

# Siklosporin A Nefrotoksisitesi İçin Rat Modeli: Wistar Soyu Ratlar Üzerinde Bir Çalışma

## *A Rat Model for Cyclosporine A Nephrotoxicity: A Study on Wistar Strain Rats*

Cevat Yazıcı<sup>1</sup>, Kader Köse<sup>1</sup>, Süleyman Gökalp<sup>2</sup>, Özlem Canöz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya AD, Kayseri

<sup>2</sup>Dr. Vedat Ali Özkan Kayseri Devlet Hastanesi, Kayseri

<sup>3</sup>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji AD, Kayseri

### ÖZET

Transplantasyonda kullanılan siklosporin A (CsA)'nın, başlıca yan etkisi nefrotoksisitedir. CsA tedavisi alan hastalarda, CsA'dan başka faktörler de renal ve kardiyovasküler etkilere yol açabildiğinden; sadece CsA'dan kaynaklanan yan etkilerin ortaya konulmasında, deneysel modellere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma, CsA nefrotoksisitesi için ideal bir deneysel model önerebilmek amacıyla, fonksiyonel ve morfolojik nefrotoksisite oluşturabilen uygun CsA dozunu, uygulama şekli ve süresini belirlemek üzere Wistar erkek ratlar ile yapıldı.

Her biri 2-3 rat içeren dört gruba, sırasıyla 20, 30, 40 ve 50 mg/kg/gün dozlarında CsA, ip veya sc olarak uygulandı. Bu ön çalışmanın verilerine göre; CsA'nın sc 30 mg/kg/gün dozunda 30 gün süreyle 10 rata uygulanması planlandı. Kontrol grubuna da ağırlık başına 2.0 ml serum fizyolojik verildi. Çalışmanın 0, 10, 20, 30. günlerinde, ratların plazmasında BUN ve kreatinin (Kr); idrarında üre nitrojeni, Kr ve mikroprotein ölçüldü; ratların ağırlıkları ve idrar volümleri belirlendi. Klirens (KKr) hesaplandı. Böbrekler histolojik olarak incelendi.

CsA uygulamasının 10. gününden itibaren, plazma BUN'un yükseldiği; günlük Kr atılımının azaldığı; KKr'nin düştüğü; ratların giderek zayıfladığı ve daha az idrar çıkardıkları gözlemlendi. Otuzuncu günde bu toksisiteye ilaveten, plazma Kr ve idrar üre nitrojeni seviyelerinin de yükseldiği belirlendi. Böbrek patolojisinde, tübüllerde vakuolizasyon başta olmak üzere, dilatasyon, nekroz ve atrofi oluşumu gözlemlendi.

Sonuç olarak, erkek Wistar ratlara sc 30 gün uygulanan 30 mg/kg/gün CsA'nın fonksiyonel ve morfolojik nefrotoksisite oluşturabileceği ve nefrotoksisite çalışmalarında bu modelin başarıyla kullanılabileceği söylenebilir.

**Anahtar kelimeler:** CsA nefrotoksisitesi, Wistar rat, deneysel model

### ABSTRACT

Nephrotoxicity is a side effect of cyclosporine A (CsA), which is used after transplantation. In CsA-treated patients, factors other than the drug may also have renal and cardiovascular effects. Therefore, experimental models are needed to study adverse effects of only CsA. Since the study was planned to suggest an ideal model for CsA nephrotoxicity, the most appropriate route, duration and dose of administration were determined in male Wistar rats treated with CsA for making functional and morphological nephrotoxicity.

CsA were intraperitoneally or subcutaneously administered to the four groups of rats, in each 2-3, at doses of 20, 30, 40 and 50 mg/kg bw/day, respectively. According to data of this pre-study, study groups were subcutaneously treated with CsA at a dose of 30 mg/kg/day for 30 days, and saline was used for control group. On zero, 10th, 20th and 30th days of the study, plasma BUN and creatinine (Cr) and urine urea nitrogen, Cr and microprotein were analyzed. Urine volumes and weights were recorded. Clearance (CCr) was calculated. Renal tissues were also assessed histologically.

There was an increase in plasma BUN and decreases in daily Cr output, CCr, body weights and urine volumes in CsA group by the 10th day of the study. Plasma Cr and urine nitrogen levels were higher on the 30th day, in addition to these toxic effects. In proximal tubules mostly vacuolization, dilatation, necrosis and atrophy were observed in renal histopathology.

Our results show that, at a dose of 30 mg/kg/day CsA administered to male Wistar rats for 30 days resulted in functional and morphologic nephrotoxicity, and also this experimental model may be used in the studies of CsA nephrotoxicity, successfully.

**Keywords:** CsA nephrotoxicity, Wistar rat, experimental model

*Nefroloji Dergisi 2004;13 (3) 144-151*

### Giriş ve Amaç

Siklosporin A (CsA), 1980'li yıllardan itibaren, böbrek, kalp ve karaciğer (KC) nakillerinde ve otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılan, immüno-supresif bir ajandır (1). Ancak CsA'nın nefrotoksisite gibi ciddi yan etkilerinin olması, ilacın isteni-

Yazma adresi: Yrd. Doç. Dr. Cevat Yazıcı  
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı  
38039 Talas Yolu, Kayseri  
Tel: (0352) 437 49 37/23277  
E-posta: yazici@erciyes.edu.tr

Tablo I. Kontrol ratlarında (n: 5) ölçülen parametrelerin günlere göre değerlendirilmesi				
PARAMETRELER	0. GÜN	10. GÜN	20. GÜN	30. GÜN
Plazma BUN (mg/dl)	16.4±0.9	14.2±1.8	14.8±0.8	15.0±1.6
Plazma Kreatinin (mg/dl)	0.58±0.04	0.60±0.06	0.56±0.05	0.60±0.00
Rat Ağırlığı (g)	277±4	285±8	284±9	299±7*,**
<b>İdrar</b>				
Hacim (ml)	15.9±4.6	18.1±2.9	17.6±1.7	19.6±4.3
Mikroprotein (mg/dl)	53.2±9.9	59.0±11.2	63.4±13.6	70.8±7.6
Üre nitrojeni (mg/dl)	1847±413	1753±354	1587±309	1665±353
Kreatinin (mg/dl)	53.8±18.7	47.6±9.1	46.2±7.4	46.9±8.3
Kreatinin (mg/gün)	7.90±0.83	8.41±0.47	8.04±0.86	8.92±0.77
KKr (ml/dk)	0.95±0.09	0.98±0.07	0.99±0.05	0.95±0.04
KKr (ml/dk/100 g)	0.34±0.03	0.34±0.02	0.35±0.01	0.32±0.01
İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: 0. gün (*) ve 20. gün (**) değerleri ile yapılan karşılaştırmalarda elde edildi (ANOVA ve post-ANOVA testleri).				

Tablo II: CsA grubunda (n: 5) ölçülen parametrelerin günlere göre değerlendirilmesi				
PARAMETRELER	0. GÜN	10. GÜN	20. GÜN	30. GÜN
Tam kan CsA (ng/ml)		4005±93	4027±90	3962±135
Plazma BUN (mg/dl)	17.0±1.9	23.8±3.7	27.2±5.7*	33.6±6.4*,**
Plazma Kreatinin (mg/dl)	0.54±0.05	0.60±0.00	0.58±0.04	0.68±0.04*,***
Rat Ağırlığı (g)	259±43	242±38	231±43	227±57
<b>İdrar</b>				
Hacim (ml)	12.2±2.0	7.2±4.0	7.4±0.6	6.5±2.4*
Mikroprotein (mg/dl)	54.0±5.9	56.2±8.1	60.8±5.2	63.8±9.3
Üre nitrojeni (mg/dl)	1911±311	2391±633	2150±367	2136±803
Kreatinin (mg/dl)	55.0±13.9	83.7±19.2	67.7±27.8	88.4±42.3
Kreatinin (mg/gün)	6.73±2.13	5.42±1.79	4.89±1.86	5.21±1.68
KKr (ml/dk)	0.85±0.19	0.63±0.21	0.58±0.20	0.47±0.10*
KKr (ml/dk/100 g)	0.33±0.03	0.25±0.04	0.24±0.04*	0.21±0.03*
İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: 0. gün (*), 10. gün (**) ve 20. gün (***) değerleri ile yapılan karşılaştırmalarda elde edildi (ANOVA ve post-ANOVA testleri).				

len süre ve dozda kullanımını sınırlayabilmektedir (2,3).

CsA'nın renal toksik etkilerini açıklamak üzere, deneysel ve klinik çalışmalarla desteklenen birçok mekanizma öne sürülmektedir (4,5). Klinik çalışmalarda CsA ile tedavi edilen hastalarda, doku reddi, altta yatan otoimmün hastalık ve ilave terapötik ajanların kullanımı gibi, CsA'dan başka faktörler de renal ve kardiyovasküler etkilere yol açabildiğinden; sadece CsA'dan kaynaklanan yan etkilerin or-

taya konulmasında, deneysel modellere ihtiyaç duyulmaktadır (6). Diğer taraftan, deneysel çalışmalarda CsA ile oluşan renal fonksiyonel ve morfolojik bozuklukların, seçilen hayvan modeline; CsA dozuna; çözücünün özelliklerine; uygulama şekli (oral, sc, iv, ip), hızı ve süresine; beslenme durumuna; ekstraselüler sıvı volümüne ve daha birçok faktöre bağlı olduğu gösterilmiştir (6,7). Bu nedenle, pek çok faktörden etkilenen nefrotoksitesiyi açıklayabilmek için yapılan yoğun hayvan çalışmalarının

standardizasyonu, büyük önem taşıyacaktır.

Bu çalışma, deneysel araştırmalarda kullanılabilir ideal bir model önerebilmek amacıyla, Wistar soyu erkek ratlarda fonksiyonel ve morfolojik nefrotoksisite oluşturabilen uygun CsA dozu, uygulama şekli ve süresini belirlemek için planlandı.

### Gereç ve Yöntem

**Çalışma Grubu:** Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'ndeki (DEKAM) Wistar Albino, 105-120 günlük, 220-290 gr ağırlığında, 50 erkek rat çalışma kapsamına alındı. Çalışma süresince, 12 saat karanlık/aydınlık döngüsünde, normal oda sıcaklığı ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ) ve neminde tutulan ratlar, standart pellet yem ve musluk suyu ile beslendi ve adaptasyon için, çalışmadan en az bir hafta önce aynı deney ortamına alındı.

**Çalışma Planı:** Nefrotoksisiteye yol açan CsA dozunu, uygulama şekli ve süresini belirlemek

amacıyla, toplam 10 ratla bir ön çalışma yapıldı: Her biri 2 ya da 3 rat içeren dört gruba, sırasıyla 20, 30, 40 ve 50 mg/kg/gün dozlarında CsA, intraperitoneal ya da subkutan (sc) olarak uygulandı. Bu ön çalışmanın verilerine göre; çalışma grubunu oluşturan 10 rata, 30 mg/kg/gün dozunda, sc olarak 30 gün süreyle CsA uygulanması planlandı.

Stok CsA (50 mg/ml), kg rat ağırlığı başına %10 etanol içeren 2.0 ml serum fizyolojik (SF) ile uygun şekilde dilüe edilerek günlük uygulanacak dozlar ayarlandı. Kontrol grubuna da, kg rat ağırlığı başına %10 alkol içeren 2.0 ml SF verildi. Ratlar, 3-5 gün aralıklarla tartılarak, deney süresince gerekli doz ayarlamaları yapıldı. Çalışmanın 0. ve 30. günlerinde ratların hepsinden; 10. ve 20. günlerinde her gruptan sadece beşer rattan intrakardiyak yolla elde edilen plazmada ve metabolik kafeste toplanan idrar örneklerinde bazı biyokimya analizleri yapıldı; ratların ağırlıkları ve 24 saatlik idrar volümleri tespit edildi. Son kan örnekleri alın-

**Tablo III. Kontrol ve CsA grubu parametrelerinin günlere göre değerlendirilmesi**

PARAMETRELER	0. Gün		10. Gün		20. Gün		30. Gün	
	Kontrol	CsA	Kontrol	CsA	Kontrol	CsA	Kontrol	CsA
Plazma BUN (mg/dl)	18.1±2.2	18.1±2.2	14.2±1.8	23.8±3.7*	14.8±0.8	27.2±5.7*	15.4±1.6	40.1±12.4*
Plazma Kreatinin (mg/dl)	0.57±0.04	0.55±0.05	0.60±0.06	0.60±0.00	0.56±0.05	0.58±0.04	0.58±0.04	0.65±0.05*
Rat Ağırlığı (g)	271±7	256±37	285±8	242±38	284±9	231±43	299±10	215±42*
<b>İdrar</b>								
Hacim (ml)	15.1±4.9	11.8±2.8	18.1±2.9	7.2±4.0*	17.6±1.7	7.4±0.6*	17.2±4.3	6.9±2.4*
Mikroprotein (mg/dl)	53.3±8.2	53.0±5.4	59.0±11.2	56.2±8.1	63.4±13.6	60.8±5.2	71.4±15.9	71.0±10.5
Üre nitrojeni (mg/dl)	1966±489	1934±415	1753±354	2391±633	1587±309	2150±367	1667±248	2478±651*
Kreatinin (mg/dl)	55.0±18.9	61.5±25.3	47.6±9.1	83.7±19.2*	46.2±7.4	67.7±27.8	52.6±15.7	76.9±31.8
Kreatinin (mg/gün)	7.56±0.82	6.88±1.83	8.41±0.47	5.42±1.79*	8.04±0.86	4.89±1.86*	8.58±0.86	4.89±1.26*
KKr (ml/dk)	0.92±0.09	0.86±0.16	0.98±0.07	0.63±0.21*	0.99±0.05	0.58±0.20*	0.97±0.04	0.49±0.09*
KKr (ml/dk/100 g)	0.34±0.03	0.33±0.03	0.34±0.02	0.25±0.04*	0.35±0.01	0.24±0.04*	0.32±0.01	0.23±0.04*

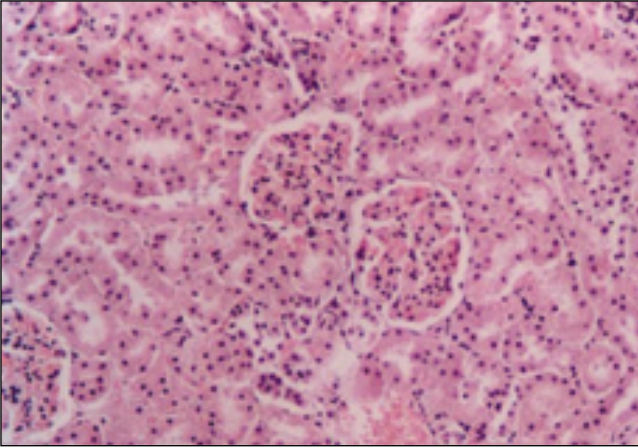
İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: \*: Kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalar sırasında elde edildi (Student t testi).

**Tablo IV. Çalışma gruplarına ait böbrek dokusu histolojik değişiklikleri**

Gruplar	Tübüler vakuolizasyon (%)	Tübüler nekroz (%)	Tübüler dilatasyon (%)	Tübüler atrofi (%)
Kontrol	0	0	0	0
CsA	61.5±19.1*	7±8.9*	19.5±18.6*	5.5±8.3

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: \*: Kontrol ile CsA grubunun karşılaştırılması sırasında elde edildi (Student t testi).



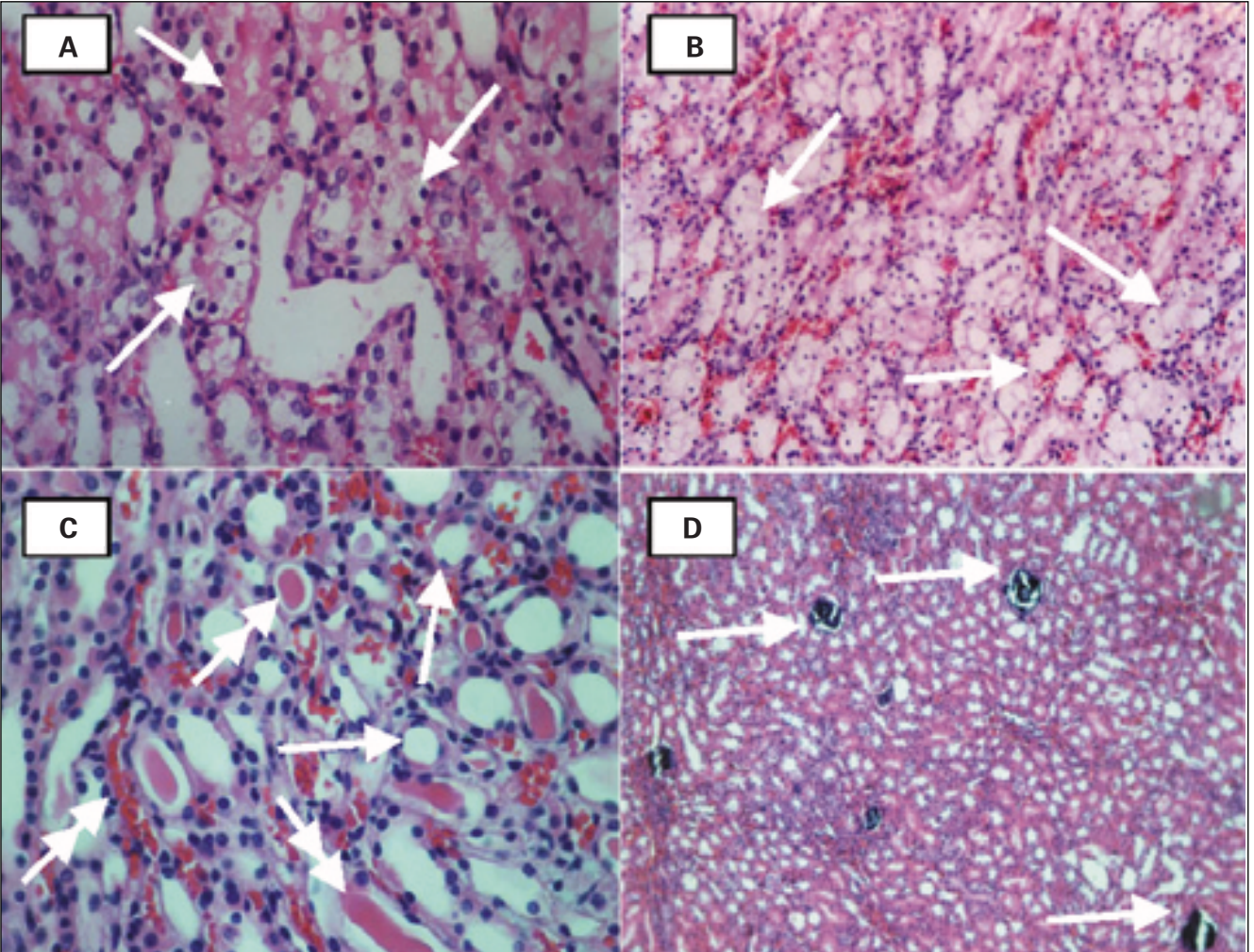


**Resim 1.** Kontrol grubu böbrek dokusunun histolojik görünümü (HEx200).

dıktan hemen sonra, eter anestezisi altında sakrifiye edilen ratların böbrek dokuları %10'luk formalin ile 24 saat fikse edildi ve histopatolojik olarak incelendi.

Ratların plazmasında üre nitrojeni (BUN) ve kreatinin (Kr); idrar örneklerinde de üre nitrojeni, Kr ve mikroprotein seviyeleri, Konelab 60i otoanalizörü ve kitleri kullanılarak tayin edildi. Klirens (KKr) değerleri, ml/dk ve ml/dk/100 g olarak hesaplandı. Histopatolojik değerlendirme sırasında, hazırlanan preparatların her birinde, toplam yüz tübül olacak şekilde incelenen farklı mikroskopik alanlardaki tübüller, vakuolizasyon, nekroz, dilatasyon ve atrofi bulgularına göre, yüzde (%) olarak derecelendirildi (8). Preparatların fotoğrafları çekildi.

**İstatistik Analiz:** SPSS for Windows 10.0 paket bilgisayar programı kullanılarak, CsA ve kontrol



**Resim 2.** CsA grubu böbrek dokusunun histolojik görünümü: **A)** Vakuolizasyon; **B)** Nekroz; **C)** Atrofi (tek ok) ve atrofik lümende proteinize materyal (çift ok); **D)** kalsifikasyon (HEx400).

gruplarında ölçülen parametrelerin günlere göre değişimi, ANOVA ve post-ANOVA (Scheffe prosedür) testleri ile karşılaştırıldı. Histopatolojik bulgular ile ölçüm günlerine göre parametrelerin iki grup arasında karşılaştırılması Student *t* testi ile yapıldı. Anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak kabul edildi.

### Bulgular

Kontrol ve CsA gruplarında plazma BUN ve Kr seviyeleri ile idrarda mikroprotein, üre nitrojeni, Kr ve KKr sonuçları, ağırlık ve günlük idrar volümleri, ölçüm yapılan 0, 10, 20 ve 30. günlere göre, sırasıyla Tablo I ve II'de gösterildi.

Kontrol ratlarında plazma ve idrar parametrelerinin çalışma süresince değişmediği; sadece çalışma sonunda ratların ağırlığında %8 oranında bir artış olduğu belirlendi (Tablo I).

CsA grubunda, 10. günden itibaren, plazma BUN'un yükseldiği; günlük Kr atılımı ve KKr'nin azaldığı; ratların giderek zayıfladığı ve daha az idrar çıkardıkları gözlemlendi. Buna karşılık, idrar mikroprotein, üre nitrojeni ve Kr seviyelerinin, çalışma süresince değişmediği; istatistiki önemi olmasa da, 20. günden itibaren idrarla günlük Kr atılımının azaldığı ve KKr'nin de anlamlı şekilde düşmeye başladığı belirlendi. Uygulamanın 30. gününde bu toksik etkilere ilave olarak, plazma Kr ve idrar üre nitrojeninin de yükseldiği belirlendi (Tablo II).

Çalışmanın 0 ve 30. günlerinde, grupları oluşturan ratların hepsinden; 10 ve 20. günlerinde beşer taneşinden alınan kan ve idrar örneklerine ait bulguların birbirleriyle karşılaştırılması, Tablo III'te verildi. Ölçülen parametrelerin 0. gün değerleri bakımından, çalışma grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Onuncu günde CsA grubunda istatistiki olmasa da, ratların zayıfladığı ve BUN değerlerinin belirgin şekilde yükseldiği; günlük idrar hacminin azaldığı; idrar Kr daha yüksek bulunmakla beraber günlük Kr atılımının azaldığı ve KKr değerlerinin de anlamlı şekilde düştüğü gözlemlendi. Yirminci günde CsA grubunda BUN'un daha yüksek; idrar hacmi, Kr atılımı ve KKr'nin daha düşük olduğu görüldü. Otuzuncu günde, CsA grubunda, ratların belirgin şekilde zayıfladığı ve daha az idrar çıkardıkları; plazma BUN ve Kr seviyelerinin yükseldiği, idrarla günlük Kr atılımının azaldığı ve KKr'nin düştüğü; üre nitrojeni değerlerinin de yükseldiği tespit edildi (Tablo III).

Böbrek histopatolojisinde, CsA grubunda şiddetli tübüler vakuolizasyon, nekroz, dilatasyon ve atrofi gözlemlendi. Ayrıca kortiko-medüller birleşimde kal-

sifikasyonlar bulundu. Kontrol grubu tamamen normal olarak değerlendirildi (Resim 1,2). CsA grubunda gözlenen tübüler vakuolizasyon, nekroz, dilatasyon oluşumuna ait % değerlerin, istatistiki bakımdan anlamlı olduğu belirlendi (Tablo IV).

### Tartışma

Nefrotoksisite, CsA kullanan insanların %75'inde gözlenen bir yan etki olup (3), ilacın özellikle böbrekte toksik etki göstermesinin nedenleri için farklı görüşler ileri sürülmektedir. Doku kültürü çalışmalarında, böbrek hücreleri ile diğer hücreler arasında CsA'nın toksik etkisine duyarlılık açısından fark olmadığı gösterilmiştir (9). Belitsky ve arkadaşlarına (9) göre, farelere nontoksik dozda verilen CsA'nın, kana göre böbreklerde daha yüksek düzeyde olması, ilacın dokuda ilerleyici birikimi ve/veya azalan doku klirensi ile açıklanmaktadır. Aynı çalışmada akciğer, kalp gibi organların CsA toksisitesine karşı daha dirençli olması, bu organlardaki CsA klirensinin nispeten yüksek oluşu ile izah edilmiştir (9). Değişik organların farklı CsA dağılım ve klirensine sahip olmaları, CsA toksisitesine karşı organlar arasındaki hassasiyet farkını açıklayabilir.

CsA dozu ve uygulama süresi ile yakın ilişkili olduğu bilinen CsA'nın nefrotoksik etkileri, yüksek serum Kr düzeyleri ve düşük KKr gibi fonksiyonel ve arteriopatoloji, tübülointerstisyel fibrozis gibi morfolojik bozukluklar olarak değerlendirilebilir (10).

CsA nefrotoksisitenin açıklanabilmesi için kullanılacak en ideal model, hayvan çalışmalarıdır. Ancak maymun, köpek, tavşan, fare ve rat gibi farklı hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarda, farklı türler arasında (ratlarda daha fazla olmak üzere) CsA toksisitesine karşı duyarlılığın farklı olduğu belirlenmiştir (7). Diğer taraftan rat soyları arasında da duyarlılığın değişebileceği gösterilmiştir. Deneysel nefrotoksisite oluşturulmasında, Fischer ratların en duyarlı olduğu ve sırasıyla spontan hipertansif rat, Wistar ve Sprague-Dawley soylarında duyarlılığın giderek azaldığı tespit edilmiştir (11,12).

İnsanlarda ve ratlarda benzer farmakokinetik özelliklere sahip olduğu gösterilen CsA'nın absorpsiyonu, organizmada dağılımı, metabolizması ve organizmadan atılımı; doza, cinsiyete ve yaşa bağımlı olarak değişebilmektedir (11,13,14). Ayrıca insanlara benzer şekilde, dişi ratlarda CsA klirensinin ve erkek ratlarda biyoyararlanımının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (13,14). Duncan ve arkadaşları (12), erkek ratların CsA nefrotoksisitesine daha du-



yarlı olmasını, dişi ve erkek ratlarda CsA'nın farmakokinetik özelliklerinin farklı olmasına bağlamışlardır. Bu nedenle, çeşitli değişkenlerden etkilenen CsA nefrotoksitesinin, ideal bir model olan ratlarda bile oluşturulmasında bazı güçlüklerle karşılaşılması kaçınılmazdır.

Oral 10 mg/kg/gün CsA uygulanan transplant hastalarında, 10 gün içerisinde serum Kr düzeylerinin yükseldiği; Wistar ratlara 30 gün uygulanan, 20 mg/kg CsA ile KKr'nin düşürülemeyeceği; fakat sadece bir hafta uygulanan 50 mg/kg CsA ile Kr değerlerinin yükseldiği bildirilmektedir (7). Ratlara günde 25 mg/kg'ın altında uygulanan CsA dozlarının, böbrek fonksiyonlarını etkilemediğini gösteren çalışmalar da vardır (12). Ayrıca, deneysel çalışmalarda, CsA kullanımıyla ilk dört haftada serum Kr, BUN ve KKr ile yansıtılan fonksiyonel bozuklukların; hepatik sitokrom P 450 sisteminin indüksiyonu ya da nefronlarda dengeleyici hipertrofi gelişimi gibi faktörler nedeniyle, dört haftadan sonra giderek düzelebileceği de öne sürülmektedir (11).

Herhangi bir ajanın renal etkilerini incelemek için rat modeli kullanıldığında; böbrek/vücut ağırlığının ratlarda 1/125, insanlarda ise 1/240 olduğu unutulmamalıdır. Bu fark dikkate alındığında, gram böbrek ağırlığı başına GFD, insanlara göre ratlarda yaklaşık iki kat daha fazla olacaktır (11). Bu yüzden, CsA'nın insanlarda kullanılan dozda uygulanması, ratlarda daha hafif renal etkiler oluşturmaktadır (7). Parenteral uygulamalarda nefrotoksik CsA dozu; insanlarda 3-5 mg/kg iken (2), ratlarda soy ve cinsiyet ile değişmekle beraber, yaklaşık 15-30 mg/kg arasındadır (12).

Erkek Wistar ratlarla yapılan daha sonraki çalışmalarda, kg rat ağırlığı/gün başına; 30 mg/4hafta/ip (15), 20 mg/3hafta/sc (16) ve 30 mg/30gün/oral (17) CsA uygulamaları ile nefrotoksitesite elde edildiği, biyokimyasal ve histopatolojik olarak gösterilmiştir. Deneysel çalışmalarda oral, ip ve sc gibi farklı şekillerde uygulanan CsA, benzer renal histolojik bulgular (18) vermekle beraber; sc uygulama hem daha kolay yapılabilen ve hem de istenilen kan CsA düzeylerini sağlamaktadır (19).

Erciyes Üniversitesi DEKAM'da bulunan, Sprague-Dawley, Wistar ve melez rat soyları arasında, nefrotoksitesiteye en duyarlı rat soyunu belirleyen çalışmanın (20) devamı şeklinde, literatür bilgileri de dikkate alınarak, erkek Wistar ratlarda tübül vakuolizasyonun yanı sıra, nekroz, dilatasyon ve atrofiye neden olan CsA dozunu, uygulama süre ve

şeklini belirlemek amacıyla bir ön çalışma daha yapılmış ve Wistar ratlara 30 gün sc uygulanan 30 mg/kg/gün CsA'nın, nefrotoksitesite için en uygun rat modeli olduğu sonucuna varılmıştır.

Literatürde, ratlara farklı doz, süre ve şekillerde verilen CsA ile plazma BUN ve Kr seviyelerinin yükseldiğini; idrar hacminin (18) ve idrarla günlük Kr atılımının azaldığını ve KKr'nin düştüğünü gösteren pek çok çalışma mevcuttur (18,21-23). CsA'nın oluşturduğu renal hasarı klinik olarak yansıtan bu fonksiyonel değişiklikler, akut CsA nefrotoksitesisi olarak tanımlanmakta ve düşük GFD, yüksek BUN/kreatinin oranı ve oligüriyi içermektedir (18). Bu çalışmada, CsA'nın renal fonksiyonlara etkileri, uygulamanın 10. gününden itibaren başlamış; çalışmanın sonunda BUN ve Kr yükselirken, günlük Kr atılımı ve KKr'nin düştüğü; ratların giderek zayıfladığı ve daha az idrar çıkardığı gözlenmiştir.

CsA'nın günlük idrar atılımına etkileri ile ilgili zıt görüşler vardır. CsA ile idrar hacminin arttığını gösteren Hannemann ve arkadaşları (19) ile Kinzler ve arkadaşlarına (22) göre, CsA glomerüllerden çok tübüleri etkilediğinden, toksisite takibinde plazma Kr, BUN ve KKr yerine, tübül fonksiyonu gösteren idrar hacmi kullanılmalıdır. Bu çalışmanın bulgularını destekler şekilde, akut böbrek yetmezliği ile uyumlu olarak CsA'nın idrar volümünü azalttığını bildiren çalışmalar da vardır (18, 24).

CsA ile oluşan kilo kaybının, ratlarda görülen ishal (25), artmış kas protein katabolizması ve azalmış protein sentezine (22), iştahsızlığa (26), CsA dozuna (18) ve uygulama süresine (21) bağlı olduğu öne sürülmektedir. Bu çalışmada da CsA verilen ratlarda gözlenen ishal ve iştahsızlık tablosunun, ağırlık kaybına katkıda bulunabileceği düşünülebilir.

Her ne kadar literatürde CsA'nın idrar üre nitrojenine etkisini gösteren bir bulgu olmasa da, bu çalışmada 30 günün sonunda üre nitrojen seviyeleri yüksek bulunmuştur. Normal böbrekte toplayıcı kanallarda bulunan ürenin bir kısmının henle kulpu-na doğru absorblandığı bilinmektedir. Bu mekanizma ile yaklaşık 50 kat konsantre edilen üre, olabildiğince az su ile atılabilmektedir. Orta derecede antidiürez durumunda ise, su tasarrufuna katkıda bulunmak için; proksimal tübül sıvısına göre, idrarla 100 kat daha konsantre üre çıkarılmaktadır (27). CsA ile azalan idrar volümünün, idrar üre nitrojenine bu yolla etki yaptığı düşünülebilir. Ayrıca Kinz-

ler ve arkadaşları (22), 30 mg/kg CsA verilen ratlarda gözlenen yüksek plazma BUN değerlerinin; artmış kas protein katabolizması, azalmış idrar akış hızı ve bozulmuş tübüler fonksiyona bağlı olduğunu ve bu nedenle CsA toksisitesinde plazma BUN seviyelerinin renal fonksiyonu ölçmede kullanılmayacağına öne sürmüşlerdir. Bu görüşlere göre, proksimal tübülüse giren üre yükünün ve sonuçta idrar üre nitrojeninin artabileceği söylenebilir.

Nefrotoksik etkinin histopatolojik düzeyde tespit edilmesi, renal fonksiyonların değerlendirilmesi açısından kıymetli bir parametredir (22). Ancak CsA nefrotoksitesinde renal hücre harabiyetinin histopatolojik derecesi ile fonksiyon kaybının şiddeti arasında ilişki olmadığını öne süren çalışmalar da vardır (18,24). Ayrıca, düşük CsA dozlarında renal fonksiyon bozukluğu gözlenirken, yapısal değişiklikler için CsA dozunun daha yüksek olması gerekmektedir (18). CsA'nın glomerüllerden çok, tübüleri etkilediği bilinmektedir (22). CsA verilen ratlarda, böbrek histopatolojisi, tübüler vakuolizasyon (12,16,23), nekroz (23,28), dilatasyon (16,23,28) ve atrofi (16,29) gibi bulguları içerir. Hatta tübüler vakuolizasyonun CsA nefrotoksitesini için nonspesifik, fakat oldukça karakteristik bir lezyon olduğu ve tübülötoksik etkinin doza bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir (16). Ayrıca CsA'nın toksik etkilerinin, proksimal tübülüs içeren medüller böbrek alanlarında daha bariz olduğunu gösteren araştırmalar da yayımlanmıştır (7,18,29).

Bu çalışmada, CsA uygulanan ratların böbrek dokularında tübüler vakuolizasyon başta olmak üzere, tübüler dilatasyon, nekroz ve atrofi oluşumu gözlemlendi. Literatürle uyumlu olan bu histopatolojik bulgular, CsA'nın morfolojik toksisitesini yansıtmaktadır.

Sonuç olarak, erkek Wistar ratlara 30 gün süreyle sc uygulanan CsA'nın fonksiyonel ve morfolojik nefrotoksite oluşturabileceği ve toksisite çalışmalarında bu modelin başarıyla uygulanabileceği söylenebilir.

### Kaynaklar

1. Anon. Sandimmune. Novartis Pharmaceuticals Corporation. T2001-50/89005205 USA, 2001.
2. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji (1. Cilt, 9. Baskı). Feryal Matbaacılık, Ankara, 2000, ss 408-414.
3. Diasio RB, LoBuglio AF. Immunomodulators: Immunosuppressive agents and immunostimulants. In: Molinoff PB, Rudon RW (eds), Goodman Gilman's. The Pharmacological Ba-

- sis of Therapeutics (9th ed). Mc Graw Hill, London, 1996, pp 1296-1299.
4. Olyaei AJ, Mattos AM, Bennett WM. Immunosuppressant-induced nephropathy. Drug Saf 1999; 21:471-488.
5. Thomas S, Andoh TF, Pichler RH, et al. Accelerated apoptosis characterizes cyclosporine-associated interstitial fibrosis. Kidney Int 1998; 53:897-908
6. Porter GA, Andoh TF, Bennett WM. An animal model of chronic cyclosporine nephrotoxicity. Ren Fail 1999; 21:365-368.
7. Thiel G. Experimental cyclosporine A nephrotoxicity: a summary of the international workshop. Clin Nephrol 1986; 25:S205-S210.
8. Mihatsch MJ, Ryffel B, Gudat F, Thiel G. Cyclosporine nephropathy. In: Tisher CC, Brenner BM (eds), Renal Pathology with Clinical and Functional Correlations (2nd ed). J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1994, pp 1641-1681.
9. Belitsky P, Ghose T, Givner M, Rowden G, Poge B. Tissue distribution of cyclosporine A in the mouse: a clue to toxicity? Clin Nephrol 1986; 25:S27-S29.
10. Andoh TF, Bennet WM. Chronic cyclosporine nephrotoxicity. Curr Opin Nephrol Hypertens 1998; 7:265-270.
11. Sullivan BA, Hak LJ, Finn WF. Cyclosporine nephrotoxicity: Studies in laboratory animals. Transplant Proc 1985; 17 (Suppl 1): 145-154.
12. Duncan JI, Thomson AW, Aldridge RD, Simpson JG, Whiting PH. Cyclosporine induced renal structural damage: Influence of dosage, strain, age and sex with reference to the rat and guinea pig. Clin Nephrol 1986; 25:S14- S17.
13. Molpeceres J, Chacon M, Berges L, Pedraz JL, Guzman M, Aberturas MR. Age and sex dependent pharmacokinetics of cyclosporine in the rat after a single intravenous dose. Int J Pharm 1998; 174:9-18.
14. Min DI, Lee M. Gender specific effect on the pharmacokinetics of cyclosporine in healthy subjects. J Kor Soc Health Sys Pharm 2000; 17:405-412.
15. Haberland A, Henke W, Grune T, Siems W, Junk K, Schimke I. Differential response of oxygen radical metabolism in rat heart, liver and kidney to cyclosporine A treatment. Inflamm Res 1997; 46:452-454.
16. Duymelinck C, Denk JT, Dauwe SE, De Broe ME, Verpooten GA. Inhibition of matrix metalloproteinase system in a rat model of chronic cyclosporine nephropathy. Kidney Int 1998; 54:804-818.
17. Trinidad P, Gabriel A, Ramon CJ, et al. Cyclosporine increases local glomerular synthesis of reactive oxygen species in rats: Effect of vitamin E on cyclosporine nephrotoxicity. Transplantation 1998; 66:1325-1329.
18. Mihatsch MJ, Ryffel B, Hermle M, Brunner FP, Thiel G. Morphology of cyclosporine nephrotoxicity in the rat. Clin Nephrol 1986; 25:S2-S8.
19. Hannemann J, Wunderle W, Yousif T, Kruger S, Baumann K. Toxic effect of concomitant administration of cyclosporin A and acyclovir on renal function and morphology in rats. Arch Toxicol 1997; 71:556-562.
20. Gökalp SS, Yazıcı C, Köse K, Canöz Ö. Siklosporin A nefrotoksitesini: Farklı rat modelleri üzerinde çalışmalar. XVIII. Ulusal Nefroloji, Hipertansiyon, Diyaliz ve Transplantasyon Kongresi, 5-9 Eylül 2001, Kapadokya. Özet Kitabı, s 61.
21. Ryffel B, Siegl H, Petric R, Muller AM, Hauser R, Mihatsch MJ. Nephrotoxicity of cyclosporine in spontaneously hyper-

- tensive rats: Effects on blood pressure and vascular lesions. *Clin Nephrol* 1986; 25:S193-S198.
22. Kinzler GJ, Holmes EW, Reckard CR, Jablakow VR, Fresco R, Flanigan RC. The effect of chronic renal insufficiency on cyclosporine nephrotoxicity. *J Urol* 1991; 145:179-83.
23. Tariq M, Morais C, Sobki S, Al Sulaiman M, Al Khader A. Effect of lithium on cyclosporin-induced nephrotoxicity in rats. *Ren Fail* 2000; 22:545-560.
24. Thiel G, Mihatsch MJ, Stahl RA, Hermle M, Brunner FP. Cyclosporine a nephrotoxicity in Goldblatt renovascular hypertension in rats. *Clin Nephrol* 1986; 25:S199-S204.
25. Eldean AS, Dwunwanne A, Junaid Ta, Yacoub T. Experimental studies on multiorgan toxicity of cyclosporine A in rats using a radiopharmaceutical and comparison with histopathological findings. *Hum Exp Toxicol* 1996; 15:867-871.
26. Brunner FP, Hermle M, Mihatsch MI, Thiel G. Mannitol potentiates cyclosporine nephrotoxicity. *Clin Nephrol* 1986; 25:S130-S136.
27. Guyton AC. The kidneys and body fluids. In: Wonsiewicz MJ (ed), *Guyton Text Book of Medical Physiology* (8th ed), WB Saunders Company, Philadelphia, 1991, pp 324-325.
28. Zhong Z, Arteel GE, Connor HD, et al. Cyclosporine-A increases hypoxia and free radical production in rat kidneys-prevention by dietary glycine. *Am J Physiol* 1998; 275:595-604.
29. Sobh M, Sabry A, Moustafa F, Foda MA, Sally S, Ghoneim M. Effect of colchicine on chronic cyclosporine nephrotoxicity in Sprague-Dawley rats. *Nephron* 1998; 79:452-457.