşitli memeli türlerinde, böbrek dokularından izole edilen GGTP'nin hafif alt birimlerinin 22 kDa olmak üzere aynı molekül ağırlığında olduğu oysa, ağır alt birimlerinin molekül ağırlığının türlere göre değiştiği açıklanmış, ağır alt birimin sıçan ve tavşanda 46-50 kDa arasında; insan, sığır, domuz ve koyunda ise 60 kDa veya üzerinde olduğu saptanmıştır (68, 131, 207).

Değişik türlerde ve aynı tür içindeki farklı dokularda yer alan GGTP'nin molekül ağırlıklarındaki farklılıklar, glikoprotein yapısındaki bu enzimin içerdiği nötral, asidik oligosakkaridler ile siyalik asit sayısındaki değişikliklerle açıklanabilmektedir (234).

Sıçan böbrek dokusundan saflaştırılan GGTP enziminin, çeşitli teknikler kullanılarak beş izozimik formu ayırt edilmiştir. Bu izoenzimlerin siyalik asit içerikleri ve şeker zincirleri sayısı açısından farklılıklar gösterdikleri ayrıca siyalik asit içerikleri ile izoelektrik noktaları arasında doğrusal bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (207). GGTP formlarının, tek tip bir enzim molekülünden post-translasyonel modifikasyonlar sonucu oluştuğu belirtilmiştir (139).

Son yıllarda yayınlanan iki araştırmada; uygulanan tekniklere göre değişiklik göstermek üzere serum GGTP izoenzimlerinin bir çalışmada 4 fraksiyona (162), diğer bir çalışmada ise 9-11 izoenzim bandına (233) ayrıldığı rapor edilmiş, belirli izoenzim formlarının özellikle hepatosellüler karsinoma ve karaciğer hastalıklarının tanısında işaretçi olabileceği bildirilmiştir.

II.3.3. İdrar GGTP Aktivite Tayininin Klinik Önemi

İdrarda bulunan GGTP başlıca böbrek dokusundan kaynaklanmaktadır (139).

Szasz (202), 1970 yılında ilk defa idrarda GGTP aktivitesini ölçebilecek bir yöntemi rapor etmiştir.

Üriner GGTP tayini, başlangıçta, akut inflamasyonda, kronik tahribat sürecinde ve böbrek transplantasyonundan sonra hastanın durumunu izleme açısından önemli bir test olarak değerlendirilmiş, daha sonra çeşitli toksikolojik araştırmalarda, kimyasal ajanların, ağır metallerin, pestisitlerin ve klinikte çeşitli ilaçların nefrotoksik etkilerinin araştırılmasında kullanılmıştır (31, 37, 43, 73, 78, 87, 135, 230).

Maruhn ve Szasz (127, 202), GGTP'in üriner atılımında sekse bağlı bir farklılık bulunmadığını bildirmişlerdir.

İdrar GGTP'inin izoenzim formları plazmadakinden çok böbrek GGTP'ına uygunluk göstermektedir. GGTP'in molekül ağırlığının sağlıklı glomerüllerden filtre edilemeyecek büyüklükte olması nedeniyle, üriner GGTP'in plazma enziminden köken almadığı ve enzimin normal idrarda bulunuş sebebinin böbrek tüp hücrelerinin yenilenmesi (turnover) esnasında membran fragmanlarından sızması ile ilişkili olduğu görülmektedir. Plazma GGTP düzeyleri yükselmiş olan farklı karaciğer hastalarının idrar enzim düzeylerinde bir artış görülmemesi, benzer şekilde üremili hastalarda plazmadaki enzimin aktivite artışına çok ender rastlanmış olması, plazma ve idrar GGTP düzeyleri arasında bir korelasyon bulunmadığı şeklinde yorumlanmaktadır. İdrar GGTP aktivitesi, akut böbrek hastalarında belirgin şekilde artmakta ve bu tip hastaların idrarındaki enzim özellikleri ve izoenzimleri normal kişilerin böbrek enzimine uymaktadır (180, 185)

Böbrek hastalığı olan 369 çocuk üzerinde yapılan geniş kapsamlı bir araştırmada; idrar GGTP aktivitesinin piyelonefrit, Alport's sendromu, Wilm's tümörü ve glomerülopati olgularında anlamlı bir artış gösterdiği, en yüksek artışın böbrek yetmezliği gösteren böbrek hastalıklarında olduğu belirtilmiştir. Üriner GGTP, çocukluk çağındaki tübüler bozuklukların değerlendirilmesinde kullanılabilecek "non-invasive" bir test olarak önerilmiştir (185).

Liebert (120), böbrek zedelenmesi ve çeşitli travmalara bağlı sekonder böbrek hasarlarının tanısında, üriner enzim tayinlerinin uygunluğunu 168 hasta üzerinde araştırmıştır. İdrarda GGTP aktivitesinin de saptandığı bu araştırmada, enzimüri ile izotop nefrografi ve renal sintigrafi arasında uyum bulunması gözönüne alınarak, bu yöntemlerin birbirini tamamladığı ve birlikte kullanılmaları gerektiği belirtilmiş, üriner GGTP'in renal hasarın tanısında yararlı bir gösterge olduğu vurgulanmıştır.

II.4. N-Asetil- β -D-Glukozaminidaz (NAG)

N-Asetil- β -D-Glukozaminidaz (EC 3.2.1.30; 2-asetamido-2-deoksi β -D-glukoz asetamidodeoksiglihidrolaz; NAG), molekül ağırlığı 130-140 kDa arasında olan lizozomal

bir enzimdir. Hücre membranları ve diğer biyolojik sistemlerde bulunan heksozamin içeren glikoprotein ve glikozaminoglikanların yıkılmasında görevli hidrolitik etkili bir enzimdir (116, 163, 164).

NAG, hemen hemen bütün memeli hücrelerinin lizozomlarında bulunur. Özellikle renal proksimal tübülüs hücrelerinin lizozomlarında yüksek konsantrasyonda bulunduğu bildirilmiştir (91, 107, 116). Enzim, molekül ağırlığının yüksekliğinden dolayı glomerüllerden filtre edilemez ve idrarda görülen yüksek NAG aktivitesi böbrek tübüler hücrelerinin hasarında ortaya çıkar (53, 116, 167, 236).

Enzim böbrekler dışında kan, dalak, akciğer, karaciğer, kalp, beyin ve testislerde bulunur (116).

Isaksson ve ark. (101), sıçanlarda, saflaştırılmış insan serum NAG izoenzimlerinin plazma klerenslerini araştırmışlar; A, B, P izoenzimlerinin dokudaki izoenzimlere göre dolaşımdan daha yavaş temizlendiğini, desialilasyondan sonra serum izoenzimlerinin klerenslerinin belirgin derecede arttığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca, nativ ve desialillenmiş serum NAG izoenzimlerinin sıçan karaciğeri nonparankimal hücreleri ve hepatositleri tarafından alınımını araştırdığında; nativ serum izoenzimlerinde tespit edilebilir bir alınma gözlenmezken, nörominidaz uygulaması ile desialillenmiş izoenzimlerden A ve B'nin karaciğer nonparankimal hücrelerince alındığı fakat P formu için böyle bir durum olmadığı ancak desialillenmiş serum formlarının hiçbirinin hepatositlerce alınmadığı gözlenmiştir.

II.4.1. NAG'ın Yapısal Özellikleri ve İzoenzimleri

N-asetil- β -D-glukozaminidaz, α ve β polipeptit zincirlerinin farklı kombinasyonlarından meydana gelmiştir; α ve β alt-birimlerinden oluşan karma multimerik yapıdan A izoenzimi, 2 ya da 4 β alt-birimden homomultimerik yapıdaki B izoenzimi oluşur (139).

NAG'ın asidik NAG-A, bazik NAG-B olmak üzere iki major formu, insan dokularında ve kanda yüksek konsantrasyonda bulunur. Ayrıca ara form'ları NAG-I₁, NAG-I₂ ile hamilelerde serumda görülen NAG-P olmak üzere minör form'ları daha vardır (53, 117,

126, 164, 167). NAG'ın iki temel izoenzimik formu A ve B ilk kez insan dalağında tespit edilmiş, daha sonra serum, idrar, böbrek, karaciğer ve serebrospinal sıvıda da gösterilmiştir (53).

NAG-A'nın, doku formu ve serum formu olarak iki tipi bulunur; serum izoenzimini doku izoenziminden ayırt etmek için, serumda bulunan izoenzime kısaca NAG-A^S denilmiştir (53, 191). NAG-A'nın böbrek izoenzimi (doku formu) 50°C de hızla inaktive olurken, B formuna benzeyen bazı ürünler oluşmaktadır. Oysa ki, NAG-A^S izoenzimi 50°C de ısıtıldığında iki ara form, I₁ ve I₂ meydana gelir. NAG-I₂'nin hamile kadınların serumunda görülen P formuna oldukça identik olduğu bildirilmiştir (53).

Sağlıklı kişilerin idrarındaki enzim aktivitesinin büyük kısmının NAG-A'nın doku formu olduğu, iyon değiştirici kromatografi ile serum formundan ayrılabilirdiği ve normal idrarda sadece çok az miktarlarda B formu ile birlikte ara form'ların bulunduğu gösterilmiştir (167, 191).

Normal idrarda bulunan NAG-A izoenziminin böbrek dokusunda bulunan NAG-A izoenzimi ile aynı molaritedeki sodyum klorürde elüe edilmesi, üriner NAG aktivitesinin sağlıklı kişilerde böbrek lizozomlarından kaynak aldığını ortaya koymuştur (53).

Yine aynı şekilde, normal idrarın izoenzim profilinin renal dokunun izoenzim profiline benzemesi, üriner NAG'ın plazma enziminin filtrasyonundan kaynaklanmadığını ve renal tübüler hücre orjinli olduğunu ortaya koymuştur (236).

NAG izoenzimlerinin yapısal farklılıkları, izoenzimlerin fiziksel özelliklerini de farklı kılmıştır. NAG-A'nın izoelektrik noktası (pI) 5.4 iken, NAG-B'nin ise 7.9'dur. Bu özellik major iki izoenzimin elektroforez ve iyon değiştirici kromatografi ile ayrılmasına olanak vermiştir. Ayrıca izoenzimler ısıya dayanıklılıklarına (termostabilite) göre de ayrılabilir. NAG-A'nın 50°C de sitrat-fosfat tamponunda (pH : 4.5) hızla inaktif olduğu fakat NAG-B'nin 50 dakika stabil kaldığı gösterilmiştir (126, 139, 164).

İnsan böbrek dokusu homojenatlarına DEAE-selüloz kromatografisi uygulandığında, total aktivitenin yüzde 26'sının B formu, yüzde 74'ünün ise A formundan meydana geldiği görülmüştür (91).

NAG'ın her iki major formunun da böbrek dokusunda bulunduğu, ancak sadece NAG-A'nın normal idrarda tespit edildiği, NAG-B'nin normal sağlıklı kişilerin böbrek dokusunda bulunmakla beraber idrarında pratik olarak görülmediği bildirilmiştir. Normal olarak idrarda atılan NAG'ın major formu NAG-A'dır. NAG-B idrarda, total üriner aktivitenin sadece 1/10'ini, böbrek dokusunda ise 1/4'ini oluşturmaktadır (53, 167). Normal idrarda total NAG aktivitesinin küçük bir toplamının (yüzde 13) NAG-B ve NAG-I form'larından oluştuğu bildirilmiştir (53, 236). Bu nedenle, NAG-B'nin idrarda görülmesinin daima anormal enzim atılımıyla birlikte olduğu, renal doku harabiyetinin duyarlı bir işaretçisi olduğu ve renal hasarın takibinde üriner NAG-B aktivitesinin izlenmesinin, total üriner NAG aktivitesinin izlenmesinden daha yararlı olduğu vurgulanmıştır (91, 167, 191).

Çeşitli böbrek hastalıklarında, idrardaki NAG-B izoenziminin total NAG aktivitesinin yüzde 30'undan fazlasını oluşturduğu tespit edilmiştir (167).

NAG-A'nın doku formunun idrarda yüksek aktivitede bulunuşunun renal tübüler hasarın bir göstergesi olduğu bildirilmiştir. NAG-A^S'nin molekül büyüklüğü yüzünden sağlıklı glomerüllerden geçemeyeceği ve normal koşullarda idrara çıkamayacağı, bu nedenle serum izoenziminin glomerüler hasarın bir işaretçisi olabileceği düşünülmüştür (191, 236). Hematürlü hastaların idrarlarında bulunan A formunun NAG-A^S formu ile aynı olduğu bildirilmiştir (53).

Patolojik idrarda NAG'ın her iki major formunun da atılımının arttığı, total NAG aktivitesinin büyük bir kısmından B formunun sorumlu olduğu bildirilmiştir. A formunun lizozomlardan ekzositoz yoluyla, B formunun ise lizozomal membrandan koparak atılması sözkonusudur. NAG-B'nin idrarda artmasının böbrek hasarına bağlı olduğu sonucuna varılmıştır (53, 167). Isıya dayanıklı B formunun patolojik durumlarda idrara çıktığı ve böbrek dokusunun yıkımında güçlü bir kanıt olduğu bildirilmiştir (229).

Çeşitli renal hasarlarda, ara form'ların da idrarda arttığı ancak bu artışın total aktivitenin sadece yüzde 5'i kadar olduğu saptanmıştır (53, 236).

NAG-B izoenziminin lizozomal membranda, NAG-A izoenziminin lizozomda, NAG-I izoenziminin ise plazmada bulunduğu gösterilmiştir. NAG-B'nin atılımında zar sınırlaması olması ve nefrotoksisitenin bir göstergesi olmasından dolayı idrardaki atılımının ılımlı hücre

nekrozuna bağlı olabileceği, NAG-I'nın ise transplant reddinin neden olduğu böbrek hasarına bağlı olarak plazmadan kaynaklanan bir sızıntıyı gösterebileceğine dikkat çekilmiştir (164, 236).

N-asetil- β -D-glukozaminidaz'ın genetik olarak eksikliğinde bazı lizozomal depo hastalıkları tablosu ortaya çıkmaktadır. Tay-Sachs (G_{M2} gangliozidoz tip 1), Bernheimer-Seltelberger, Adult-Chronic gangliozidoz hastalığında dokularda ve kanda NAG-A izoenziminin eksik olduğu, Sandhoff's hastalığında (G_{M2} gangliozidoz tip 2) ise hem NAG-A hem de NAG-B izoenzimlerinin eksik olduğu bildirilmiştir. Gaucher hastalığında (Tip 1 ve Tip 2) serumda NAG aktivitesinin oldukça yüksek olduğu saptanmıştır (139, 164).

Bourbouze ve ark. (24), mikrodiseksiyon tekniği kullanarak tavşan böbreğinde total NAG ve izoenzim aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında elektrofokusing ile nefronun her bir segmentinin izoenzim profilini çıkar mışlardır: Total NAG aktivitesinin başlıca NAG-A'dan oluştuğunu, NAG-A'nın glomerülde düşük, proksimal kıvrımlı tübülde ise diğer segmentlerden yaklaşık dört kat fazla olduğunu göster mişlerdir. NAG'ın A ve B izoenzimlerinin primer olarak proksimal kıvrımlı tübülde lokalize olduğunu, NAG-B izoenziminin nefronun tüm segmentlerinde bulunmasına karşın total NAG aktivitesinin küçük bir fraksiyonunu oluşturduğunu, ancak proksimal tübüllerde total NAG aktivitesinin yüzde 20-30'unu oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Bu nedenle NAG-B artışının proksimal tübüler hasarın bir göstergesi olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca elektrofokusing ile minör form, NAG-I'nın nefron boyunca yayıldığı gösterilmiş ve böbrek dokusunda her iki major izoenzimin de bulunduğu ancak normal idrarda baskın olarak A izoenziminin bulunduğu ve ekzositoz yolu ile atıldığı saptanmıştır. NAG-B formunun lizozomal membran ile ilişkili olması ve hücre hasarı meydana geldikten sonra idrara çıkmasından dolayı, geşitil hastalıklarda idrarda B formunun atılımındaki artışların, proksimal tübüler lezyonların varlığını gösterdiğini bildirmişlerdir.

Hultberg ve Isaksson (97), enzim immunoassay yöntemi ile insan idrarı ve böbrek korteksinde NAG izoenzimlerini incelemişler, böbrek korteksinde NAG-B'nin total NAG aktivitesinin yaklaşık yüzde 20'sini oluşturduğunu göster mişlerdir.

Karaciğer hastalıkları (192), diyabetes mellitus (163, 191), hamilelik, kanser ve myelomlarda (96, 200), arteriosklerozda ya da enfarktüs geçiren hastalarda (11) serumda NAG seviyesinin arttığı gözlenmiştir. İnsanda farklı lösemik hücre tiplerinde (lökosit, lenfosit, granülosit) NAG izoenzim aktiviteleri araştırılmış, NAG-I'nın tüm lösemi türlerinde anlamlı oranda yüksek olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, I izoenziminin yararlı bir tümör proliferasyon işaretçisi olduğu ve akut lösemisinin ayrıca tanısında faydalı olabileceği ifade edilmiştir (165).

Sağlıklı bir kişide serumda bulunan izoenzim A düzeyinin, izoenzim B düzeyinden yüksek olduğu bildirilmiştir (163, 191).

II.4.2. İdrar NAG Aktivite Tayininin Klinik Önemi

N-asetil-β-D-glukozaminidaz'ın renal proksimal hasarın son derece hassas bir göstergesi olduğu vurgulanmıştır (74, 91, 128, 224).

İdrar NAG aktivitesinin, böbrek hasarını tespit etmede oldukça duyarlı olduğu ve diğer klasikleşmiş renal fonksiyon testlerinin anormal sonuçlar vermesinden önce arttığı bildirilmiştir (109, 174).

Üriner NAG ölçümünün özellikle, çeşitli nefrotoksik yan etkili ilaçların yol açtığı renal hasarların izlenmesi başta olmak üzere (3, 7, 70, 71, 117, 118), cerrahi girişimlerden sonra ve birçok renal hastalığın takibinde (109, 201, 213, 214, 224) yararlı olacağı ifade edilmiştir. Ayrıca böbrek nakli ameliyatlarından sonraki olası doku reddinin izlenmesinde günlük atılımının ölçülmesi erken bir haberci olarak değerlendirilmektedir (25, 236).

Diyabetes mellitus (93, 138, 191), diyabetik mikroanjyopati (229), esansiyel hipertansiyon (2), hipertroidi (209), akromegali (196) ve felçli olgularda (98) ayrıca aşırı sigara tüketenlerde (99), endüstriyel ve çevresel toksinlerin neden olduğu böbrek hasarlarında (13, 14, 23, 29, 58, 208, 210) idrarda NAG aktivitesinin arttığı bildirilmiştir.

Kunin ve ark. (116), yaptıkları geniş kapsamlı bir araştırmada, üriner NAG/kreatinin oranının 2-56 yaş grubunda, herhangi bir sekse bağlı farklılık olmaksızın her iki sekste de oldukça sabit (hemen hemen aynı değerde) olduğunu belirtmişlerdir. İki yaşından küçük çocuklardaki artmış değerlerin, düşük glomerüler filtrasyona ve düşük kreatinin atılımına

bağlı olduğu bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar, idrarda NAG artışının renal transplantasyon rejeksiyonunun tanınmasında, renal iskemide, böbreğe uygulanan cerrahi girişimlerden sonra ve birçok böbrek hastalıklarında (glomerüler yada tübülointerstisyel) ortaya çıktığını bildirmişler ve NAG enzimürisini renal hastalığın izlenmesinde güvenilir bir test olarak önermişlerdir.

Yapılan bir çalışmada; çocuklarda aminoglikozid tedavisi sırasında oluşabilecek nefrotoksisite riskini önceden haber vermesi açısından, idrardaki NAG seviyesi bir gösterge olarak kabul edilmiş ve idrar NAG seviyesi tedavi sırasında başlangıç değerinden bir kat daha fazla yükselmiş ise aminoglikozid kullanımında dikkatli olmak gerektiği bildirilmiştir (7).

Gibey ve ark. (71), on gün süreyle dört farklı aminoglikozit (gentamisin, dibekasin, netilmisin, amikasin) ile tedavi edilen 88 hastada; tedavi sonrasında gentamisin verilenlerde NAG-B'nin üriner atılımında önemli bir artış, diğer ilaçların verildiği kişilerde ise üriner NAG-A ve NAG-I izoenzim düzeylerinde önemli bir artış saptamışlardır. Bunun nedenini, farklı gruplardan olan bu antibiyotiklerin toksisite mekanizmalarının farklı olmasına ve üriner NAG izoenzim atılımının nefrotoksik hasarın farklı tiplerinde değişkenlik göstermesine bağlamışlardır. İzoenzim A ve I'nın üriner atılımındaki yükselmelerin düşük nefrotoksisite riskini, B'nin üriner atılımındaki yükselmenin ise yüksek nefrotoksisite riskini akla getirebileceğini işaret etmişlerdir.

Jung ve ark. (109), kronik renal hastalığı olan olgularda yaptıkları bir çalışmada, NAG ölçümünün renal hasarı tespit etmede diğer üriner enzimler ile klasik parametrelerden (serum kreatinin, total protein atılımı gibi), ayrıca GFR ölçümünden daha duyarlı ve hassas olduğuna işaret etmişler, nefrolojide bu enzimin idrar tayinlerini kronik renal hastalıkların tanı ve takibi açısından yararlı bir parametre olarak önermişlerdir.

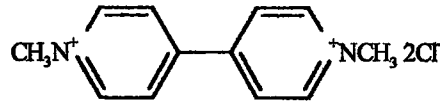
Langhendries ve ark. (117)'nin aminoglikozid nefrotoksisitesine ilişkin yayınladıkları bir derlemede; sağlıklı yetişkinlerin idrarında NAG-A aktivitesinin baskın olduğunu fakat aminoglikozit tedavisi gören yetişkinlerin idrarlarında NAG-B aktivitesinin daha fazla olduğunu, bu durumun, aminoglikozitlerin tercihi olarak B formunun sentezini indüklemesiyle ilgili olduğunu belirtmişlerdir. Diğer yandan, sağlıklı neonatlarda üriner NAG aktivitesinin sadece B formundan oluştuğu, insan amnion sıvısında tespit edilen

NAG'ın izoenzim profilinin sağlıklı yenidoğan infantların idrarlarındaki ile aynı olduğu ve böbrek hasarlarında idrara geçen B formunun immature form olduğunu ifade etmişlerdir.

Johnston ve ark. (104), hipertansiyonlu hastalarda, idrarda NAG aktivitesi ile protein tayinlerinin renal hastalığın tespitinde en duyarlı parametreler olduğunu ifade etmişler özellikle üriner NAG ölçümlerinin, birincil böbrek hastalıklarının tanısında oldukça hassas bir işaretçi olduğunu da vurgulamışlardır.

II.5. Parakuat

Parakuat (Metil Viologen; 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilyum diklorür) (Şekil 3), literatürde ilk defa 19. yüzyılın sonlarında Weidel ve Rosso tarafından bahsedilmiştir. 1933'de Michaelis ve Hill, maddenin redoks özelliklerini keşfederek bileşiği "Metil Viologen" olarak adlandırmışlardır. Bu özelliğinden dolayı uzun yıllar kimyacılar tarafından oksido-redüksiyon indikatörü olarak kullanılmıştır. 1950'lerde İngiltere'de "Imperial Chemical Industries" (ICI)'deki araştırmacılar tarafından herbisidal aktivitesi keşfedilip, 1955'de orjinal olarak bipiridilyum herbisidi olarak geliştirilmiştir. 1962'de ICI'nın "Plant Protection" departmanı tarafından patentlenerek geniş spektrumlu kontak herbisit (tarımda yabancı otları öldürmede kullanılan madde) olarak piyasaya sunulmuştur. Günümüzde, başta Britanya olmak üzere dünya üzerinde 130'u aşkın ülkede herbisit olarak kullanımı oldukça yaygındır (84).

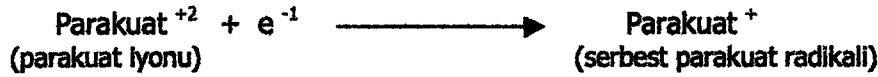


Şekil 3. Parakuat'ın kimyasal yapısı

İnsanlarda kazayla parakuat yutulması sonucu meydana gelen ilk zehirlenme vakası literatürde 1966 yılında bildirilmiştir. Sadece 1966-1978 yılları arasında parakuat zehirlenmesine dair tıbbi yayınlarda 400'den fazla makale yayınlanmıştır (80).

II.5.1. Parakuat'ın Herbisidal Aktivitesi

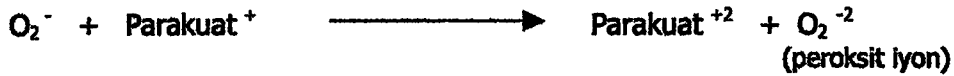
Parakuat herbisidal aktivitesini bitkilerin yeşil yaprakları üzerinde gösterir. Işık ve oksijen varlığında hızlı bir şekilde yabancı bitkileri öldürür. İlk olarak Dodge ve ark. (49)'nın önerdikleri fitotoksisite mekanizmasına göre; parakuat, bitki hücresinin klorofillerinde solunum ve fotosentez işlemleri esnasında elektron transfer sistemi ile girişim yaparak, NADP^+ 'nin NADPH 'a redüksiyonunu inhibe eder. Elektronlar için NADP^+ ile yarışarak, kendisi stabil bir serbest radikale indirgenir :



Kloroplastlarda üretilen moleküler oksijen, serbest parakuat radikali ile reaksiyona girerek parakuat iyonunu rejenere ederken (reoksidasyon), okside parakuat iyonu ve süperoksit iyonu açığa çıkartır :



Süperoksit iyon ve diğer bir parakuat⁺ radikali reaksiyona girerek peroksit iyonu oluşturur :



Bu reaksiyonlar sonucunda meydana gelen oksijenin reaktif formları, süperoksit ve peroksit radikalleri, bitki hücre membranları için oldukça toksiktirler. Membranların polidoymamış lipit bileşenlerini polimerize ederek membranların parçalanmasına yol açarlar. Parakuat ile muamele edilen bitkilerin yeşil yapraklarından alınan hücre örnekleri elektron mikroskopunda incelendiğinde, hücre membranlarının parçalanmış olduğunun gözlenmesi, parakuat tarafından meydana getirilen hasarın primer bölgesinin hücre membranları olduğunu doğrulamıştır (80, 197).

Parakuat, yeşil yapraklı bitkilere topik olarak uygulandığı zaman güneş ışığının da etkisiyle oldukça etkili bir fitotoksik maddedir. Uygulanmasını takiben toprakta bulunan kolloidal kil partikülleri içinde adsorbe olunarak etkisiz hale geçtiği ve bu nedenle diğer

herbisitlerin aksine hiçbir çevresel kontaminasyon riski taşımadığı bildirilmiştir. Bu nedenle normal kullanım şartlarında insan ve hayvan yaşamı için herhangi bir toksisite riski taşımamaktadır (80, 197). İnsanların ve hayvanların tükettiği tarımsal ürünlerle de kontaminasyonunun olmadığına anlaşılmıştır, parakuat'ın etkili, aynı zamanda güvenilir bir kontak herbisit olarak kullanımını yaygınlaştırmıştır (84).

II.5.2. Parakuat Maruziyeti

Parakuat zehirlenmesi çoğunlukla herbisidin intihar amacıyla ya da kazara oral yoldan vücuda alınmasıyla olur. Oral yoldan alınan herbisidin oldukça düşük bir absorpsiyon oranı olduğu bildirilmiştir. İnsanlarda 4 mg/kg dozu toksik, 30 mg/kg dan fazlası öldürücü risk taşımaktadır (50, 161).

Parakuat'ın dermal absorpsiyon yoluyla ciddi bir toksisite oluşturduğuna ilişkin az sayıda yayın mevcuttur. Parakuat'ın normal kullanımı sırasında derinin mükemmel bir bariyer olduğu (84, 219), ancak mekanik ya da kimyasal bir hasar sonucu deride oluşan yara/sıynklardan perkütan absorpsiyonun önemli oranda arttığı gözlenmiştir (69, 161). Ayrıca deride direk sitotoksik etkisine bağlı olarak oluşturduğu lokal hasar sonucu bariyerin ortadan kalkması, parakuat'ın intak deriden letal dozda absorpsiyonuna olanak verebilir (50, 217). Dermal toksisite nadir olup, genellikle ürünün yanlış kullanımı ya da dikkatsizlik, kaza sonucu ürüne topik olarak maruz kalmanın sonucu meydana gelebilir (84).

Solunum yoluyla parakuat absorpsiyonunun çok düşük hatta olası olmadığı bildirilmiştir. Tarımsal uygulamalarında, parakuat çözeltilerinin spreyleneşmesi ile oluşan parakuat aerosollerinin düşük buhar basıncına sahip olması nedeniyle buharlaşamaması ve havada asılı kalamaması ayrıca aerosol partiküllerinin çapının 5 mikrondan daha büyük olması nedeniyle alveolar bariyeri geçememesi, inhalasyon yoluyla sistemik toksisite oluşturma riskini azaltmaktadır (17, 80, 84).

Kazayla ya da intihar amacıyla parakuat yutulmasından sonra morbidite ve mortalite oranı fazla olmakla beraber (168), uzun dönem spreş uygulayan tarla işçilerinde yapılan epidemiyolojik araştırmalarda, gerek dermal gerekse inhalasyonel maruziyete bağlı herhangi bir ciddi sistemik toksisitenin gözlenmediğı bildirilmiştir (84, 190).

Herbisidin nadir olarak, cana kıyma amacıyla enjeksiyonu yoluyla sistemik toksisiyete yol açtığı da bildirilmiştir (82).

II.5.3. Parakuat Farmakokinetikleri

Parakuat, gastrointestinal sistem (GİS)'den oldukça zayıf absorbe edilir; oral dozun yaklaşık yüzde 1-5'i sistemik absorpsiyona uğrar. Mide tübüyle sıçanlara radyoaktif işaretli parakuat verildikten sonra, verilen dozun yüzde 70-80'inin feçes ile yüzde 10-20'sinin ise idrar ile atıldığı gözlenmesi, parakuat'ın oral emiliminin zayıf olduğunu göstermiştir (46).

Parakuat, farkedilir bir şekilde metabolize edilmeden başlıca böbrekler yoluyla vücuttan atılır. Herbisidin böbreklerden eliminasyon mekanizması tam olarak açıklığa kavuşmamış olmakla beraber, enerji-bağımlı mekanizmalar aracılığı ile renal kortekste aktif olarak biriktiği ve eliminasyonunun düşük serum konsantrasyonunda katyon transport sistemi aracılığı ile aktif olarak renal tübüler sekresyonla, yüksek serum düzeylerinde ise nefrotoksisite gelişiminin kendi sekresyonunu azalttığı, eliminasyonda glomerüler filtrasyonun önemli olduğu belirtilmiştir (35, 51, 122, 197, 222). Daniel ve Gage (46), sıçanlarda yaptıkları çalışmada, oral yoldan verilen reaktif işaretli parakuat'ın yüzde 30'unun parakuat metaboliti halinde feçeste bulunduğunu, ancak subkutan (s.c.) enjeksiyonla verilen radyoaktif işaretli parakuat'ın hemen tamamının (yüzde 96) değişikliğe uğramamış halde idrarla atıldığını bildirmişlerdir. Absorbe olunan parakuat'ın çok az bir kısmının ise safra ile gastrointestinal kanala atıldığı bildirilmiştir (184).

Parakuat'ın farmakokinetiği konusunda yapılan erken dönemdeki çalışmalarda; vücut sıvıları ve dokularda tespit edilememesi nedeniyle parakuat'ın, memeli dokusundan hızla ve tamamen itrah edildiği düşünülmüş, bu yüzden "vur - ve - kaç zehir" olarak adlandırılmasına neden olmuştur (34).

Daha sonraları, parakuat eliminasyonunda "üç kompartımanlı açık model" in geçerli olduğu ortaya konmuştur (18) : Birinci kompartıman olan kan, santral kompartımandır. İkinci kompartıman periferik kompartımandır ve böbrek, akciğer, kalp v.s gibi oldukça vasküler dokulardan oluştuğu kabul edilir. Bu kompartımanlar ile kan arasında oldukça hızlı

bir değişim vardır. Üçüncü kompartımanın ise akciğerler içindeki pnömositler olduğu düşünülür. Pnömositlerin santral kompartıman ile etkileşimi yavaştır. Parakuat, poliamin transport sistemi ile pnömositlerde aktif olarak birikir.

Parakuat, bifazik eliminasyon kinetiği gösterir; başlangıçta plazma konsantrasyonunda hızlı bir yükselmenin ardından hızlı bir itrah, sonrasında ise yavaş (uzamış) eliminasyon periyodu sözkonusudur. Uzun eliminasyon periyodu boyunca parakuat'ın kandaki konsantrasyonunun tespit sınırlarının altında olduğu, bunun nedeninin ise periferel dokuların parakuat deposu gibi görev yapmaları ve parakuat'ın bu dokulardan oldukça yavaş olarak kana geri verilmesidir (82). Uzamış eliminasyon periyodu, herbisidin plazmadan periferel kompartımanlara doğru kaymasının bir sonucu olup, dokuların herbisit ile uzun süre maruz kalmasına ve ciddi doku harabiyetlerinin ortaya çıkmasına neden olur. İnsanlarda parakuat toksisitesi başlangıçta aktif olarak atılımının gerçekleştiği böbreklerde, takiben akciğer ve diğer dokularda kendini gösterir (34, 48, 82). Parakuat'ın vücuttan atılımının başlıca böbrekler yoluyla olması nedeniyle, gelişen erken renal yetmezliğin de parakuat eliminasyonunda belirgin bir azalmaya ve yeniden dağılımına (redistribüsyon) bağlı olarak dokularda, özellikle akciğer dokusunda, belirgin olarak yığılımina katkıda bulunur (181). Ölümünün başlıca nedeni sıklıkla pulmoner interstisyel fibrözün neden olduğu respiratuvar yetmezlik sonucunda meydana gelir (34). Akut zehirlenme durumundan sonra yaşama dönmüş kişilerde veya ölenlerde yapılan postmortem analizlerde, parakuat'ın alındıktan haftalar/aylar sonra bile plazma, idrar ve dokularda tespit edilebildiği gözlenmiştir (92, 184). Sıçanlarda yapılan toksikolojik araştırmalarda da, kandan zehirin hızla elimine edildiği ve akciğer, karaciğer, böbrek, dalak, beyin ve kalp gibi dokularda önemli miktarlarda biriktiği ve uzun süre tespit edildiği izlenmiştir (143, 193).

Dey ve ark. (48)'nın yaptıkları bir çalışmada, sıçanlara s.c. parakuat verilmesini takiben plazma ve dokulardaki parakuat konsantrasyonları tespit edilmiş; uygulamadan sonraki 10-60 dakika içinde böbreklerin en yüksek parakuat konsantrasyonuna sahip doku olduğu, plazmanın üç katı miktarda parakuat içerdiği tespit edilmiştir. 4 saat - 7 gün boyunca ise en yüksek parakuat konsantrasyonuna sahip dokunun akciğerler olduğu bildirilmiştir.

Hawksworth ve ark. (85)'nın parakuat eliminasyonunu inceledikleri çalışmalarında; köpeklerle düşük dozlarda intravenöz (i.v.) parakuat verilmişinden sonra, parakuat'ın idrarla hızla elimine edildiği, yüksek dozlarda ise renal klerenste, glomeruler filtrasyon hızında ve idrar hacminde hızlı bir düşme meydana getirerek renal yetmezlik meydana geldiği ve kendi eliminasyonunu azalttığı gözlenmiştir.

Parakuat'ın para-amino hippurik asit (PAH) klerensinde azalmaya neden olması, renal hemodinamiklerde derin değişikliklere neden olduğunun, ayrıca inülin klerensinde azalmaya neden olması ise total renal fonksiyonlarda genel bir azalmaya yol açtığına göstergesidir (122).

II.5.4. Parakuat'ın Toksik Etkileri

İnsanlarda, yüzde 20 parakuat içeren konsantre çözeltisinden (Gramoxone) bir ağız dolusu alınması ile ya da derinin geniş bir yüzeyinin lokal olarak maruziyeti sonucu akut multiorgan hasarları meydana geldiği bildirilmiştir (83, 150).

Parakuat, doza bağlı olarak akciğer (19, 94, 100), karaciğer (142, 216), böbrek (60, 65, 143, 187, 199), kalp (159, 171, 178), adrenaller (148, 178), santral sinir sistemi (50, 95), deri (42, 102), oral mukoza ve özefagusta (217) önemli toksik hasarlara yol açar. Bunların yanı sıra, mutajenik etkisi de dikkate alınmaya başlanmıştır (189).

İnsanlarda parakuat zehirlenmesi yüzde 30-60 arasında mortalite riski taşır (41, 83). Zehirlenmenin şiddetine bağlı olarak ölümler birkaç saat ile birkaç hafta içinde, akut renal yetmezlikten ya da çoğunlukla "delayed death" olarak isimlendirilen ilerleyici, irreversibl pulmoner fibröz nedeniyle kötüye giden şiddetli pulmoner yetmezlik sonucu meydana gelmektedir (18, 33, 80, 82, 83, 197, 217).

Parakuat zehirlenmesinin ilk bulguları sıklıkla, pulmoner ödemle birlikte böbrek ve karaciğer fonksiyonlarındaki bozukluklardır (33, 82).

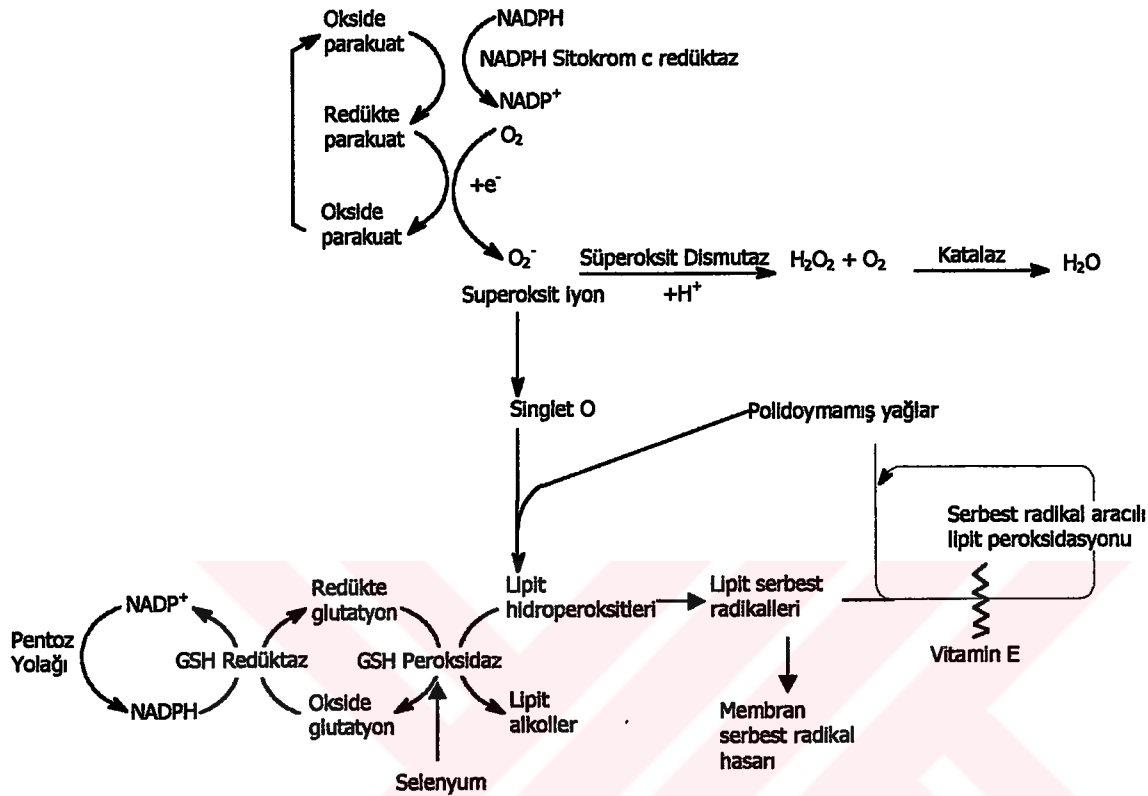
İnsanlarda parakuat zehirlenmesinin renal disfonksiyon bulguları; üremi, azalmış serum proteini, proteinüri, aminoasidüri, glikozüri, fosfatüri, idrarda aşırı sodyum ve ürat kaybı (serum elektrolit düzeyi değişiklikleri) ile sonuçlanan proksimal tübüler fonksiyon bozukluklarını kapsar. Renal biyopsi ya da böbrek dokusunun postmortem incelenmesinde

glomerüler dejenerasyon ile proksimal tübüler nekroz sıklıkla görülür. Akut tübüler nekroza bağlı olarak oligürik ya da non-oligürik renal yetmezlik gelişebilir. Ayrıca adrenal kortikal nekroz oluşumu da dikkate değer sıklıktadır. Ancak renal yetmezlik, parakuat zehirlenmesindeki ölümlerin genel nedeni değildir (9, 41, 80, 178, 184, 217).

İnsanlarda Gramoxone ingesyonunun akut renal yetmezliğe neden olduğu sıklıkla bildirilmiştir (65, 83, 187, 198). Yapılan toksikolojik araştırmalarda, sıçan, fare, köpek ve koyunlara parakuat verildikten sonra proksimal tübüler hasar ve renal fonksiyonlarda azalma gözlenmiştir (12, 51, 122, 147, 221, 222). Absorbe olunan parakuat'ın yüzde 80'den fazlasının böbrekler yoluyla itrah edilmesinin, renal fonksiyonlardaki erken bozulmanın sonucu parakuat eliminasyonunu azalttığı ve parakuat kinetiklerini değiştirerek toksisiteyi arttırdığı bildirilmiştir (46). Parakuat nefrotoksitesi nefronun proksimal segmenti ile sınırlıdır. Parakuat'ın başlıca böbrekler yoluyla ve aktif sekresyonla atılması, proksimal tübül hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda birikmesine neden olur. Aynı zamanda böbreklerde toksik konsantrasyona erişen herbisidin renal fonksiyonlarda meydana getirdiği bozulma ve renal hasar, eliminasyonuna engel olarak böbrek dışındaki diğer organlarda da birikmesine ve toksik etki göstermesine neden olur (51, 85).

Parakuat'ın *in vivo* toksisite mekanizması, bitki hücresindeki fitotoksisite mekanizması ile benzerdir : Parakuat'ın tek elektron redüksiyonu ile başlayan sıklık redüksiyon-oksidasyon reaksiyonları sonucunda meydana gelen reaktif oksijen türleri (süperoksit ve peroksit radikalleri), hücre membranındaki poli-doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipid hidroperoksitlerini meydana getirir. Oldukça dayanıksız olan lipid hidroperoksitleri yağ asidi serbest radikallerine dekompoze olur. Böylece hücre ölümüne neden olan lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonu tetiklenmiş olur (Şekil 4).

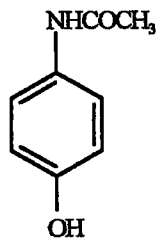
Bunun yanı sıra hücrede NADPH'ın hızlı ve sürekli oksidasyonunun, yaşamsal hücresel faaliyetlerin yavaşlaması ve yaygın hücre ölümünde önemli rolü olduğu da bir gerçektir (17, 33, 195).



Şekil 4. Parakuat'ın *in vivo* toksisite mekanizması (Bus ve ark. (1975) tarafından önerilen), (33).

II.6. Asetaminofen

Asetaminofen (Parasetamol; N-asetil-p-aminofenol; APAP) (Şekil 5), non-steroidal antiinflamatuar ilaçlar (NSAİİ)'in para-aminofenol türevleri grubunda yer alır. Güçlü analjezik ve antipiretik etkiye sahip olmakla birlikte antiinflamatuar etkisi oldukça zayıftır (110).



Şekil 5. Asetaminofen'in yapısı

Asetaminofen 1800'ü yılların sonlarında sentez edilmiş, tıpta ilk defa 1893 yılında von Mering tarafından kullanılmıştır. Fenasetin'in başlıca aktif metaboliti olduğunun anlaşıldığı 1949 yılından sonra popüler bir ilaç haline gelmiştir (39). Fenasetin'in analjezik nefropatisine neden olduğunun anlaşılmasıyla birlikte 1960'lardan itibaren başta İskandinav ülkeleri olmak üzere Türkiye de dahil birçok ülkede kullanımı yasaklanmış, onun yerini asetaminofen almıştır. Günümüzde asetaminofen tüm dünyada yaygın olarak kullanılan narkotik-olmayan analjezik-antipiretik ilaçların başında gelmektedir (110, 177).

II.6.1. Farmakolojik Etkileri

Asetaminofen, analjezik-antipiretik etkileri aspirin'e eşit fakat antiinflamatuvar etkinliği oldukça düşük olan bir ilaçtır. Bu nedenle iltihabi indikasyonlarda kullanılmaz. Ancak antiinflamatuvar ilaçların analjezik etkisini arttırmak için kombine kullanılabilir (110).

Asetaminofen, özellikle çocuklarda ve aspirin kullanımı kontrendike olan (gut ya da peptik ülserli) hastalar da dahil olmak üzere her yaştan insanda, ılımlı-orta şiddetli ağrıların tedavisinde kullanılan "mild-analgesic" olarak tabir edilen bir ilaçtır. Analjezik-antipiretik etkilerinin santral sinir sisteminde araşidonat siklooksijenaz enzimi üzerinden prostaglandinlerin sentez ve saliverilmesini selektif olarak inhibe etmesiyle ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Periferdeki peroksitten zengin iltihabi dokulardaki siklooksijenaz'ı inhibe edememesi, antiinflamatuvar etkisinin olmamasını açıklayabilir. Yetişkinlere önerilen oral dozu günde 4 g'ı aşmamak şartıyla 500-1000 mg'dır; bu dozlarda self-medikasyon için 5-10 günden fazla kullanılması tavsiye edilmez (27, 39, 110, 182).

II.6.2. Absorbsiyon ve Farmakokinetiği

Asetaminofen oral yoldan alındığında GİK'dan süratle ve tamamen absorbe olur. Sistemik yararlılığı yüzde 75'tir. Terapötik etkisi erken başlar; plazma düzeyi 1/2-1 saat içinde maksimuma erişir. Terapötik yarı ömrü 1.5-2.5 saattir, toksik dozlarda 8 saate kadar çıkabilir hatta artabilir (27, 110, 172, 182). Plazma yarı ömrünün uzamasında karaciğer hasarına bağlı olarak ilacın metabolizmasındaki bozulmanın ve konjugasyonun doygunluğa

erişmesinin rolü olduğu düşünülmüşse de, alınan dozun büyük kısmının başlangıçta hızlı bir şekilde absorbe edilmesinin, kalan kısmın absorpsiyonunun ise yavaş ve uzamış olmasının asıl önemli etken olduğu belirtilmiştir (204).

Asetaminofen, vücut sıvılarında hemen hemen uniform bir dağılım gösterir ve değişken oranlarda plazma proteinlerine bağlanır. Akut zehirlenme durumunda yüzde 20-50'sinin plazma proteinlerine bağlandığı bildirilmiştir (27, 110, 182).

Asetaminofen, büyük oranda (yaklaşık yüzde 95'i) metabolize edilerek, başlıca karaciğer mikrozomal enzimleri tarafından glukuronik ve sülfürik asitle konjuge edilip non-toksik metabolitleri halinde idrarla atılır, çok az bir kısmı da değişmemiş halde idrarda bulunur. Normal metabolizmasında ilacın yaklaşık yüzde 4 oranında sitokrom P450 karma fonksiyonlu oksidaz enzim sistemi yoluyla oksitlenerek kimyasal olarak reaktif ara ürünlere dönüştüğü bildirilmiştir. Terapötik dozlarda toksik ara metabolitler hücresel glutatyon ile konjuge edilerek hızla detoksifiye edilir. Glutatyon konjugatları vücuttan intakt olarak ya da sistein veya merkaptürik asit ile konjuge edilerek sekonder metabolitler şeklinde atılırlar (110, 172, 204). Asetaminofen'den sitokrom P450 aracılığı ile oluşan bir metaboliti, N-asetil-p-benzokinonimin'in ise çok reaktif bir ara bileşik olduğu ve glutatyon'un sülfidril grupları ile tepkimeye girdiği bildirilmiştir (177) (Şekil 6).

Farelerde yapılan bir çalışmada metabolitlerin doku/plazma oranları tespit edilmiş; glutatyon konjugatlarının karaciğerde, sistein konjugatlarının böbrekte konsantre olmasının, fare böbreğinin sistein konjugatlarının sentezinde başlıca yer olabileceğini düşündürmüştür (204). Asetaminofen'in hidrokisillenmiş ve deasetillenmiş metabolitleri de az miktarda oluşur. Mutad dozda eliminasyon yarı ömrü 2.4 saattir; aşırı dozda alındığında 7.3 saate kadar çıkabilir (110).

II.6.3. Toksikolojik Özellikleri

Asetaminofen, hekimin tavsiye ettiği tedavi dozlarında alındığında iyi tolere edilen, yan etkileri az olan bir ilaçtır. Ancak, aşırı dozda alındığında doza bağlı olarak oldukça ciddi yan etkiler meydana getirebilir (110).

Asetaminofen aşırı dozda alındığında, öldürücü akut karaciğer nekrozu yaptığı bilinen az sayıdaki ilaçlardan biridir (110, 182). Ayrıca aşırı dozlarında renal tübüler nekroz ve akut böbrek yetmezliği geliştiği de bildirilmiştir (173).

Yetişkinlerde bir seferde 10 g ve üstü dozlarda alındığında belirgin akut karaciğer nekrozu sıklıkla meydana gelir. Bir seferde 20 g'ın üzerinde alınmışsa ölüm riski artar (39, 110). İngiltere'de yapılan bir araştırmanın istatistiksel sonuçları, asetaminofen'in 1989 yılında self-zehirlenme vakalarında meydana gelen ölümlerin dördüncü en yaygın sebebi olduğunu ortaya koymuştur. Bu raporda ilacın İngiltere ve Galler'de "İntihar hapi" olarak adlandırıldığı da görülmektedir (177).

İlacın absorpsiyonu, eliminasyonu ile kıyaslandığında oldukça hızlıdır. Bu nedenle oral olarak alınan ilaç hızla dokulara geçebilir. İlaç değişmemiş halde başta karaciğer olmak üzere, yüksek miktarlarda böbrek dokusunda birikir ve bu organlar için potansiyel toksisite oluşturabilir (39, 204).

Karaciğer ve böbrek asetaminofen'in konjugasyonunda başlıca rolü olan organlardır (204).

Asetaminofen, böbreklerde primer olarak glukuronidasyon ile elimine edilir. UDP-glukuronil transferaz enzimi genetik olarak eksik olan Gunn ve RHA sıçanların asetaminofen nefrotoksitesine daha duyarlı oldukları gösterilmiştir. Duyarlılığın nedeninin, ilacın glukuronidasyonundaki azalmaya ve dolayısıyla sitokrom P450 aracılı biyoaktivasyonundaki artmanın sonucunda meydana gelen toksik reaktif ara ürünlere bağlı olduğu ortaya konulmuştur (47).

Asetaminofen'in toksik renal metabolizmasında iki major metabolik yolun önemli olduğu bildirilmiştir. Bunlar, başlıca kortekste lokalize olan NADPH-bağımlı sitokrom P450 karışık fonksiyonlu oksidaz sistemi diğeri ile, baskın olarak medullada lokalize olan NADPH-bağımsız prostaglandin H sentaz (yağ asidi siklooksijenaz ve prostaglandin hidroperoksidaz) sistemidir (220).

Yüksek dozda asetaminofen insanlarda, Fischer 344 (F344) sıçanlarda hepatik sentrilobular ve renal kortikal nekroza neden olur. Hepatik nekroz, mikrozomal sitokrom P450 sistemi aracılığı ile arilleyici ara ürünün oluşumuna bağlıdır. Ancak renal mikrozomlar

tarafından da asetaminofen'in P450 bağımlı mekanizmalar yoluyla arilleyici ara ürüne metabolize edilmesi, asetaminofen'in neden olduğu renal hasarın en azından bir kısmının, karaciğerde gerçekleşen biyokimyasal mekanizmalara benzer olduğunu düşündürmektedir (151).

Aşırı miktarlarda ilacın genellikle cana kıyma amacıyla alındığı bilinmektedir. İlacın aşırı dozlarda alınması sonucu meydana gelen akut nefrotoksisite, asetaminofen'in sitokrom P450 karışık fonksiyonlu oksidazlar ile metabolik aktivasyonuna bağlıdır ve baskın olarak renal korteksle sınırlıdır. Asetaminofen'in metabolik aktivasyonu sonucu N-asetil-p-benzokinonimin meydana gelir. Bu bileşik, asetaminofen nefrotoksisitesinden sorumlu başlıca reaktif metabolit olarak kabul edilmektedir. Bu reaktif arilleyici ara ürün, non-enzimatik olarak glutatyon ile reaksiyona girerek detoksifiye edilir. Hücresel koruyucu mekanizmalar (glutatyon ve glutatyon-bağımlı enzimler) reaktif metabolitleri detoksifiye etmede yetersiz kaldıkları zaman biriken non-konjuge metabolitler renal hücresel makromoleküllere irreversible olarak bağlanır, hücrenin yapı ve fonksiyonlarını bozarak toksik etkilerini gösterir (Şekil 6). Hücresel düzeydeki bu biyokimyasal değişiklikler morfolojik olarak tespit edilebilir doku hasarlarından önce meydana gelir (27, 59, 177, 182, 220). Besinsel glutatyon eksikliğine bağlı olarak glutatyon'un hücresel depolarının azalması sonucu, kronik alkoliklerde renal toksisiteye duyarlılığın arttığı ve ilacın terapötik dozlarında dahi akut tübüler nekroz geliştiği bildirilmiştir (111).

İnsanlarda ve deney hayvanlarında akut olarak aşırı dozlarda alınan asetaminofen'in, akut karaciğer nekrozu ile beraber akut böbrek yetmezliğine neden olduğu (28, 30) ya da karaciğer hasarı gözlenmesin böbrek yetmezliği oluşturabildiği (45, 52, 103, 105) bildirilmiştir. Asetaminofen zehirlenmesinden sonra renal ve hepatik toksisite oluşumunda gözlenen bu farklar, P450 metabolize eden enzimlerin karaciğer ve böbrekte karakter bakımından oldukça farklı olduğunu (20), asetaminofen'in hücresel toksisite mekanizmalarının aynı olmadığını göstermektedir (154).

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada; asetaminofen'in indüklediği hepato-renal toksisitenin mikrozomal monooksijenazların inhibitörü olan dietilditiyo karbamat ile tamamen önlenebildiği, karaciğerde glutatyon miktarında önemli azalma olurken, böbrekte bu tip etkinin gözlenmemesine dayanarak, asetaminofen'in hepato- ve nefrotoksik

etkilerinin farklı mekanizmalara dayandığı ileri sürülmüştür. Parasetamol-S konjugatlarının böbrekte C-S-Liyaz tarafından metabolize edilmesinin nefrotoksisiteden sorumlu olabileceği hipotez olarak önerilmiştir (137).

Diğer bir araştırmada ise; erkek Wistar sıçanlarda akut asetaminofen nefrotoksisitesi araştırılmış ve farklı dozlarda (200, 500, 1000 mg/kg, i.p.) asetaminofen uygulanmasının sonucunda tüm dozlarda karaciğerde glutasyon düzeylerinde azalma görüldükçe, sadece 1000 mg/kg dozundaki asetaminofen uygulamasının böbrekte glutasyon düzeyinde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca renal hasarın, hepatik hasar gözlenmiş ya da gözlenmesin meydana geldiği saptanmıştır. Erken dönem asetaminofen nefrotoksisitesinin, tübüler fonksiyonlarda ve özellikle medullar dokunun distal yapısında değişikliklere yol açan renal hemodinamik değişikliklere bağlı olduğu bildirilmiştir (212).

İnsanlarda asetaminofen'in kronik kullanımına bağlı olarak (54, 188) ve deneysel olarak uzun süre asetaminofen verilen sıçanlarda (32), renal medullada asetaminofen birikimi sonucunda "renal papiller nekroz" ile karakterize analjezik nefropatisinin geliştiği bildirilmiştir. Asetaminofen kullanımına bağlı gelişen analjezik alışkanlığının, renal hastalıkların ve renal yetmezliğin gelişiminde önemli bir morbidite-mortaliteye sahip olduğu bildirilmiştir (149).

Asetaminofen'in kronik nefrotoksisitesinden, prostaglandin H sentaz enzim kompleksinin aracılık ettiği direk hücresel hasar sorumlu tutulmaktadır. Deneysel olarak indüklenen kronik nefrotoksisitede, prostaglandin H sentaz enzim kompleksinin prostaglandin hidroperoksidaz bileşiminin aktive olduğu, asetaminofen'i okside ederek reaktif ara ürün meydana getirdiği gözlenmiştir. Bu reaktif metabolitin glutasyon ile konjuge olarak detoksifiye edildiği ya da asetaminofen'i rejenere ettiği bildirilmiştir. Glutasyon eksikliği, hücre hasarını indüklediği gibi prostaglandin hidroperoksidaz aktivitesini de artırarak, asetaminofen'in ko-oksidasyonunu ve toksik reaktif metabolitlerinin oluşumunu indükler (220). Asetaminofen-aracılı analjezik nefropatisi, primer olarak medullar lezyonları, sekonder olarak kortikal hasar bulgularını içerir (134).

Tavşanlarda yapılan bir çalışmada, tavşan böbreğinin medulla bölgesinin kortekse oranla daha düşük glutasyon, glutasyon redüktaz, glutasyon peroksidaz ve GGTP aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu durumun özellikle asetaminofen'e bağlı

analjezik nefropatisi gelişiminde medulla bölgesinin neden daha savunmasız (hassas) olduğunu açıklamada yardımcı olabileceği ileri sürülmüştür (136). Medullada asetaminofen birikimi özellikle kronik nefrotoksisite ve analjezik nefropatisinin gelişiminde önemli bulunmuştur (220).

Asetaminofen, renal ve hepatik mikrozomlarda p-aminofenol'e (PAP) deasetillenmektedir. Asetaminofen'in deasetilasyonu ile oluşan PAP, F344 sıçanlarda proksimal tübülün pars rektasında selektif olarak nekroza neden olmaktadır. PAP'ün, p-aminofenoksi serbest radikale oksitlendiği ve bu radikalın oksidasyonu sonucu oluşan 1,4-benzokinonimin'in de hücresel makromeküllere kovalent olarak bağlandığı belirlenmiştir. Ayrıca, bazı benzokinol-glutasyon konjugatlarının da sıçanlarda renal nekroza neden oldukları bildirilmiştir. PAP'ün glutasyon ile konjugasyonu sonucu meydana gelen metabolitin oksidasyonu sonucunda oluşan 1,4-benzokinonimin tiyoeter'in böbrek dokusunda PAP'dan daha toksik etkili olduğu bildirilmiştir (67).

Hart ve ark. (56), 600 mg/kg, i.p. asetaminofen verilen genç erkek CD-1 farelerde asetaminofen'in böbrekte biyotransformasyonu ile oluşan reaktif elektrofillerin kovalent bağlanmasının nefrotoksisitede önemli rolü olduğunu ifade etmişlerdir.

Erkek CD-1 farelerde, böbrek kültüründe yapılan bir çalışmada asetaminofen'in sitozolik proteinleri arıldığı gösterilmiş ve selektif olarak 58-kDa asetaminofen-bağlayıcı protein'in en belirgin sitozolik hedef olduğu bildirilmiştir (88).

Hart ve ark. (55), erkek CD-1 farelerdeki asetaminofen nefrotoksisitesinin, F344 sıçanlardaki mekanizmadan farklı yolla meydana geldiğini, deasetilasyonun şart olmadığını, sitokrom P450 aracılı aktivasyonla meydana gelen toksik elektrofil metabolitin kovalent bağlanmasıyla ilgili olduğunu ifade etmişlerdir.

Newton ve ark. (151), asetaminofen'in deasetilasyonu ile oluşan metaboliti PAP'ün nefrotoksik etkisini Fischer-344 (F344) sıçanlarda araştırmışlardır. Bu amaçla sıçanlara değişik dozlarda APAP (0-900 mg/kg, s.c.) veya PAP (0-200 mg/kg, s.c.) uygulayarak 24 saatlik idrarda PAP itrahını ölçmüşler, bu metabolitin renal ve hepatik fonksiyonlara etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, asetaminofen'den böbrekte oluşan PAP'ün güçlü ve özgül bir nefrotoksik bileşik olduğu, asetaminofen kullanımına bağlı olarak ortaya çıkabilen

renal nekrozdan bu bileşimin sorumlu olabileceği öne sürülmüştür. Ayrıca, asetaminofen ve PAP'ın renal glutatyon konsantrasyonunu azalttığı, renal makromolekülleri arıldığı gösterilmiştir.

Sıçanlarda, asetaminofen'in böbreklerde metabolik aktivasyonu için PAP'e deasetilasyonunun şart olduğu, deasetilasyon sonucunda PAP'ın renal mikrozomlarda NADPH-bağımsız mekanizmalar yoluyla önemli bir metabolik aktivasyonunun sözkonusu olduğu ve asetaminofen'in indüklediği nefrotoksisitenin gelişiminde PAP'ın üstünlüğü bildirilmiştir (152, 158).

Ayrıca, asetaminofen'in sitotoksik metabolitlerinin glutatyon ile konjuge edilmesinde türler arasında hatta bireysel kapasiteler açısından da fark olduğu (59), asetaminofen'in böbrek dokusu tarafından tutulabilirliğinin ve nefrotoksik metabolit PAP'e duyarlılığın türe göre farklı olduğu (154) bildirilmiştir.

Asetaminofen'in farmakokinetik ve metabolizmasının incelendiği çalışmalarda; erkek, orta-yaşlı Sprague-Dawley (SD) sıçanların (9-12 aylık), genç sıçanlara (2-3 aylık) göre asetaminofen nefrotoksisitesine daha duyarlı oldukları gözlenmiştir (205). Benzer bir çalışmanın F344 sıçanlarda yapıldığı bir araştırmada; bu sıçanlarda asetaminofen nefrotoksisitesinde gözlenen farklılıkların, sıçanların asetaminofen'in indüklediği nefrotoksisiteye yaşa bağlı olarak gösterdikleri duyarlılığın artmasıyla ilgili olabileceğini düşündürmüştür (10).

Sıçanlarda yapılan çalışmalarda, asetaminofen nefrotoksisitesinde sekse bağlı farklılıklar olduğu ortaya konmuştur. Genç dişi SD sıçanların, aynı yaştaki erkek sıçanlara göre asetaminofen nefrotoksisitesine daha duyarlı oldukları, sekse bağlı nefrotoksisiteden sorumlu mekanizmanın, asetaminofen'in sitokrom P450 aracılı N-asetil-p-benzoknonimin'e biyoaktivasyonundaki ve/veya PAP'e deasetilasyonundaki farka bağlı olabileceği bildirilmiştir (141).

Asetaminofen'in indüklediği nefrotoksisitede soy farklılığının öneminin araştırıldığı bir çalışmada; genç erkek F344 sıçanların ağırlıkları bakımından eşleştirilmiş SD sıçanlara göre, asetaminofen nefrotoksisitesine daha duyarlı oldukları fakat SD sıçanlarda böyle bir duyarlılığın olmadığı gözlenmiştir (203). Yüksek dozda asetaminofen'in SD sıçan, fare ve

tavşanların böbrek dokularında tespit edilebilir bir histopatolojik değişiklik yaratmadığı, erkek F344 sıçanlarda ise proksimal tübüler nekroza yol açtığı bildirilmiştir (153).

Sıçanlarda asetaminofen nefrotoksisitesine soy farklılığı üzerine farmakokinetiğin rolünün incelendiği bir çalışmada; 2 aylık F344 ve SD sıçanlarda, asetaminofen'e bağlı nefrotoksisitede soy farklılığının, asetaminofen metabolizmasındaki major yollar ya da farmakokinetikteki farklılığa bağlı olmadığı görülmüştür (203).

Sıçanlarda asetaminofen'in indüklediği nefrotoksisitenin hayvan türüne göre değişiklik göstermesinin, asetaminofen'in P450'yi aktive etmesindeki veya nefrotoksik metabolit olan PAP'e deasetilasyonundaki farklılığa bağlanamayacağı (153), türler arası bu farklılığın, PAP'ün böbrekteki aktivasyonunun ya da PAP'den meydana gelen reaktif ara ürünlerin detoksifikasyonundaki farklılıkların türe göre farklı oluşuyla (154) veya böbrekteki glutatyon'u rejenere edebilme kabiliyetinin türe göre farklı oluşuyla ilgili olabileceği (36) bildirilmiştir.

Tarloff ve ark. (204), asetaminofen'in indüklediği nefrotoksisitenin, sıçanın türü yanısıra yaşı ile de ilişkili olduğu, yaş ilerledikçe, tür farklılığından kaynaklanan etkinin azaldığını, ilacın farmakokinetiğindeki yaşa bağlı farklılıklarla ilintili olabileceğini öne sürmüşlerdir.

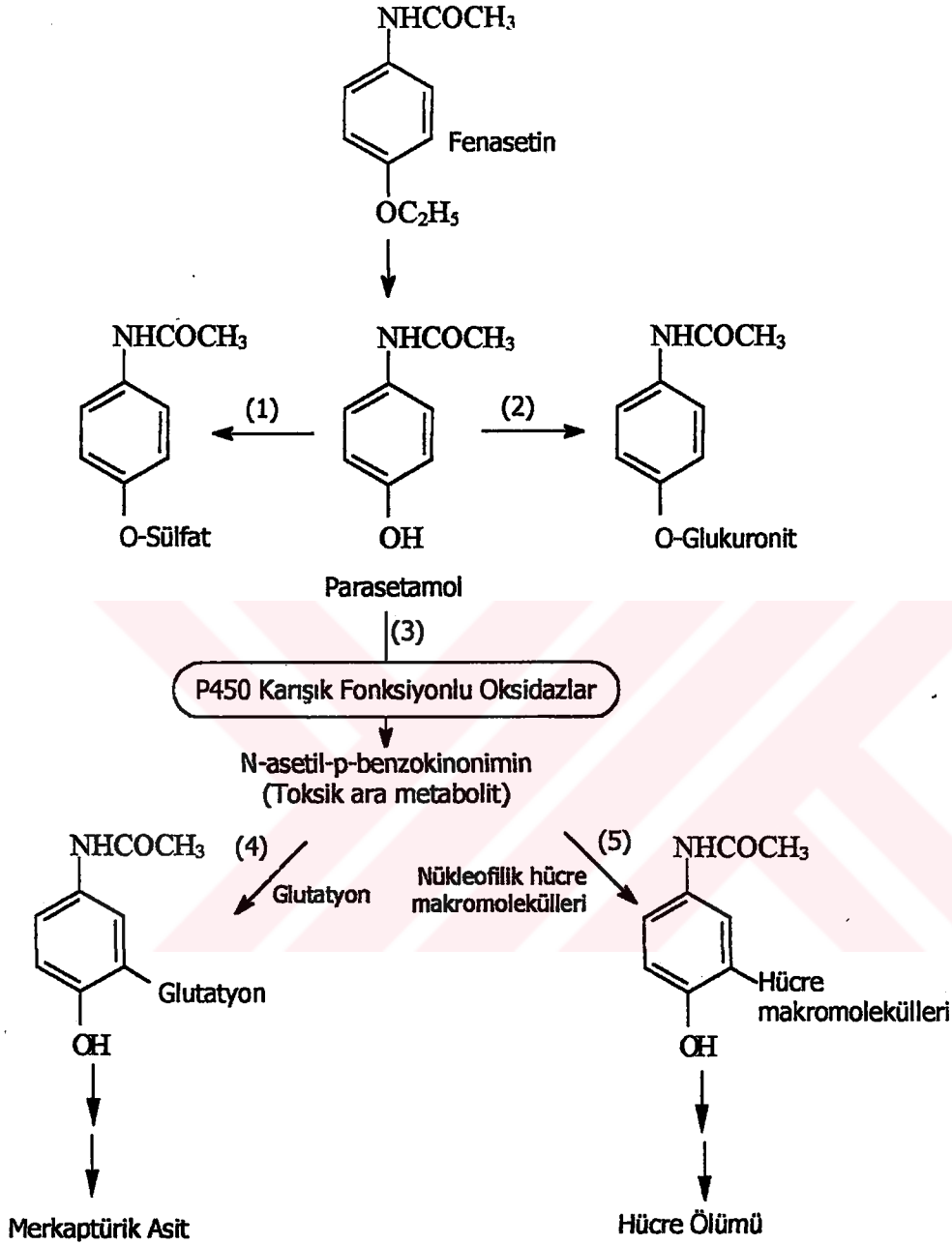
Newton ve ark. (155), asetaminofen'in nefrotoksisitesi konusunda sıçanlarda yaptıkları araştırmada; asetaminofen'in neden olduğu kortikal nekrozun olabilmesinin, direk olarak P450 bağımlı asetaminofen'in metabolik aktivasyonu ya da asetaminofen'in deasetilasyonu ile oluşan PAP'ün metabolik aktivasyonuna bağlı oluşan reaktif ara ürünlerin oluşumuyla ilgili olabileceğini; özellikle PAP'den oluşan reaktif arilleyici ara ürün/ürünlerin *in vivo* ortamda renal makromolekülleri F344 sıçanlarda arıldığı oysa SD sıçanlarda bu olayın gerçekleşmediğini göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar başka bir çalışmada; *in vitro* şartlarda, PAP'ün aktivasyonunun karaciğere göre böbrekte 5-10 kat daha fazla olduğunu da saptamışlardır (154).

Asetaminofen'e bağlı organ hasarında şişmanlığın bir risk faktörü olup olmadığının SD sıçanlarda araştırıldığı çalışmada; aşırı beslenen şişman sıçanlardaki artmış karaciğer ve böbrek hasarı, beslenmesi pelletle kontrol edilen sıçanlara göre önemli bulunmuştur.

Ayrıca şişman sıçanlarda, diyeti pelletle kontrol edilen sıçanlara göre daha fazla glukuronik asit ve daha az sülfat konjugatı meydana geldiğinin gözlenmesi, şişman insanlardaki artmış glukuronidasyona ve artmış toksisiteye de klinik bir kanıt olmuştur (44).

Colin ve ark. (40), asetaminofen'in doza bağlı metabolizmasına ilacın uygulama yollarının etkisini sıçanlarda incelemişlerdir; 100-750 mg/kg aralıkta seçilen dozlarda i.p. veya oral (p.o.) olarak tek doz asetaminofen uygulamasından belirli bir süre sonra ilaç ve metabolitlerinin idrar konsantrasyonları saptanmış, bazı biyokimyasal parametreler aracılığı ile karaciğer ve böbrekteki toksisiteleri izlenmiştir. Yüksek dozda ilacın i.p. olarak uygulandığında hepatik ve renal toksisite yaptığı, oral verildiğinde ise bu etkilerin ortaya çıkmadığı anlaşılmış, toksik etkinin, i.p. olarak uygulanan ilacın idrarda gerek değişikliğe uğramamış halde, gerekse merkaptürat şeklinde, ağız yolu ile uygulandığından çok daha yüksek oranda bulunması ile ilgili olabileceği sonucuna varılmıştır.





Şekil 6. Asetaminofen metabolizması : Asetaminofen normal terapötik dozlarda 1 ve 2, yüksek dozlarda 3 ve 4 ile gösterilen yollarla metabolize edilir. Glutasyon tükendiğinde toksik ara ürün proteinlerle reaksiyona girer ve hücre hasarına yol açar (reaksiyon 5) (177).

BÖLÜM III

ARAÇ, GEREÇ ve YÖNTEMLER

III.1. Kullanılan Maddeler

Parakuat diklorür
L-δ-glutamil-p-nitroanilid monohidrat
Glisil glisin
p-nitrofenil N-asetil-β-D-glukozaminid
p-nitrofenol
Folin-Ciocalteu
Sodyum azid
Sephadex G-25 Fine
"Sigma Chem. Co., St. Louis, U.S.A." den sağlanmıştır.
2-amino-2-metil-1-propanol hidroklorür
Tris(hidroksimetil)-aminometan
Kreatinin
Pikrik asit
Siğır serum albumin
Fenol
Sodyum nitro prussid
Üre
Üreaz
"E. Merck, Darmstadt, Germany" den sağlanmıştır.
Asetaminofen, Fako A.Ş.'den sağlanmıştır.
Deneylerde kullanılan diğer maddeler amaca uygun saflıktadır.

III.2. Kullanılan Aletler

Hassas terazi - Sartorius 2442
pH metre - Schott Gerate CG 840
Magnetik karıştırıcı - Nüve MK 318

Tüp karıştırıcı - Nüvemix NM 110
 Çalkalamalı su banyosu - Nüve BM 101
 Santrifüj - Heraeus Spatech Minifuge RF
 Spektrofotometre - Shimadzu Digital UV-VIS 160 A
 Otomatik pipet - Socorex Swiss ve Genex Beta
 Tıbbi pens ve bistüri

III.3. Kullanılan Çözeltiler

III.3.1. GGTP Aktivite Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler (139)

1.) Tampon-Glisil Glisin Çözeltisi, pH: 8.2 :

(120 mmol/L tris, 90 mmol/L glisil glisin, 10 mmol/L $MgCl_2$)

1.454 g tris, 1.189 g glisil glisin ve 0.244 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ tartıldı. Yaklaşık 80 ml distile suda çözüldü. 25°C de damla damla 1 mol/L HCl ilavesiyle pH: 8.2'ye getirildi ve 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

2.) GGPNA-Sübrat Çözeltisi, 48 mmol/L, 0.15 mol/L HCl içinde :

1.370 g L-gamma-glutamyl-p-nitroanilid monohidrat tartıldı, 0.15 mol/L HCl'de çözüldü ve 100 ml'ye tamamlandı.

Bu çözelti kullanılacağı zaman taze olarak hazırlandı.

3.) 1.4 mol/L Glasiyel Asetik Asit Çözeltisi :

% 100'lük glasiyel asetik asitten 8.01 ml alındı, distile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

4.) 1 mol/L HCl :

% 37'lik HCl'den 8.281 ml alındı, distile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

5.) 0.15 mol/L HCl :

% 37'lik HCl'den 1.242 ml alındı, distile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

III.3.2. NAG Aktivite Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler (91)

1.) Sitrik Asit Çözeltisi, 0.2 mol/L :

4.2 g sitrik asit.H₂O tartıldı, distile su ile çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

2.) Sodyum Sitrat Çözeltisi, 0.2 mol/L :

5.15 g susuz trisodyum sitrat tartıldı, distile su ile çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

3.) Sitrat Tamponu, 0.1 mol/L, pH: 4.4 :

28 ml sitrik asit çözeltisi ile 22 ml sodyum sitrat çözeltisi magnetik karıştırıcıda karıştırıldı ve çözeltinin sıcaklığı 37°C'ye getirildi. pH metre kontrolünde sitrik asit veya sodyum sitrat çözeltisinden damla damla ilave edilerek pH: 4.4 ± 0.05'e ayarlandı. Son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

4.) NAG-Sübrat Çözeltisi, 10 mmol/L :

342 mg p-nitrofenil-N-asetil-β-D-glukozaminid, sitrat tamponu içinde çözülerek 100 ml'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 10'ar ml alınarak polistiren tüplere konuldu ve deney gününe kadar -20°C'de saklandı.

NAG-sübrat çözeltisi kullanılacağı zaman 37°C'lik su banyosunda çözündürülerek sıcaklığı dengeye getirildi.

5.) AMP Tamponu, 0.75 mol/L, pH: 10.25 :

9.42 g 2-amino-2-metil-1-propanol hidroklorür yaklaşık 50 ml distile suda çözüldü. pH metre kontrolünde (25°C de) 6 mol/L NaOH çözeltisinden damla damla ilave edilerek pH: 10.25'e ayarlandı. Son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

6.) NaOH Çözeltisi, 6 mol/L :

24 g NaOH tartıldı, distile su ile çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

7.) PNP-Çalışma Standardı, 100 µmol/L :

10 mmol/L p-nitrofenol stok standardından 1 ml alınarak 0.15 mol/L NaCl çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlandı.

Bu çözelti kullanılacağı zaman taze olarak hazırlandı.

8.) NaCl Çözeltisi, 0.15 mol/L :

0.876 g NaCl tartıldı, distile su ile çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

9.) NAG Kolonu (Sephadex G-25 Fine) Rejenerasyon Çözeltileri :

- NaCl Çözeltisi, 0.15 mol/L

- NaN_3 Çözeltisi, 3.1 mmol/L :

50.37 mg sodyum azid tartıldı, distile suda çözülerek 250 ml'ye tamamlandı.

III.3.3. Kreatinin Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

1.) 0.1 N HCl Çözeltisi :

% 37'lik HCl'den 0.828 ml alınıp distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2.) TCA Çözeltisi, 1.2 mol/L :

19.606 g trikloroasetik asit distile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

3.) % 6.4 NaOH Çözeltisi :

6.4 g NaOH tartıldı, bir miktar distile suda çözülerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

4.) Doymuş Pikrik Asit Çözeltisi :

Pikrik asit üzerine bir miktar distile su eklenip karıştırılmak suretiyle doymuş hale getirildi. Süzgeç kağıdından süzülerek berraklaştırıldı.

5.) Alkali Pikrat Çözeltisi :

1:1 oranında doymuş pikrik asit çözeltisi ile NaOH çözeltisinin karıştırılmasıyla hazırlandı. Bu çözelti kullanılacağı zaman taze olarak hazırlandı.

6.) Standart Stok Kreatinin Çözeltisi, % 100 mg, 0.1 N HCl Çözeltisi İçinde :

100 mg kreatinin tartıldı, 0.1 N HCl'de çözüldü ve 100 ml'ye tamamlandı.

7.) Kreatinin Çalışma Standardı Çözeltisi, % 1 mg :

1 ml standart stok kreatinin çözeltisi distile suyla 100 ml'ye seyretildi.

Bu çözelti her hafta taze olarak hazırlandı.

III.3.4. BUN Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler (179)

Tüm çözeltiler bidistile ve amonyum içermeyen suyla hazırlanmıştır.

1.) Fenol-Nitroprussid Çözeltisi :

10 g fenol ve 0.05 g sodyum nitroprussid.2H₂O tartıldı, distile suda çözülerek L'ye tamamlandı.

2.) Alkali Hipoklorit Çözeltisi :

5 g NaOH yaklaşık 500 ml distile suda çözülüp soğutuldu ve 0.42 g sodyum hipoklorür ilave edilerek distile suyla L'ye tamamlandı.

3.) EDTA Çözeltisi, 10 g/L, pH: 6.5 :

10 g EDTA disodyum yaklaşık 800 ml distile suda çözüldü. pH metre kontrolünde damla damla 1 M NaOH ilavesiyle pH: 6.5'a getirildi, distile su ile L'ye tamamlandı.

4.) Stok Üreaz :

0.2 g üreaz (3000-4000 U/g) 10 ml distile su ve 10 ml gliserol ile magnetik karıştırıcıda karıştırılarak süspansiyon şeklinde hazırlandı.

5.) Çalışma Üreaz :

1 ml stok üreaz süspansiyonu, EDTA çözeltisi ile 100 ml'ye seyreltildi.

6.) Standart Stok Üre çözeltisi (% 500 mg üre azotu içerir) :

1.0717 g susuz üre tartıldı, bir miktar distile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı. Koruyucu olarak 0.1 g sodyum azid eklendi.

7.) Üre Çalışma Standardı Çözeltisi (% 10 mg üre azotu içerir) :

2 ml standart stok üre çözeltisi distile suyla 100 ml'ye seyreltildi.

III.3.5. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler (124)

1.) % 2 Na₂CO₃ Çözeltisi, 0.1 N NaOH İçinde :

2 g Na₂CO₃ tartıldı, 0.1 N NaOH içinde çözündürülerek 100 ml'ye tamamlandı.

2.) % 2 Na-K Tartarat Çözeltisi :

2 g Na-K tartarat distile suda çözülerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

3.) % 1 CuSO₄.5H₂O Çözeltisi :

1 g CuSO₄.5H₂O tartılarak distile suda çözülür, hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

4.) Protein Renk Reaktifi Çözeltisi :

50 ml Na₂CO₃ çözeltisine, 0.5 ml Na-K tartarat çözeltisi ve 0.5 ml CuSO₄.5H₂O çözeltisi ilave edilerek deney günü taze olarak hazırlandı.

5.) Folin-Ciocalteu Çözeltisi :

Bu çözelti kullanılacağı zaman 1:1 oranında distile su ile seyreltilerek hazırlandı.

6.) Standart Stok Protein Çözeltisi, 1 mg/ml :

10 mg siğir serum albumini (BSA) hassas olarak tartıldı, distile su ile 10 ml'ye tamamlandı.

III.3.6. Böbrek Dokusunun Histolojik İncelemesinde Kullanılan Çözeltiler

III.3.6.1. Yıkama Çözeltileri

1.) B5 Depo Çözeltisi :

66.67 g civa klorür ve 16.67 g sodyum asetat tartıldı. Bir miktar distile suda hafif ısıtılarak çözündürüldü ve L'ye tamamlandı. Soğuyunca süzüldü. Serin yerde muhafaza edildi.

2.) % 10 Tamponlu Formalin :

2.6 g K_2HPO_4 ve 9.4 g NaH_2PO_4 tartıldı. Bir miktar distile suda çözündürüldü. 50 ml % 37'lik formalin ilave edilip, distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

3.) B5-Formalin Tespit Çözeltisi :

9 hacim B-5 ve 1 hacim % 10 tamponlu formalin çözeltisinin karıştırılmasıyla hazırlandı. Tespit çözeltisi deney günü böbrekler çıkarılmadan önce taze olarak hazırlandı.

III.3.6.2. Saklama Çözeltisi

1.) % 4 Tamponlu Formalin Çözeltisi :

2.6 g K_2HPO_4 ve 9.4 g NaH_2PO_4 tartıldı. Bir miktar distile suda çözündürüldü. 20 ml % 37'lik formalin ilave edilip distile su ile 500 ml'ye tamamlandı. (% 37'lik formalin % 100'lük kabul edilerek hesap yapılmıştır).

III.4. Çalışma Materyali

Bu çalışmada, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deneysel Hayvan Laboratuvarı'ndan sağlanan Swiss-Albino türünden, sağlıklı görünümlü, ağırlıkları 180-330 g arasında değişen (ortalama 255.56 ± 3.11) toplam 108 erkek sıçan kullanılmıştır.

Sıçanlarda parakuat, asetaminofen ve parakuat + asetaminofen verilerek indüklenen böbrek hasarının saptanması için idrarda GGTP ve NAG enzim aktivitelerinin yanısıra protein, kreatinin ile serumda kreatinin ve üre azotu düzeylerine bakılmıştır. Çıkarılan sıçan böbrek dokusu örnekleri de histolojik olarak incelenmiştir.

Deneysel çalışmalar Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı ve Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

III.4.1. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması

Deneye alınacak sıçanların her biri ayrı kafeslere konularak numarandırıldı ve istedikleri kadar su içmeleri ve yemeleri bakımından serbest bırakılarak normal diyetlerini almaları sağlandı. Yeni ortamlarına alıştıran deneklerin, uygulamaya geçilmeden önce mesaneleri boşaltıldı. Eter anestezisi altında, deney grubu sıçanlarına belirli dozlarda ilaç uygulanırken, kontrol grubu sıçanlarına da aynı yoldan, aynı hacim ve sürede olmak üzere distile su enjekte edildi.

Deney protokolü 4 gruptan oluşmuştur :

Kontrol Grubu : Ortalama vücut ağırlığı 261.67 ± 3.66 g olan 12 erkek sıçandan oluşan bu gruba intraperitoneal (i.p.) yoldan distile su enjekte edildi.

Parakuat (PK) Grubu : Ortalama vücut ağırlığı 257.27 ± 8.10 g olan 11 erkek sıçandan oluşan bu gruba i.p. yoldan 40 mg/kg dozda parakuat tek doz olarak uygulandı. Parakuat distile suda çözülerek 8 mg/ml'lik çözeltisi halinde hazırlandı. Uygulama dozunu sağlamak üzere 0.5 ml/100 g sıçan vücut ağırlığı esas alınarak tatbik edildi.

Asetaminofen (APAP) Grubu : Uygulanan asetaminofen dozuna göre dört grup oluşturuldu :

- **APAP-250 Grubu :** Ortalama vücut ağırlığı 240.00 ± 13.14 g olan 12 erkek sıçandan oluşan bu gruba i.p. yoldan 250 mg/kg dozda asetaminofen tek doz olarak uygulandı.
- **APAP-500 Grubu :** Ortalama vücut ağırlığı 260.83 ± 12.15 g olan 12 erkek sıçandan oluşan bu gruba i.p. yoldan 500 mg/kg dozda asetaminofen tek doz olarak uygulandı.
- **APAP-750 Grubu :** Ortalama vücut ağırlığı 250.91 ± 7.80 g olan 11 erkek sıçandan oluşan bu gruba i.p. yoldan 750 mg/kg dozda asetaminofen tek doz olarak uygulandı.
- **APAP-900 Grubu :** Ortalama vücut ağırlığı 253.00 ± 10.33 g olan 10 erkek sıçandan oluşan bu gruba i.p. yoldan 900 mg/kg dozda asetaminofen tek doz olarak uygulandı.

Sıçanlara farklı uygulama dozlarında verilen asetaminofen, havanda dövölüp inceltildikten sonra distile suda (40°C de) süspansiyonu halinde hazırlandı. Asetaminofen uygulama dozları ve 100 g sıçan vücut ağırlığı başına tatbik edilen süspansiyon hacimleri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Asetaminofen uygulama dozları ve 100 g sıçan vücut ağırlığı başına tatbik edilen süspansiyon hacimleri

APAP Uygulama Dozu (mg/kg)	Süspansiyondaki APAP Dozu (mg/ml)	Uygulanan Hacim (ml/100 g sıçan ağırlığı)
250	25	1
500	50	1
750	37,5	2
900	45	2

Parakuat + Asetaminofen (PK+APAP) Grubu : Bu gruptaki sıçanlara 40 mg/kg, i.p. yoldan tek doz parakuat uygulandıktan 30 dakika sonra, her gruba göre farklı dozlarda olmak üzere asetaminofen uygulandı.

PK+APAP-250 Grubu : Ortalama vücut ağırlığı 254.00 ± 11.27 g olan 10 erkek sıçandan oluşan bu gruba i.p. yoldan parakuat uygulanmasını takiben, 250 mg/kg dozda asetaminofen tek doz olarak uygulandı.

PK+APAP-500 Grubu : Ortalama vücut ağırlığı 277.00 ± 10.33 g olan 10 erkek sıçandan oluşan bu gruba i.p. yoldan parakuat uygulamasını takiben, 500 mg/kg dozda asetaminofen tek doz olarak uygulandı.

PK+APAP-750 Grubu : Ortalama vücut ağırlığı 248.00 ± 9.17 g olan 10 erkek sıçandan oluşan bu gruba i.p. yoldan parakuat uygulamasını takiben, 750 mg/kg dozda asetaminofen tek doz olarak uygulandı.

PK+APAP-900 Grubu : Ortalama vücut ağırlığı 254.00 ± 8.46 g olan 10 erkek sıçandan oluşan bu gruba i.p. yoldan parakuat uygulamasını takiben, 900 mg/kg dozda asetaminofen tek doz olarak uygulandı.

Deney gruplarına uygulanan ilaçların cinsi, dozu, uygulama yolu ve süresi Tablo 2’de toplu halde verilmiştir.

Tablo 2. Deney gruplarına uygulanan ilaçlar ve dozları ile uygulama yolu ve süresi.
İ.p.: İntraperitoneal

Deney Grup No	Uygulanan İlaç	Sıçan Sayısı	Doz (mg/kg)	Veriliş Yolu	Süre (Gün)
1	Parakuat (PK)	11	40	i.p.	1
2	Asetaminofen (APAP)	12	250	i.p.	1
		12	500	i.p.	1
		11	750	i.p.	1
		10	900	i.p.	1
3	PK + APAP	10	40 + 250	i.p.	1
		10	40 + 500	i.p.	1
		10	40 + 750	i.p.	1
		10	40 + 900	i.p.	1

III.4.2. İdrar ve Kan Örneklerinin Alınması

Deneye alınan sıçanlara uygulamaları yapıldıktan sonra her bir sıçan kendi metabolizma kafeslerine konuldu. Oda sıcaklığının 21-25°C arasında sabit tutulduğu, 12 saat aydınlık/karanlık olacak şekilde ayarlanan deney odasında bir gün boyunca bekletilerek 24 saatlik idrarları biriktirildi. Uygulamayı takip eden bu süre boyunca sıçanlara yem verilmezken sadece su içmelerine izin verildi. İdrar toplanmasından sonra eter anestezisi altında sıçanların boyunları vurularak öldürülmek suretiyle kan örnekleri alındı. Her iki böbrek histolojik inceleme için çıkarıldı.

İdrar örnekleri 4°C de 3000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. İdrar süpernatantları belirli hacimlerde seyreltilerek bekletilmeden GGTP aktivite tayini ile, kreatinin ve total protein miktar tayinleri yapıldı. NAG aktivite tayini ise süpernatantlara jel filtrasyonu uygulamasını takiben yapıldı.

Alınan kan örnekleri oda ısısında bir saat pıhtılaşmaya bırakıldıktan sonra 2000 g'de 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serum örneklerinde kreatinin ve BUN miktar tayinleri yapıldı.

III.4.3. Böbrek Dokusunun Histolojik İncelemeye Hazırlanması

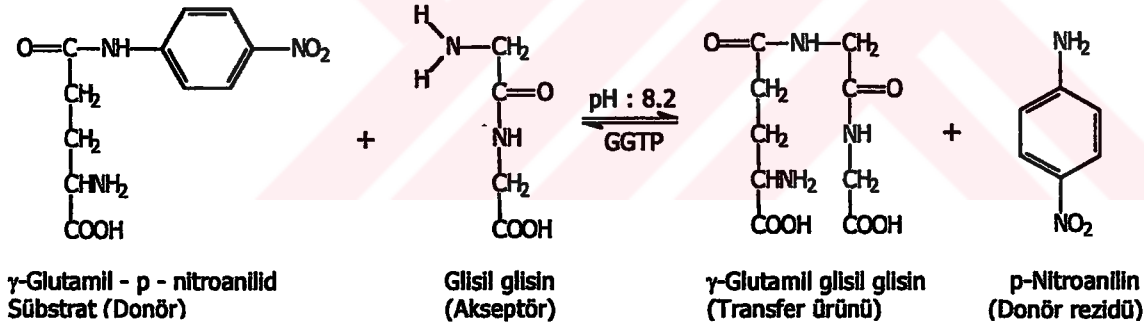
Her bir grup için Tablo 2'de belirtilen ilaçların uygulanmasından sonra geçen 24 saatlik süre sonunda böbrekler alındı.

24 saatin sonunda eter anestezisi altında boyunları vurularak öldürülen sıçanlardan çıkartılan böbrekler kortiko-pelvik düzlemde birer kesi yapılarak ikiye ayrıldı; kapsülleri soyulduktan sonra B5-formalin tespit çözeltisinde 30 dakika bekletildi. Sonra bol akarsu ile yıkanan dokular, % 4'lük tamponlu formalin çözeltisi içinde muhafaza edildi. Böbrek dokuları Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarı'nda ince dilimlere kesitlendi ve parafin bloklar hazırlandı. 4 µ kalınlıkta kesitler hazırlanarak hematoksilin eozin ile boyandı.

III.5. Yöntemler

III.5.1. GGTP Aktivitesinin Tayini (139)

İdrarda GGTP aktivitesinin ölçümü; alkali ortamda sübstrat gamma-glutamil-p-nitroanilid (GGPNA)'ın GGTP tarafından gamma-glutamil kısmının glisil glisin'e transferi ile açığa çıkan sarı renkli p-nitroanilin (PNA) bileşiğinin 405 nm deki absorbansının ölçülmesi esasına dayanır. Yöntemin prensibi aşağıdaki şekilde özetlenebilir (Şekil 7) :



Şekil 7. GGTP aktivitesinin ölçümünde kullanılan yöntemin prensibi.

4°C de 3000 g'de 10 dakika santrifüj edilen 24 saatlik idrar süpernatantından, distile su ile 1:10 oranında seyreltilen idrar numunelerinde GGTP aktivite tayini yapıldı. İdrar örnekleri santrifüj edildikten sonra GGTP analizi yapılınca kadar 4°C de muhafaza edildi. En fazla iki gün içinde çalışıldı. Yöntemin çalışma şekli Tablo 3'de sunulmuştur.

Tablo 3. GGTP aktivitesinin tayini :

	Kör	Örnek
Tampon (Glisil – Glisin)	2 ml	2 ml
İdrar	200 µl	200 µl

37 °C de ısıtılır

Sübrat (Gamma glutamil p-nitroanilid)	-	200 µ
--	---	-------

37 °C de 10 dakika bekletilir

1.4 N Asetik Asit	1 ml	1 ml
Sübrat (Gamma glutamil p-nitroanilid)	200 µl	-

10 dakika içinde 405 nm de köre karşı örnek absorpsansı okunur.

$$\text{GGTP Aktivitesi (U/L)} = \frac{\Delta A}{\text{Dakika}} \times \frac{10^3}{\text{Milimolar Absorbtivite}} \times \frac{V}{v}$$

formülünden hesaplandı. 405 nm'de p-nitroanilin'in milimolar absorbtivitesi (9.87), V; total reaksiyon hacmi (3.4 ml), v; idrar hacmi (0.2 ml) değerleri yerlerine konulunca;

$$\text{GGTP Aktivitesi (U/L)} = \frac{\Delta A}{\text{Dakika}} \times 1722.389\text{'dur.}$$

Dakikada 1 µmol p-nitroanilin'i açığa çıkaran GGTP aktivitesi 1 Ünite olarak kabul edildi. Sonuçlar, U/L enzim aktivitesi ve U/g kreatinin (idrar kreatinini üzerinden enzim atılımı) şeklinde ayrı ayrı ifade edildi.

III.5.2. NAG Aktivitesinin Tayini (91)

İdrarda NAG aktivitesi, 4°C de 3000 g'de 10 dakika santrifüj edilen 24 saatlik idrarların jel filtrasyonu ile enzim inhibitörlerinden uzaklaştırılmasından sonra tayin edildi.

Santrifüj edilen idrarlar 4°C de korunmuş, en fazla 5 saat içersinde jel filtrasyonu işlemi uygulanmıştır.

III.5.2.1. Jel Filtrasyon Kromatografisi

İdrarda fizyolojik olarak itrah edilen değişik iyonların ve düşük molekül ağırlıklı maddelerin, üriner enzim aktivite ölçümlerini etkileyebildikleri bildirilmiştir (226). İdrar örneklerine jel filtrasyonu uygulanarak enzim aktivitesini etkileyen değişik inhibitör ve aktivatörleri ortamdan ayırmak mümkündür (91, 106, 128).

Jel filtrasyonu; hemen hemen aynı büyüklükte porlara sahip genellikle çapraz bağlı polisakkarit bir materyal olan delikli "jel filtrasyon granülleri" ile doldurulmuş bir kolonda, çözünmüş solütlerin ayrımı işlemidir. Jel filtrasyon granülleri por genişlikleri ile moleküler bir elek gibi davranarak, kompleks bir karışımdan molekül ağırlıklarına göre maddelerin ayrımını sağlarlar. Bio-Gel (poliakrilamid), Sephadex (dekstran) ve Sepharose (polisakkarit) sık olarak kullanılan bu granüllerin ticari preparatlarıdır (38, 179).

İnsolubl jel filtrasyon granülleri uygun bir çözücüde bırakılırsa biri granüllerin içinde, diğeri de granüllerin dışında olmak üzere iki solvent faz oluşur. Küçük moleküller granüllere girebilir, buna karşılık daha büyük olanlar giremez. Üstten kolona uygulanan ve tamponla elüe edilen örnek, kolonun aşağısına doğru hareket ederken, büyük moleküller daha hızlı hareket eder ve jel granülleri içine girmeden sadece granüller arasındaki sıvı ile birlikte akarlar. Küçük moleküller ise jel granüllerinin içine girerek tutulurlar ve daha geç elüe olurlar (38).

Jel Kromatografisinin Uygulanışı :

250 mm uzunluğunda, 10 mm çapında olan jel filtrasyon kolonu, 5.6 ml'lik jel yatağı içerecek şekilde, 0.15 mol/L NaCl çözeltisi içinde süspanse edilmiş hidrate Sephadex G-25 jeli ile dolduruldu.

1 ml idrar süpernatantı, 0.5 ml elüat (0.15 mol/L NaCl) ile birlikte kolona verildi. Elüat (1.5 ml) tam olarak kolondan aktıktan sonra, yeniden 2 ml elüat verildi. NAG içeren bu elüat (2 ml) tam olarak bir tübe toplandı ve elüatta NAG aktivite tayini yapıldı.

Ayırma işleminden sonra kolon, yeniden kullanım için 25 ml NaCl-Na₃ çözeltisi ile yıkandı. Kolona NaCl-Na₃ çözeltisi doldurularak, alt ve üst kapaklar kapatılıp, oda ısısında muhafaza edildi. Rejenerasyon işlemi her uygulamadan sonra tekrar edildi.

İdrarda NAG aktivitesinin ölçümü p-Nitrofenol (PNP) Yöntemi'ne göre yapıldı. Bu yöntem; asidik ortamda sübstrat olarak kullanılan p-nitrofenil-N-asetil-β-D-glukozaminid (PNP-NAG)'ın NAG tarafından hidrolitik parçalanması ile açığa çıkan p-nitrofenol (PNP)'ün alkali ortamda verdiği sarı rengin renk şiddetinin 405 nm deki absorbansının ölçülmesi esasına dayanır.

İdrar örneklerine jel filtrasyonu uygulandıktan sonra NAG analizi yapılncaya kadar hiçbir koruyucu madde ilave edilmeden -20°C de saklanarak, en fazla 2 gün içinde çalışıldı. NAG-sübstrat çözeltisi ve jel filtre idrar, analiz öncesi 37°C de bekletilerek ortam ısısına getirildiler. Yöntemin çalışma şekli Tablo 4'de sunulmuştur.

Tablo 4. NAG aktivitesinin tayini :

	Reaktif Körü (RK)	Standart (S)	İdrar (İ)	İdrar Körü (İK)
NaCl	0.5 ml	-	-	-
p-nitrofenol çalışma standardı	-	0.5 ml	-	-
Jel filtre idrar	-	-	0.5 ml	0.5 ml

37°C de 5 dakika ısıtıldı

NAG-Sübstrat	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	-
--------------	--------	--------	--------	---

37°C de 15 dakika bekletildi

AMP Tamponu	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
NAG-Sübstrat	-	-	-	0.5 ml

30 dakika içinde Reaktif Körü, Standart, İdrar ve İdrar Körünün optik dansiteleri distile suya karşı 405 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunur.

$$\text{NAG Aktivitesi (U/L)} = \frac{A [\text{I} - \text{İK}]}{A [\text{S} - \text{RK}]} \times \frac{(100 \mu\text{mol/L}) \times \text{seyr.faktörü (2)}}{\text{inküb.zamanı (15 dak.)}}$$

formülünden hesaplandı.

$$\text{NAG Aktivitesi (U/L)} = \frac{A [I - IK]}{A [S - RK]} \times 13.3\text{'dür.}$$

Dakikada 1 µmol p-nitrofenol açığa çıkaran NAG aktivitesi 1 Ünite olarak kabul edildi. Sonuçlar, U/L enzim aktivitesi ve U/g kreatinin (İdrar kreatinini üzerinden enzim atılımı) şeklinde ayrı ayrı ifade edildi.

III.5.3. Kreatinin Miktar Tayini

İdrar ve serumda kreatinin miktar tayini Boehringer Mannheim (Kat No : 124 192) hazır kit prosedürüne göre yapıldı. Yöntem deproteinizasyonlu kinetik Jaffé yöntemidir. Kreatinin tayini; alkali ortamda kreatinin'in pikrik asit ile oluşturduğu turuncu-portakal renkli kompleksin 520 nm deki absorbansının ölçülmesi esasına dayanır.

III.5.3.1. İdrarda Kreatinin Miktar Tayini

İdrar kreatinin miktarları idrarların toplandığı aynı gün içinde tayin edilmişlerdir. Üriner kreatinin miktar tayini için 4°C de 3000 g'de 10 dakika santrifüj edilen 24 saatlik idrar süpernatantından distile su ile 1:100 oranında seyreltilen idrar örneği kullanıldı. Örnek tübüne 0.5 ml idrar süpernatantı, standart tübüne 0.5 ml kreatinin çalışma standardı çözeltisi (% 1 mg) konuldu. Her iki tübe 0.5'er ml TCA ilave edilerek karıştırıldı. Taze hazırlanmış alkali pikrat çözeltisinden 1'er ml ilave edilerek oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Süre sonunda 520 nm de köre karşı absorbanslar okundu. Kör tübü 0.5 ml distile su konularak hazırlandı ve aynı işlemler uygulandı. Sonuçlar, g/L kreatinin atılımı olarak ifade edildi.

III.5.3.2. Serumda Kreatinin Miktar Tayini

Serumda kreatinin 4°C de bir gün ya da -20°C de iki hafta dayanıklı kalabilir (121). Çalışmamızda serum kreatinin tayinleri en fazla iki gün içinde gerçekleştirilmiştir.

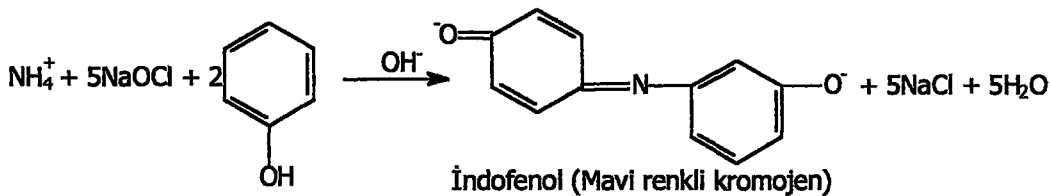
Serumun proteinlerinden uzaklaştırılması için, 0.5 ml TCA üzerine 0.5 ml serum ilave edilerek 3500 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Berrak süpernatanttan 0.5 ml alınarak bir tübe aktarıldı. Üzerine taze hazırlanmış alkali pikrat çözeltisinden 0.5 ml ilave edilerek karıştırıldı. Oda ısısında 20 dakika bekletildi. Süre sonunda 520 nm de köre karşı absorbanslar okundu. Her deney için körle birlikte standart çalışıldı. Kör ve standart tüplerine sırasıyla 0.25'er ml distile su ve kreatinin çalışma standardı çözeltileri ilave edilip, aynı işlemler uygulandı. Sonuçlar, mg/dl kreatinin olarak ifade edildi.

III.5.3.3. Kreatinin Standart Çözeltilerinin Hazırlanması ve Standart Eğrisinin Çizimi

100 mg kreatinin tartıldı, 0.1 N HCl'de çözülerek 100 ml'ye tamamlandı. Böylece ana stok kreatinin standardı (1 mg/ml) hazırlandı. Stok çözeltiden alınan belirli hacimler distile su ile seyreltilerek % 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 mg kreatinin bulunduran standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden 0.5'er ml alınarak III.5.3.1'de belirtilen aynı işlemlere tabi tutulduktan sonra 520 nm de köre karşı absorbansları okundu ve standart eğri çizildi. Her deney günü taze hazırlanan standartlardan bir kaç farklı konsantrasyonda numunelerle birlikte okunarak standart eğriden sapmalar düzeltildi.

III.5.4. Serumda Üre Azotu (BUN) Miktar Tayini (179)

Serumda üre azotu tayini için Berthelot Yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemde; üre üreaz ile hidroliz edilir. Oluşan amonyum iyonları fenol ile reaksiyona girer ve alkali ortamda hipoklorit iyonları ile birlikte mavi renkli indofenol bileşiğini meydana getirir. Nitroprussid, reaksiyonu hızlandırır. Üre azotu miktarı mavi renkli kromojenin renk şiddetiyle orantılıdır. Berthelot yönteminin prensibi aşağıdaki şekilde özetlenebilir (Şekil 8):



Şekil 8. Berthelot yönteminin prensibi.

Serum üresinin oda sıcaklığında bir gün, 4°C de birkaç gün ve buzdolabında dondurularak saklandığında ise 2-3 ay stabil kalabildiği bildirilmiştir (179). Çalışmamızda BUN miktarları en geç iki gün içinde tayin edilmiştir.

Örnek ve standart tübüne 1'er ml çalışma üreaz çözeltisi konuldu. Her iki tübe sırasıyla 10 µl serum ve 10 µl üre çalışma standardı (% 10 mg üre azotu taşıyan) pipetlendi. Tüpler 37°C'deki çalkalayıcı su banyosunda 15 dakika bekletildi. Süre sonunda 5'er ml fenol-nitroprussid ve 5'er ml alkali hipoklorit ilave edilerek, ağızları parafilmle kapatılıp iyice karıştırıldı. Tekrar 20 dakika daha 37°C'lik su banyosunda bekletildi. Süre sonunda 560 nm'de köre karşı spektrofotometrede absorbansları okundu. Kör tübü 10 µl distile su konularak hazırlandı ve aynı işlemler uygulandı. Sonuçlar, mg/dl üre azotu olarak ifade edildi.

III.5.4.1. Üre Azotu Standart Çözeltilerinin Hazırlanması ve Standart Eğrisinin Çizimi

1.0717 g susuz üre tartıldı, distile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı. Böylece ana stok üre azotu standardı (5 mg/ml) hazırlandı. Stok çözeltiden alınan belirli hacimler distile su ile seyreltilerek ml'de 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 ve 1.4 mg üre azotu bulunduran standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden 10'ar µl alınarak III.5.4.'deki aynı işlemler uygulandıktan sonra 560 nm de köre karşı spektrofotometrede absorbansları okundu ve standart eğri çizildi. Her deney günü, standartlardan birkaç farklı konsantrasyon numune ile birlikte okunarak standart eğriden sapmalar düzeltildi.

III.5.5. Üriner Total Protein Miktar Tayini (124)

Üriner total protein miktar tayini Lowry Yöntemi'ne göre yapılmıştır. İdrar örnekleri santrifüj edilerek bekletilmeden aynı gün içinde idrar proteini çalışılmıştır. Bu yöntem; proteinlerin alkali ortamda bakır iyonları ile blüre tepkimesi vermesi esasına dayanır. Peptit bağları alkali ortamda bakır tuzları ile mor renkli kompleks oluşturur. Aynı zamanda protein yapısındaki tirozin ve triptofan amino asitleri fosfomolibdat-fosfotungstat çözeltisi (Folin-Ciocalteu) ile indirgenir.

4°C de 3000 g'de 10 dakika santrifüj edilen 24 saatlik idrar süpernatantından, distile su ile 1:100 oranında seyreltilen idrar örneğinde protein miktar tayini yapıldı. Ana stok BSA standardı (1 mg/ml) çözeltisinden 0.5 ml alıp 10 ml'ye tamamlanarak hazırlanan 50 µl/ml'lik BSA çözeltisinden 0.4 ml standart tübüne, seyreltik idrar numunesinden alınan 0.4 ml örnek tübüne pipetlendi. Tüplere 2'şer ml protein renk reaktifi eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Süre bitiminde 1:1 oranında distile su ile seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0.2 ml pipetlendi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında bir saat bekletildikten sonra 750 nm de spektrofotometrede köre karşı absorbanslar okundu. Kör tübü ise 0.4 ml distile su konularak hazırlandı ve aynı işlemlere tabi tutuldu.

Sonuçlar, mg/dl protein atılımı ve üriner kreatinin ile bağdaştırılmış protein atılımı (mg protein/mg üriner kreatinin) olarak ayrı ayrı ifade edildi.

III.5.5.1. Sığır Serum Albumini (BSA) İle Standart Çözeltilerin Hazırlanması ve Protein Standart Eğrisinin Çizimi

10 mg BSA tartıldı ve distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Böylece ana stok BSA standardı (1 mg/ml) hazırlandı. Stok çözeltiden alınan belirli hacimler distile su ile seyreltilerek ml'de 10, 20, 40, 60, 80, 100 ve 120 µg BSA bulunduran standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden 0.4'er ml alınarak III.5.5.'deki işlemlere tabi tutulduktan sonra 750 nm de spektrofotometrede köre karşı absorbanslar okundu ve standart eğri çizildi. Her deney günü, taze hazırlanan standartlardan bir kaç farklı konsantrasyonda örnekler ile birlikte okunarak standart eğriden sapmalar düzeltildi.

III.5.6. Böbrek Dokusunun Histolojik Değerlendirmesi

Histopatolojik inceleme, verilen ilaçlardan, dozlardan, sıçanların serum ve idrar parametre değerlerinden habersiz bir patolog tarafından ışık mikroskopunda yapıldı. Böbrek dokusu özellikle toksik dejeneratif ve nekrotik değişiklikler açısından incelendi. Nekrotik değişiklikler bulguların şiddetine ve yaygınlığına göre 0, 1, 2, 3 (yok, hafif, orta, şiddetli) şeklinde semi-kantitatif skorlandı. Nekrotik değişiklikler dışındaki histopatolojik bulgular da kaydedildi.

III.5.7. İstatistiksel Değerlendirmeler

Toplam olarak 108 deney sıçanının kullanıldığı bu çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS programında yapılmıştır. Çalışma grupları arasında ANOVA uygulanmış ancak varyanslar homojen bulunmadığı için varyans analizi yerine Kruskal-Wallis testi ve ardından gruplar arası karşılaştırmalarda non-parametrik Mann-Whitney U – Wilcoxon Rank Testi uygulanmıştır.



BÖLÜM IV

BULGULAR

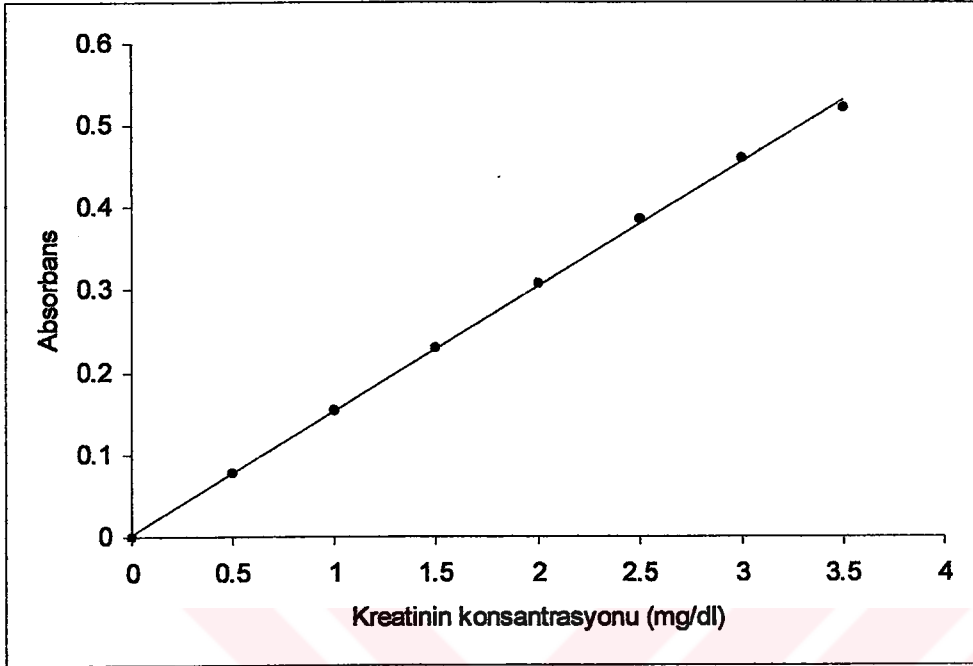
IV.1. Standart Eğri Çizimleri

IV.1.1. Kreatinin Standart Eğrisi

Çeşitli konsantrasyonlarda kreatinin taşıyan çözeltilerin spektrofotometrede okunan absorbans değerleri ve bunlara ilişkin standart hatalar Tablo 5'de verilmiş ve Şekil 9'da bu değerlere göre çizilen standart eğri gösterilmiştir.

Tablo 5. Kreatinin standart eğrisinin çizimi için maddenin bilinen konsantrasyonlarına karşı absorbans okumaları. Ort. $\pm$ S.H.: Ortalama $\pm$ Standart Hata, (n): Her konsantrasyon için ölçüm sayısı.

Kreatinin (mg/dl)	Absorbans Ort. $\pm$ S.H.	(n)
0.5	0.078 $\pm$ 0.0003	(5)
1	0.154 $\pm$ 0.0005	(5)
1.5	0.230 $\pm$ 0.0006	(5)
2	0.308 $\pm$ 0.0004	(5)
2.5	0.387 $\pm$ 0.0005	(5)
3	0.461 $\pm$ 0.0007	(5)
3.5	0.522 $\pm$ 0.0009	(5)



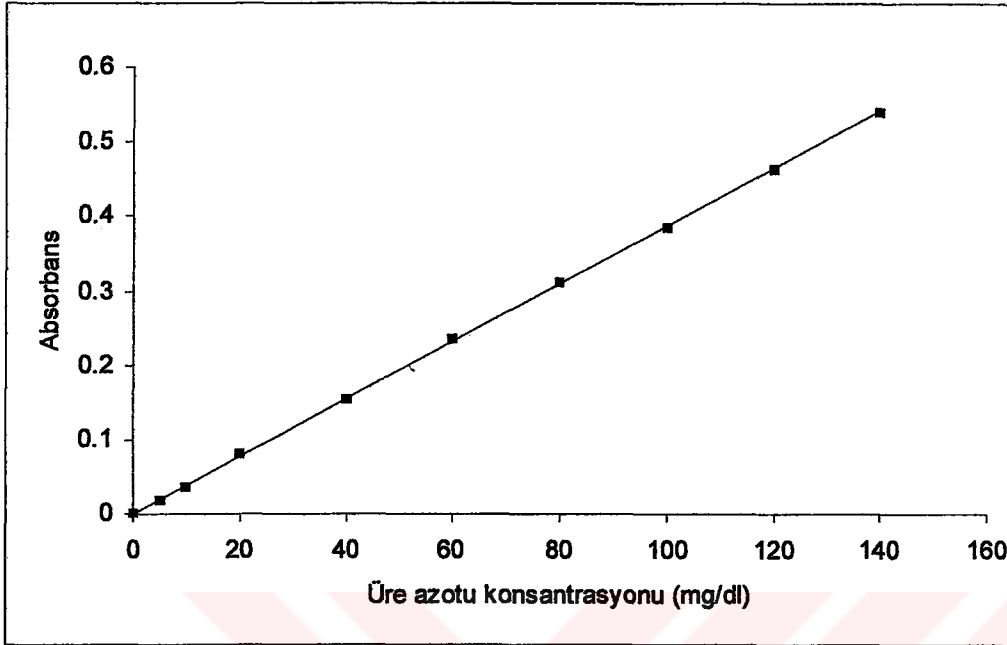
Şekil 9. Kreatinin standart eğrisi

IV.1.2. Üre Azotu Standart Eğrisi

Çeşitli konsantrasyonlarda üre azotu taşıyan çözeltilerin spektrofotometrede okunan absorbans değerleri ve bunlara ilişkin standart hatalar Tablo 6'da verilmiş ve Şekil 10'da bu değerlere göre çizilen standart eğri gösterilmiştir.

Tablo 6. Bilinen konsantrasyonlardaki üre azotu çözeltilerinin absorbans okumaları.
Ort. $\pm$ S.H.: Ortalama $\pm$ Standart Hata, (n): Her konsantrasyon için ölçüm sayısı.

Üre Azotu (mg/dl)	Absorbans Ort. $\pm$ S.H.	(n)
5	0.018 $\pm$ 0.0004	(5)
10	0.037 $\pm$ 0.0008	(5)
20	0.080 $\pm$ 0.0011	(5)
40	0.155 $\pm$ 0.0016	(5)
60	0.235 $\pm$ 0.0026	(5)
80	0.312 $\pm$ 0.0033	(5)
100	0.385 $\pm$ 0.0031	(5)
120	0.465 $\pm$ 0.0045	(5)
140	0.540 $\pm$ 0.0031	(5)



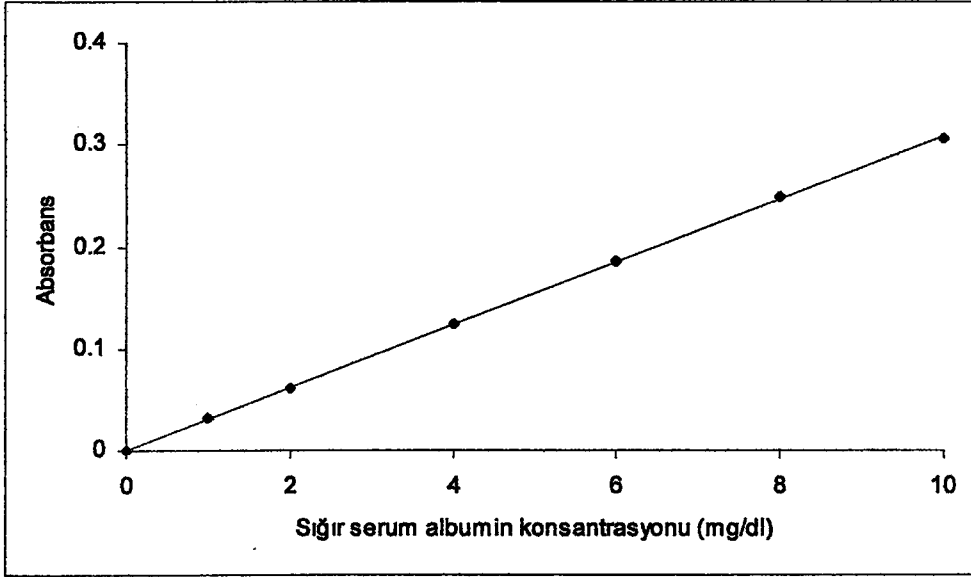
Şekil 10. Üre azotu standart eğrisi

IV.1.3. Sığır Serum Albumin (BSA) Standart Eğrisi

Çeşitli konsantrasyonlarda BSA taşıyan çözeltilerin spektrofotometrede okunan absorbans değerleri ve bunlara ilişkin standart hatalar Tablo 7'de verilmiş ve Şekil 11'de bu değerlere göre çizilen standart eğri gösterilmiştir.

Tablo 7. Protein standart eğrisinin çizimi için BSA'nın bilinen konsantrasyonlarına karşı absorbans okumaları. Ort. $\pm$ S.H.: Ortalama $\pm$ Standart Hata, (n): Her konsantrasyon için ölçüm sayısı.

BSA (mg/dl)	Absorbans Ort. $\pm$ S.H. (n)
1	0.032 $\pm$ 0.0011 (5)
2	0.061 $\pm$ 0.0015 (5)
4	0.125 $\pm$ 0.0015 (5)
6	0.186 $\pm$ 0.0025 (5)
8	0.248 $\pm$ 0.0025 (5)
10	0.306 $\pm$ 0.0031 (5)



Şekil 11. Sığır serum albumin standart eğrisi

IV.2. İdrar ve Serum Parametrelerine İlişkin Bulgular

Kontrol grubu ve ilaç uygulanan sıçanların idrar ve serum parametrelerine ilişkin ortalamalar ile ortalamalar arası farkın önem kontrol analizleri toplu halde Tablo 8 ve Tablo 9'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre çizilen bar grafikler ise Şekil 12, 13, 14, 15, 16'da gösterilmiştir.

IV.3. Böbrek Dokularına Ait Histolojik Bulgular

Böbreklerde izlenen bulgular ağırlıklı olarak tübül epitel hücrelerindeki dejeneratif ve nekrotik değişikliklerden oluşmuştu. Tüp epitel hücrelerinde toksik etkinin şiddetine göre sırası ile vakuolizasyon, şişme, apoptozis, karyoreksis, lümene dökülme, tek tek hücre düzeyinde nekroz, bir tüp kesitinin tamamını içeren nekroz izlendi. Nekroza gidişin başka bir bulgusu da ileri derecede yassılaşmış epitel hücrelerinin yarattığı mikrokistik görünümdü. Bulguların yaygınlığı tek hücre düzeyinden geniş tüp kümelerine kadar, tek tek odaklardan çok sayıda geniş odaklara kadar değişiyordu. Nekrotik değişiklikler daha çok proksimal tüplerde ve özellikle meduller ışıklara denk gelen bölgelerde idi. Ayrıca distal tüplerde protein tıkaçları, atık hücre tıkaçları izlendi. Toksik dejeneratif ve nekrotik değişiklikler yanısıra, glomerüller ve kapiller yatakta konjesyon, tübülo-interstisyel alanda

yangısal infiltrasyon odakları dikkat çekmekte idi. Tanımlanan bu bulguların bir kısmı Resim 1, 2, 3, 4 ve 5’de gösterilmiştir.

Histopatolojik bulgular, bulgu şiddeti ve yaygınlığına göre semi-kantitatif olarak skorlanmıştır. Histopatolojik bulguların skorlanmasında % tercih edilmemiştir. Çünkü, en fazla toksik etkinin görüldüğü böbreklerde etkilenen alan % 20’yi aşmamaktadır. Bu nedenle, % 0 ile % 20 arasında değişen alanları sayısal olarak vermenin çok doğru olmayacağı düşünülmüştür.

Gruplarda histopatolojik bulguların her sıçana ait sayısal skorları toplanarak sıçan sayısına bölünmesi ile elde edilen sayı, “grubun ortalama histolojik skoru” olarak kaydedilmiştir. Skor ortalamaları Tablo 8 ve Tablo 9’da belirtilmiştir. Tübülointerstisyel yangı ve konjesyon skorlamaya dahil edilmemiştir.

Tablo 8. Kontrol grubu ile Parakuat veya Asetaminofen uygulanan sıçanların idrar ve serum parametrelerine ilişkin ortalama değerleri ile böbrek dokusunda histopatolojik skor ortalamaları.

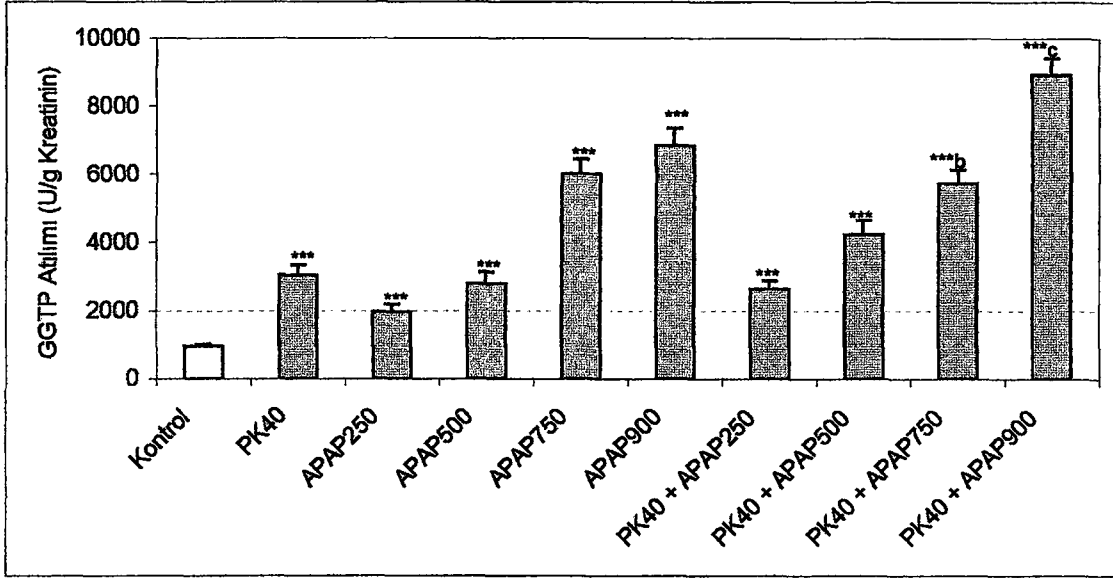
	İDRAR					SERUM		BÖBREK DOKUSU (#)
	Miktar (ml/24 sa.)	Kreatinin (g/Lt)	Protein (mg/mg Kre.)	GGTP (U/g Kre.)	NAG (U/g Kre.)	Kreatinin (mg/dl)	BUN (mg/dl)	
Kontrol (12)	7.83 ± 0.58	1.32 ± 0.07	5.77 ± 0.19	949.58 ± 51.41	15.61 ± 0.43	0.92 ± 0.02	16.03 ± 0.53	0.00
PK (40mg/kg) (11)	10.73 ± 0.94	0.68 ± 0.08**	7.31 ± 0.47	2621.00 ± 266.93***	36.46 ± 1.61***	1.28 ± 0.14*	28.43 ± 2.95**	1.72
PK (40mg/kg) + APAP (250mg/kg) (10)	12.40 ± 1.42	0.62 ± 0.10**	17.26 ± 1.08***c	3025.55 ± 317.60***	38.79 ± 1.92***	1.20 ± 0.04**	32.92 ± 4.50**	2.10
PK (40mg/kg) + APAP (500mg/kg) (10)	8.10 ± 0.84	0.69 ± 0.06**	31.14 ± 2.02***c	4241.60 ± 403.90***	51.15 ± 1.85***b	1.38 ± 0.15**	35.89 ± 5.85**	2.60
PK (40mg/kg) + APAP (750mg/kg) (10)	7.70 ± 0.82	0.67 ± 0.10**	51.36 ± 4.09***c	7651.50 ± 388.18***b	64.42 ± 4.30***c	1.53 ± 0.08**	59.34 ± 4.86***b	2.60
PK (40mg/kg) + APAP (900mg/kg) (10)	5.90 ± 0.64 ^a	0.58 ± 0.04**	62.24 ± 4.22***c	8928.80 ± 490.02***c	81.32 ± 4.01***c	1.85 ± 0.09**	70.83 ± 3.65***c	2.80

Sonuçlar, Ortalama ± Standart Hata şeklinde verilmiş, her bir grubun hayvan sayıları ve uygulama dozları parantez içinde belirtilmiştir. PK; Parakuat, APAP; Asetaminofen. (#)=Böbrek dokusunda nekrotik değişiklikler; (0) normal, (1) hafif nekroz, (2) orta şiddetli nekroz, (3) şiddetli nekroz. Kontrol grubuna göre; * p<0.01, ** p<0.001, *** p<0.0001. Parakuat grubuna göre; ^a p<0.01, ^b p<0.001, ^c p<0.0001.

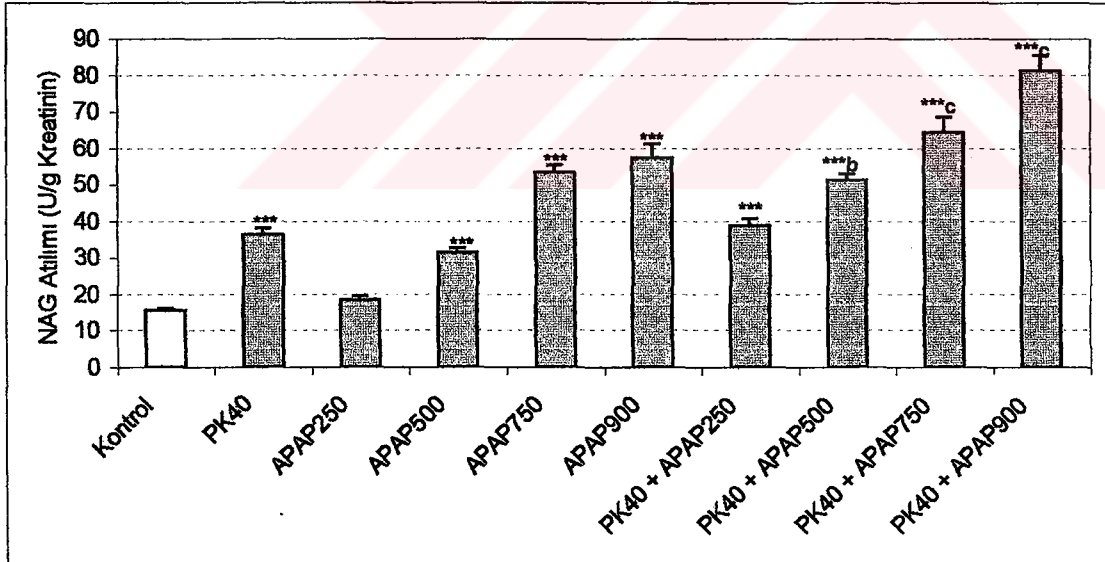
Tablo 9. Kontrol grubu ve farklı dozlarda Asetaminofen uygulanan sıçanların idrar ve serum parametrelerine ilişkin ortalama değerleri ile böbrek dokusu histopatolojik skor ortalamaları.

	İDRAR					SERUM		BÖBREK DOKUSU (#)
	Miktar (ml/24 sa.)	Kreatinin (g/Lt)	Protein (mg/mg Kre.)	GGTP (U/g Kre.)	NAG (U/g Kre.)	Kreatinin (mg/dl)	BUN (mg/dl)	
Kontrol (12)	7.83 ± 0.58	1.32 ± 0.07	5.77 ± 0.19	949.58 ± 51.41	15.61 ± 0.43	0.92 ± 0.02	16.03 ± 0.53	0.00
APAP (250mg/kg) (12)	5.50 ± 0.57	1.70 ± 0.25	12.75 ± 0.49***	1958.92 ± 224.94***	18.48 ± 0.92	1.06 ± 0.03	14.69 ± 0.81	0.58
APAP (500mg/kg) (12)	4.83 ± 0.51*	2.02 ± 0.15**	15.08 ± 0.90***	2783.42 ± 326.85***	31.43 ± 1.25***	1.07 ± 0.05	15.16 ± 0.51	1.50
APAP (750mg/kg) (11)	11.45 ± 0.45**	0.67 ± 0.03**	38.24 ± 0.98***	6007.55 ± 427.14***	53.28 ± 2.28***	1.06 ± 0.04	12.80 ± 0.62*	2.36
APAP (900mg/kg) (10)	10.60 ± 0.86**	0.72 ± 0.06**	45.54 ± 1.29***	6845.30 ± 501.49***	57.39 ± 3.83***	1.15 ± 0.04*	19.32 ± 0.59*	2.20

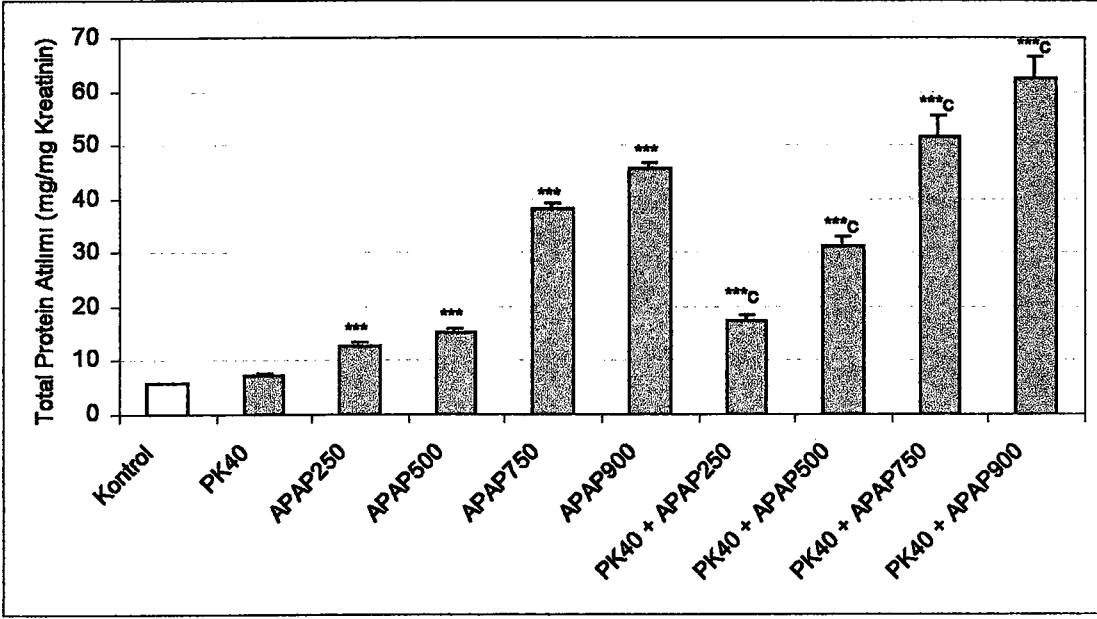
Sonuçlar, Ortalama ± Standart Hata şeklinde verilmiş, her bir grubun hayvan sayıları ile uygulama dozları parantez içinde belirtilmiştir. APAP; Asetaminofen. (#)=Böbrek dokusunda nekrotik değişiklikler; (0) normal, (1) hafif nekroz, (2) orta şiddetli nekroz, (3) şiddetli nekroz. Kontrol grubuna göre; * p<0.01, ** p<0.001, *** p<0.0001.



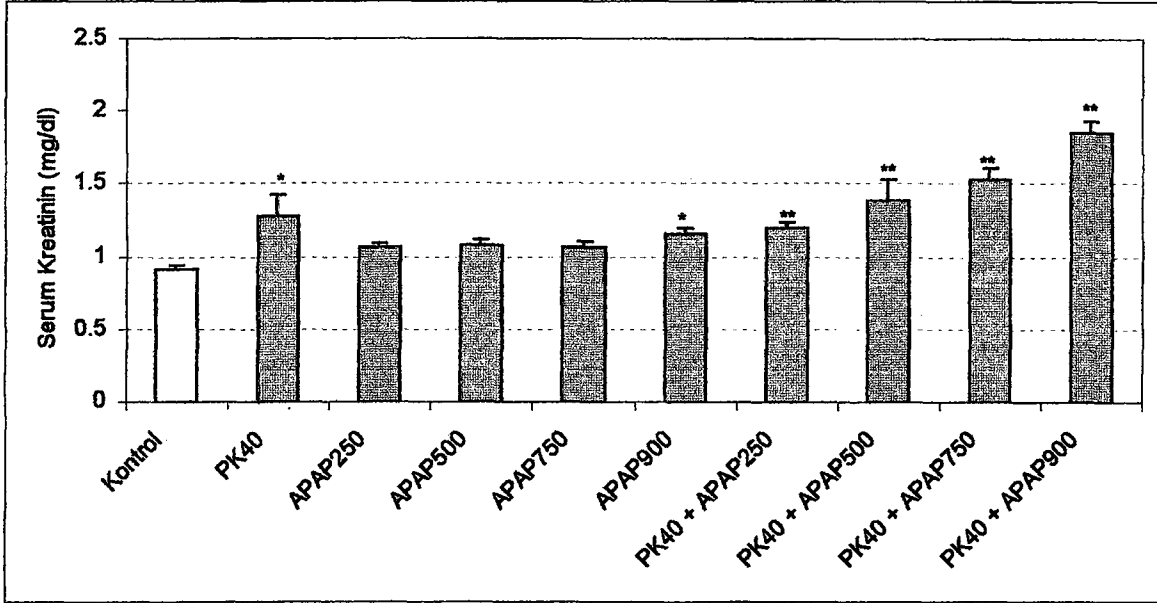
Şekil 12. Kontrol grubu ile ilaç uygulanan gruplarda 24 saat sonunda üriner GGTP atılımı. PK; Parakuat, APAP; Asetaminofen olup, yanlarındaki sayısal değerler ile mg/kg cinsinden uygulama dozları belirtilmiştir. Barlar her grupta Ortalama $\pm$ Standart Hata'yı göstermektedir. Kontrol grubuna göre ***: $p < 0.0001$; parakuat grubuna göre b: $p < 0.001$ ve c: $p < 0.0001$.



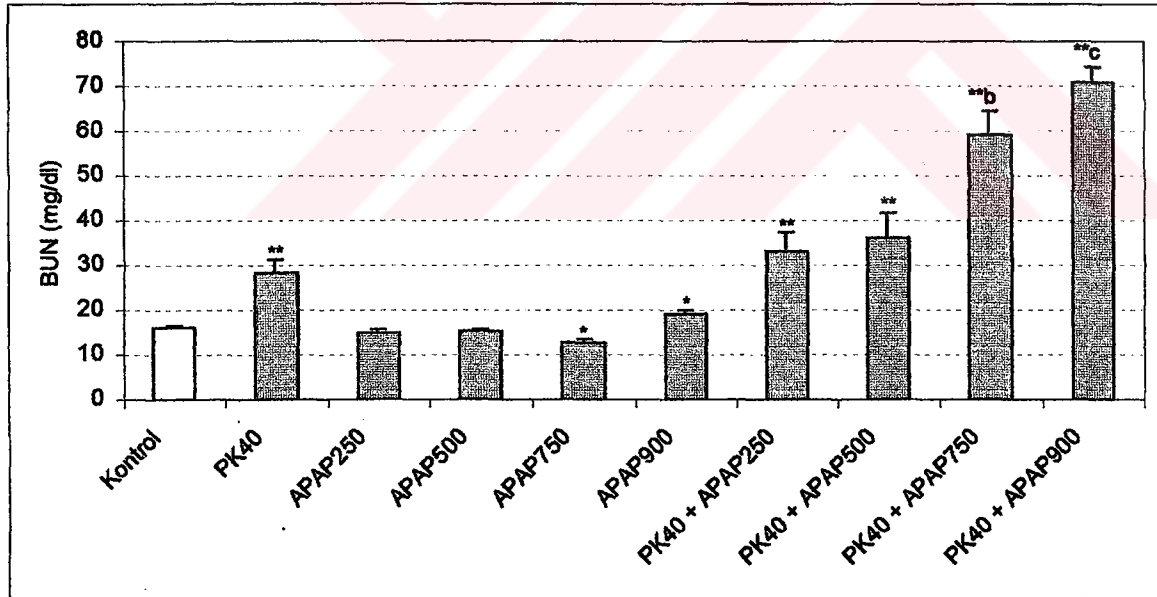
Şekil 13. Kontrol grubu ile ilaç uygulanan gruplarda 24 saat sonunda üriner NAG atılımı. Kısaltmalar, Şekil 12'deki gibidir. Kontrol grubuna göre ***: $p < 0.0001$; parakuat grubuna göre b: $p < 0.001$, c: $p < 0.0001$.



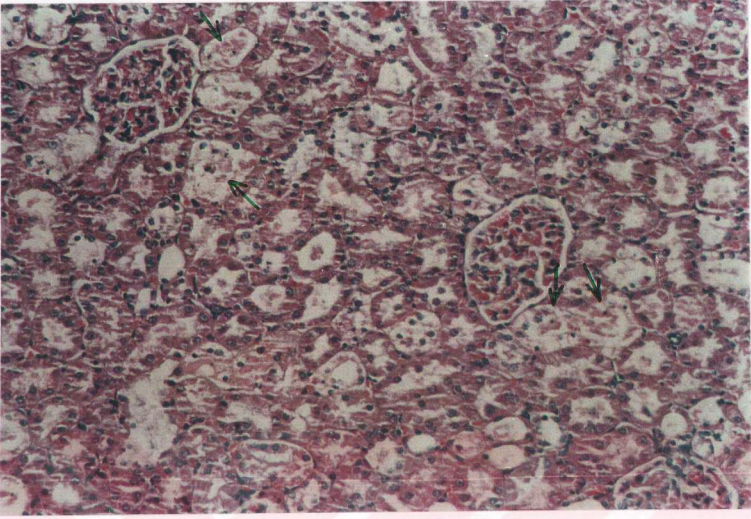
Şekil 14. Kontrol grubu ile ilaç uygulanan gruplarda 24 saat sonunda idrarda total protein atılımı. Kısaltmalar, Şekil 12'deki gibidir. Kontrol grubuna göre ***: $p < 0.0001$; parakuat grubuna göre c: $p < 0.0001$.



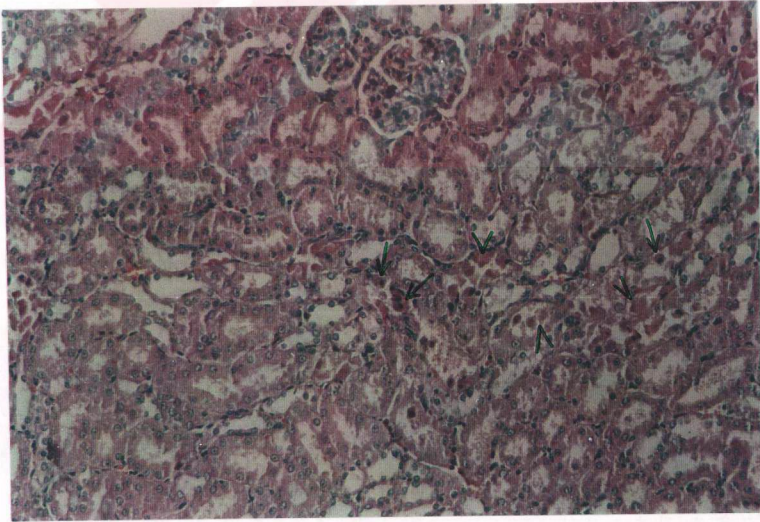
Şekil 15. Kontrol grubu ile ilaç uygulanan gruplarda 24 saat sonra serumda kreatinin miktarları. Kısaltmalar, Şekil 12'deki gibidir. Kontrol grubuna göre *: $p < 0.01$, **: $p < 0.001$.



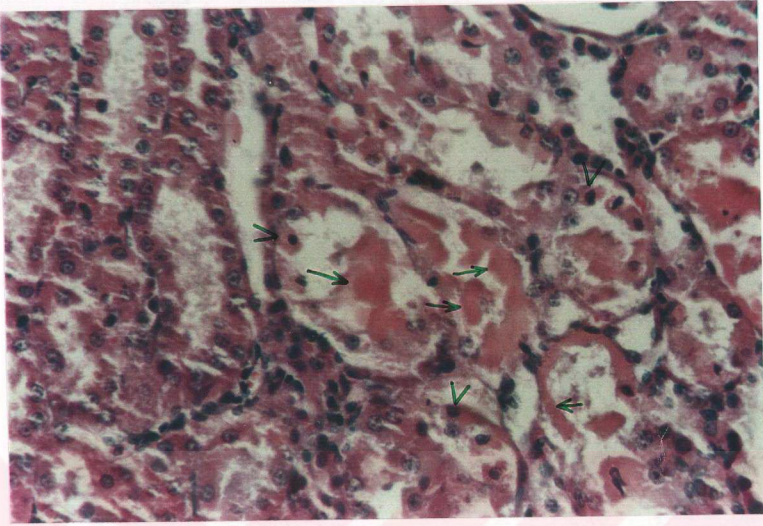
Şekil 16. Kontrol grubu ile ilaç uygulanan gruplarda 24 saat sonra serumda üre azotu miktarları. Kısaltmalar, Şekil 12'deki gibidir. Kontrol grubuna göre *: $p < 0.01$, **: $p < 0.001$; parakuat grubuna göre b: $p < 0.001$, c: $p < 0.0001$.



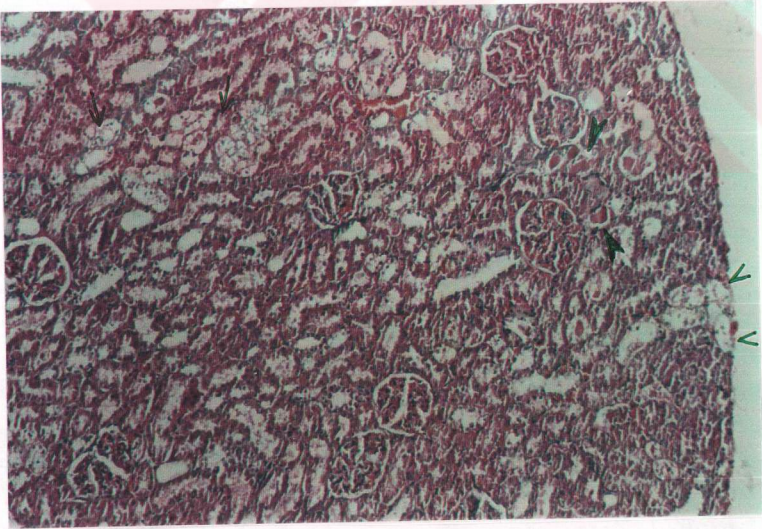
Resim 1. Vakuolizasyon ve bu degeneratif değişiklikten nekroza geçiş gösteren tüpler (ok). (40 mg/kg Parakuat uygulanan grupta) (X 20 - HE).



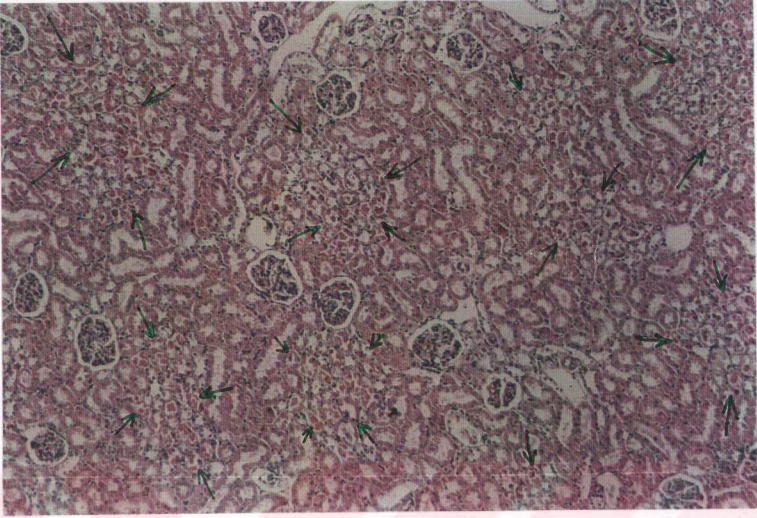
Resim 2. Tüp epitel hücrelerinde çekirdeklerin küçük ve çok koyu görüldüğü, stoplazmaların koyu pembe homojen görünümde olduğu apoptotik değişiklikler (ok), tek tek çekirdeklerini kaybetmiş, lümene dökülme eğilimi gösteren koyu pembe renkte nekrotik hücreler (ok başı). (750 mg/kg Asetaminofen uygulanan grupta) (X 20 - HE).



Resim 3. Nekroza uğramış lümene dökülmüş hücreler ve hücre atıkları (ok) ile tek tük piknotik hücreler (ok başı). (900 mg/kg Asetaminofen uygulanan grupta) (X 40 - HE).



Resim 4. Glomerüllerde ve kapiller yatakta ileri derecede konjesyon, tüp epitelinde vakuoler dejenerasyon (ok), hemen kapsül altında nekroz alanları (açık ok başı) ve tüp lümenlerinde tıkaçlar (kapalı ok başı). (40 mg/kg Parakuat + 250 mg/kg Asetaminofen uygulanan grupta) (X 10 - HE).



Resim 5. Çok sayıda yaygın geniş nekroz odakları (ok). (40 mg/kg Parakuat + 900 mg/kg Asetaminofen uygulanan grupta) (X 10 - HE).

BÖLÜM V

TARTIŞMA ve SONUÇ

V.1. İdrarın Toplanması İlişkin Tartışma

Hayvanlar üzerinde yapılan deneysel nefrotoksisite çalışmalarında idrar biriktirilirken dışkı, hayvan yemi ve bakteriyel kontaminasyonun önlenmesi, enzimüri çalışmaları için öngörülen genel bir kuraldır (106). Gumbleton ve Nicholls (78), deney hayvanlarının metabolizma kafeslerine alıştırılmaları gerektiğini, aksi takdirde ortama alıştırılmayan hayvanların idrarında yüksek enzim aktivitesinin görülebileceğini, ayrıca temperaturün de üriner enzim atılımı üzerindeki etkisinin gözönünde bulundurulması gerektiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, deneye alınacak sıçanlar bir gün önceden metabolizma kafeslerine yerleştirilerek ortama alıştırıldı. Metabolizma kafeslerinin bulunduğu deney odası 12 saat aydınlık-12 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı ve oda sıcaklığının korunduğu izole bir ortam oluşturuldu.

İdrarda GGTP ve NAG atılımlarında, birçok enzimde olduğu gibi sirkadiyen varyasyonlar sözkonusudur. Her iki enzimin öğleden sonraki idrara göre sabah idrarındaki (8:00-12:00 arası) atılımlarının daha fazla olduğu bildirilmiştir (63).

İdrarda GGTP ve/veya NAG aktivite tayininin yapıldığı çalışmalarda genellikle 24 saatlik idrar örnekleri tercih edilse de (31, 53, 73, 218, 225), 16 saatlik idrar (113), 18 saatlik idrar (87), 20 saatlik idrar (78), spot idrar (71, 81, 116, 133) ya da sabah idrarında (5, 8, 109, 127, 176) tayin yapıldığını bildiren yayınlar bulunmaktadır.

Çalışmamızda, daha yaygın olarak kullanılan 24 saatlik idrarda aktivite tayini yapılması benimsenmiştir. Bu amaçla enzim aktivite tayinleri deney hayvanlarına ilaç

uygulandıktan hemen sonra başlayarak 24 saat süre içinde toplanan idrar örneklerinde yapılmıştır.

V.2. Santrifügasyon İşlemi İle İlgili Tartışma

İdrar sedimentinde, süpernatantın 2-4 katı kadar GGTP aktivitesi bulunduğu gösterildiğinden (202), hücrel elementlerin uzaklaştırılması amacıyla idrar örneğinin 3000 g'de 5-10 dakika santrifüj edilmesi, idrarda GGTP aktivite tayininden önce benimsenmiş bir uygulamadır (87, 89, 185).

İdrarda NAG analizi öncesinde, idrarın 3000 g'de 5 dak. (128) ya da 1800 g'de 10 dak. (176) gibi farklı devirlerde santrifüj edildiği görülmektedir. Paraire ve ark. (167), idrarı 900 g'de 5 dak. santrifüj etmişler ve sedimentte ihmal edilebilir düzeyde NAG aktivitesine rastladıklarını bildirmişlerdir. Buna karşın Wellwood ve ark. (225), idrarın 2000 rpm'de 20 dak. santrifügasyonunun idrarda NAG aktivitesini değiştirmediğini ve bu nedenle idrarın santrifüjlenmesinin gereksiz olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Çalışmamızda, 24 saatlik idrar örnekleri 4°C de 3000 g'de 10 dak. santrifüj edilerek elde edilen idrar süpernatantlarında enzim aktiviteleri tayin edilmiştir.

V.3. Üriner GGTP İle İlgili Tartışma

Szasz (202), idrarda sıcaklığa dayanıklı, düşük molekül ağırlığında, diyaliz edilebilir inhibitörler bulunduğuna ve bu inhibitörlerin GGTP aktivitesini önemli düzeyde düşürdüğüne dikkat çekmiştir. Bu bulgu, bazı araştırmacılar tarafından desteklenirken (43, 185), diyalizin gereksiz olduğunu ve taze idrarda ölçümü yapılan enzim aktivitesi ile diyaliz uygulanmış örnekte ölçümü yapılan enzim aktivitesi arasında hiçbir fark olmadığını öne sürenler de olmuştur (89).

Gordon ve ark. (73), enzimin tayini öncesinde idrar örneğinin 1/10 oranında seyreltilmesinin GGTP aktivitesini yaklaşık yüzde 20 arttırdığını ve böylece diyalize gerek kalmayacağını bildirmişlerdir. Bu nedenle, hücrel elementleri uzaklaştırmak üzere uygulanan santrifügasyon işleminden sonra, idrar örneğine inhibitörleri uzaklaştırmak amacıyla diyaliz (5, 31, 43, 87, 185) veya santrifügal ultrafiltrasyon (81) ya da jel

filtrasyonunun (22, 108, 127) uygulandığı çalışmaların yanısıra, idrarın serum fizyolojik, su veya tampon ile 1/10-20 oranında seyreltilmesinden sonra, doğrudan enzim aktivite tayininin yapıldığı (8, 73, 75, 81, 113, 129) çalışmalar da mevcuttur.

Gosset ve ark. (75), köpek idrar süpernatantında, direkt olarak ve jel filtrasyonu uygulanmasından sonra yaptıkları çalışmaların sonucunda, idrar GGTP aktivite tayininden önce jel filtrasyonu uygulanmasına gerek olmadığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda GGTP aktivitesi, 24 saatlik idrar örneklerinde santrifügasyon işlemi takiben idrar süpernatantlarının gerekli oranlarda distile su ile seyreltilmesinden sonra tayin edilmiştir.

V.3.1. Üriner GGTP Aktivitesinin Stabilitesi İle İlgili Tartışma

İdrar örneklerini saklama koşullarının GGTP aktivitesine etkisi, çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Bu konudaki ortak görüşlere göre; idrarın dondurularak saklanması üriner GGTP aktivitesinde kayba yol açmaktadır. Santrifüj edilmiş idrar örneğindeki GGTP aktivitesi -70°C de kısmen korunurken, -20°C de önemli kayba uğramaktadır (129). Aktivite diyaliz sonrası -20°C de 1-7 gün korunabilmektedir (185). Diğer taraftan idrar GGTP aktivitesinin oda sıcaklığında (20°C de) bir hafta ve 4°C de bir ay stabil kaldığı gösterilmiştir (31, 129).

GGTP aktivite tayini, benzer çalışmalarda yaygın olarak kullanılan Szasz Yöntemi ile yapılmıştır (81, 166, 185).

Çalışmamızda, idrar örneklerindeki GGTP aktivitesinin santrifügasyon işleminden sonra aynı gün içinde tayin edilmesine özen gösterilmiş ya da analize kadar 4°C de korunarak ve en fazla iki gün içinde çalışılmıştır.

V.3.2. Üriner GGTP Aktivitesinin İfade Edilişi İle İlgili Tartışma

Konuyla ilgili yayınlar incelendiğinde, idrar GGTP aktivitesinin ifade edilişinde standart bir ifade şeklinin bulunmadığı anlaşılmaktadır.

İdrar GGTP aktivitesini 24 saatlik idrardaki aktivite, U/24 sa., (185), 16 ya da 18 saatlik idrardaki aktivite, U/16 sa., U/18 sa., (87, 113), 1 saatlik idrardaki aktivite, U/sa., (78) olarak ifade eden araştırmacılar olduğu gibi, vücut ağırlığı başına günlük enzim atılımı, U/kg/24 sa., (31), litredeki enzim ünitesi, U/L, (129, 185) olarak veya ml idrardaki enzim ünitesi, U/ml, (73) olarak ifade eden araştırmacılar da vardır. Hatta aynı yayın içinde bu ifade şekillerinden birkaçının birlikte kullanıldığı da görülmektedir (73, 185).

Diğer taraftan enzim atılımı, üriner kreatinin miktarına oranlanarak da ifade edilmektedir. Bu ifadeler U/mg kreatinin (73, 81, 90), mU/mg kreatinin (43), U/g kreatinin (12, 129) veya U/mmol kreatinin (185, 230) gibi farklı olabilmektedir.

Kreatinin atılımının zaman içinde nispeten sabit olması ve idrar akış hızından etkilenmemesi nedeniyle, sonuçlar kreatinin üzerinden verildiğinde, üriner hadım veya zaman üzerinden ifade edilmesine göre enzim atılımındaki değişkenlik en aza indirgenmektedir (227). Enzim atılımının üriner kreatinin üzerinden ifade edilmesi, idrar akış hızındaki değişikliklerin etkisini en aza indirmektedir (43, 73, 78, 185).

Ayrıca, laboratuvar hayvanları ile yapılan deneysel çalışmalarda 24 saatlik idrar biriktirme işleminin zahmetli ve zaman alıcı olduğu, bu zaman içinde enzimin aktivite kaybına uğrayabileceği de gözönünde tutularak spot idrarda çalışıldığı durumlarda, enzim aktivitesinin üriner kreatinine oranlanarak ifade edilmesi gerektiğini savunanlar da vardır (43, 75, 81, 176, 185).

24 saatlik idrardaki enzim atılımı ile "GGTP aktivitesi/üriner kreatinin" oranı arasında iyi bir korelasyon bulunmakta, ancak gün-içi varyasyonlar bu ifade şeklini sınırlandırmaktadır (75). Sağlıklı sıçanlarda günün belirli zamanlarında alınan spot idrarda kreatinin üzerinden ifade edilen GGTP atılımı oldukça sabit olmakla birlikte, sabah örneklerine kıyasla öğleden sonraki örneklerde daha yüksek değerler elde edilmiştir (81). Üriner GGTP düzeylerindeki bu değişiklikler kreatin veya kreatin öncüllerini içeren besin alımından sonra geçen sürelerdeki farklılıklar ve/veya renal fonksiyonlardaki diürenal varyasyonlar ile açıklanmaya çalışılmıştır (86, 170). Amodio ve ark. (5), yemek yeme ve su alınımına bağlı güçlü diürezde, idrar GGTP atılımında artış olduğunu bildirmiştir. Jung ve ark. (108), idrar akış hızına bağlı enzim atılımındaki artışların sadece fırçasal kenar enzimlerinin solubl formlarına özgü olduğunu, tübül aparatı boyunca yüksek idrar akış

hızının solubl enzim formlarının salınımını arttırdığını ve bu enzimlerden özellikle GGTP'in diğer fırçasal kenar enzimlerine göre diürezden en fazla etkilendiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda üriner GGTP, kreatinin üzerinden enzim atılımı olarak (U/g kreatinin) ifade edilmiştir.

V.4. Üriner NAG İle İlgili Tartışma

Üriner NAG aktivite tayininde, idrarn kapsadığı düşük molekül ağırlıklı olası inhibitörlerin uzaklaştırılması gerekli görülmüştür (81, 87, 128). Bu amaçla, NAG aktivitesinin dilüe edilmiş idrarda direkt çalışıldığı gibi (121, 133, 224, 225), santrifugal ultrafiltrasyon'un uygulandığı (81) ya da jel filtrasyonunun tercih edildiği yayınlar da oldukça fazladır (91, 107, 109, 128, 176). Maruhn (128), idrarda jel filtrasyonundan sonra çalışmamızda kullandığımız PNP-NAG Yöntemi ile NAG tayininde enzim aktivitesinde yüzde 19'luk bir artış gözlemlemiştir. Werner ve ark. (226), jel filtrasyonunun diyalize göre idrardaki inhibitörleri tamamen uzaklaştırdığını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, diyaliz ve jel filtrasyonu sonrasında idrar enzimlerinin düzeylerini belirlemişler ve iki yöntemi kıyaslamışlardır. Farklı enzim aktivitelerinin diyaliz esnasında değişik zamanlarda pik yapıp sonradan düşmeleri, araştırmacılara, diyaliz işleminin multiple enzim analizi için uygun olmadığını düşündürmüştür. Werner ve Gabrielson (228), ultrafiltrasyon ile jel filtrasyon yöntemlerini kullanarak üriner enzim analizi yapmışlar, bulguların istatistiksel olarak farklı olmadığını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, diyalizin güvenilir olmadığını da belirtmişlerdir. Wellwood ve ark. (225), idrarn 20 katı dilüsyonunun inhibitörlerin uzaklaştırılması için yeterli olduğunu ve böylece diyalize gerek kalmadığını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda NAG analizi öncesinde, idrar süpernatantı jel filtrasyon yöntemi (Sephadex G-25 Fine) ile düşük molekül ağırlıklı olası inhibitör maddelerden uzaklaştırılmıştır. "Fine jel" ile ayrılmanın daha iyi sonuç verdiği, bu nedenle enzim aktivite tayini sonuçlarının daha güvenilir olduğu bildirilmiştir (106, 128, 226).

V.4.1. Üriner NAG Aktivitesinin Stabilitesi İle İlgili Tartışma

Horak ve ark. (91), üriner NAG aktivitesinin bilirubin, hemoglobin, salisilik asit ve metilen mavisi tarafından kısmen inhibe edildiğini, bromsülfalein ve askorbik asidin idrar NAG aktivitesini etkilemediğini bildirmişlerdir. Üre'nin de üriner NAG aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (140).

Kunin ve ark. (116), idrarın bakteriyel kolonizasyonunun NAG artışına yol açmadığını, Wellwood ve ark. (225), ise bakteriyel kontaminasyonun NAG aktivitesini etkileyebildiğini ve bu nedenle idrarın iyi muhafaza edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, bakteriyel büyümeyi önlemek için kullanılacak koruyucu maddelerin enzim aktivitesini inhibe edebileceğini, görünür bir hemoglobinürinin ise NAG tayinini etkilemediğini göstermişlerdir.

Wellwood ve ark. (225) ile Horak ve ark. (91), üriner NAG analizi için porsiyon idrar örneklerinin uygun olduğunu, çünkü; NAG atılımındaki diurnal varyasyonların ve idrar akış hızından kaynaklanan değişikliklerin, NAG aktivitesinin üriner kreatinine oranlanarak ifade edilmesi suretiyle önüne geçileceğini, böylece idrar toplama güçlüğü'nün ve bakteri üremesini önlemek için idrara eklenen koruyucu maddelerin (mertiyolat, toluen) enzim aktivitesinde yapacakları inhibisyonun önlenebileceğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar, idrar örneklerinin hemen çalışılmasını veya 4°C ya da -20°C de bekletilmesini önermişlerdir. Üriner NAG analizi için kullanılan idrar örneklerinin -20°C de aylarca saklanabileceği çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (91, 116, 167, 225). Diğer bazı çalışmalarda da idrar örneklerinin 4 ila 6°C llerde birkaç gün süreyle saklanabileceği belirtilmiştir (74, 91).

Çalışmamızda, üriner NAG analizi için kullanılan jel filtre idrar örnekleri -20°C de saklanmış ve enzim aktivitesi iki gün içinde çalışılmıştır.

Üriner NAG aktivite tayini, birçok araştırmacının tercih ettikleri ve yaygın bir yöntem olan PNP-NAG Yöntemi'ne göre yapılmıştır (109, 176, 201, 213, 214).

V.4.2. Üriner NAG Aktivitesinin İfade Edilişi İle İlgili Tartışma

İncelenen yayınlarda idrarda NAG aktivitesi ölçümü için genellikle spot idrar (71, 81, 116, 133, 191, 224) ya da 24 saatlik idrar (53, 112, 218) örneklerinin tercih edildiği görülmektedir.

Üriner NAG atılımının ifade edilmesinde ise, aktivitenin idrar örneğindeki kreatinin konsantrasyonuna oranlanarak değerlendirilmesi genel olarak benimsenmiş bir uygulamadır. Böylece, idrar akışındaki varyasyonlara bağlı olarak NAG atılımında meydana gelebilecek değişiklikler, enzim aktivitesinin üriner kreatinin konsantrasyonuna bağdaştırılarak ifade edilmesi yolu ile elimine edilir. Bu işlem 24 saatlik idrar toplama gerekliliğini de ortadan kaldırır (8, 81, 91, 109, 116, 118, 133, 213, 214, 224). Endojen kreatinin renal glomerüllerden serbestçe filtre edilir ve tübüler geri emilimi söz konusu değildir. Bu nedenle üriner kreatinin konsantrasyonu sadece glomerüler filtrasyon hızına bağlıdır. Doğal olarak spot idrarda enzim aktivitesinin idrar kreatinine oranının, enzim konsantrasyonundan daha sabit bir değere sahip olması zorunludur (81).

Harauchi ve ark. (81), sağlıklı sıçanların sabah ile öğleden sonraki spot idrar örneklerinde, "üriner NAG/kreatinin" oranının oldukça sabit olduğunu ve gün içindeki varyasyonunun oldukça az olduğunu göstermişlerdir.

Kunin ve ark. (116) ile Wellwood ve ark. (224), spot idrarda yaptıkları çalışmalarda, üriner NAG aktivitesinin üriner kreatinine oranının insanlarda gün boyu rölatif olarak sabit kaldığını bildirmişlerdir.

Bomhard ve ark. (22)'nin sıçanlarda yaptıkları çalışma sonuçlarına göre, lizozomal enzim NAG'ın diürece bağlı olarak idrardaki atılımında önemli bir korelasyon bildirilmiştir. Ayrıca diürezde NAG ile üriner kreatinin atılımı arasında da oldukça yakın bir bağlantı olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda üriner NAG, kreatinin üzerinden enzim atılımı olarak (U/g kreatinin) ifade edilmiştir.

V.5. Kontrol Grubuna İlişkin Tartışma

Sıçanlarda yapılan çeşitli bileşiklerin nefrotoksik etkilerini araştırmaya yönelik çalışmalarda, ortalama üriner GGTP ve NAG atılımı U/kreatinin değerlerine ilişkin kontrol bulgularının farklı olduğu görülmüştür.

Gordon ve ark. (73), sıçanlarda kontrol grubunda ortalama üriner GGTP atılımını 54.9 ± 5.8 U/mg kreatinin (54900 ± 5800 U/g Kr.), Hoops ve ark. (90) 1980 ± 130 U/g kreatinin, Harauchi ve ark. (81) spot idrarda 1355 ± 18 U/mg kreatinin (1355000 ± 18000 U/g Kr.), Whiting ve ark. (230) 6070 ± 1750 U/g kreatinin, Wagner ve ark. (218) 885 ± 270 U/g kreatinin ve Kocaoğlu ve ark. (115) 770 ± 50 U/g kreatinin olarak bulmuşlardır. Bu bulgular kıyaslandığında, sağlıklı sıçanlarda üriner kreatininin g'ı başına GGTP aktivitesinde 775 U ile 1355000 U arasında değişen çok farklı değerlerin yer aldığı görülmektedir. Çalışmamızda, kontrol grubu GGTP aktivitesi için bulduğumuz 949.58 ± 51.41 U/g kreatinin değeri, yayınlarda her biri farklı olan sonuçlarla kıyaslandığında, Wagner ve ark. (218) ile Kocaoğlu ve ark (115)'nin bulgularıyla oldukça uyumludur.

Sıçanlarda yapılan çalışmalarda, Wagner ve ark. (218), kontrol grubu üriner NAG atılımı ortalamasını 3.6 ± 2.1 U/g kreatinin, Harauchi ve ark. (81) 18300 ± 300 U/g kreatinin, Whiting ve ark. (230) 867 ± 97 U/g kreatinin ve Manesh ve ark. (112) ise 316.6 ± 115.6 U/g kreatinin olarak bulmuşlardır. Sonuçlar karşılaştırıldığında, sağlıklı sıçanlarda üriner kreatininin g'ı başına ltrah edilen NAG aktivitesinde 3.6 U ile 18300 U arasında değişen oldukça farklı değerler göze çarpmaktadır. Çalışmamızda, üriner NAG düzeyleri sağlıklı kontrol grubu sıçanlarında ortalama 15.61 ± 0.43 U/g kreatinin bulunmuştur.

Yayınlarda bildirilen sonuçların birbirlerinden önemli derecede sapmalar gösterdiği ve çalışmamızda kendi kontrol sıçanlarımızın idrarlarında ölçtüğümüz ve U/g kreatinin olarak ifade ettiğimiz ortalama üriner NAG aktivitesinin de yayınlarla tam uyum göstermediği ortadadır. Bu durumun, uygulanan yöntemlerdeki farklılıklardan kaynaklanabileceği gibi (129), sıçanlardaki tür ve cinsiyet farklılıklarından (125) ve/veya enzim atılımındaki gün içi varyasyonlardan kaynaklanması (81) olasıdır.

V.6. Uygulanan İlaçlara İlişkin Tartışmalar

V.6.1. Parakuat (PK) İle İlgili Tartışma

Parakuat, insanlarda ve hayvanlarda oldukça ciddi toksik etkilere neden olduğu bildirilen bir herbisittir. Klinik olarak parakuat zehirlenmesi, yutma veya enjeksiyon yerindeki ülserasyonlar ile akut respiratuvar bozukluk ve renal yetmezlik ile teşhis edilebilir (61).

Hawthorn ve ark. (85), 20 mg/kg intravenöz (i.v.) tek doz parakuat uygulamasının köpeklerde renal yetmezliğe yol açtığını ve doza bağlı olarak renal fonksiyonlardaki bozukluğun arttığını bildirmişlerdir. Çeşitli deney hayvanlarında parakuat nefrotoksitesi konusunda yapılan çalışmalarda uygulanan dozların çoğunlukla intraperitoneal (i.p.) olarak tek doz şeklinde ve kg vücut ağırlığı başına 18-120 mg gibi doz aralıklarında seçildiği görülmüştür (33, 51, 145, 198). Bu bulgulardan yola çıkarak, çalışmamızda parakuat'ın, sıçanlarda nefrotoksik etki oluşturmaları için 40 mg/kg dozda, i.p. yoldan tek dozda verilmesi uygun görülmüştür. Seçilen uygulama dozu sıçanlarda yapılan nefrotoksite çalışmalarında kullanılan dozlara benzerdir (62, 195).

Lock ve ark. (122), sıçanlarda açlığın renal fonksiyonları azaltarak önemli bir hemokonsantrasyona neden olduğunu belirtmişler ve parakuat uygulandıktan sonra 24 saat boyunca aç bırakılan sıçanlardaki renal fonksiyonlarda gözlenen azalmanın, hem açlığın hem de parakuat'ın kombine etkisiyle, renal kan akımının azalmasının bir sonucu olabileceğini belirtmişlerdir. Çalışma şartlarımızda kullandığımız metabolizma kafeslerinin, sıçanların beslenmesine olanak verebilecek özellikte olmaması nedeniyle, 24 saatlik idrar toplama süresince sıçanların sadece su içmelerine imkan tanınmıştır. Ancak, kontrol ve diğer deney gruplarımızda da aynı deney protokolü uygulandığından, açlığın etkisi deney şartlarımız içersinde ihmal edilmiş bulunmaktadır.

PK uyguladığımız sıçanların üriner GGTP ve NAG U/g kreatinin değerlerinin ortalamaları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak oldukça anlamlı yüksek bulunmuştur ($p < 0.0001$) (Tablo 8). Bu sonuçlar PK'ın idrar GGTP atılımında % 176, NAG atılımında ise % 134'lük bir artışa neden olduğunu göstermektedir (Şekil 12, 13).

Nefropatinin tanı ve takibinde üriner kreatinin ölçümleri de sık olarak kullanılmaktadır. PK uygulanan sıçanlarda idrar kreatinin ortalaması, kontrol grubu değeri ile kıyaslandığında üriner kreatinin atılımında PK grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşme gözlenmektedir (Tablo 8). Bu grupta gözlenen enzimürinin de şiddetli olması, PK'ın nefrotoksik etkisinin üriner enzim ile üriner kreatinin atılımında sapmalara yol açtığını göstermektedir. Nagano ve ark. (145) farelerde, 120 mg/kg, i.p. yoldan tek doz PK verilmesinden sonra kreatinin atılımında azalma belirlemişler ve bu azalmanın kreatinin klerensi ve dolayısıyla GFR'deki azalmanın bir göstergesi olduğunu belirterek, PK'ın renal fonksiyonlarda bozulmalara yol açtığını ileri sürmüşlerdir.

Deney hayvanlarına nefrotoksik dozda verilen parakuat'ın bir diğer etkisi, idrar hacminde değişikliklere neden olmasıdır. Parakuat, oligüri, anüri (122, 198) veya poliüriye (145, 175) neden olur, ancak oligüri ve anüri daha sık gözlenmektedir (221). İdrar hacmindeki azalma suyun tübüler reabsorbsiyonundaki artışa ve/veya suyun filtrasyonundaki azalmaya bağlanabildiği gibi, az idrar çıkarmanın parakuat verilmesini takiben GFR'de gözlenen düşme ile doğrudan ilişkili olabileceği de bildirilmiştir (198). Poliüri, tübüler reabsorbsiyon yeteneğindeki bozulmayı gösterir (145). Webb ve ark. (221) ise, koyunlara 2-8 mg/kg, i.v., PK verilmesinden sonra, kontrol ve deney grubunda 24 saatlik idrar miktarları açısından anlamlı bir değişiklik kaydetmemişlerdir.

Lock ve ark. (122) sıçanlarda, oral yoldan verilen parakuat'ın neden olduğu renal fonksiyonlardaki azalmanın en erken bulgusunun, 12 saat sonra gözlenen idrar akışındaki azalma olduğunu bildirmişlerdir. Bu durumu, plazma hacmindeki azalmanın dolaylı olarak renal kan akımında yavaşlamaya yol açması ve renal fonksiyonlarda azalmaya neden olmasına bağlamışlardır. Bu bulgu, parakuat'ın ilk 24 saat içinde renal fonksiyonlarda azalmaya neden olabileceğinin bir göstergesi olarak kabul edilmiştir.

Bizim çalışmamızda, 24 sa.'lik idrar miktarları açısından kontrol grubu ile PK grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.01$) (Tablo 8). Bu sonuca dayanarak 40 mg/kg, i.p., PK'ın sıçanlarda ilk 24 sa. içinde idrar çıkışı üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını söyleyebiliriz.

Yaptığımız araştırmalarda deney hayvanlarında parakuat nefrotoksitesinin üriner enzimler ile izlendiği yalnızca bir yayına rastlanmıştır. Lock ve ark. (123)'ün bu konudaki

çalışmasında; sıçanlara 680 µg/kg oral (p.o.) ve 108 µg/kg subkutan (s.c.) yoldan tek doz parakuat uygulanmış, 24 saatlik idrarlarda sadece oral ilaç verilen sıçanların NAG aktivitesinde (nmol/saat olarak verilmiştir) anlamlı bir artış bulunurken, subkutan ilaç verilen deney grubunda bir artış görülmemiştir. Benzer şekilde, sadece oral parakuat verilen sıçanlarda 24 saatin sonunda poliüri, proteinüri, glikozüri ve azotemi gözlenmiştir.

Çalışmamızda, 40 mg/kg i.p. tek doz parakuat'ın indüklediği nefrotoksisitenin üriner enzimler olan GGTP ve NAG ile izlenmesi amaçlanmıştır. Bu enzimlerin üriner atılımlarındaki artış tübüler disfonksiyonun bir göstergesidir. NAG, proksimal renal tübüllerin lizozomlarında, GGTP ise nefronun fırçasal kenar membranında lokalize olmuştur. Tübüler hücre hasarında bu enzimler ultrafiltrata salınırlar ve idrardaki aktivitelerinde artış gözlenir (109). Bulgularımızı herhangi bir kaynakla karşılaştırma olanağımız olmasa da, bulunan sonuçlar kontrol grubu ile kıyaslandığında oldukça dikkat çekmektedir (Tablo 8). Sonuçlarımız, 40 mg/kg parakuat'ın sıçanlarda proksimal tübüllerde önemli bir hasara yol açtığını, üriner GGTP ve NAG tayinlerinin proksimal tübül hasarını ve nefrotoksisiteyi tespit etmede erken dönemde yararlı olduğunu ortaya koymaktadır.

Nefropatinin tanı ve takibinde üriner protein ölçümleri de sıklıkla kullanılmaktadır. Deney hayvanlarına nefrotoksik dozda uygulanan parakuat'ın idrarda protein atılımında artışa yol açtığı bildirilmiştir (123, 145-147, 222). Sobha ve ark. (198), parakuat zehirlenmesi ile gelen bir olguda proteinüri gözlemişler, ancak renal biyopside tübüler "basement" membranda herhangi bir tahribata rastlamadıklarını belirtmişlerdir. Nagano ve ark. (145) da, parakuat verilen farelerde gözlemledikleri proteinürinin, reaktif oksijen türleri ile glomerüler "basement" membranın parçalandığının bir göstergesi olduğunu belirtmişlerdir.

İnsanda parakuat nefrotoksisitesi sonucunda gözlenen proteinüride, albuminden başka proteinlerin atılımında artış gözlenmesi (α_1 -mikroglobulin, lizozim gibi), hem glomerüler hem de tübüler hasarın bir göstergesidir (13, 64, 123). Albumin atılımındaki artışın, glomerüler hemodinamik faktörlerin bozulmasına bağlı olarak geliştiği bildirilmiştir (198).

Son yıllarda çeşitli çalışmalarda total üriner protein miktarının, üriner kreatinine oranlanarak verildiği görülmektedir (81, 107, 116, 176, 218). Lemann ve ark. (119) insanlar üzerinde, Grauer ve ark. (76) köpekler üzerinde yaptıkları çalışmalarda, porsiyon idrardaki "üriner protein/üriner kreatinin" oranının 24 sa.'lık idrardaki protein atılımını doğru olarak yansıttığını göstermişlerdir. Harauchi ve ark. (81) ise, spot idrardaki total protein konsantrasyonunun, öğleden sonraki idrarda, sabah idrarına göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda üriner protein ölçümleri 24 saatlik idrarda, idrar biriktirme işleminin sona erdiği aynı gün içinde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar "mg protein/mg kreatinin" olarak ifade edilmiştir. Tablo 8'de görüldüğü şekilde, PK grubu üriner protein ortalaması, kontrol grubu üriner protein ortalamasından yüksek olsa da, istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p>0.01$).

Parakuat'ın deney hayvanlarında kreatinin ve ürenin renal klerensini azaltarak serum kreatininin ve üre azotunda anlamlı artışlara neden olduğu bildirilmiştir (122, 123, 145-147). Kreatinin klerensi glomerüler filtrasyon hızının bir göstergesi sayıldığından, azoteminin nefrojenik orjinli olduğu anlaşılır (122, 145). Fisher ve ark. (64), BUN artışını oligüri ile birlikte gözlemlemişler ve plazma hacmindeki azalmanın (dehidrasyon) sonucu renal kan akımındaki azalmanın azotemiye eşlik edebileceğini ileri sürmüşlerdir.

Çalışmamızda, PK grubunun serum kreatinin ortalaması, kontrol grubu ortalamasından anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.01$) (Tablo 8). Bu anlamlılık, PK uyguladığımız sıçanlarda ortalama serum kreatinin değerinde kontrole göre % 39'luk bir artışı göstermektedir (Şekil 15).

Aynı tabloda görüldüğü üzere, PK grubunda serum üre azotu ortalaması, kontrol grubu ortalamasından oldukça anlamlı yüksektir ($p<0.001$). Bu sonucumuz, sıçanlara 40 mg/kg dozda PK uygulamasının % 77'lik bir azotemiye neden olduğunu göstermektedir (Şekil 16). Serum kreatinin ve üre azotunda gözlenen yükselmeler, daha önceden deney hayvanlarında bildirilen parakuat'ın bu etkilerini onaylamaktadır. Ancak, çalışmamızda 24 sa.'lık idrar hacmi ortalamaları açısından kontrol grubu ile PK grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamış olması, Fischer ve ark.'nın çalışmasında bahsettikleri, azotemiye dehidrasyonun katkısının olabileceği şeklindeki görüşünü tartışmaya olanak vermektedir.

Parakuat'ın neden olduğu akut renal yetmezliğin patojenezinde iskemik saldırılardan çok, herbisidin neden olduğu toksik hasarın tek başına daha önemli olduğu bildirilmiştir. Parakuat, siklik redoks işlemleri sonucunda reaktif oksijen kaynaklarının üretimi yoluyla oksidatif strese ve hücre hasarına neden olur. Reaktif oksijen kaynaklarının parakuat nefrotoksisitesinde önemli bir rolü olabileceği ve antioksidan koruyucuların yetersizliğinin de bu reaksiyonlara eşlik edebileceği bildirilmiştir. Parakuat, lipoit peroksidasyonu yoluyla antioksidan glutatyon (GSH) miktarını önemli ölçüde azaltmaktadır. Ayrıca, parakuat redüksiyonu NADPH oksidasyonu ile beraber yürümektedir. Bu nedenle herbisidin toksisitesinde, hem reaktif oksijen kaynaklarının üretiminin hem de NADPH tüketiminin rolü olabileceği öne sürülmektedir (18, 33) (Şekil 4).

Parakuat zehirlenmesinin insanlarda renal tübüler hasar ve akut tübüler nekroza neden olduğu bildirilmiştir (50, 83, 184). Zehirlenen olgularda böbreğin histolojik incelemesinde gözlenen lezyonlar başlıca proksimal kıvrımlı tübüllerin epitelindedir. Bununla birlikte tüpleri döşeyen kapiller damarlarda orta şiddetli lezyonlar bulunurken, glomerüler ve interstisyel lezyonlar nadirdir (9, 16, 198).

Sıçan ve farelere parakuat verilmesi sonucunda parakuat'ın, nefronun proksimal kıvrımlı tübüllerinde nekroza ve dejenerasyona neden olduğu histolojik olarak gösterilmiştir. Nefrotoksisitenin nefronun proksimal segmenti ile sınırlı olduğu görülmektedir (51, 66, 80, 123). Parakuat eliminasyonu, primer olarak böbreklerden idrara aktif sekresyon ile olur. Bu durum, proksimal tübül hücreleri içinde parakuat miktarının artmasına ve yüksek konsantrasyonlara ulaşmasına olanak verir. Renal hasar, aktif sekresyon süresinin uzamasıyla birlikte herbisidin renal tübüler hücreler içinde yüksek konsantrasyonlarda birikmesine bağlıdır (51, 85, 198).

Ayrıca, parakuat toksisitesinde böbreklerin rolünün çok önemli olduğu ve başlangıçta renal fonksiyonlar henüz normalken alınan herbisidin büyük miktarının ilk birkaç saat içinde idrarla atıldığı bildirilmiştir (18). Ancak yüksek dozda parakuat'ın renal tübüler nekroza neden olarak "parakuat klerensi"ni önemli oranda azalttığı ve bu durumun nefrotoksisiteyi şiddetlendirdiği de bir gerçektir (85).

Ben-Rejeb ve ark. (12) sıçanlarda yaptıkları çalışmada; oral yoldan 20, 30, 50 mg/kg dozlarda PK verilmesinden 24 saat sonra tübüler lezyonların başladığını, özellikle proksimal tübülün daha hassas olduğunu, distal lezyonların ise daha geç ortaya çıktığını ve 2 ay sonra bile gözlenebildiğini bildirmişler, glomerüllerde sadece orta derecede değişiklikler saptamışlardır. Nagata ve ark. (146), Beagle köpeklerle 7 mg/kg, s.c., PK verilmesinden sonra geçen 24 saatin sonunda yapılan histopatolojik incelemede, proksimal tübül "basement" membranda kalınlaşma ve nekrotik epitelyel hücrelerin varlığını göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar diğer bir çalışmada da, 0.495 mg/kg/gün, 28 gün, s.c. PK uygulanan Beagle köpeklerde böbrek proksimal tübül epitel ve mezenşiyal hücrelerinde orta derecede lokal hasar kaydetmişlerdir (147).

Çalışmamızda, PK uyguladığımız sıçanların her birinin böbrek dokularının histopatolojik incelemeleri sonucunda grubun tübüler nekroz skor değeri ortalaması 1.72 olarak bulunmuştur. Bu değer, kullanmış olduğumuz deney hayvanlarında PK'nın hafif - orta dereceli nekroza neden olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Histopatolojik incelemelerde özellikle nefronun proksimal tübüllerindeki nekroz ve dejenerasyon varlığı dikkat çekmekteydi (Resim 1).

V.6.2. Asetaminofen (APAP) İle İlgili Tartışma

Asetaminofen (parasetamol), aşırı dozlarda insanlarda ve deney hayvanlarında akut hepato- ve nefrotoksisiteye neden olan analjezik-antipiretik bir ilaçtır. İnsanlarda terapötik dozlarda hiçbir toksisitesi yokken, aşırı dozlarda alındığında (>2,000 mg/kg) oldukça reaktif kinonlar ve metabolitler meydana gelir. Bu reaktif bileşikler, GSH ve protein sülfidril grupları ile reaksiyona girerek hücre fonksiyon bozukluğuna ve sonuçta hepato-renal toksisiteye neden olurlar. Akut renal toksisitenin primer olarak proksimal tübülle sınırlı hücresel hasar ile karakterize olduğu ve GFR'de önemli bir azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (20, 88, 212).

Dişi sıçanların asetaminofen nefrotoksisitesine daha duyarlı oldukları bildirildiğinden (59, 141) ve deneysel olarak asetaminofen ile indüklenen nefrotoksisite çalışmalarında çoğunlukla erkek sıçanların tercih edilmiş olması nedeniyle (10, 59, 106, 137, 151, 153, 154, 156, 212) çalışmamızda erkek sıçanlar kullanılmıştır. İlaç i.p. yoldan 4 farklı dozda

(250, 500, 750, 900 mg/kg) tek bir enjeksiyonda verilmiştir. Sıçanlarda asetaminofen nefrotoksisitesini indükleyici uygulama dozu genellikle 900 mg/kg, i.p. olmak üzere tek doz olarak bildirilmektedir (40, 151, 153, 156, 212). Sıçanlarda asetaminofen'in renal ve hepatotoksik etkisinin yüksek dozda ilacın i.p. olarak uygulandığında ortaya çıkması, p.o. verildiğinde ise bu etkilerin izlenmediği bilindiğinden (40), ilaç i.p. olarak uygulanmıştır.

Tablo 9'da görüldüğü üzere, farklı dozlarda asetaminofen uygulanan sıçanların idrarla atılan ortalama GGTP miktarı U/g kreatinin değerleri, tüm gruplarda kontrol değerinden istatistiksel olarak oldukça anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.0001$). Bu değerler, asetaminofen uygulanan sıçanlarda kontrol grubuna göre üriner GGTP atılımında doza paralel olarak sırasıyla % 107, % 193, % 533 ve % 621 oranında artışlara yol açtığı bir göstergesidir (Şekil 12).

Benzer şekilde, asetaminofen uygulanan sıçanlarda idrarla atılan ve üriner kreatinine oranlanarak ifade edilen ortalama NAG değerlerinin, kontrol değerinden APAP-500, APAP-750 ve APAP-900 gruplarında istatistiksel olarak oldukça anlamlı yüksek olduğu ($p<0.0001$), APAP-250 grubunda ise farkın kontrole göre anlamsız olduğu görülmektedir ($p>0.01$). Enzim aktivitesinde anlamlı artışların olduğu 500, 750 ve 900 mg/kg ilaç uygulanan gruplarda üriner NAG atılımında sırasıyla kontrole göre % 101, % 241 ve % 332 oranında artışlar gözlenmiştir (Şekil 13).

Asetaminofen'in nefrotoksisitesi konusunda yapılan deneysel çalışmalar genellikle, ilacın metabolitleri ve bu metabolitlerin nefrotoksik etkideki rolleri (40, 55, 106, 117, 151, 153, 154, 211) veya nefrotoksisite mekanizmaları (56, 137, 141, 156, 212) ile ilişkilidir. Asetaminofen ile indüklenen nefrotoksisitenin üriner enzim aktiviteleri ile izlendiği sadece üç yayına rastlanmıştır.

Metz ve ark. (132)'nin sağlıklı kişiler üzerinde yaptıkları çalışmada, 5 sağlıklı kişiye 2'şer gram parasetamol bir seferde oral olarak verilmiştir. İdrarda, fırçasal kenar enzim GGTP, lizozomal enzim NAG ve galaktozidaz (GAL) ile sitoplazmik enzim laktat dehidrogenaz (LDH) aktiviteleri incelenmiştir. LDH ve GGTP aktivitesindeki artışların, asetaminofen'e bağlı orta dereceli proksimal tübüler epitel hücre hasarını gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Kocaoğlu ve ark. (115), akut asetaminofen nefrotoksitesini araştırdıkları çalışmalarında, 900 mg/kg, i.p., tek doz APAP verilen sıçanlarda üriner GGTP aktivitesinde kontrol grubuna göre oldukça anlamlı artış bulmuşlar ve asetaminofen'in nefrotoksik etkisinin üriner GGTP aktivite tayini ile izlenebileceğini öne sürmüşlerdir.

Mitic ve ark. (135), böbreğin toksik ajanlara daha duyarlı ve savunmasız olduğu kronik glomerülonefrit ve Balkan endemik nefropatili (BEN) hasta grubuna oral yoldan 2'şer g asetaminofen vermişler ve akut etkisini incelemişlerdir. İlk 24 sa. içinde sadece üriner kreatinin atılımında anlamlı bir artış gözleendiğini, total protein ile üriner enzimlerden GGTP ve NAG atılımında anlamlı bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar, asetaminofen'in nefrotoksik etkisinin üriner GGTP ve NAG aktiviteleri ile izlenebileceğini destekler yöndedir. Sonuçlarımıza göre; en düşük dozda asetaminofen uygulanan sıçanlarda (250 mg/kg), üriner NAG aktivitesinde anlamlı bir artış gözlenmemiş olması, GGTP'in ise uygulanan tüm dozlarda idrar aktivitesinde artışlara neden olması ve GGTP enzimürisinde gözlenen yüzde artışların NAG enzimürisinden daha fazla olması nedeniyle, asetaminofen nefrotoksitesinde fırçasal kenar enzim GGTP'in lizozomal enzim NAG'a göre proksimal hasarı daha erken dönemde ortaya koyduğunu söyleyebiliriz.

Tablo 9'da yer alan, APAP uygulanan sıçanlarda idrar kreatinin ortalama değerleri kontrol grubu değeri ile kıyaslandığında, üriner kreatinin atılımında APAP-250 grubunda elde edilen ortalama değer kontrole göre anlamlı bulunmamıştır. APAP-500 grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış, APAP-750 ve APAP-900 gruplarında anlamlı azalma bulunmuştur. Kreatinin atılımında doza bağlı olarak ortaya çıkan azalma (750 ve 900 mg/kg dozlarında) ilaah nefrotoksik etkisinin SER'de azalmanın neden olması ile

İdrar miktarlarının ortalamaları açısından APAP-250 grubunda kontrole göre anlamlı bir değişiklik bulunmazken, APAP-500 grubunda anlamlı bir azalma, APAP-750 ve APAP-900 gruplarında anlamlı bir artış saptanmıştır. İdrar akış hızındaki azalma dehidrasyon, renal hasar ve ilacın antidiüretik etkisi ile açıklanmıştır (59). 750 ve 900 mg/kg APAP uygulanan gruplarda gözlenen poliüri, tübüler reabsorbsiyon yeteneğinin bozulduğunu göstermektedir.

Asetaminofen uygulanan sıçanların idrarında ölçülen protein miktarlarının ortalamaları Tablo 9'da verilmiştir. Üriner kreatinine oranlanarak ifade edilen değerler, tüm gruplarda kontrol değerinden oldukça anlamlı yüksek bulunmuştur ($p < 0.0001$). Uygulama dozlarında, kontrol grubuna göre ilaç verilen gruplarda üriner protein atılımı doza paralel olarak % 121, % 161, % 563 ve % 759 oranında artmıştır (Şekil 14).

Proteinüri, glomerüler ve tübüler fonksiyonlardaki bozulmanın ve akut renal yetmezliğin bir göstergesidir (235). Williams ve ark. (231), hafif-orta şiddetli renal bozukluğu olan 108 hastada renal yetmezlik gelişimini takip etmişler; bu kişilerin 24-sa.'lik idrarlarındaki üriner total protein atılımı ile böbrek hasarındaki kötüleşme arasında önemli bir korelasyon olduğunu ve buradan yola çıkarak proteinürinin, renal yetmezlik gelişiminin takibinde yararlı bir prognostik indeks olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda farklı dozlarda asetaminofen uyguladığımız sıçanlarda, üriner protein atılımında önemli derecelerde artışlar gözlenmesi ve ilacın bu etkisinin doza bağlı olması, asetaminofen nefrotoksitesinin üriner total protein atılımı ile izlenebileceğini ortaya koymaktadır.

Asetaminofen uygulanan sıçanlarda serum kreatinin ortalamaları Tablo 9'da ve bu değerlere ilişkin çizilen bar grafikleri ise Şekil 15'de verilmiştir. İstatistiksel analizde APAP-250, APAP-500 ve APAP-750 gruplarının serum kreatinin ortalamaları kontrol değeri ortalamasına göre anlamlı bulunmazken ($p > 0.01$), 900 mg/kg dozda asetaminofen uygulanan sıçanlarda gözlenen artış kontrole göre anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Serum kreatinin ölçümlerinin erken dönemdeki renal hasarı yeterli olarak göstermediği ve erken dönemdeki renal fonksiyonel bozuklukların tespit edilmesinde serum kreatinin düzeylerinin, kreatinin atılımındaki kompensatuvar artışlar ile gizlenebildiği bildirilmiştir (194). Çalışmamızda da, 900 mg'dan daha düşük dozlarda asetaminofen uyguladığımız sıçanların serum kreatinin değerlerinde ilk 24 saatin sonunda anlamlı artışlar

görülmemiştir. Eguia ve ark. (52), yüksek dozda asetaminofen alınmasından sonra karaciğer hasarı gözlenmeyen, ancak nefrotoksisite bildirilen 34 hastanın 23'ünde klinik bulgu olarak oligüri gözlemişler, yüksek dozda ilacın alınımından 2-5 gün sonra akut renal yetmezlik geliştiğini ve serum kreatinin düzeylerinin ise 3 ile 16. günlerde maksimuma eriştiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda bu gruptaki sıçanların BUN ortalamaları da toplu halde aynı tabloda verilmiştir (Tablo 9). APAP-250 ve APAP-500 gruplarında kontrol değeri ile kıyaslandığında BUN ortalamalarında düşmeler gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. APAP-750 grubundaki azalma (% 20'lik) ise kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$). En yüksek dozda APAP uyguladığımız (900 mg/kg) deney sıçanlarında bu doz azotemiye yol açmış ve % 21'lik anlamlı artış saptanmıştır ($p<0.01$) (Şekil 16).

Newton ve ark. (153), 250, 750, 900 mg/kg, i.p., APAP verilen F344 sıçanlarda, kg başına 750 ve 900 mg uygulama dozlarından sonraki 24 saatin sonunda kan üre azotunda anlamlı artış bulmuşlar, 250 mg/kg dozda APAP verilen sıçanlarda gözlenen düşmeyi ise anlamlı bulmamışlardır. Başka bir çalışmalarında da (151), F344 sıçanlara 250, 500, 750, 900 mg/kg dozlarda s.c. yoldan asetaminofen uygulamışlar; kg başına 250 ve 500 mg uygulama dozlarından 24 saat sonra kan üre azotunda anlamlı olmayan düşme kaydetmişler, 750 ve 900 mg/kg dozlarda ise anlamlı artışlar tespit etmişlerdir.

Rumack ve ark. (182), toksik dozda asetaminofen'in indüklediği karaciğer hasarının üre oluşumunu önlemesi nedeniyle, BUN değerlerinin çok fazla ya da çok az düzeylerde (orantısız olarak) düştüğünü bildirmişlerdir. İnsanlarda öldürücü olmayan, aşırı dozlarda asetaminofen alınmasından sonra ılımlı ve/veya şiddetli azoteminin sık görülen klinik bir bulgu olduğu, hatta karaciğer hasarı görülmeyen birçok hastada dahi azotemi gözlemlendiği bildirilmiştir (28, 134). Aşırı dozda asetaminofen alınması sonucu gelişen renal hasarda, BUN artışının yanında serumda kreatinin'in de arttığı bildirilmiştir (45). Bu bulgu, çalışmamızda sadece en yüksek dozda (900 mg/kg) asetaminofen verilen sıçanlarda gözlediğimiz serum kreatinin ve BUN düzeylerindeki artışlarla uyumludur.

İnsanlarda, aşırı dozda alınan asetaminofen'in akut proksimal tübüler nekroza neden olduğu ancak renal iskeminin böbrek hasarının gelişiminde katkısı olmadığı

bildirilmiştir (28, 45, 134, 182). Newton ve ark. (151-154), patoloji ile BUN'un asetaminofen nefrotoksitesini izlemede en duyarlı işaretçiler olduğunu belirtmiş, histolojik değişikliklerin renal fonksiyonlardaki değişiklikleri yansıtan BUN'da gözlenen değişikliklerle uyumlu olduğunu bildirmişlerdir.

Beierschmitt ve ark. (10) da, 600 mg/kg, i.p., tek doz APAP verilen erkek F344 sıçanlarda, renal hasarı BUN ve histopatoloji yardımıyla incelemişler; BUN düzeyinde 12 saat sonunda kontrole göre (% 135) artış tespit etmişler, renal lezyonların da bu bulguyu desteklediğini bildirmişlerdir.

Hart ve ark. (55), erkek CD-1 farelere 600 mg/kg, p.o., APAP verildikten 12 saat sonra BUN'da artma ve belirgin kortikal nekroz gözlemlemişlerdir.

Mitchell ve ark. (134), asetaminofen'in direk renal hasarının, böbreklerde primer olarak renal kortekste bulunan, birçok ilacın oksidasyonunda rolü olan terminal oksijenaz sitokrom P450 enzim sistemi aracılığı ile asetaminofen'in arilleyici metabolite biyotransformasyonuna bağlı olduğunu ifade etmişlerdir. Daha sonra birçok araştırmacı yaptıkları *in vivo* çalışmalarla, akut renal tübüler nekroz gelişiminde asetaminofen'in metabolik aktivasyonunun zorunlu olduğu konusunda ortak bilgiye varmışlardır (88, 141, 152, 156, 158, 177) (Şekil 6). Son yıllarda Hart ve ark. (57), asetaminofen-glutasyon konjugatlarının asetaminofen nefrotoksitesinde rolünün olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Body ve Bereczky (21), letal dozda asetaminofen verilen ve 24 saatin sonunda histolojik incelemeye alınan sıçan böbreğinde, tübüler ödem ve dilatasyon ile tübüler epitelde dejenerasyon ve konjesyon gözlemlediklerini bildirmişlerdir.

Newton ve ark. (156) da, sıçanlarda 900 mg/kg, i.p., APAP uygulanmasından 24 saat sonra ortaya çıkan tübüler hasarın önce düz proksimal segmentte görüldüğünü ve daha sonra kıvrımlı segmente doğru kayarak tüm kortekse yayıldığını bildirmişler, diğer taraftan şiddetli tübüler nekrozdan medullanın ve glomerüllerin etkilenmediğini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar daha önce yaptıkları çalışmalarında asetaminofen dozu arttıkça histopatolojik bulguların şiddetlendiğinden söz etmişlerdir (153). Araştırmacılar asetaminofen'in neden olduğu nefrotoksik etki için histopatolojik değişikliklerin belirleyici olduğunu ancak toksik etkisinin asetaminofen'den 5-10 kat daha fazla olmasına rağmen

PAP'ün yarattığı nefrotoksisitede histolojik bulguların belirleyici olmadığını vurgulamışlardır.

Çalışmamızda, farklı dozlarda APAP uyguladığımız sıçanların böbrek dokularının histopatolojik tübüler nekroz skor değerlerine ilişkin ortalamaları Tablo 9'da verilmiş, böbrek dokusunda gözlenen nekrotik değişikliklere ait bulguları ise Resim 2 ve 3'de gösterilmiştir. Histopatolojik bulgular ilacın nefrotoksik etkisini desteklemekle birlikte, 500 mg/kg uygulama dozu üzerindeki diğer dozlarda histopatolojik değişikliklerin şiddetinde bir artma olmadığı, doz ile bulgu şiddetinin paralel gitmediği görülmüştür. Bu bulgumuz, histopatolojinin farklı dozlardaki asetaminofen'in nefrotoksik etkisini belirlemede yetersiz kaldığını göstermektedir. Ortalamalarda ortaya çıkan bu sonuç, bireysel farklılıkların toksik doz ve toksik etki üzerinde belirleyici olduğunu düşündürmektedir.

Farklı dozlarda asetaminofen uygulanan sıçanlarda, enzimürde (özellikle GGTP) ve üriner total protein atılımında elde edilen bulgular, 500 mg/kg APAP dozundan sonra ilacın nefrotoksik etkisinde bir sıçrama olduğunu göstermektedir. Enzimüri ve proteinüri asetaminofen'in doza bağlı olarak meydana getirdiği tübüler disfonksiyonu ortaya koymada oldukça belirleyici görülmektedir. Serum kreatinin ve BUN düzeylerindeki artışlar ise sadece en yüksek dozda (900 mg/kg) asetaminofen verilen grupta nefrotoksisiteyi belirlemede bir yarar sağlamıştır.

V.6.3. Parakuat + Asetaminofen (PK + APAP) İle İlgili Tartışma

Çalışma 4 farklı deney grubundan oluşmuştur. Her gruptaki sıçanlara 40 mg/kg, i.p., parakuat uygulandıktan yarım saat sonra farklı dozlarda asetaminofen (250, 500, 750, 900 mg/kg i.p.) uygulanmıştır.

Bu gruplarda üriner kreatinine oranlanarak ifade edilen ortalama GGTP ve NAG aktiviteleri Tablo 8'de verilmiştir. Grupların tümünde ölçülen üriner GGTP ve NAG değerleri kontrol değerine göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı artışlar göstermiştir ($p < 0.0001$). Kontrol grubu ile kıyaslandığında kombine ilaç uygulanan gruplarda idrar GGTP aktivitesinde dozlara göre sırasıyla % 219, % 347, % 706, % 840 ve idrar NAG

aktivitesinde de % 148, % 228, % 313, % 421 oranında artışlar meydana gelmiştir (Şekil 12, 13).

PK + APAP uygulanan sıçanların üriner kreatinin ortalamaları da Tablo 8’de verilmiştir. Kombine ilaç uygulanan sıçanlarda, ortalama üriner kreatinin değerleri kontrol grubu ortalama değeri ile karşılaştırıldığında, kreatinin atılımındaki azalmalar oldukça anlamlıdır ($p<0.001$). Kontrol grubuna göre kombine ilaç uygulanan sıçanlarda idrarda GGTP ve NAG enzimürisinin de oldukça anlamlı (şiddetli) olması, yüksek enzim oranının, hem enzimin hem de kreatinin’in üriner atımlarının normalden değişmesinin bir sonucu olduğunu göstermektedir.

PK + APAP uygulanan sıçanlarda üriner total protein ortalamaları da aynı tabloda (Tablo 8) verilmiştir. Üriner protein atılımında, kombine grupların tümünde kontrol grubuna göre oldukça anlamlı artışlar saptanmıştır ($p<0.0001$). Bu değerler, PK + APAP verilen sıçanlarda kontrol grubuna göre, üriner protein atılımında dozlara göre sırasıyla % 199, % 440, % 790, % 979 oranında artışlara yol açmıştır (Şekil 14). Kombine ilaç uygulanan gruplarda proteinürideki anlamlı artışların, anormal enzimüri değerlerine eşlik ettiği görülmektedir. Ancak, NAG’ın yüksek molekül ağırlığında bir enzim (130-140 kDa) olması nedeniyle hasara uğramış glomerüler filtrasyon aparatından serbestçe filtre edilemeyeceği ve bu nedenle proteinüriye artmış enzimürinin bir katkısının olamayacağı bildirilmiştir (116).

Genel olarak serum kreatinin ve BUN, renal fonksiyon bozukluklarının tespit edilmesinde yaygın olarak kullanılan parametrelerdir (109, 116, 230). PK + APAP uygulanan sıçanların serum kreatinin ve BUN ortalamaları Tablo 8’de verilmiştir. Grupların tümünde, serum kreatinin ve üre azotunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak oldukça anlamlı artışlar saptanmıştır ($p<0.001$). Serum kreatinin düzeylerinde kontrol grubuna göre sırasıyla % 30, % 50, % 66, % 101 oranında, BUN düzeyinde ise % 105, % 124, % 270, % 342 oranında artış görülmektedir (Şekil 15, 16).

Kombine uygulamalarda, GGTP ve NAG enzimürisinde ve hem de üriner protein atılımında gözlenen yüzde artışların her iki ilacın tek başına uygulamalarında ortaya çıkan artışlardan fazla olması, ilaçların birlikte alınmaları sonucunda aditif nefrotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Benzer şekilde, kombine uygulamanın sonucunda serum

kreatinin ve BUN'da gözlenen artışlar, verilen asetaminofen dozu arttıkça iki ilacın aditif nefrotoksik etkisinin kuvvetlendiğini göstermektedir. Artmış enzim aktivitesi, her iki ilacın aditif toksisitesine bağlı olarak proksimal renal hasarın şiddetlendiğinin bir göstergesidir. PK böbreklerden aktif olarak sekrete edildiğinden, APAP'ın meydana getirdiği tübüler hasar teorik olarak PK atılımını azaltacaktır. PK + APAP gruplarında ortaya çıkan nefrotoksik indüksiyon, PK ve APAP arasındaki biyokimyasal birtakım etkileşimleri kapsayan diğer bazı mekanizmalara da bağlı olabilir. Bunlardan bir tanesi, glutatyon eksikliği olabilir görüşündeyiz.

Çalışmamızda PK + APAP uyguladığımız sıçanların böbrek dokularının histolojik incelemeleri sonucunda elde edilen her bir grubun semi-kantitatif tübüler nekroz skor değeri ortalamalarına bakıldığında (Tablo 8), parakuat ile birlikte asetaminofen uygulanan deney sıçanlarında histopatolojik bulguların ortalama skorlarının asetaminofen dozu ile orantılı gitmediği ve 40 mg/kg PK + 500 mg/kg APAP verildikten sonra skor ortalamasında farkedilir bir artış olmadığı gözlenmektedir. Bu bulgu histopatolojinin, her iki ilacın kombine uygulanmasının neden olduğu nefrotoksisiteyi belirlemede yetersiz kaldığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda, parakuat ile indüklenen nefrotoksik etkiye farklı dozlarda asetaminofen'in katkısını araştırdığımızda, yapılan istatistiksel incelemeler sonucunda; PK ile birlikte 250, 500, 750, ve 900 mg/kg APAP verilen sıçanlarda, sadece PK verilen sıçanlara göre, total üriner protein atılımında ileri derecede anlamlı artışlar gözlenmiştir ($p<0.0001$). Enzimürideki artışlar, 500 mg/kg ilave APAP uygulamasından sonraki dozlarda kaydedilmiş, ilk duyarlı artış NAG atılımında gözlenirken, ilave APAP dozu 750 mg/kg olduğunda ancak GGTP'da duyarlı bir artış gözlenmiştir. Serum kreatinin düzeylerinde kombine uygulamaların hiçbirinde, PK grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmezken, BUN düzeylerinde 500 mg/kg ve üzeri APAP ilave edilen gruplarda anlamlı artışlar bulunmuştur (Tablo 8). Bu sonuçlar, parakuat'ın nefrotoksik etkisine asetaminofen'in doza bağlı olarak aditif bir nefrotoksik katkısının olduğunu ortaya koymaktadır. Nefrotoksik katkının tespit edilmesinde üriner protein atılımının enzimüriden daha hassas olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada, parakuat ve asetaminofen tarafından indüklenen nefrotoksik etkilerin ve aditif nefrotoksisitenin enzimüri yardımıyla saptanması amaçlanmıştır. Sunulan bulgulara göre, ilaçların nefrotoksik etkilerinin izlenmesinde esas alınan kriterlerden; total protein atılımı ile GGTP ve NAG aktivite artışlarında anlamlı istatistiksel sonuçlara ulaşılmıştır. Özellikle total protein atılımı ile, aditif nefrotoksisite daha erken dönemde ve daha hassas olarak ortaya konmuştur. Nefrotoksisitenin izlenmesinde kullandığımız enzimüri parametrelerinden, GGTP ve NAG'ın tek başına parakuat ve asetaminofen'e bağlı nefrotoksisitenin gösterilmesinde son derece hassas oldukları ancak bu hassasiyetin uygulanan toksik bileşiklerin dozuna bağlı olarak erken yanıt açısından farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Aditif nefrotoksisitenin belirlenmesinde, söz konusu iki enzimden NAG, parakuat + asetaminofen şeklindeki kombine bir uygulamaya GGTP'dan daha erken yanıt vermektedir. Sonuç olarak, her iki enzimin de, parakuat ve asetaminofen'in tek başına ya da kombine uygulamaları ile oluşan nefrotoksisitenin izlenmesinde deneysel ve kesin sonuç açısından pratik ve yararlı oldukları ortaya konmuştur.

ÖZET

Nefrotoksik maddelerle yapılan *in vivo* deneysel çalışmalarda, üriner enzimlerin atılımındaki artışların tübüler hasarın işaretçisi oldukları belirtilmiştir.

Bu çalışmada; Parakuat (PK) ve Asetaminofen (APAP)'ın sıçan böbreği üzerindeki akut toksik etkilerinin erken tanısında yardımcı olmak üzere, fırçasal kenar enzim Gamma-Glutamil Transpeptidaz (GGTP) ve lizozomal enzim N-Asetil- β -D-Glukozaminidaz (NAG)'ın idrardaki aktivite tayinlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, renal fonksiyonların izlenmesinde klasik olarak başvurulmuş bazı biyokimyasal parametrelerin ölçümlerine de (idrarda protein, serumda kreatinin ve kan üre azotu=BUN) yer verilmiştir.

Çalışma, toplam on grupta Swiss-Albino türünden 108 adet erkek sıçan üzerinde gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu dışındaki deney gruplarına, 40 mg/kg PK (PK grubu) ya da 250, 500, 750 veya 900 mg/kg APAP (APAP-250, APAP-500, APAP-750, APAP-900 grupları), kombine gruplara ise 40 mg/kg PK verilmesinin ardından 250, 500, 750 veya 900 mg/kg APAP (PK+APAP-250, PK+APAP-500, PK+APAP-750, PK+APAP-900 grupları) intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

Üriner GGTP atılımında ilaç verilen tüm gruplarda, üriner NAG atılımında APAP-250 grubu dışındaki (250 mg/kg APAP verilen) diğer tüm gruplarda, kontrol grubuna göre ileri derecede artışlar meydana gelmiştir ($p<0.0001$).

Total üriner protein atılımı açısından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, PK verilen grup dışında diğer tüm ilaç verilen gruplarda, idrar protein atılımında ileri derecede artışlar meydana gelmiştir ($p<0.0001$).

Serum kreatinin düzeylerinde, PK grubunda ve en yüksek dozda APAP verilen grupta (APAP-900) kontrol grubuna göre anlamlı artışlar saptanmıştır ($p<0.01$). Benzer şekilde, BUN düzeylerinde de, PK ve APAP-900 gruplarında anlamlı artışlar saptanmıştır.

($p<0.001$). PK + APAP verilen kombine grupların hepsinde, her iki parametre açısından anlamlı artışlara ulaşılmıştır ($p<0.001$).

Böbrek dokularının histopatolojik inceleme sonuçları, PK ve APAP'ın nefronun proksimal tübüllerinde nekroz ve dejenerasyona neden olduğunu ortaya koymuştur. Ancak, histopatolojinin, farklı dozlarda APAP'ın ve her iki ilacın kombine uygulanmasının neden olduğu nefrotoksik etkileri belirlemede yetersiz kaldığı görülmüştür.

Bu çalışmada, PK ve APAP enjekte edilen sıçanlarda böbrek hasarının izlenmesinde en duyarlı, en erken işaretçilerin, enzimlerin üriner atılımındaki artışlar ile üriner protein atılımı olduğu sonucuna varılmıştır. Erken dönemde gözlenen proteinüri ve enzimüriyi, serum BUN ve kreatinindeki anlamlı artışlar izlemiş, ancak histopatolojik bulgular ile enzimüri arasında korelasyon bulunamamıştır. Enzimlerin idrarda atılımlarında gözlenen artışlar; 1) PK ve APAP'ın nefrotoksik etkilerinin doza bağlı olduğunu, 2) ilaçların tek başına ve birlikte indüklediği nefrotoksisitenin izlenmesinde GGTP ve NAG'ın idrardaki aktivite tayinlerinin yararlı birer nefrotoksisite işaretçisi olarak kullanılabileceğini, 3) ilaca ve/veya doza bağlı olarak indüklenen nefrotoksik etkide, her iki enzimin üriner atılımında farklılıklar ve hassasiyetler ortaya çıkabileceğini göstermiştir. Ayrıca, APAP'ın, PK'ın nefrotoksik etkisine ek (aditif) bir nefrotoksik katkısının olduğu ve aditif toksik etkinin belirlenmesinde proteinürinin enzimüriden daha hassas olduğu belirlenmiştir.

SUMMARY

In vivo studies done with nephrotoxic substances demonstrated that increases in excretion of urinary enzymes were markers of tubular damage.

This study investigates the activities of Gamma-Glutamyl Transpeptidase (GGTP), a brush border enzyme, and N-acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAG), a lysosomal enzyme, in urine in order to improve the early determination of the acute toxic effects of paraquat (PK) and acetaminophen (APAP) in rat kidney. Some biochemical parameters (protein in urine, serum creatinine and blood urea nitrogen=BUN) were also measured to monitor renal functions.

In this study, 108 male Swiss-Albino rats were used in ten groups. Except for the control group, treated groups received 40 mg/kg PK (PK group) or 250, 500, 750 or 900 mg/kg APAP (APAP-250, APAP-500, APAP-750, APAP-900 groups), intraperitoneally (i.p.). Combined groups also received 40 mg/kg PK then 250, 500, 750 or 900 mg/kg, i.p., APAP (PK+APAP-250, PK+APAP-500, PK+APAP-750, PK+APAP-900 groups).

Urinary excretion of GGTP and NAG increased significantly in all groups treated with the drugs, ($p < 0.0001$, comparable to control). However, NAG excretion did not increase significantly in APAP-250 group.

Total urinary protein excretion increased in all groups treated with APAP and PK+APAP ($p < 0.0001$, comparable to control). This parameter did not increase significantly in PK-treated groups.

Serum creatinine levels increased in PK group and the highest dose received APAP group ($p < 0.01$, comparable to control). Similarly, BUN levels increased significantly in PK and APAP-900 group ($p < 0.001$). Both parameters increased significantly in all PK+APAP (combined) groups ($P < 0.001$).

Histopathological results of kidney tissues demonstrated that PK and APAP caused proximal tubular necrosis and degeneration in nephrons. However, histopathological examination was found to be inadequate in determination of nephrotoxicity caused by different doses of APAP and combined drug treatment.

Based on this study we conclude that increases in urinary excretions of enzymes and proteins are the most sensitive early determinants in monitoring kidney damage in PK and APAP-treated rats. Increases in protein and enzyme excretions observed at early onset of renal damage were followed by significant increases serum BUN and creatinine; however, no correlation was found between histopathological findings and increase in urinary enzyme excretion. Increases observed in urinary excretion of enzymes demonstrated that 1) nephrotoxic effects of PK and APAP are dose-dependent, 2) the determination of GGTP and NAG activities in urine is a helpful method in monitoring of nephrotoxicity induced by a single drug or drug combinations, and 3) alterations in urinary excretions of these two enzymes and changes in sensitivity can be observed during drug- or dose-dependent nephrotoxicity induced by a drug or drug combinations. In addition to these APAP may contribute to the nephrotoxicity caused by PK and this additive effect can be determined more sensitively by urinary increases in protein excretions than that in enzymes.

KAYNAKLAR

1. Akgün, N., "Boşaltım Fizyolojisi", Fizyoloji-Boşaltım, Dolaşım ve Sindirim Fizyolojisi, 9. Basım, Ege Üni. Basımevi, İzmir, 1994, s. 1-90.
2. Alderman, M.H., Melcher, L., Drayer, D.E., Reidenberg, M.M., "Increased excretion of urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase in essential hypertension and its decline with antihypertensive therapy", N. Engl. J. Med., 309(20), (1983), 1213-1217.
3. Ali-Mirafteb, H., Bourbouze, R., Bondiou, M.T., Percheron, F., "Urinary excretion of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) and its isoenzyme B as a marker of the nephrotoxicity of gentamicin : re-test from an animal model", Pathol. Biol. Paris, 36(3), (1988), 240-244.
4. Amadio, P., Rigotti, P., Bazzera, G., Pagnini-Arslan, C., Bonvicini, P., et.al, "Are urinary enzymes useful markers of kidney damage in obstructive jaundice-An experimental study on Sprague-Dawley Rats", Nephron, 39, (1985), 377-381.
5. Amadio, P., Bazzera, G., Malatesta, R., Gatta, A., "Reference ranges and methodological aspects in the urinary measuring of lysozyme, malate-dehydrogenase, δ -glutamyltransferase and α -glucosidase", Enzyme, 33, (1985), 216-225.
6. Aras, K., Erşen, G., "Böbrek Fonksiyon Testleri", Klinik Biyokimya, Bölüm 12, Ankara Üni. Basımevi, Ankara, 1975, s. 563-571.
7. Assadamongkol, K., Tapaneya-Olarn, W., Chatasingh, S., "Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) in aminoglycoside nephrotoxicity", J. Med. Assoc. Thai., (72 Suppl 1), (1989), 42-46.
8. Baggio, B., Gambaro, G., Briani, G., Favaro, S., Borsatti, A., "Urinary excretion of glycosaminoglycans and brush border and lysosomal enzymes as markers of glomerular and tubular involvement in kidney disease", Contr. Nephrol., 42, (1984), 107-110.
9. Beebejaun, A.R., Beevers, G., Rogers, W.N., "Paraquat poisoning-prolonged excretion", Clin. Toxicol., 4, (1971), 397-407.

10. Beierschmitt, W.P., Keenan, K.P., Weiner, M., "The development of acetaminophen-induced nephrotoxicity in male Fischer-344 rats of different ages", *Arch. Toxicol.*, 59(4), (1986), 206-210.
11. Belfiore, F., Napoli, E., Vecchio, L.L., Rabuazzo, A.M., "Increased serum activity of beta-n-acetyl-glucosaminidase in atherosclerosis", *Am. J. Med. Sci.*, 268(4), (1974), 235-239.
12. Ben-Rejeb, A., Maillet, M., Bescol, L.J., Guillam, M.C., "Ultrastructure of the kidney in paraquat-poisoned rats. Comparative study with literature data on man and animal", *Arch. Anat. Cytol. Pathol.*, 45(4), (1997), 199-207.
13. Bernard, A., Lauwerys, R., "Epidemiological application of early markers of nephrotoxicity", *Toxicoll. Lett.*, 46(1-3), (1989), 293-306.
14. Bernard, A., Thielemans, N., Roels, H., Lauwerys, R., "Association between NAG-B and cadmium in urine with no evidence of a threshold", *Occup. Environ. Med.*, 52(3), (1995), 177-180.
15. Berndt, W.O., Davis, M.E., "Renal Methods for Toxicology", Hayes, A.W., (Ed.), *Principles and Methods of Toxicology*, Raven Press, New York, 1989, s. 635-655.
16. Bescol-Liversac, J., Paquelin, A., Guillam, C., "Ultrastructural study of a renal biopsy in a patient poisoned by paraquat", *Eur. J. Toxicol. Environ. Hyg.*, 8(4), (1975), 236-246.
17. Bismuth, C., Garnier, R., Dally, S., Fournier, P.E., "Prognosis and treatment of paraquat poisoning : A review of 28 cases", *J. Toxicol.-Clin. Toxicol.*, 19(5), (1982), 461-474.
18. Bismuth, C., Schermann, J.M., Garnier, R., Baud, F.J., Pontal, P.G., "Elimination of paraquat", *Human Toxicol.*, 6, (1987), 63-67.
19. Bismuth, C., Hall, A.H., Baud, F.J., Borron, S., "Pulmonary dysfunction in survivors of acute paraquat poisoning", *Vet. Hum. Toxicol.*, 38(3), (1996), 220-222.
20. Blantz, R.C., "Acetaminophen : acute and chronic effects on renal function", *Am. J. Kidney Dis.*, 28(1 Suppl 1), (1996), S3-6.
21. Body, E.M., Bereczky, G.M., "Liver necrosis from paracetamol", *Br. J. Pharmacol.*, 26, (1966), 606-611.

22. Bomhard, E., Maruhn, D., Mager, H., "Excretion of urinary enzymes in female Sprague-Dawley rats in relation to cellular compartment, creatinin excretion and diuresis", *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 29, (1991), 775-782.
23. Boujemaa, W., Lauwerys, R., Bernard, A., "Early indicators of renal dysfunction in silicotic workers", *Scand. J. Work. Environ. Health.*, 20(3), (1994), 180-183.
24. Bourbouze, R., Baumann, F.C., Bonvalet, J.P., Farman, N., "Distribution of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase isoenzymes along the rabbit nephron", *Kidney Int.*, 25(4), (1984), 636-642.
25. Bourbouze, R., Gluckman, J.C., Frantz, P., Paraire, M., Baumann, F.C., et.al., "Early monitoring of human renal transplantations by N-acetyl-beta-D-glucosaminidase isoenzyme activities in urines", *Clin. Chim. Acta.*, 149(2-3), (1985), 185-195.
26. Bowman, W.C., Rand, M.J., "The Urinary System : Drugs Affecting Renal Function and The Urinary Tract", *Textbook of Pharmacology*, Blackwell Sci. Publ., Londra, 1984, s. 1-40.
27. Bowman, W.C., Rand, M.J., "Drugs Used to Relieve Pain", *Textbook of Pharmacology*, c.16, 2nd Ed., Blackwell Sci. Publ., Cambridge, 1990, s. 16.25-16.29, 26.34-26.35.
28. Boyer, R.D., Rouff, S.L., "Acetaminophen-induced hepatic necrosis and renal failure", *J.A.M.A.*, 218(3), (1971), 440-441.
29. Brogren, C.H., Christensen, J.M., Rasmussen, K., "Occupational exposure to chlorinated organic solvents and its effect on the renal excretion of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase", *Arch. Toxicol. Suppl.*, 9, (1986), 460-464.
30. Brown, R., "Hepatic and renal damage with paracetamol overdose", *J. Clin. Pathol.*, 21, (1968), 793-794.
31. Burgat-Sacaze, V., Braun, J.P., Rico, A., Benard, P., Eghbali, B., "Methoxyethylmercury nephrotoxicity : Effects on enzymuria and kidney function", *Arch. Toxicol.*, 43, (1980), 227-231.
32. Burrell, J.H., Yong, J.L., MacDonald, G.J., "Irreversible damage to the medullary interstitium in experimental analgesic nephropathy in F344 rats", *J. Pathol.*, 164(4), (1991), 329-338.

33. Bus, J.S., Cagen, S.Z., Olgaard, M., Gibson, J.E., "A mechanism of paraquat toxicity in mice and rats", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 35, (1976), 501-513.
34. Calderbank, A., "The bipyridylium herbicides", *Advan. Pest. Contr. Res.*, 8, (1968), 127-235.
35. Chan, B.S., Lazzaro, V.A., Seale, J.P., Duggin, G.G., "The renal excretory mechanisms and the role of organic cations in modulating the renal handling of paraquat", *Pharmacol. Ther.*, 79(3), (1998), 193-203.
36. Chen, T.S., Richie, J.P.Jr., Lang, C.A., "Life span profiles of glutathione and acetaminophen detoxification", *Drug Metab. Dispos.*, 18(6), (1990), 882-887.
37. Chodorowski, Z., Umiastowski, J., Bielaszewski, M., "Excretion of gamma-glutamyl transpeptidase in urine of patients treated with gentamicin", *Wiad. Lek.*, 46, (1993), 92-95.
38. Clark, J.M., Switzer, R.L., *Experimental Biochemistry, "Chromatography"*, Exp. 2, 2nd. Ed., W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1977, s. 20-22.
39. Clissold, S.P., "Paracetamol and phenacetin", *Drugs*, 32 Suppl 4, (1986), 46-59.
40. Colin, P., Sirois, G., Chakrabarti, S., "Effects of route of administration on the dose-dependent metabolism of acetaminophen in rats", *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 281(2), (1986), 181-191.
41. Conradi, S.E., Olanoff, L.S., Dawson, W.T., "Fatality due to paraquat intoxication : Confirmation by postmortem tissue analysis", *A.J.C.P.*, 80(5), (1983), 771-776.
42. Cooper, S.P., Downs, T., Burau, K., Buffler, P.A., Tucker, S., et .al., "A survey of actinic keratoses among paraquat production workers and a non-exposed friend reference group", *Am. J. Ind. Med.*, 25(3), (1994), 335-347.
43. Coratelli, P., Antonelli, M., Giangrande, M.S., Paasvanti, G., Giannattasio, M., "Cis-platinum nephrotoxicity : Changes in urinary enzyme pattern in patients submitted to two different dosages", *Conrt. Nephrol.*, 42, (1984), 242-247.
44. Corcoran, G.B., Wong, B.K., "Obesity as a risk factor in drug-induced organ injury : increased liver and kidney damage by acetaminophen in the obese overfed rat", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 241(3), (1987), 921-927.

-
45. Curry, R.W., Robinson, J.D., Sughrue, M.J., "Acute renal failure after acetaminophen ingestion", *J.A.M.A.*, 247, (1982), 1012-1014.
 46. Daniel, J.W., Gage, J.C., "Absorption and excretion of diquat and paraquat in rats", *Brit. J. Industr. Med.*, 23, (1966), 133-136.
 47. De Morales, S.M., Chow, S.Y., Wells, P.G., "Biotransformation and toxicity of acetaminophen in congenic RHA rats with or without a hereditary deficiency in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 117(1), (1992), 81-87.
 48. Dey, M.S., Breeze, R.G., Hayton, W.L., Karara, A.H., Krieger, R.I., "Paraquat pharmacokinetics using a subcutaneous toxic low dose in the rat", *Fundam. Appl. Toxicol.*, 14, (1990), 208-216.
 49. Dodge, A.D., "The mode of action of the bipyridylium herbicides, paraquat and diquat", *Endeavour*, 30, (1971), 130-135.
 50. Dolan, M., Danzl, D.F., Horowitz, J., Moore, D., "Paraquat ingestion", *Ann. Emerg. Med.*, 13, (1984), 612-614.
 51. Ecker, J.L., Hook, J.B., Gibson, J.E., "Nephrotoxicity of paraquat in mice", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 34, (1975b), 178-186.
 52. Eguia, L., Materson, B.J., "Acetaminophen-related acute renal failure without fulminant liver failure", *Pharmacotherapy*, 17(2), 1997, 363-370.
 53. Ellis, B.G., Tucker, S.M., Thompson, A.E., Price, R.G., "Presence of serum and tissue forms of N-acetyl- β -glucosaminidase in urine from patients with renal disease", *Clin. Chim. Acta.*, 64, (1975), 195-202.
 54. Elseviers, M.M., De Broe, M.E., "Analgesics nephropathy : is it caused by multi-analgesic abuse or single substance use?", *Drug Saf.*, 20(1), (1999), 15-24.
 55. Emeigh Hart S.G., Belerschmitt, W.P., Bartolone, J.B., Wyand, D.S., Khairallah, E.A., et.al., "Evidence against deacetylation and for cytochrome P450-mediated activation in acetaminophen-induced nephrotoxicity in the CD-1 mouse", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 107(1), (1991), 1-15.

56. Emeigh Hart, S.G., Beierschmitt, W.P., Wyand, D.S., Khairallah, E.A., Cohen, S.D., "Acetaminophen nephrotoxicity in CD-1 mice. I. Evidence of a role for in situ activation in selective covalent binding and toxicity", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 126(2), (1994), 267-275.
57. Emeigh Hart, S.G., Wyand, D.S., Khairallah, E.A., Cohen, S.D., "Acetaminophen nephrotoxicity in the CD-1 mouse. II. Protection by probenecid and AT-125 without diminution of renal covalent binding", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 136(1), (1996), 161-169.
58. Endo, G., Horiguchi, S., Kiyota, I., "Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in lead exposed workers", *J. Appl. Toxicol.*, 10(4), (1990), 235-238.
59. Engelhardt, G., Homma, D., "Effects of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine and a combination of these substances on kidney glutathione levels", *Drug Res.*, 46(1), (1996), 513-518.
60. Erickson, T., Brown, K.M., Wigder, H., Gillespie, H., "A case of paraquat poisoning and subsequent fatality presenting to an emergency department", *J. Emerg. Med.*, 15(5), (1997), 649-652.
61. Erickson, T., Brown, K.M., Wigder, H., Gillespie, M., "Paraquat poisoning", *J. Emerg. Med.*, 15(5), (1997), 649-652.
62. Fairshier, R.D., Vaziri, N.D., Dearden, L.C., Malott, K., Caserio, M., "Effect of dimethylthiourea on paraquat toxicity in rats", *Toxicol. Apply. Pharmacol.*, 74, (1984), 150-154.
63. Feldmann, D., Flandrois, C., Jardel, A., Phan, T.M., Aymard, P., "Circadian variations and reference intervals for some enzymes in urine of healthy children", *Clin. Chem.*, 35(5), (1989), 864-867.
64. Fisher, H.K., Humphries, M., Bails, R., "Paraquat poisoning : Recovery from renal and pulmonary damage", *Ann. Intern. Med.*, 75, (1971), 735-736.
65. Florkowski, C.M., Bradberry, S.M., Ching, G.W., Jones, A.E., "Acute renal failure in case of paraquat poisoning with relative absence of pulmonary toxicity", *Postgrad. Med. J.*, 68(202), (1992), 660-662.

66. Fowler, B.A., Brooks, R.E., Brooks, B.S., "Effects of the herbicide paraquat on the ultrastructure of mouse kidney", *Am. J. Pathol.*, 63(3), (1971), 505-520.
67. Fowler, L.M., Moore, R.B., Foster, J.R., Lock, E.A., "Nephrotoxicity of 4-aminophenol glutathione conjugate", *Hum. Exp. Toxicol.*, 10(6), (1991), 451-459.
68. Gardell, S.J., Tate, S.S., "Subunit interactions in gamma-glutamyl transpeptidase", *J. Biol. Chem.*, 256, (1981), 4799-4804.
69. Garnier, R., Chataigner, C., Efthmiou, M.L., Moraillon, I., Bramary, F., "Paraquat poisoning by skin absorption : report of two cases", *Vet. Hum. Toxicol.*, 36(4), (1994), 313-315.
70. Gibey, R., Dupond, J.L., Alber, D., Leconte-des-Floris, R., Henry, J.C., "Predictive value of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG), alanine-aminopeptidase (AAP) and beta-2-microglobulin (beta 2M) in evaluating nephrotoxicity of gentamicin", *Clin. Chim. Acta.*, 116(1), (1981), 25-34.
71. Gibey, R., Dupond, J.L., Henry, J.C., " Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) isoenzyme profiles : a tool for evaluating nephrotoxicity of aminoglycosides and cephalosporins", *Clin. Chim. Acta.*, 137(1), (1984), 1-11.
72. Goldstein, R.S., Schnellman, R.S., "Toxic response Of The Kidney", *Casarett & Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons*, Klaassen, C.D., (Ed.), Fifty Ed., c.14, McGraw-Hill Comp. Inc., New York, USA, 1996, s. 417-442.
73. Gordon, J.A., Gattone, V.H., Schloowerth, A.C., "Gamma-glutamyl transpeptidase excretion in cisplatin-induced acute renal failure", *Am. J. Kidney. Dis.*, 8, (1986), 18-25.
74. Goren, M.P., Wright, R.K., Osborne, S., "Two automated procedures for N-acetyl-β-D-glucosaminidase determination evaluated for detection of drug-induced tubular nephrotoxicity", *Clin. Chem.*, 32(11), (1986), 2052-2055.
75. Gossett, K.A., Turnwald, G.H., Kearney, M.T., Greco, D.S., "Evaluation of gamma-glutamyl transpeptidase to creatinine ratio from spot samples of urine supernatant, as an indicator of urinary enzyme excretion in dogs", *Am. J. Vet. Res.*, 48, (1987), 455-457.

76. Grauer, G.F., Thomas, C.B., Eicker, S.W., "Estimation of quantitative proteinuria in the dog, using the urine protein-to-creatinine ratio from a random, voided sample", *Am. J. Vet. Res.*, 46(10), (1985), 2116-2119.
77. Guder, W.G., Ross, B.D., "Enzyme distribution along the nephron", *Kidney Int.*, 26, (1984), 101-111.
78. Gumbleton, M., Nicholls, P.J., "Dose-response and time-response biochemical and histological study of potassium dichromate-induced nephrotoxicity in the rat", *Fd. Chem. Toxic.*, 26, (1988), 37-44.
79. Guyton, A.C., "Vücut Sıvıları ve Böbrekler", *Tıbbi Fizyoloji*, Gökhan, N., Çavuşoğlu, H., (Çev.), *Fizyoloji*, Cilt I, Bölüm 6, Türkçe 2. Baskı, Merk Yayıncılık, İstanbul, 1988, s. 569-610.
80. Haley, T.J., "Review of the toxicology of paraquat", *Clin. Toxicol.*, 14(1), (1979), 1-46.
81. Harauchi, T., Yoshizaki, T., "A method for determining urinary enzyme activities as nephrotoxic indicators in rats", *Japan J. Pharmacol.*, 54, (1990), 205-215.
82. Harley, J.B., Grinspan, S., Root, R.K., "Paraquat suicide in a young woman : Result of therapy directed against the superoxide radical", *Yale J. Biol. Med.*, 50, (1977), 481-488.
83. Harsanyi, L., Nemeth, A., Lang, A., "Paraquat (Gramoxone) poisoning in South-West Hungary, 1977-1984. Toxicological and histopathological aspects of group intoxication cases", *Am. J. Foren. Med. Pathol.*, 8(2), (1987), 131-134.
84. Hart, T.B., "Paraquat—a review of safety in agricultural and horticultural use", *Human Toxicol.*, 6, (1987), 13-18.
85. Hawksorth, G.M., Bennett, P.N., Davies, D.S., "Kinetics of paraquat elimination in the dog", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 57, (1981), 139-145.
86. Hoffmann, J., Hardeland, R., "Diurnal rhythmicity in rat kidney δ -glutamyl transpeptidase activity", *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, 89, (1981), 245-247.
87. Hofmeister, R., Bhargava, A.S., Günzel, P., "Value of enzyme determinations in urine for the diagnosis of nephrotoxicity in rats", *Clin. Chim. Acta.*, 160, (1986), 163-167.

88. Holvik, D.J., Fisher, R.L., Brendel, K., Gandolfi, A.J., Khairallah, E.A., et.al., "Protein arylation precede acetaminophen toxicity in a dynamic organ slice culture of mouse kidney", *Fundam. Appl. Toxicol.*, 34(1), (1996), 99-104.
89. Honda, M., Tsuchihashi, M., Hayashi, M., Arai, M., Kobayashi, T., "Determination of the activity of urinary enzymes derived from renal tubules", *Sangyo. Ika. Daigaku. Zasshi.*, 13, (1991), 39-46.
90. Hoops, V., Gallone, A., Biondi, F., Vaccaro, F., Sorrentino, M.C., et.al., "Rifampicin reduces nephrotoxicity of siklosporine A in rats : Studies of renal enzyme excretion", *Transplant. Proc.*, 20, (1988), (Supl. 1-2), 557-560.
91. Horak, E., Hopfer, S.M., Sunderman, F.W., "Spectrophotometric assay for urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity", *Clin. Chem.*, 27(7), (1981), 1180-1185.
92. Houze, P., Baud, F.J., Mouy, R., Bismuth, C., Bourdon, R., et.al., "Toxicokinetics of paraquat in humans", *Hum. Exp. Toxicol.*, 9(1), (1990), 5-12.
93. Hsiao, P.H., Tsai, W.S., Tsai, W.Y., Lee, J.S., Tsau, Y.K., et.al., "Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in children with insulin-dependent diabetes mellitus", *Am. J. Nephrol.* 16(4), (1996), 300-303.
94. Hudson, M., Patel, S B., Ewen, S.W., Smith, C.C., Friend, J.A., "Paraquat induced pulmonary fibrosis in three survivors", *Thorax.*, 46(3), (1991), 201-204.
95. Hughes, J.T., "Brain damage due to paraquat poisoning : a fatal case with neuropathological examination of the brain", *Neurotoxicology*, 9(2), (1988), 243-248.
96. Hultberg, B., Isaksson, A., "A possible explanation for the occurrence of increased beta-hexosaminidase activity in pregnancy serum", *Clin. Chim. Acta.*, 113(2), (1981), 135-140.
97. Hultberg, B., Isaksson, A., "Enzyme Immunoassay of beta-hexosaminidase isoenzymes in human urine and renal cortex with monoclonal antibodies", *Enzyme*, 42(1), (1989), 25-30.
98. Hultberg, B., Lindgren, A., Brattstrom, L., Isaksson, A., "Elevated urinary beta-hexosaminidase in patients with stroke", *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 52(8), (1992), 777-780.

99. Hultberg, B., Isaksson, A., Brattstrom, L., Israelsson, B., "Elevated urinary excretion of beta-hexosaminidase in smokers", *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 30(3), (1992), 131-133.
100. Im, J.G., Lee, K.S., Han, M.C., Kim, S.J., Kim, J.O., "Paraquat poisoning : Findings on chest radiography and CT in 42 patients", *A.J.R. Am. J. Roentgenol.*, 157(4), (1991), 697-701.
101. Isaksson, A., Bergenfeldt, M., Hultberg, B., Joelsson, B., "Metabolism of the human serum beta-hexosaminidase isoenzymes in the rat : an in vivo and in vitro study", *Enzyme*, 35(3), (1986), 154-160.
102. Jee, S.H., Kuo, H.W., Su, W.P., Chang, C.H., Sun, C.C., "Photodamage and skin cancer among paraquat workers", *Int. J. Dermatol.*, 34(7), (1995), 466-469.
103. Jeffery, W.H., Lafferty, W.E., "Acute renal failure after acetaminophen overdose : Report of two cases", *Amer. J. Hosp. Pharm.*, 38, (1981), 1355-1358.
104. Johnston, I.A.D., Jones, N.F., Scoble, J.E., Yuen, C-T., Price, R.G., "The diagnostic value of urinary enzyme measurements in hypertension", *Clin. Chim. Acta.*, 133, (1983), 317-325.
105. Jones, A.F., Vale, J.A., "Paracetamol poisoning and the kidney", *J. Clin. Pharm. Ther.*, 18(1), (1993), 5-8.
106. Jung, K., Pergande, M., Schreiber, G., Schröder, K., "Stability of enzymes in urine at 37°C", *Clin. Chim. Acta.*, 131, (1983), 185-191.
107. Jung, K., Diego, J., Strobelt, V., "Diagnostic significance of some urinary enzymes for detecting acute rejection crises in renal-transplant recipients : Alanine aminopeptidase, alkaline phosphatase, δ -glutamyl transferase, N-acetyl- β -D-glucosaminidase and lysozyme", *Clin. Chem.*, 32(10), (1986), 1807-1811.
108. Jung, K., Schulze, G., "Diuresis-dependent excretion of multiple forms of renal brush-border enzymes in urine", *Clin. Chim. Acta.*, 156, (1986), 77-84.
109. Jung, K., Schulze, B.D., Sydow, K., "Diagnostic significance of different urinary enzymes in patients suffering from chronic renal disease", *Clin. Chim. Acta.*, 168, (1987), 287-295.

110. Kayaalp, S.O., "Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji" 2. Cilt, 8. Basım, Hacettepe-T.A.Ş., Baskı: Feryal Matbaacılık San. ve Tic. Ltd. Şti., 1998, s. 1040-1042.
111. Kaysen, G.A., Pond, S.M., Roper, M.H., Menke, D.J., Marrama, M.A., "Combined hepatic and renal injury in alcoholics during therapeutic use of acetaminophen", *Arch. Intern. Med.*, 145, (1985), 219-223.
112. Khalil-Manesh, F., Gonick, H.C., Cohen, A., Bergamaschi, E., Mutti, A., "Experimental model of lead nephropathy", *Environ. Res.*, 58, (1992), 35-54.
113. Kluwe, W.M., "Renal function tests as indicators of kidney injury in subacute toxicity studies", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 57, (1981), 414-424.
114. Knoll, E., Wisser, H., Rautenstrauch, H., "Comparative study of the diagnostic value of disc electrophoresis of urine proteins and measurement of the excretion of N-acetylglucosaminidase for the detection of renal tubule damage in chronic polyarthritis", *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 18, (1980), 53-58.
115. Kocaoğlu, S., Karan, A., Berkan, T., Başdemir, G., "Acute acetaminophen nephrotoxicity and urinary gamma-glutamyltransferase activity in rats", *Drug Metabol. Drug Interact.*, 14(1), (1997), 47-54.
116. Kunin, C.M., Chesney, R.W., Craig, W.A., England, A.C., DeAngelis, C., "Enzymuria as a marker of renal injury and disease : Studies of N-acetyl- β -glucosaminidase in the general population and in patients with renal disease", *Pediatrics*, 62(5), (1978), 751-760.
117. Langhendries, J.P., Battisti, O., Bertrand, J.M., "Aminoglycoside nephrotoxicity and urinary excretion of N-acetyl- β -D-glucosaminidase", *Biol. Neonate.*, 53, (1988), 253-259.
118. Langhendries, J.P., Mattot, M., Francois, A., Deprez, D., Battisti, O., et.al., "Validity of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) determination in assessing netilmicin nephrotoxicity in preterm babies", *Biol. Neonate.*, 56(2), (1989), 76-82.
119. Lemann, J., Doumas, B.T., "Proteinuria in healthy and disease assessed by measuring the urinary protein/creatinine ratio", *Clin. Chem.*, 33(2), (1987), 297-299.

120. Liebert, H., "Relevanz von harnenzymbestimmungen fur die diagnostik und verlaufskontrolle von nierenverletzungen und sekundaren nierenschaden-ergebnisse einer prospektiven studie", *Langenbecks Arch. Chir.*, 373, (1988), 270-286.
121. Lim. C.W., "N-acetyl- β -D-glucosaminidase assay by the p-nitrophenol technique : Inhibitory effects of urine as decreased by gel filtration and by simple dilution", *Clin. Chem.*, 33(5), (1987), 713-714.
122. Lock, E.A., "The effect of paraquat and diquat on renal function in the rat", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 48, (1979), 327-336.
123. Lock, E.A., Ishmael, J., "The acute toxic effects of paraquat and diquat on the rat kidney", *Toxicol. Apply. Pharmacol.*, 50, (1979), 67-76.
124. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *J. Biol. Chem.*, 193, (1951), 265-275.
125. Malvoisin, E., Mercier, M., Roberfroid, M., "Gamma-glutamyl transferase : application of a new radiochemical assay to the analysis of its subcellular distribution in rat liver", *Enzyme*, 23, (1978), 373-381.
126. Marchewka, Z., Kuzniar, J., Jacyszyn, K., "Isoenzymes of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in urine of patients with acute renal failure after intoxication", *Int. Urol. Neph.*, 21(6), (1989), 649-657.
127. Maruhn, D., Fuchs, I., Mucs, G., Bock, K.D., "Normal limits of urinary excretion of eleven enzymes", *Clin. Chem.*, 22(10), (1976), 1567-1574.
128. Maruhn, D., "Rapid colorimetric assay of β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase in human urine", *Clin. Chim. Acta.*, 73, (1976), 453-461.
129. Matteucci, E., Gregori, G., Pellegrini, L., Navalesi, R., Giampietro, O., "Effects of storage time and temperature on urinary enzymes", *Clin. Chem.*, 37, (1991), 1436-1441.
130. Meister, A., "Glutathione : Metabolism and function via the gamma-glutamyl cycle", *Life Sciences*, 15, (1974), 177-190.
131. Meister, A., Tate, S.S., Griffith, O.W., "Gamma-glutamyl transpeptidase", Jakoby, W.B. (Ed.), *Methods in Enzymology*, c.77, New York, Academic Press, 1981, s. 237-253.

132. Metz, U., Graben, N., Maruhn, D., Bock, K.D., "Urinary enzyme excretion after a single dose of phenacetin and paracetamol (acetaminophen) during antidiuresis and during water diuresis", *Clin. Chim. Acta.*, 160(2), (1986), 151-155.
133. Meyer, B.R., Fischbein, A., Rosenman, K., Lerman, Y., Drayer, D.E., et.al., "Increased urinary enzyme excretion in workers exposed to nephrotoxic chemicals", *Am. J. Med.*, 76, (1984), 989-997.
134. Mitchell, J.R., McMurtry, R.J., Statham, C.N., Nelson, S.D., "Molecular basis for several drug-induced nephropathies", *Amer. J. Med.*, 62, (1977), 518-526.
135. Mitic, Z.M., Stefanovic, V., "Acute effects of acetaminophen on renal function and urinary excretion of some proteins and enzymes in patients with kidney disease", *Ren. Fail.*, 21(5), (1999), 525-532.
136. Mohandas, J., Marshall, J.J., Duggin, G.G., Horvath, J.S., Tiller, D.J., "Differential distribution of glutathione and glutathione-related enzymes in rabbit kidney. Possible implications in analgesic nephropathy", *Biochem. Pharmacol.*, 33(11), (1984), 1801-1807.
137. Moller-Hartmann, W., Siegers, C.P., "Nephrotoxicity of paracetamol in the rat-mechanistic and therapeutic aspects", *J. Appl. Toxicol.*, 11(2), (1991), 141-146.
138. Morita, E., Kaizu, K., Uriu, K., Hashimoto, O., Komine, N., et.al., "Clinical significance of urinary enzymes in diabetic nephropathy", *J. Diabetic Compl.*, 5(2-3), (1991), 158-159.
139. Moss, D.W., Henderson, A.R., "Enzymes", c. 20, s. 857-851; O'Brien, J.F., "Lysosomal Storage Disease", c. 40, s. 2149-2154; Silverman, L.M., Christensen, R.H., "Amino Acids and Proteins", c. 19, s. 717-723; Veldee, M.S., "Nutrition", c. 26, s. 1258; Whelton, A., Watson, A.J., Rock, R.C., "Nitrogen Metabolites and Renal Function", c. 33, s. 1527-1536; Burtis, C.A., Ashwood, E.R., (Eds.), *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, W.B., Saunders Co., (2nd Ed.), U.S.A., 1994.
140. Mueller, P.W., MacNeil, M.L., Steinberg, K.K., "N-acetyl- β -D-glucosaminidase assay in urine : urea inhibition", *J. Anal. Toxicol.*, 13, (1989), 188-190.
141. Mugford, C.A., Tarloff, J.B., "The contribution of oxidation and deacetylation to acetaminophen nephrotoxicity in female Sprague-Dawley rats", *Toxicol Lett.*, 93(1), (1997), 15-22.

142. Mullick, F.G., Ishak, K.G., Mahabir, R., Stromeyer, W., "Hepatic injury associated with paraquat toxicity in humans", *Liver*, 1, (1981), 209-221.
143. Murray, R.E., Gibson, J.E., "Lethality and pharmacokinetics of paraquat in rats", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 19, (1971), 405-409.
144. Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K., Rodwell, V.W., Harper'in Biyokimyası, Menteş, G., Ersöz, B., (Çev.), Barış Kit., 1993, s. 866,872.
145. Nagano, N., Yagi, M., Nishikori, K., "Protective effects of antioxidants on paraquat-induced acute renal failure in mice", *Japan. J. Pharmacol.*, 59, (1992), 481-483.
146. Nagata, T., Kono, I., Masaoka, T., Akahori, F., "Acute toxicological studies on paraquat : Pathological findings in Beagle Dogs following single subcutaneous injections", *Vet. Hum. Toxicol.*, 34(2), (1992), 105-112.
147. Nagata, T., Kono, I., Masaoka, t., Akahori, F., "Subacute toxicity of paraquat in Beagle Dogs : Clinopathology and pathologic examinations", *Vet. Hum. Toxicol.*, 34(1), (1992), 15-20.
148. Nagi, A., "Paraquat and adrenal cortical necrosis", *Br. Med. J.*, ii, (1970), 669.
149. Nanra, R.S., "Analgesic nephropathy in the 1990s--an Australian perspective", *Kidney Int. Suppl.*, 42, (1993), S86-S92.
150. Nemeth, A., Harsanyi, L., Lang, A., Fischer, J., "Evaluation of organ injuries in paraquat intoxication", *Prog. Histochem. Cytochem.*, 23(1-4), (1991), 213-219.
151. Newton, J.F., Kuo, C.H., Gemborys, M.W., Mudge, G.H., Hook, J.B., " Nephrotoxicity of p-aminophenol, a metabolite of acetaminophen, in the Fischer 344 rat", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 65, (1982), 336-344.
152. Newton, J.F., Bailie, M.B., Hook, J.B., "Acetaminophen nephrotoxicity in the rat. Renal metabolic activation in vitro", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 70(3), (1983), 433-444.
153. Newton, J.F., Yoshimoto, M., Bernstein, J., Rush, G.F., Hook, J.B., "Acetaminophen nephrotoxicity in the rat. I. Strain differences in nephrotoxicity and metabolism", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 69, (1983), 291-306.
154. Newton, J.F., Yoshimoto, M., Bernstein, J., Rush, G.F., Hook, J.B., "Acetaminophen nephrotoxicity in the rat. II. Strain differences in nephrotoxicity and metabolism of p-

- aminophenol, a metabolite of acetaminophen", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 69, (1983), 307-318.
155. Newton, J.F., Pasino, D.A., Hook, J.B., "Acetaminophen nephrotoxicity in the rat : Quantitation of renal metabolic activation in vivo", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 78(1), (1985), 39-46.
 156. Newton, J.F., Kuo, C.H., Deshone, G.M., Hoefle, D., Bernstein, J., et.al., "The role of p-aminophenol in acetaminophen-induced nephrotoxicity : Effect of bis(p-nitrophenyl) phosphate on acetaminophen and p-aminophenol nephrotoxicity and metabolism in Fischer 344 rats", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 81, (1985), 416-430.
 157. Ngaha, E.O., Plummer, D.T., "Toxic renal damage : Changes in enzyme levels", *Biochem. Med.*, 18, (1977), 71-79.
 158. Nicholls, A.W., Caddick, S., Wilson, I.D., Farrant, R.D., Lindon, J.C., et.al., "High resolution NMR spectroscopic studies on the metabolism and futile deacetylation of 4-hydroxyacetanilide (paracetamol) in the rat", *Biochem. Pharmacol.*, 49(8), (1995), 1155-1164.
 159. Noguchi, N., Tanaka, E., Yamamoto, H., Misawa, S., "Initial accumulation of paraquat in the heart leading to acute death", *Nippon. Hoigaku. Zasshi.*, 44(1), (1990), 6-11.
 160. Noyan, A., "Vücut Sıvılarının Ayarlanması : Boşaltım ve Böbrek Fonksiyonu", *Fizyoloji, Bölüm 6*, 6. Baskı, Meteksan A.Ş., 1989, s. 606-610.
 161. Okonek, S., Wronski, R., Niedermayer, W., Okonek, M., Lamer, A., "Near fatal percutaneous paraquat poisoning", *Klin. Wochenschr.*, 61, (1983), 655-659.
 162. Okuyama, K., "Seperation and identification of serum gamma-glutamyl transpeptidase isoenzymes by wheat germ agglutinin affinity electrophoresis : a basic analysis and its clinical application to various liver disease", *Keio. J. Med.*, 42(4), (1993), 149-156.
 163. Orlacchio, A., Mafei, C., Beccari, T., Lisi, P., "β-N-acetyl-D-glucosaminidase isoenzymes by chromatofocusing from serum and skin in diabetes", *Clin. Chim. Acta.*, 141(2-3), (1984), 127-133.
 164. Orlacchio, A., Emiliani, C., Di Renzo, G.C., Cosmi, E.V., "β-N-acetyl-D-glucosaminidase isoenzymes from human amniotic membranes", *Clin. Chim. Acta.*, 159, (1986), 279-289.

165. Orlacchio, A., Emiliani, C., Tabilio, A., Pioda, G.B., "Expression of a particular beta-N-acetylglucosaminidase isoenzyme in human haematopoietic leukemic cell-lines", *Cell. Biochem. Funct.*, 4(3), (1986), 197-203.
166. Orłowski, M., Szewczuk, A., "Determination of gamma-glutamyl transpeptidase activity in human serum and urine", *Clin. Chim. Acta.*, 7, (1962), 755-760.
167. Paraire, M., Bourboze, R., Baumann, F., Percheron, F., "Differential assay of A and B isoenzymes in urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase", *Clin. Chim. Acta.*, 129, (1983), 233-238.
168. Pedrazzini, G.B., Saglini, V., Pedrinis, E., Mombelli, G., Domenighetti, G., "Fatal voluntary poisoning by parenteral paraquat", *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 121(36), (1991), 1293-1297.
169. Pemeger, T.V., Whelton, P.K., Klag, M.J., "Risk of kidney failure associated with the use of acetaminophen, aspirin, and nonsteroidal antiinflammatory drugs", *N. Engl. J. Med.*, 331(25), (1994), 1675-1679.
170. Pfeiffer, J., Scheller, H.A., "Morphometric study of cellular autophagy including diurnal variations in kidney tubules of normal rat", *J. Cell. Biol.*, 64, (1975), 608-621.
171. Povoas, R., Maciel, F.M., Orlando, J.M., Povoas, E.F., Honsi, E., et.al., "A cardiac lesion secondary to paraquat", *Arq. Bras. Cardiol.*, 59(2), (1992), 95-98.
172. Prescott, L.F., "Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin", *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 10(2), (1980), 291S-298S.
173. Prescott, L.F., Proudfoot, A.T., Cregeen, R.J., "Paracetamol-induced acute renal failure in the absence of fulminant liver damage", *Br. Med. J.*, 284, (1982), 421-422.
174. Price, R.G., "Urinary enzymes, nephrotoxicity and renal disease [Review]", *Toxicology*, 23, (1982), 99-134.
175. Purser, D.A., Rose, M.S., "The toxicity and renal handling of paraquat in cynomolgous monkey", *Toxicology*, 15, (1979), 31-40.
176. Raab, P.W., "Diagnostic value of urinary enzyme determinations", *Clin. Chem.*, 18, (1972), 5-25.

177. Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Pharmacology, "Anti-Inflammatory and Immunosuppressant Drugs", c. 13, s. 230-236, "Harmfull Effects of Drugs", c. 49, s. 760-764, 4th Ed., Churchill Livingstone, Toronto, 1999.
178. Reif, R.M., Lewinsohn, G., "Paraquat myocarditis and adrenal cortical necrosis", J. Forensic Sciences JFSCA., 28(2), (1983), 505-509.
179. Rock, R.C., Walker, W.G., Jennings, C.D., "Nitrogen Metabolites and Renal Function", s. 1270-1271, Bowers, L.D., "Chromatography", s. 145-146, Tietz, N.W., (Ed.), Textbook of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1986.
180. Rosalki, S.B., "Gamma-glutamyl transpeptidase", Bodansky, O., Latner, A.L. (Eds.), Adv. Clin. Chem., c.17, New York, Academic Press, 1975, s. 53-107.
181. Rose, M.S., Smith, L.L., Wyatt, I., "Evidence for energy-dependent accumulation of paraquat into rat lung", Nature (London), 252, (1974), 314-315.
182. Rumack, B.R., Matthew, H., "Acetaminophen poisoning and toxicity", Pediatr. Clinic., (1974), 871-876.
183. Rush, G.F., Smith, J.H., Newton, J.F., Hook, J.B., "Chemically induced nephrotoxicity : role of metabolic activation", Crit. Rev. Toxicol., 13(2), (1984), 99-160.
184. Russell, L.A., Stone, B.E., Rooney, P.A., "Paraquat poisoning : Toxicologic and pathologic findins in three fatal cases", Clin. Toxicol., 18(8), (1981), 915-928.
185. Salgo, L., Szabo, A., "δ-glutamyl transpeptidase activity in human urine", Clin. Chim. Acta., 126, (1982), 9-16
186. Schreiner, G.E., Maher, J.F., "Toxic nephropathy", Am. J. Med., 38, (1965), 409-449.
187. Segasothy, M., Chong, S.M., Kew, S.T., et.al., "Renal involvement in paraquat poisoning [letter]", Nephron, 37, (1984), 143.
188. Segasothy, M., Samad, S.A., Zulfigar, A., Bennett, W.M., "Chronic renal disease and papillary necrosis associated with the long-term use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as the sole or predominant analgesic", Am. J. Kidney. Dis., 24(1), (1994), 17-24.
189. Selypes, A., Nagymajtenyi, L., Berencsi, G.Y., "Mutagenic and embriyotoxic effctcs of paraquat and dlquat", Bull. Environ. Contam. Toxicol., 25, (1980), 513-517.

190. Senanayake, N., Gurunathan, G., Hart, T.B., Amerasinghe, P., Babapulle, M., et.al., "An epidemiological study of the healthy of Sri Lankan tea plantation workers associated with long term exposure to paraquat", *Br. J. Ind. Med.*, 50(3), (1993), 257-263.
191. Severini, G., Aliberti, L.M., Di Girolamo, M., "N-acetyl- β -glucosaminidase isoenzymes in serum and urine of patients with diabetes mellitus", *Clin. Chem.*, 34(12), (1988), 2430-2432.
192. Severini, G., Aliberti, L.M., Koch, M., Capurso, L., Tarquini, M., "Clinical evaluation of serum N-acetyl-beta-D-glucosaminidase as a liver function test", *Biochem. Med. Metab. Biol.*, 44, (1990), 247-251.
193. Sharp, C.W., Ottolenghi, A., Posner, H.S., "Correlation of paraquat toxicity with tissue concentrations and weight loss of the rat", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 22, (1972), 241-251.
194. Shaw, T., Benson, E.S., "Renal Function and Its Evaluation", Davidsohn, I., Henry, J.B., (Eds.), *Todd-Sanford Clinical Diagnosis By Laboratory Methods*, c. 3, W.B. Saunders Co., Toronto, 1974, s. 96.
195. Siefkin, A.D., "Combined paraquat and acetaminophen toxicity", *J. Toxicol.-Clin. Toxicol.*, 19(5), (1982), 483-491.
196. Skrha, J., Marek, J., Sramkova, J., Stolba, P., "N-acetyl-beta-glucosaminidase and albuminuria in acromegaly", *Horm. Metab. Res.*, 23(6), (1991), 285-287.
197. Smith, P., Heath, D., "Paraquat", *Clin. Rev. Toxicol.*, 4, (1976), 411-445.
198. Sobha, H., Pushpakumari, P., Nampoory, N.M.R., Visweswaran, R.K., Ravindran, M., "Paraquat poisoning with acute renal failure - a case report", *J. Assoc. Physicians. India.*, 37(5), (1989), 341-342.
199. Soontornniyomkij, V., Bunyaratvej, S., "Fatal paraquat poisoning : a light microscopic study in eight autopsy cases", *J. Med. Assoc. Thai.*, 75 Suppl 1, (1992), 98-105.
200. Sorenson, A.W., Rosenshein, N., Tepper, S.A., Kritchevsky, D., "Serum hexosaminidase as a possible biomarker for human cancer", *J. Med.*, 15(5-6), (1984), 409-415.
201. Swedenborg, P., Hultberg, B., Thysell, H., "Urinary beta-hexosaminidase excretion in polycystic kidney disease", *Acta. Med. Scand.*, 210(6), (1981), 471-473.

202. Szasz, G., "Gamma-glutamyl transpeptidase-aktivitat im urin", *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 8, (1970), 1-8.
203. Tarloff, J.B., Goldstein, R.S., Hook, J.B., "Strain differences in acetaminophen-nephrotoxicity in rats : role of pharmacokinetics", *Toxicology*, 56(2), (1989), 167-177.
204. Tarloff, J.B., Goldstein, R.S., Morgan, D.G., Hook, J.B., "Acetaminophen and p-aminophenol nephrotoxicity in aging male Sprague-Dawley and Fischer 344 rats", *Fundam. Appl. Toxicol.*, 12(1), (1989), 78-91.
205. Tarloff, J.B., Goldstein, R.S., Silver, A.C., Hewitt, W.R., Hook, J.B., "Intrinsic susceptibility of the kidney to acetaminophen toxicity in middle-aged rats", *Toxicol. Lett.*, 52(1), (1990), 101-110.
206. Tate, S.S., Meister, A., "Interaction of gamma-glutamyl transpeptidase with amino acids, dipeptides and derivatives and analogs of glutathione", *J. Biol. Chem.*, 249, (1974), 7593-7602.
207. Tate, S.S., Meister, A., "Gamma-glutamyl transpeptidase from kidney", Colowick, S.P., Kaplan, N.O., (Eds.), *Methods in Enzymology*, c. 113, New York, Academic Press, 1985, s. 400-418.
208. Taylor, S.A., Chivers, I.D., Price, R.G., Arce, T.M., Milligan, P., "The assesment of biomarkers to detect nephrotoxicity using an integrated database", *Environ. Res.*, 75(1), (1997), 23-33.
209. Tominaga, M., Fujiyama, K., Hoshino, T., Tanaka, Y., Takeuchi, T., et.al., "Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in the patients with hyperthyroidism", *Horm. Metab. Res.*, 21(8), (1989), 438-440.
210. Tomokuni, K., Ichiba, M., Hirai, Y., "Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and beta-aminoisobutyric acid in workers occupationally exposed to metals such as chromium, nickel, and iron", *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, 65(1), (1993), 19-21.
211. Trummer, L., Monasterolo, L.A., Elias, M.M., "Nephrotoxicity of acetaminophen in male Wistar rats : role of hepatically derived metabolites", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 279(2), (1996), 548-554.
212. Trumper, L., Girardi, G., Elias, M.M., " Acetaminophen nephrotoxicity in male Wistar rats", *Arch. Toxicol.*, 66(2), (1992), 107-111.

213. Tsau, Y.K., Chen, C.H., Yang, L.F., Sheu, J.N., "Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in children with idiopathic nephrotic syndrome", *Chung. Hua. Min. Kuo. Hsiao. Erh. Ko. I. Hsueh. Hui. Tsa. Chih.*, 32(5), (1991), 286-290.
214. Tsau, Y.K., Chen, C.H., Yang, L.F., "Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in children with acute renal failure", *Chung. Hua. Min. Kuo. Hsiao. Erh. Ko. I. Hsueh. Hui. Tsa. Chih.*, 33(1), (1992), 5-11.
215. Tseng, C.L., Wang, P.J., Tsay, Y.K., Lin, M.Y., Shen, Y.Z., "Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) in children receiving antiepileptic drugs", *Chung. Hua. Min. Kuo. Hsiao. Erh. Ko. I. Hsueh. Hui. Tsa. Chih.*, 33(4), (1992), 251-256.
216. Vadnay, I., "Hepatic alterations in experimental paraquat intoxication", *Exp. Toxic. Pathol.*, 45, (1993), 355-364.
217. Vale, J.A., Meredith, T.J., Buckley, B.M., "Paraquat poisoning : Clinical features and immediate general management", *Human Toxicol.*, 6, (1987), 41-47.
218. Wagner, K., Metz-Kurschel, M., Claus, M., Fritschka, E., Maasche, B., et.al., "Effect of FK 506 on excretion of urinary enzymes in rats", *Transplant. Proceed.*, 23(6), (1991), 3126-3127.
219. Walker, M., Dugard, P.H., Scott, R.C., "Absorbtion through human and laboratory skin : in vitro comparison", *Acta. Pharm. Suec.*, 20, (1983), 52-53.
220. Walker R.J., "Paracetamol, nonsteroidal antiinflammatory drugs and nephrotoxicity", *New Zealand Med. J.*, Leading Article, (1991), 182-183.
221. Webb, D.W., "The pathophysiology of paraquat nephrotoxicity in the sheep", *J. Toxicol.-Clin. Toxicol.*, 19(9), (1982-1983), 911-929.
222. Webb, D.W., "Nephrotoxicity of paraquat in the sheep and the associated reduction in paraquat secretion", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 68, (1983), 282-289.
223. Weeden, R.P., "Occupational renal disease", *Am. J. Kidney. Dis.*, 3, (1984), 241-252.
224. Wellwood, J.M., Ellis, B.G., Price, R.G., Hammond, K., Thompson, A.E., et.al., "Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase activities in patients with renal disease", *Brit. Med. J.*, 3, (1975), 408-411.

225. Wellwood J.M., Price, R.G., Ellis, B.G., Thompson, A.E., "A note on the practical aspects of the assay of N-acetyl- β -glucosaminidase in human urine", *Clin. Chim. Acta.*, 69(1), (1976), 85-91.
226. Werner, M., Maruhn, D., Atoba, M., "Use of gel filtration in the assay of urinary enzymes", *J. Chromatogr.*, 40, (1969), 254-263.
227. Werner, M., Heilbron, D.C., Maruhn, D., Atoba, M., "Patterns of urinary enzyme excretion in healthy subjects", *Clin. Chim. Acta.*, 29, (1970), 437-449.
228. Werner, M., Gabrielson, D., "Ultrafiltration for improved assay of urinary enzymes", *Clin. Chem.*, 234(4), (1977), 700-704.
229. Whiting, P.H., Ross, I.S., Borthwick, L., "N-acetyl- β -D-glucosaminidase levels and diabetic microangiopathy", *Clin. Chim. Acta.*, 97, (1979), 191-195.
230. Whiting, P.H., Thomson, A.W., Simpson, J.G., "Cyclosporine and renal enzyme excretion", *Clin. Nephrol.*, 25 (Suppl. 1), (1986), 100-104.
231. Williams, P.S., Fass, G., Bone, J.M., "Renal pathology and proteinuria determine progression in untreated mild/moderate chronic renal failure", *Q. J. Med.*, 67(252), (1988), 343-354.
232. Wright, P.J., Plummer, D.T., "The use of urinary enzyme measurements to detect renal damage caused by nephrotoxic compounds", *Biochem. Pharmacol.*, 23, (1974), 63-73.
233. Xu, K., Meng, X.Y., WU, J.W., Shen, B., Shi, Y.C., Wei, Q., "Diagnostic value of serum gamma-glutamyl transferase isoenzyme for hepatocellular carcinoma : a 10-year study", *Am. J. Gastroenterology*, 87(8), (1992), 991-995.
234. Yamashita, K., Hitoi, A., Matsuda, Y., et.al., "Structural studies of carbohydrate moieties of rat kidney gamma-glutamyl transpeptidase", *J. Biol. Chem.*, 258, (1983), 1098-1107.
235. Yenson, M., "İdrar", Kesim 2, s. 152-160, "Kan", Kesim 3, s. 307-321, *Klinik Biyokimya Laboratuvar Çalışmaları*, Beta Basım Yayın Dağ., İstanbul, 1986.
236. Yuen, C-T., Corbett, C.R.R., Kind, P.R.N., Thomson, A.E., Price, R.G., "Isoenzymes of urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) in patients with renal transplants", *Clin. Chim. Acta.*, 164, (1987), 339-350.

ÖZGEÇMİŞ

1968 yılında Bulgaristan'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi İzmir'de tamamladım. 1985 yılında üniversite eğitimime başladığım E.Ü.Eczacılık Fakültesi'nden 1989 yılında mezun oldum. 1990 yılında aynı fakültenin Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans çalışmalarına başladım. 1992 yılında Biyokimya Bilim Uzmanı ünvanını aldım. Aynı yıl E.Ü.Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi olarak atandım ve doktora çalışmalarına başladım. Halen bu görevimi sürdürmekteyim.



ŞEKİL LİSTESİ

ŞEKİL NO	KONUSU	SAYFA NO
1	Böbrek kesiti	5
2	Nefron ve kan damarlarının şekli	8
3	Parakuat'ın kimyasal yapısı	30
4	Parakuat'ın toksisite mekanizması	37
5	Asetaminofen'in kimyasal yapısı	37
6	Asetaminofen'in toksisite mekanizması	47
7	GGTP ölçüm yönteminin prensibi	58
8	Berthelot yönteminin prensibi	64
9	Kreatinin standart eğrisi	68
10	Üre azotu (BUN) standart eğrisi	69
11	Sığır serum albumin standart eğrisi	70
12	Kontrol grubu ile ilaç uygulanan gruplarda idrar GGTP atılımı bar grafiği	74
13	Kontrol grubu ile ilaç uygulanan gruplarda idrar NAG atılımı bar grafiği	75
14	Kontrol grubu ile ilaç uygulanan gruplarda idrarda total protein atılımı bar grafiği	76
15	Kontrol grubu ile ilaç uygulanan gruplarda serum kreatinin bar grafiği	77
16	Kontrol grubu ile ilaç uygulanan gruplarda serum üre azotu (BUN) bar grafiği	78

TABLO LİSTESİ

TABLO NO	KONUSU	SAYFA NO
1	Asetaminofen uygulama dozları	56
2	Deney gruplarına uygulanan ilaçlar	57
3	İdrarda GGTP aktivitesinin tayini	59
4	İdrarda NAG aktivitesinin tayini	61
5	Kreatinin standart eğrisi	67
6	Serum üre azotu (BUN) standart eğrisi	68
7	Siğır serum albumini standart eğrisinin çizimi için okunan absorbans değerleri	69
8	Asetaminofen verilen sıçanların idrar, serum ve böbrek dokularına ait bulgular	72
9	Parakuat veya Parakuat + Asetaminofen verilen sıçanların idrar, serum ve böbrek dokularına ait bulgular	73

RESİM LİSTESİ

RESİM NO	KONUSU	SAYFA NO
1	Parakuat'ın neden olduğu nekrotik bulgular	79
2 ve 3	Asetaminofen'in neden olduğu nekrotik bulgular	79 ve 80
4 ve 5	Parakuat + Asetaminofen'in neden olduğu nekrotik bulgular	80 ve 81