

Kolesterolden Zengin Diyetle Beslenen Ratlarda N-Asetilsisteinin Anti-oksidan/Pro-oksidan Etkileri

The Anti-oxidant/Pro-oxidant Effects of N-Acetylcysteine in Rats Fed with Cholesterol-rich Diet

Serpil Bayır*

Sevgi Eskiocak*

Şemsi Altaner**

Erol Çakır*

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Edirne

*Biyokimya Anabilim Dalı, **Patoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Diyetle kolesterol tüketiminin ateroskleroza yol açtığı ve kolesterolün serbest radikal üretiminde artışa neden olduğu ileri sürülmektedir. Ayrıca hiperkolesterolemik diyetin antioksidan sistemde değişikliklere yol açtığı da bildirilmektedir. Çalışmamızda; ratlarda hiperkolesterolemik diyetle oluşturulan oksidatif stres üzerine antioksidan etkili N-asetilsisteinin etkisini incelemeyi amaçladık.

Çalışmaya 53 adet dişi Sprague-Dawley rat alındı. Ratlar rastgele olarak; kontrol, kolesterol, NAC₁, NAC₂ ve NAC₃ olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Kontrol grubu normal standart rat diyeti ile beslenirken, diğer grupların tümü %1 kolesterol içeren diyetle 8 hafta boyunca beslendi. Tedavi gruplarına ayrıca periton içine 25, 50 ve 100 mg/kg/gün N-asetilsistein (NAC) uygulandı. Deney sonunda elde edilen örneklerde malondialdehid (MDA), glutatyon (GSH), nitrik oksit (NO); kolesterol ve trigliserid analizleri yapıldı. Sonuçlar Kruskal Wallis varyans analizi ve ardından anlamlı bulunan parametreler Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

Kolesterol grubunda tam kan GSH düzeyleri düşükken; plazma kolesterol, MDA ve NO düzeyleri yüksekti. 25 mg/kg/gün NAC uygulanan grupta karaciğer MDA düzeyleri kolesterol grubuna göre artmışken; 50 mg/kg/gün uygulanan grubun hem plazma hem de karaciğer dokusu MDA düzeyleri azalmıştı. Bununla beraber 100 mg/kg/gün uygulanan grupta ise plazma ve karaciğer dokusu MDA düzeylerindeki artış dikkat çekiciydi.

Bulgularımız ışığında; hiperkolesterolemik diyetle beslenmenin oksidan strese ve antioksidan savunmada dengesizliğe yol açtığını söyleyebiliriz. Hiperkolesterolemik diyet ile oluşturulan bu oksidatif hasarı önlemede 25 mg/kg/gün NAC dozunun yetersiz kaldığını, 100 mg/kg/gün NAC dozunun toksik etki gösterdiğini ve en etkin dozun 50 mg/kg/gün olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Hiperkolesterolemik diyet, N-Asetilsistein, oksidan stres, glutatyon, nitrik oksit

ABSTRACT

Dietary cholesterol is suggested to cause atherosclerosis and to increase the production of free radicals. It is reported that hypercholesterolemic diet may make some changes on the antioxidant

system. In our study, we aimed to observe the effect of N-acetylcysteine (NAC) treatment on the oxidative stress that is caused by hypercholesterolemia.

53 female Sprague-Dawley rats were placed into 5 different groups randomly, as control, cholesterol, NAC₁, NAC₂ and NAC₃. The control group was fed with standard basal rat chow while the others were fed with basal chow enriched with 1% cholesterol for 8 weeks. NAC was also administered to the treatment groups intraperitoneally (25, 50 or 100 mg/kg/day of doses). At the end of the study, malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), nitric oxide (NO), cholesterol and triglyceride were analyzed in the blood and tissue samples. The results were analyzed by Kruskal Wallis variance analysis and then by Mann-Whitney U test.

While the whole blood GSH levels in the cholesterol group were decreased, the plasma levels of cholesterol, MDA and NO were elevated. In the NAC₁ treatment group with 25 mg/kg/day dose, liver tissue MDA levels were higher than those of the cholesterol group. In the NAC₂ treatment group with 50 mg/kg/day dose, tissue and plasma MDA levels were decreased in comparison with the cholesterol group. On the other hand, tissue nad plasma MDA levels were significantly increased in the NAC₃ group, receiveing 100 mg/kg/day dose.

In the light of our findings, we can tell that hypercholesterolemic diet causes oxidant stress and an imbalance on antioxidant defense systems. To avoid the oxidative impairment caused by hypercholesterolemia, 25 mg/kg/day NAC dose is not enough, 100 mg/kg/day NAC dose shows toxic effects. We conclude that the most effective dose is 50 mg/kg/day.

Key Words: Hypercholesterolemic diet, N-Acetylcysteine, oxidant stress, glutathion, nitric oxide

GİRİŞ

Aterosklerotik kalp hastalığı (ASKH) özellikle endüstrileşmiş ülkelerde önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Aterosklerotik kalp hastalığı ülkemizde de önemli bir sağlık sorunudur; 1990 yılında yapılan Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı Taraması (TEKHARF) Çalışması ile ASKH prevalansı %6.7 olarak bulunmuştur (1). Ateroskleroz ile kan kolesterolünün yüksekliği arasında ilişki olduğu ve kan kolesterol düzeyinin diyetle tüketilen kolesterol miktarından etkilendiği bildirilmektedir (2). Ateroskleroz; damar duvarında lipid birikimi, okside düşük dansiteli lipoprotein (ox-LDL) ve kolesterolle dolu köpük hücre gelişimi, düz kas çoğalması, trombositlerin çökmesi sonucunda damar lümenini daraltan aterosklerotik plak oluşumu ile karakterize, süregelen bir arter hastalığıdır. Hiperlipidemide, oksidan stres ve lipid peroksidasyonunun önemli oranda arttığı bildirilmektedir (3-7). Peroksidasyona özellikle kolesterol derişimi yüksek olan LDL yatkındır ve ox-LDL'lerin oluşmasına neden olur. Makrofajlarda bulunan çöpçü reseptörler doğal LDL'yi tanımazken; ox-LDL'yi tanımaktadır. Çöpçü reseptörler aracılığı ile gerçekleşen

endositozda negatif geri besleme kontrolü olmadığından dolayı makrofaj içinde kolesterol birikimine ve köpük hücre oluşumuna yol açmaktadır (8,9).

L-sisteinin N-asetillenmiş türevi olan N-asetilsisteinin (NAC); moleküler yapısı nedeniyle hücrelere kolayca girebildiği ve önemli bir antioksidan olan glutatyon (GSH) oluşumunda öncül rol oynayarak oksidan strese karşı dokuların savunmasını desteklediği bildirilmektedir (10-12). Son yıllarda NAC'ın yapısında bulunan serbest tiyol grupları ile direkt antioksidan etki gösterdiği; hidrojen peroksit, hidroksil radikali, hipokloröz asit gibi oksidan moleküllerle etkileşerek radikal toplayıcı etki gösterdiği ileri sürülmektedir (13). Ayrıca köpük hücre gelişimine yol açan ox-LDL oluşumunu da engellediği ve kardiovasküler hastalıklarda bir risk faktörü olarak kabul edilen damar düz kas hücrelerinin çoğalmasını uyararak damar lümeninde daralmaya yol açan ürotensini inhibe ettiği de ileri sürülmektedir (3).

Kolesterolden zengin diyetle uyarılan deneysel ateroskleroz modeli, hastalığın patogenezini açığa çıkarmak ve tedavi seçeneklerini incelemek üzere yaygın olarak kullanılır.

maktadır. %5 kolesterol diyeti ve balon kate-teri ile aortta endotelial hasar oluşturularak yapılan çift hasar ateroskleroz modelinde NAC'ın etkileri incelenmiş, daha önceki çalışmalarda sadece kolesterolden zengin diyetle oluşturulan deneysel hiperkolesterolemi modelinde melatonin, vitamin E ve C gibi antioksidanların etkileri araştırılmış olmasına rağmen; N-asetilsistein'in etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır (14). Bu nedenle çalışmamızda glutasyon öncülü ve antioksidan bir madde olan N-asetilsistein uygulamasının kolesterolden zengin diyetle beslenme modelinde, oksidatif stresi azaltarak tedavide kullanılıp kullanılmayacağını ve N-asetilsisteinin hangi dozunun etkili olabileceğini ortaya koymayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Üniversitemiz yerel etik kurulundan onay alındıktan sonra 53 adet 14 haftalık (170-200 gram) dişi Sprague-Dawley cinsi rat çalışmaya alındı. Ratlar rastgele olarak kontrol, kolesterol, NAC₁, NAC₂ ve NAC₃ olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Kontrol grubu (n=12) standart bazal diyetle, kolesterol (n=11) ve tedavi grupları 8 hafta boyunca %1 kolesterol diyeti ile beslendi. Tedavi gruplarından birincisine 25 mg/kg/gün NAC (NAC₁;n=10), ikincisine 50 mg/kg/gün (NAC₂;n=10) ve sonuncu gruba da 100 mg/kg/gün (NAC₃;n=10) intraperitoneal (ip) olarak uygulandı. Tüm gruplarda su içimi serbest bırakıldı. Deneklerin yiyeceği tüketme hızlarında değişiklik olup olmadığını tespit etmek için yiyecek tüketimi ve kilo takibi deney periyodu boyunca ölçüldü.

Deney süresinin bitiminde denekler ketamin+ksilazin anestezisi altında; kardiyak kan, karaciğer ve aort dokuları alındı ve soğuk serum fizyolojik ile yıkandı. Aort dokusu deneysel modelin doğruluğunun ispatı ve NAC'ın aterosklerotik değişime etkisini göstermek için seçildi. GSH analizi hemen gerçekleştirildi, diğer analizler için plazma ve doku örnekleri analiz gününe dek -30° C'de saklandı. Nitrik oksit (NO), malondialdehid

(MDA), doku proteini, plazma kolesterol ve trigliserit analizlerinin tümü 1 ay içinde tamamlandı.

Dondurulmuş olan dokular analiz günü kademeli olarak çözündükten sonra ağırlıklarının 10 katı %1.15 KCl ile cam-cam homojenizatörü kullanılarak homojenize edildi. Homojenatlar 4000 rpm'de, 10 dk, +4° C'de santrifüj edilerek berrak süpernatantlarda biyokimyasal analizler gerçekleştirildi.

Tam kanda GSH analizi Beutler ve ark. (15), dokuda GSH analizi Sedlak ve ark. (16), MDA analizi Ohkawa ve ark. (17), NO analizi Cortas ve ark. (18), protein analizi ise Lowry ve ark. (19)'nın (19) tanımladıkları metodlara göre spektrofotometrik (Shimadzu UV-160 A) olarak yapıldı, doku lipidleri Folch ve ark. (20) tanımladıkları şekilde ekstrakte edildi, doku total kolesterol, trigliserit, plazma total kolesterol ve trigliserit analizleri ticari kit (Roche Diagnostics GmbH) kullanılarak otoanalizörde (Roche/Hitachi 912) analiz edildi.

Patolojik değerlendirme için abdominal aorta formole konuldu. Rutin doku takibi sonrasında hazırlanan kesitler hematoksilen-eozin ile boyandı. Aterosklerotik lezyon; inflamasyonun varlığına göre 4 basamakta derecelendirildi (21).

0: Enflamatuar hücre yok

1: Lokalize hücre infiltrasyonu

2: Birden fazla alanda ancak lokalize hücre infiltrasyonu

3: Yoğun, yaygın hücre infiltrasyonu

Grupların arasındaki farklılıklar Kruskal Wallis varyans analizi ve ardından anlamlı bulunan parametreler Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Elde edilen değerler ortalama± standart sapma (X±SD) olarak ifade edildi ve p<0.05'in altındaki farklılıklar anlamlı olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Deneklerin yiyecek tüketme miktarı ve kilo alım hızlarında gruplar arasında fark görülmedi.

Plazma ve Tam Kan

Plazma total kolesterol, trigliserit, MDA ve tam kan GSH değerleri Tablo 1'de görülmektedir.

Kolesterol grubunun plazma total kolesterol, trigliserit ve MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükseldiği ($p<0.001$, hepsinde), tam kan GSH düzeylerinin ise anlamlı derecede azaldığı ($p<0.001$) görülmüştür.

Plazma total kolesterol düzeyinin tedavi gruplarından sadece NAC₃'te, trigliserit düzeyinin ise NAC₁ ve NAC₃ gruplarında kolesterol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı ($p<0.01$, hepsinde) gözlenmiştir. Kolesterol grubuna göre NAC₁ tedavi grubunun plazma MDA düzeyleri daha yüksek düzeyde ($p<0.001$) iken; NAC₂ ve NAC₃ tedavi gruplarının plazma MDA düzeyleri ise daha düşük düzeyde ($p<0.001$ ve $p<0.01$, sırasıyla) olduğu saptanmıştır. Tam kan GSH düzeylerinin NAC₂ ve NAC₃ tedavi gruplarında kolesterol grubuna göre arttığı ($p<0.001$, ikisinde) ve en yüksek değer NAC₂ grubunda olduğu gözlenmiştir.

NAC tedavi grupları arasında plazma MDA düzeylerinde NAC₂ ve NAC₃ gruplarında NAC₁'e göre anlamlı bir azalma ($p<0.001$, ikisinde) gözlenirken; NAC₃'de NAC₂'ye

göre artış ($p<0.001$) saptanmıştır. Tam kan GSH düzeylerinde NAC₂ ve NAC₃ gruplarında NAC₁'e göre anlamlı bir artma ($p<0.01$, ikisinde) gözlenirken; NAC₃'de NAC₂'ye göre azalış ($p<0.05$) saptanmıştır.

Karaciğer Dokusu

Metabolik olarak aktif bir doku olduğu için biyokimyasal incelemeler amacıyla seçilen karaciğer dokusunda total kolesterol, trigliserit, MDA NO ve GSH değerleri Tablo 2'de görülmektedir.

Kolesterol grubunda karaciğer dokusu total kolesterol, MDA ve NO düzeyleri, kontrol grubuna göre artmış bulundu ($p<0.01$, $p<0.001$ ve $p<0.001$, sırasıyla). Ancak karaciğer dokusu GSH içeriği ise kontrol grubuna göre azalmıştı ($p<0.001$).

Kolesterol grubuna göre karaciğer dokusu total kolesterol içeriği tedavi gruplarının hepsinde ($p<0.001$, hepsinde), trigliserit içeriği de NAC₁ ve NAC₃ gruplarında ($p<0.01$, her ikisinde) azalmıştı. NAC₁ tedavi grubunda kolesterol grubuna göre MDA değeri değişmezken; NO düzeyi azalmış, GSH düzeyi ise yükselmişti ($p<0.001$, her ikisinde). NAC₂ tedavi grubunda kolesterol grubuna göre MDA ve NO değerleri azalmış ($p<0.05$ ve $p<0.001$, sırasıyla), GSH ise yükselmişti ($p<0.001$). NAC₃ tedavi grubunda ise kolesterol grubuna göre

Tablo 1. Kontrol, kolesterol ve NAC tedavi gruplarının plazma total kolesterol, trigliserid, MDA ve tam kan GSH değerleri (X ± SD).

§	Gruplar				
	Kontrol (n=12)	Kolesterol (n=11)	NAC ₁ (n=10)	NAC ₂ (n=10)	NAC ₃ (n=10)
Total Kolesterol (mmol/L)	1.51±0.16	1.88±0.14 a***	1.62±0.35	1.66±0.36	1.55±0.20 b**
Trigliserid (mmol/L)	0.71±0.20	1.11±0.26 a***	0.56±0.36 b**	1.02±0.44 c*	0.58±0.25 b**
MDA (nmol/ml)	3.63±0.43	5.12±0.79 a***	7.49±0.88 b***	2.98±0.24 b*** c***	4.14±0.34 b*** c*** d***
GSH (mmol/dl tam kan)	4.24±0.22	3.38±0.27 a***	3.70 ± 0.48	4.94±0.87 b*** c**	4.03±0.46 b*** c** d*

§Karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır.

a: Kontrol grubuna göre karşılaştırma * $p<0.05$

b: Kolesterol grubuna göre karşılaştırma ** $p<0.01$

c: NAC₁ grubuna göre karşılaştırma *** $p<0.001$

d: NAC₂ grubuna göre karşılaştırma

Tablo 2. Kontrol, kolesterol ve NAC tedavi gruplarının karaciğer dokusu MDA, NO ve GSH değerleri (X ± SD).

Ş	Gruplar				
	Kontrol (n=12)	Kolesterol (n=11)	NAC ₁ (n=10)	NAC ₂ (n=10)	NAC ₃ (n=10)
Total Kolesterol (µmol/gr doku)	53.94±17.14	85.33±16.41 a**	39.92±8.88 b***	41.72±16.63 b***	38.83±13.64 b***
Trigliserit (µmol/gr doku)	23.40±8.23	27.53±7.10	19.14±6.89 b*	23.53±8.43	20.24±7.56 b*
MDA (nmol/mg protein)	2.14±0.29	3.06±0.39 a***	3.11±0.40	2.64±0.33 b* c*	3.57±0.48 b* c* d***
NO (mmol/mg protein)	8.25±0.84	10.32±1.09 a***	8.03±1.16 b***	9.19±0.76 b** c*	9.92±1.23 c**
GSH	11.45±0.34	7.31±0.85 a***	9.64±1.32 b***	10.28±0.75 b***	12.36±1.51 b*** c*** d***

ŞKarşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır.

a: Kontrol grubuna göre karşılaştırma *p<0.05

b: Kolesterol grubuna göre karşılaştırma **p<0.01

c: NAC₁ grubuna göre karşılaştırma ***p<0.001

d: NAC₂ grubuna göre karşılaştırma

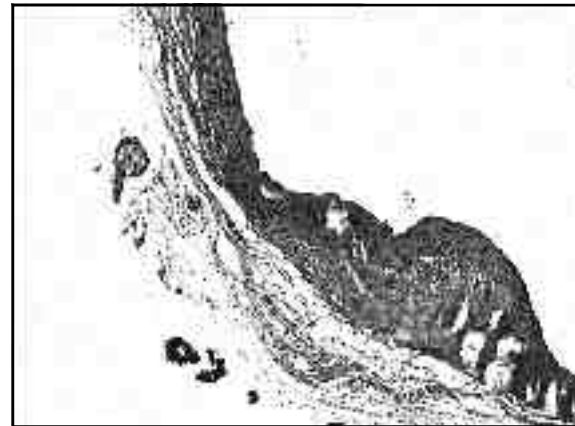
MDA ve GSH değerleri yükselmişti (p<0.05 ve p<0.001, sırasıyla).

NAC tedavi grupları arasında karaciğer dokusu MDA düzeylerinde NAC₂ grubunda NAC₁'e göre anlamlı bir azalma (p<0.05) gözlenirken; NAC₃'te NAC₂'ye göre artış (p<0.001) saptanmıştır. NAC₂ ve NAC₃ gruplarının karaciğer NO düzeylerinin NAC₁ grubununkine göre anlamlı olarak arttığı (p<0.05 ve p<0.001, sırasıyla) gözlenmiştir. Diğer tedavi gruplarına göre karaciğer dokusunda en yüksek GSH düzeyi NAC₃ grubunda idi (p<0.001, ikisinde).

Deneklerden alınan aort dokusu çok küçük olduğundan biyokimyasal inceleme yapılmamış olup sadece patolojik inceleme yapılmıştır. Abdominal aort dokusunda yapılan patolojik incelemede kontrol ve NAC tedavi gruplarındaki deneklerin hiç birinde aterosklerotik lezyon tespit edilmemiştir (Resim 1). Kolesterol grubundaki, deneklerden çıkarılan abdominal aortalarda yapılan incelemede makroskopik olarak dikkat çekici bulguya rastlanmamıştır, ancak mikroskopik incelemelerde, 6 olguda aort endotelinde düzensizlik ve intimal köpüklü histiosit kümelenmeleri dikkati çekmiştir. Ayrıca lökosit ve lenfosit varlığı ve arada fibröz bağ dokusu artımı izlenmiştir (Resim 2). Bu vakalarda



Resim 1. NAC (25 mg/kg) grubundaki denekte düzenli yapıda aort duvarı (H+E, x50).



Resim 2. Kolesterol grubundaki denekte abdominal aort lümeninde aterosklerotik plak (H+E, x50).

Tablo 3. Abdomen aort dokularının aterosklerotik inflamatuvar lezyon skorlamasının dağılımı.

Skor	Gruplar				
	Kontrol (n=12)	Kolesterol (n=11)	NAC ₁ (n=10)	NAC ₂ (n=10)	NAC ₃ (n=10)
0 (Enflamatuvar hücre yok)	12 (%100)	5 (%45.4)	10 (%100)	10 (%100)	10 (%100)
1 (Lokalize hücre infiltrasyonu)	0 (%0)	2 (%18.2)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
2 (Birden fazla alanda ancak lokalize hücre infiltrasyonu)	0 (%0)	4 (%36.4)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)

endotel düzensizliği yaygın, ancak aterom plakları 2 vakada sadece 1 alanda izlenirken 4 vakada ise birkaç alanda izlenmiştir. Böylece 11 rat içeren kolesterol grubunun 6'sında (%54.6) aterosklerotik lezyonlar gözlenmiş ve aterosklerotik lezyon skorlamasına esas olan ölçü kapsamında bu ratlardan 2'sinde 1, 4'ünde ise 2. derece aterosklerotik lezyon olduğu saptanmıştır (Tablo 3).

TARTIŞMA

Deneyisel ateroskleroz modeli olarak tavşan modelinin yanı sıra rat modeli de sık kullanılmaktadır. Her iki modelin de kullanıldığı bir çalışmada (3) kolesterol zengin diyetle beslenen tavşanlarda daha yüksek plazma kolesterol düzeyine yol açmasına rağmen doku kolesterol ve plazma oksisterol düzeyinin ratlarda daha fazla olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda antioksidan etkili bir madde olan NAC'ın etkilerini araştırmakta rat kullanımının daha uygun olacağı düşünülmüştür.

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin sağlık problemlerinden birisi olan aterosklerozun diyetle yüksek oranda kolesterol tüketimi ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Ateroskleroz gelişimi multifaktöryel nedenlere bağlı olmakla beraber, serbest radikallerin endotel hasarına yol açtığı teorisi son yıllarda yapılan çalışmaların odak noktasını oluşturmaktadır. Hiperkolesterolemide serbest radikal üretiminin ve lipid peroksidasyonunun arttığı bildirilmektedir (2). Aort endoteli doğal LDL ve okside LDL ile inkübe edildiğinde; her iki durumda da endotelden süperoksit radikali üretiminin artmış olduğu, okside LDL ile inkübasyonun daha yüksek oranda O₂⁻ üretimine yol açtığı bildirilmiştir (22).

Yüksek düzeyde saf kolesterolle beslenen rat ve tavşanların serum oksisterol düzeylerinde, kalp dokusunda ise peroksinitrit radikal düzeyinde artış olduğu tespit edilmiştir (3,4). Uzun süre yüksek kolesterol diyetine maruz kalan ratların eritrosit ve karaciğer dokularında GSH düzeyinin azaldığı (5,6) bildirilmekle beraber, değişmediğini ileri süren çalışmalar da dikkati çekmektedir (23). Yüksek kolesterol diyeti ile beslenen deney hayvanlarında serum (5,6,24) ve çeşitli dokularda (3,7) MDA düzeylerinde artış olduğu saptanmıştır. Baskın ve ark. (24) aterosklerotik plak bölgesinde plaksız bölgelere göre daha yüksek düzeyde MDA bulunduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda yüksek kolesterol diyetiyle beslenen grupta tam kan ve karaciğer dokusunda GSH düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı (p<0.001, her ikisinde) gözledik. Ayrıca; kolesterol grubunun plazma ve karaciğer dokusunda MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükselmiş olduğunu saptadık (p<0.001, her ikisinde). Kolesterol grubunda ortaya koyduğumuz GSH ve MDA düzeyi bulgularımız, daha önce yapılmış olan çalışmalar ile uyumludur (3,5-7). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, kolesterolle beslenmenin oksidatif stres yaratabileceğini, antioksidan etkili GSH düzeyinde tükenmeye ve lipid peroksidasyonuna yol açarak doku hasarı yaratmış olabileceğini düşündürmektedir. Literatür bilgisi ışığında (3,23,24) kolesterolle beslenmenin lipid peroksidasyonu ve GSH düzeyi üzerine gördüğümüz olumsuz etkisinde muhtemelen dokularda radikal üretimini arttırmasının rolü olabileceğini söyleyebiliriz.

NAC tedavi gruplarında tam kan ve karaciğer dokusu GSH düzeylerinin kolesterol grubuna göre anlamlı derecede arttığını ve bu artışın karaciğer dokusunda doza bağımlı bir şekilde olduğunu saptadık. Karaciğer MDA düzeylerinin; kolesterol grubu ile karşılaştırılmasında NAC₂ grubunda azaldığı gözlenirken; NAC₃ grubunda ise arttığı dikkati çekiyordu (p<0.05 her ikisinde). Plazma MDA seviyesinde ise kolesterol grubuna göre NAC₁ grubunda yükseliş (p<0.001), NAC₂ ve NAC₃ gruplarında düşüş (p<0.001 ve p<0.01) olduğu gözlemlendi. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulguların ışığı altında, NAC₁ grubuna uygulanan 25 mg/kg NAC dozunun deneklerdeki lipid peroksidasyonunu engellemediği ve oluşturduğu GSH artışının bu hasarı önlemede yetersiz kaldığını düşünmekteyiz. Ayrıca; NAC₂ grubuna uygulanan 50 mg/kg NAC dozunun lipid peroksidasyonunu önleyebilmesine karşın; NAC₃ grubunda ise lipid peroksidasyonunun yine artış göstermesi bu dozda NAC'ın antioksidan etki göstermekten ziyade pro-oksidan bir etki oluşturmuş olabileceğini söyleyebiliriz. Wang ve ark. (25) da etanolle oluşturdukları karaciğer hasarı üzerine NAC'ın etkilerini inceledikleri çalışmada NAC'ın çift etkisine dikkat çekmişlerdir. NAC ile önceden tedavi edilmesi antioksidan etki oluştururken; etanol uygulandıktan 4 saat sonra NAC ile tedavinin oksidan etkiyi arttırdığını bildirmişlerdir. Ayrıca NAC'ın in vitro koşullarda Fe⁺³ iyonunu Fe⁺²'ye indirgediği, hidroksil radikal üretimine yol açtığı ve yüksek NAC dozlarında bu etkinin daha hızlı ve büyük olduğu bildirilmiştir (26). NAC₃ grubunda saptadığımız bulgular ve literatür ışığı altında; yüksek doz NAC'ın geçiş metallere indirgenmesinde rol alarak radikal üretimine ve hasara yol açabileceğini söyleyebiliriz.

Çalışmamızda kolesterol grubunun karaciğer dokusunda NO düzeyinin arttığını bulduk. Bu bulgumuz; yüksek yağlı diyet uygulanan ratların karaciğer dokusunda uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) mRNA konsantrasyonunun arttığını gösteren çalışma ile uyum-

ludur (27). Lipopolisakkarit uygulanan ratlarda gözlenen NO ve iNOS mRNA artışının deneklere NAC uygulamasından sonra azaldığı, bu azalmanın doza bağımlı olduğu, ancak yüksek dozlarda NO üretiminde artışa yol açtığı bildirilmiştir (28). Majano ve ark. (29) da insan karaciğer hücre kültürü kullandıkları çalışmalarında, sitokinle uyarılan NO, iNOS mRNA ve iNOS protomer artışının yine NAC uygulaması ile azaldığını, NAC'ın iNOS gen transkripsiyonunu da inhibe ettiğini ileri sürmüşlerdir. iNOS mRNA miktarı üzerine NAC'ın doza bağımlı etki ettiğine, ancak yüksek dozlarda daha fazla inhibitör etki göstermediğine de dikkati çekmişlerdir. Karaciğer dokusunda kolesterol grubuna göre tüm tedavi gruplarında NO düzeyi düşükken, bu azalış sadece NAC₁ ve NAC₂ grubunda anlamlı idi (sırasıyla, p<0.001 ve p<0.01). Çalışmamızın bulguları sonucunda; kolesterolle indüklenen NO düzeyindeki artışın NAC uygulaması ile engellendiğini, ancak NAC dozu arttıkça özellikle karaciğerde engellenmenin yetersiz kaldığını ve bu durumun yüksek NAC dozunda gözlenen lipid peroksidasyon artışında rolü olabileceğini düşünmekteyiz.

Ateroskleroz, orta ve büyük çaplı arterlerin kan akımını azaltabilen veya tıkaçabilen subintimal kalınlaşmalarıyla (aterom) karakterize bir arterioskleroz formudur. Aterosklerotik lezyonlar sıklıkla kan akımının bozulduğu, arterlerin ayırım noktalarında oluşur. Çalışmamızda abdominal aortanın patolojik incelemesinde kolesterolden zengin diyetle beslenen kolesterol grubundaki 11 denegin 2'sinde lokal, 4'ünde ise yaygın aterosklerotik reaksiyon görülmüştür. Ancak kolesterolden zengin diyetle beslenmenin yanı sıra NAC ile tedavi edilen gruplardaki deneklerin hiçbirinde aterosklerotik lezyon saptanmamıştır (Tablo 3).

NAC tedavi gruplarının hepsinin plazma kolesterol ve trigliserit düzeyleri kolesterol grubununkinden daha düşüktü. Ancak kolesterol düzeyindeki azalış sadece NAC₃ grubunda (p<0.01), trigliserit düzeyindeki azalış

ise sadece NAC₁ ve NAC₃ gruplarında (sırasıyla p<0.01 ve p<0.001) anlamlıydı. Karaciğer doku kolesterol içeriği tüm NAC tedavi gruplarında (p<0.001, hepsinde); doku trigliserit içeriği de NAC₁ ve NAC₃ gruplarında (p<0.05, her ikisinde) kolesterol grubundan anlamlı derecede azalmıştı. Ayrıca patolojik inceleme sonucunda kolesterol grubundaki deneklerin %54.6'sında aterosklerotik değişiklikler oluşmuşken, NAC tedavi gruplarının hiçbirinde aterosklerotik değişim bulgularına rastlanmamış olması, NAC'ın aterogenezi önlemede, plazma lipidlerini düşürmek dışında bazı mekanizmaların sözkonusu olabileceğini akla getirmektedir. NAC'ın makrofajların adherens indeksini azaltması (30), endotel yüzeyinde adezyon moleküllerinin sayısını azaltması (10), serbest radikalleri toplayarak LDL oksidasyonunu önlemesi, GSH düzeyinde artışa neden olması gibi birçok faktörün NAC'ın aterogenezi önlemede etken olabileceğini söyleyebiliriz.

Sonuç olarak; yüksek düzeyde kolesterol içeren diyetle beslenmenin doku ve dolaşımda GSH tüketimine, NO ve lipid peroksidasyon düzeylerinin artmasına ve ateroskleroza neden olduğunu; hiperkolesterolemik bireylerde NAC'ın dikkatli kullanımının kısmen faydalı olabileceğini ve NAC dozunun iyi ayarlanması gerektiğini söyleyebiliriz. Bunun için daha uzun süreli ve değişik hayvan türlerinde yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz. Ancak ondan sonra hiperlipideminin olumsuz etkilerini gidermek amacıyla insanda denemeye ve doz ayarlamaya çalışmalarına başlanabilir.

Teşekkür

Deney hayvanlarının hazırlanması ve bakımı konusunda yardımları nedeniyle Deney hayvanları Birimi Veterineri Dr. Ziya Çukur'a teşekkürü borç biliriz.

KAYNAKLAR

1. Türkiye Kalp Raporu 2000, Türk Kardiyoloji Derneği Yayınları, İstanbul: Yenilik Basımevi; 2000.
2. Mahley RW. Aterogenez ve erken oluşan kalp hastalığından sorumlu faktörler, lipid biyokimyası

- ve kolesterol metabolizması. Gökdemir O, Palaoglu KE. Aterogenezin hücre ve moleküler biyolojisi, kolesterol taşınması ve lipoprotein metabolizması. 1st. San Francisco: California Üniversitesi, 1996: 3-57.
3. Mahfouz MM, Kummerow FA. Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. J Nutr Biochem 2000; 11: 293-302.
4. Onody A, Csonka C, Giricz Z, Ferdinandy P. Hyperlipidemia induced by a cholesterol-rich diet leads to enhanced peroxynitrite formation in rat hearts. Cardiovasc Res 2003; 58: 663-70.
5. Gokkusu C, Mostafazadeh T. Changes of oxidative stress in various tissues by long-term administration of vitamin E in hypercholesterolemic rats. Clin Chim Acta 2003; 328: 155-61.
6. Hsu HC, Lee YT, Chen MF. Effects of fish oil and vitamin E on the antioxidant defense system in diet-induced hypercholesterolemic rabbits. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2001; 66: 99-108.
7. Del Boccio G, Lapenna D, Porreca E, Pennelli A, Savini F, Feliciani P, et al. Aortic antioxidant defence mechanisms: time-related changes in cholesterol-fed rabbits. Atherosclerosis 1990; 81: 127-35.
8. Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. Biochem Soc Trans 2001; 29: 358-62.
9. Esterbauer H, Wiegand G, Puhl H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. Br Med Bull 1993; 49: 566-76
10. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. Cell Mol Life Sci 2003; 60: 6-20.
11. Kelly GS. Clinical applications of N-acetylcysteine. Altern Med Rev 1998; 3: 114-27.
12. Sener G, Tosun O, Sehirli AO, Kacmaz A, Arbak S, Ersoy Y, et al. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. Life Sci 2003; 72: 2707-18.
13. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. Free Radic Biol Med 1989; 6: 593-7.
14. Galis ZS, Asanuma K, Godin D, Meng X. N-acetylcysteine decreases the matrix-degrading capacity of macrophage-derived foam cells: new target for antioxidant therapy? Circulation 1998; 97: 2445-53.
15. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. J Lab Clin Med 1963; 61: 882-8.
16. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal Biochem 1968; 25: 192-205.

17. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-8
 18. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36: 1440-3.
 19. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
 20. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.
 21. Herdeg C, Fitzke M, Oberhoff M, Baumbach A, Schroeder S, Karsch KR. Effects of atorvastatin on in-stent stenosis in normo- and hypercholesterolemic rabbits. *Int J Cardiol* 2003; 91: 59-69.
 22. Stepp DW, Ou J, Ackerman AW, Welak S, Klick D, Pritchard KA Jr. Native LDL and minimally oxidized LDL differentially regulate superoxide anion in vascular endothelium in situ. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H750-9.
 23. Uysal M, Seckin S, Kutalp G, Kocak-Toker N. Erythrocyte lipid peroxidation, glutathione and vitamin E levels in cholesterol-fed rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1988; 58: 198-201.
 24. Baskin Y, Baskin H, Guner G, Tuzun E, Oto O. The inversely proportional relation between nitric oxide and lipid peroxidation in atherosclerotic plaque formation in human. *Int J Cardiol* 2003; 91: 53-7.
 25. Wang AL, Wang JP, Wang H, Chen YH, Zhao L, Wang LS, et al. A dual effect of N-acetylcysteine on acute ethanol-induced liver damage in mice. *Hepato Res* 2006; 34: 199-206.
 26. Sprong RC, Winkelhuyzen-Janssen AM, Aarsman CJ, van Oirschot JF, van der Bruggen T, van Asbeck BS. Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1283-93.
 27. Kim JW, Kang KW, Oh GT, Song J, Kim ND, Pak YK. Induction of hepatic inducible nitric oxide synthase by cholesterol in vivo and in vitro. *Exp Mol Med* 2002; 34: 137-44.
 28. Bergamini S, Rota C, Canali R, Staffieri M, Daneri F, Bini A, Giovannini F, Tomasi A, Iannone A. N-acetylcysteine inhibits in vivo nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 2001; 5: 349-60.
 29. Majano PL, Medina J, Zubia I, Sunyer L, Lara-Pezzi E, Maldonado-Rodriguez A, Lopez-Cabrera M, Moreno-Otero R. N-Acetyl-cysteine modulates inducible nitric oxide synthase gene expression in human hepatocytes. *J Hepatol* 2004; 40: 632-7.
 30. De la Fuente M, Victor VM. Anti-oxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol* 2000; 78: 49-54.
-
- Yazışma adresi:**
Dr. Sevgi Eskiocak
Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
22030 Edirne
Tel : 0.284 235 76 42/16 19
GSM: 0.536 559 50 00
E-posta: drseskiocak@yahoo.co.uk
-