

Siklosporin A'nın sıçanlarda oluşturduğu nefrotoksisiteye Vitamin C ile Vitamin E'nin ve verapamilin etkilerinin ışık mikroskobunda değerlendirilmesi

Mehmet Ural*, Meltem Özgüner*, Dilek Şenal*, Recep Sütçü**, Namık Delibaş**

*Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD., Isparta

**Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya AD., Isparta

Özet

Amaç: Siklosporin A (CsA) organ nakillerinde atılımı önlemede önemli bir kullanım alanına sahiptir. Bu güçlü bağışıklık sistemini baskılayıcı ajanın en önemli yan etkisi nefrotoksisitedir. Bu yan etkinin oluşumunda suçlanan en önemli iki mekanizma; i) böbrekte afferent arteriyolde yaptığı vazokonstriksiyon ii) antioksidan sistem enzimleri üzerine yaptığı etki serbest oksijen radikallerini arttırmasıdır. CsA uygulanan deneklere antioksidan özelliği olan Vit E ve Vitamin C ile birlikte kalsiyum kanallarını bloke ederek vazodilatatör etkinlik gösteren verapamil vererek, farklı deney gruplarında böbrek korteksindeki histopatolojik değişiklikleri değerlendirmek ve bu değişikliklere antioksidan ve vazodilatatör ajanların tek tek ve birlikte verildiklerindeki etkilerini araştırmak amacıyla bu çalışmayı yaptık. **Materyal ve Metod:** 25 sıçan; kontrol grubu, siklosporin A (CsA) verilen grup, CsA+ vitamin E ve C verilen grup, CsA+verapamil verilen grup ve CsA+vitamin+verapamil verilen grup olmak üzere beş gruba ayrıldı. 10 gün boyunca CsA nazogastrik sonda ile oral olarak 50 mg/kg dozunda, E vitamini 150 mg/kg dozunda intramüsküler olarak; C vitamini 200 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak, verapamil 0.5 mg/kg dozunda intramüsküler olarak verildi. Çalışmanın sonunda sıçanların kanları ve böbrek dokuları eter anestezisi altında alındı. Böbrek dokusu %10'luk formolde tespit edildi. Rutin histolojik takip ile bloklanan dokulardan 5µm'lik kesitler alındı ve hematoksilin-eozin ile boyanarak değerlendirildi. **Bulgular:** Çalışmamızın sonunda CsA verilen grupta histolojik olarak belirgin yapısal değişiklikler ortaya çıktı. Bu değişiklikler CsA + vitamin E ve C verilen grup ve CsA + verapamil verilen gruplarda kısmen düzelmekle birlikte; normal histolojik yapıya en yakın görünüm CsA + vitamin + verapamil alan grupta görüldü. Ayrıca böbrek dokusunda antioksidan enzimlerden glutatyon proksidaz ve katalazda en belirgin yükselme ve böbrek fonksiyon testlerinden BUN ve kreatininin de en belirgin düzelmeye de bu grupta izlendi. **Sonuç:** CsA'nın yaptığı nefrotoksisitenin önlenmesi için; verapamil, vitamin E ve C'nin birlikte kullanılmasının daha faydalı olacağı kanaatindeyiz.

Anahtar kelimeler: Siklosporin A, Nefrotoksisite, Verapamil, Vitamin E, Vitamin C

Abstract

Effects of Vitamin C, Vitamin E and verapamil on cyclosporin induced nephrotoxicity in rats: a light microscobic study

Aim: Cyclosporin A (CsA) is an important agent used in organ transplantation to prevent rejection. This immunosuppressive drug's most important secondary effect is nephrotoxicity. There are two hypotheses for the nephrotoxicity mechanism i) vasoconstriction in afferent arteriole ii) the role of reactive oxygen species. In this study we planned to see the individual or combined effects of antioxidant vitamins E and C with a calcium channel blocker verapamil. **Materials and Methods:** 25 rats divided into five groups equally; a vehicle group, CsA treated group, CsA + vitamin E and C treated group, CsA + verapamil treated group and CsA+ vitamin E and C + verapamil treated group. CsA administered 50 mg/kg/day (per oral by catheter), vitamin E administered 150 mg/kg/day (intramuscular), vitamin C administered 200 mg/kg/day (intraperitoneal), verapamil administered 0.5 mg/kg/day (intramuscular) for 10 days. At the end of study rats' blood samples and kidney tissues were taken under ether anesthesia. Tissue sections of kidney were fixed in %10 formalin. Parafin sections were cut at 5 µm, then examined after staining with hematoxylin-eosin. **Results:** In CsA treated rats, significant morphological changes were observed in kidney sections. Although in CsA + vitamin E,C and CsA + verapamil treated rats, these changes were reduced but the most significant improvement observed in the CsA + vitamin C and E + verapamil treated group. Also most significant rise of antioxidant enzymes, catalaz and glutathion peroxidase

Yazışma Adresi: Uzm. Dr. Mehmet URAL
Dr. Faruk Sükan Doğum ve Çocuk Hastanesi
Nalçacı / KONYA
E-mail: ural15@yahoo.com

in renal tissue was seen in this group. Conclusion: We suggest that using the combination of verapamil, vitamin E and C will be more useful to prevent the nephrotoxicity caused by CsA.

Key words: Cyclosporin A, Nephrotoxicity, Verapamil, Vitamin E, Vitamin C

Giriş

Siklosporin A (CsA), organ nakillerinde reddi önlemede önemli bir kullanım alanına sahiptir (1) ve en önemli yan etkisi nefrotoksitesidir (2,3). CsA'nın kullanımı transplantasyon hastalarının yaşam kalitesini ve süresini arttırmıştır (4,5). CsA hastalarda yaşam süresinin artmasında, doku reddinin ve hastanede kalma süresinin azalmasında çok etkilidir (6,7). Akut CsA nefrotoksitesisi kendini geri dönüşümlü olarak böbrek kan akımında azalma ve glomerüler filtrasyon hızında düşüş ile gösterir; kronik nefrotoksitesite ise geri dönüşümsüz tubulointerstisyel fibrozis ile karakterizedir (8-11). CsA'nın afferent arteriollerde vazokonstriksiyon yaparak nefrotoksitesiteye neden olabileceği ileri sürülmüşse de bu yan tesirin mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır (12-14). Vazokonstriksiyona bağlı olarak gelişen iskemi ve nekroz sırasında açığa çıkan serbest oksijen radikallerinin de CsA'nın nefrotoksik etkisinde rol oynayabileceği düşünülmüştür. Bazı yayınlar CsA'nın böbrekte mikrozomal lipid peroksidasyonuna yol açtığını, Vitamin E'nin lipid peroksidasyonunu baskılayıcı etkisinin CsA nefrotoksitesisini azalttığını göstermişlerdir (15,16,17). CsA uygulamasını takiben lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA)'nın böbrek korteksinde arttığı gösterilmiştir (18). Bu nedenle lipid peroksidasyonunu baskılayan antioksidanlar CsA nefrotoksitesisinde reaktif oksijen radikalleri tarafından oluşturulan böbrek hasarını sınırlandırabilirler (17). Vitamin E (Vit E), oksijen radikallerinin hücre membranı lipitlerine karşı başlattıkları oksidatif reaksiyonu antioksidan etkisi ile önler ve hücreyi koruyucu etkinlik gösterir (19,20). Yapılan çalışmalarda Vit E'nin böbrek, karaciğer (KC), ve miyokard iskemisine karşı koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır (21,22). C vitamini de güçlü indirgeyici etkisi nedeniyle ideal bir antioksidandır (23,24). CsA nefrotoksitesisinde verapamil ve vitaminlerin etkileri tek tek çalışılmıştır fakat literatürde birlikte kullanıldıklarındaki etkileri ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu bilgilere dayanarak, CsA uygulanan deneklere antioksidan özelliği olan vitamin E ve vitamin C ile birlikte kalsiyum kanallarını bloke ederek

vazodilatör etkinlik gösteren verapamili vererek, böbrek korteksindeki yapısal değişiklikleri değerlendirmek ve bu değişikliklere antioksidan ve vazodilatör ajanların tek tek ve birlikte etkilerini araştırmak amacıyla bu çalışmayı planladık.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada ağırlıkları 220-340 gram arasında değişen, ortalama 6-8 aylık, toplam 25 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan kullanıldı (n = 25). Deney süresince hayvanlara yeteri kadar (ad libitum) su ve yem (Yem Kurumu Standart Sıçan Yemi) verildi. Bu çalışmada, dört ayrı deney grubu ve bir kontrol grubu oluşturuldu. Her deney grubunda 5 sıçan kullanıldı. 10 gün boyunca grup I'e nazogastrik sonda ile oral olarak 50 mg/kg dozunda CsA verildi. Grup II'ye CsA nazogastrik sonda ile 50 mg/kg dozunda oral olarak; E vitamini 150 mg/kg dozunda intramüsküler olarak; C vitamini 200 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak verildi. Grup III'e CsA nazogastrik sonda ile 50 mg/kg dozunda oral olarak; verapamil 0.5 mg/kg dozunda intramüsküler olarak verildi. Grup IV'e CsA nazogastrik sonda ile 50 mg/kg dozunda oral olarak; E vitamini 150 mg/kg dozunda intramüsküler olarak; C vitamini 200 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak; verapamil 0.5 mg/kg dozunda intramüsküler olarak verildi. Grup V (kontrol grubu)'e nazogastrik sonda ile distile su; intramüsküler ve intraperitoneal olarak 1 ml serum fizyolojik verildi.

Deney süresinin sonunda, sıçanlardan eter anestezisi altında biyokimyasal analiz için kan örnekleri alındı. Sağ böbreklerin yarısı, dokuda antioksidan enzim ölçümü için alındı ve fosfat tamponuna konuldu. Histolojik çalışma için de kalan böbrek dokuları %10'luk formalinde tespit edildi. Rutin doku takip işlemlerinin ardından, dokular parafine gömüldü ve elde edilen parafin bloklardan Leica SM2000R marka mikrotomda 5 µm'lik kesitler alındı. Alınan kesitler hematoksilin eozin (H-E) ile boyandı ve ışık mikroskopunda değerlendirildi.

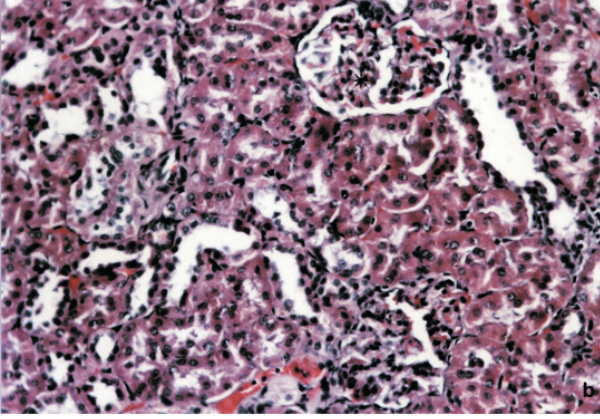
Serum BUN ve kreatinin ölçümleri, Roche-Hitachi modüler P-8000 cihazında yapıldı. Böbrek dokusunda katalaz (Catalase; CAT) aktivitesi Aebi'nin yöntemine göre (25), GSH-Px (glutatyon peroksidaz) aktiviteleri Paplia ve Valentina'nın yöntemine göre ölçüldü (26). İstatistiksel değerlendirmeler, "SPSS® 7.0 for

Windows” istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Bağımsız farklı iki grubun karşılaştırılması Mann-Whitney U testi ile yapıldı ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Işık Mikroskopik Bulgular

Kontrol grubu olarak alınan sıçanlara ait böbrek doku kesitlerinin histolojik incelenmesinde, bu organa has normal histolojik yapılar dışında herhangi bir bulguya rastlanmamıştır (Şekil 1).

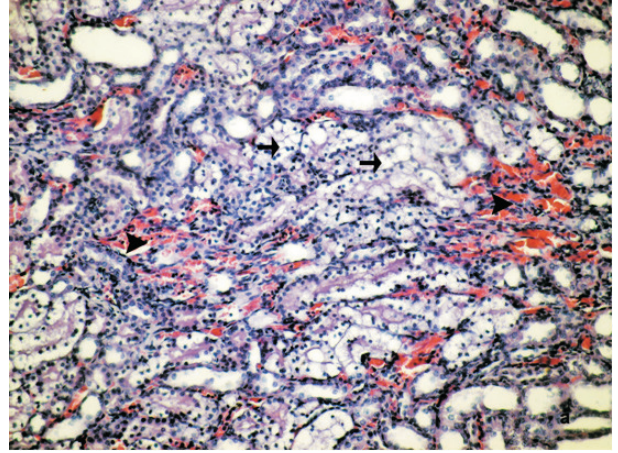


Şekil 1. Kontrol grubuna ait sıçan böbrek dokusunun korteks bölgesinde (a: x400 ; b : x200) normal glomerul ve tubuler yapılar görülmekte a: distal tübül (yıldız), proksimal tübül (ok başı), glomerül (kalın ok) ve Bowman kapsülü pariyetal yaprağı (ince ok) b: Glomerül (yıldız)(Hematoksilen-Eozin).

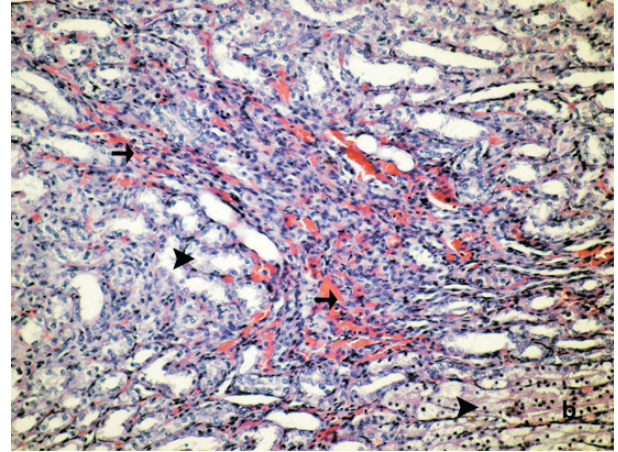
CsA verilen gruptaki sıçanların böbrek doku kesitleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, yapısal olarak belirgin değişiklikler gözlemlendi. Bu değişiklikler glomerül ve tübüllerde yapısal düzensizliklerin yanı sıra perivasküler ve peritübüler alanlarda mononükleer hücre infiltrasyonlarını içeriyordu. Mononükleer hücre infiltrasyonları, daha çok korteksin orta bölgelerinde ve medulla - korteks bileşkesinde yerleşti. Çoğu alanda peritübüler kapiler konjesyon ve kanama odakları vardı. Glomerul ve tübüllerin hemen hemen tamamının CsA'dan etkilenmiş olduğu görüldü. Distal ve özellikle proksimal tübüllerin parankim hücre sitoplazmasında, artmış vakuoller dejenerasyonlar nedeniyle köpüğümsü görünüm belirdi. Tübül parankim hücrelerinde piknotik çekirdeklere ve hidropik değişikliklere oldukça sık rastlanıldı (Şekil 2).

CsA ile birlikte Vitamin E+C uyguladığımız sıçan grubunun böbrek dokusu histolojik olarak incelendiğinde; CsA uygulaması sonucunda oluşan perivasküler ve peritübüler alanlarda mononükleer hücre infiltrasyonları, peritübüler kapiler konjesyon ve kanama odakları ve tübüllerde köpüğümsü

görünüm gibi yapısal değişikliklerin büyük oranda devam ettiği fakat tek başına CsA uygulanan gruptaki kadar yaygın olmadığı gözlemlendi. Malpighi cisimciklerinde kapiler yumak, Bowman boşluğu, izlenen mezenşiyal ve ekstremezşiyal hücreler normal histolojik yapıya yakın bir görünümde izlendi. Buna karşın proksimal ve distal tübül parankim hücrelerindeki vakuolizasyon piknotik çekirdekler gibi yapısal değişikliklerin devam etmekte olduğu gözlemlendi. (Şekil 3).



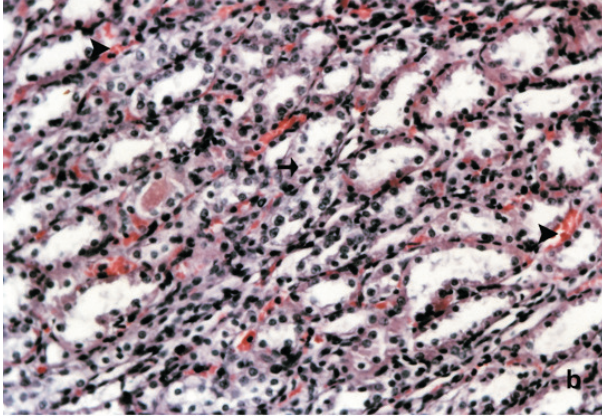
Şekil 2: CsA verilen grubun böbrek dokusunun korteks bölgesinde iki (a: x200, b: x400) tübüllerdeki ileri derece vakuolizasyon (ince ok) ve piknotik çekirdekler (dalgali ok), Bowman boşluğunda genişleme (yıldız) ve konjesyon ve kanama alanları gözlenmekte (ok başı) (Hematoksilen-Eozin)



Şekil 3: CsA+ vitamin E+C verilen grubun böbrek dokusu (a: x100, b: x200). Peritübüler kapiler konjesyon ve kanama alanları (ince ok), vakuollü tübüller (ok başı) gözlenmekte (Hematoksilen-Eozin)

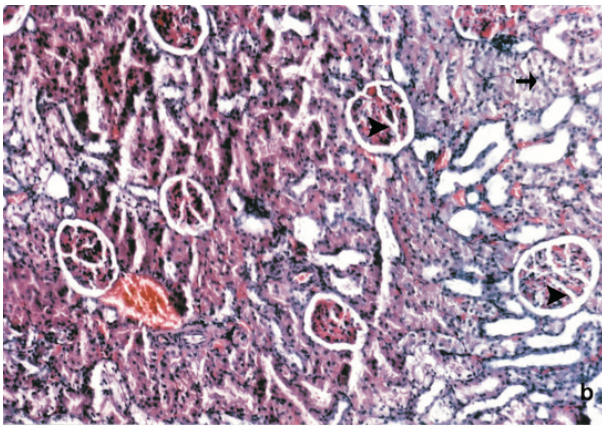
CsA ile birlikte verapamil verdiğimiz sıçan grubunun böbrek dokusu histolojik olarak incelendiğinde; CsA uygulaması sonucunda oluşan yapısal değişikliklerin azaldığı görüldü. Korteksin derin bölgelerinde özellikle proksimal tübül yapılarında vakuolizasyon devam etmekteydi. İnfiltrasyon alanları azalmış olup,

peritübüler kapiler konjesyon sınırlıydı. Malpighi cisimciklerinde kapiler yumak, Bowman boşluğu, mezenşiyal ve ekstramezenşiyal hücreler normal histolojik yapıya yakın bir görünümdeydi (Şekil 4).



Şekil 4: CsA+ verapamil verilen grubun böbrek dokusu (a: x100, b: x200). a: Çok yaygın olmayan tübüler vakuolizasyon (ok başı); b: Peritübüler kapiler konjesyon alanları (ok başı) ve tübüler vakuolizasyon (ince ok) görülmekte (Hematoksilen-Eozin).

CsA ile birlikte verapamil ve vitamin E+C uyguladığımız sıçan grubunun böbrek dokusunun ışık mikroskopunda incelenmesinde; CsA uygulaması sonucunda oluşan yapısal değişikliklerin önemli ölçüde azaldığı saptandı. Bununla birlikte özellikle kortikomedüller bölgedeki tübüllerde vakuolizasyon ve piknotik çekirdeklerin sebat ettiği gözlemlendi. Böbrek dokusunun birkaç alanında da peritübüler kapiler konjesyon ve mononükleer hücre infiltrasyonuna rastlandı. Malpighi cisimciğinde Bowman boşluğu ve kapiler yumak normale yakın olarak izlendi (Şekil 5). Çoğu kesitte proksimal ve distal tübüllerin ve damar yapılarının normale yakın bir histolojik yapıda oldukları belirlendi.



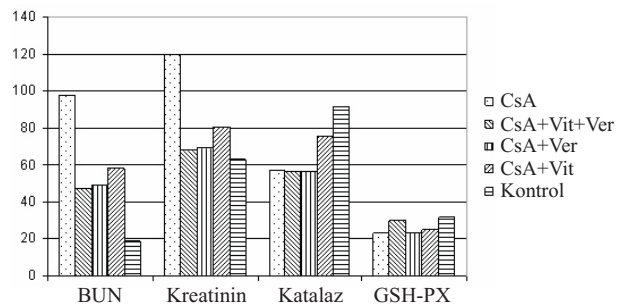
Şekil 5: CsA+verapamil+vitamin E+C verilen grubun böbrek dokusu (a: x200, b: x100). Piknotik çekirdekler içeren vakuolize tübüller (ince ok) ve normal histolojik yapıya yakın görünümlü Malpighi cisimcikleri (ok başı) görülmekte. (Hematoksilen-Eozin)

Biyokimyasal Bulgular

Deney sonunda elde edilen biyokimyasal değerler Şekil 6'da, gruplar arasındaki istatistiksel fark Tablo 1'de toplu olarak gösterilmiştir.

Tablo 1: Biyokimyasal değerlerin gruplar arasında karşılaştırılması ;"-:değişiklik yok, *:p<0.05, **: Grupların karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

Grupların Karşılaştırılması**	BUN	Kreatinin	Katalaz	GSH-PX
Kontrol/CsA	↑*	↑*	↓*	↓*
Kontrol/CsA+Vitamin	↑*	↑*	↓	↓*
Kontrol/CsA+verapamil	↑*	↑	↓	↓*
Kontrol/CsA+vitamin+ver	↑*	↑	↓	↓
CsA/CsA+Vitamin	↓*	↓*	↑	↑
CsA/CsA+Verapamil	↓*	↓*	-	-
CsA/CsA+vitamin+ver	↓*	↓*	-	↑*
CsA+Vitamin/CsA+Verapamil	↓*	↓*	↓	↓
CsA+Vitamin/CsA+vitamin+ver	↓*	↓*	↓	↑*
CsA+Verapamil/CsA+vitamin+ver	↓	↓	↓	↑*



Şekil 6: Serum BUN ve kreatinin değerlerinin ve böbrek dokusu katalaz ve GSH-PX aktivitelerinin kontrol ve deney gruplarında karşılaştırılması (Kreatinin ve GSH-PX değerleri 100 ile, Katalaz değeri 10 ile çarpılmıştır) (CsA:Siklosporin A, Vit: vitamin E ve C, Ver: verapamil, BUN: Kan üre azotu, GSH-PX: glutatyon peroksidaz) (böbrek dokusu GSH-PX ve CAT değerleri: ünite/mg protein)

Tartışma

CsA 1976 yılında bulunduğundan bu yana organ nakillerinde reddi önlemede önemli kullanım alanına sahip bağışıklık sistemini baskılayıcı bir ajandır (1). CsA nefrotoksitesisi için en çok kabul edilen hipoteze göre, CsA'nın ilk etki yeri glomerüler arteriolün başlangıç kısmıdır. Burada vasküler tonüsü artırır (27). CsA nefrotoksitesisinde suçlanan diğer bir mekanizma da, CsA'nın hücre membranında yaptığı lipid peroksidasyonu sonucunda serbest oksijen radikallerini artırarak yaptığı oksidatif hasar

mekanizmasıdır (28,29).

Her iki böbreğin tüm nefronlarında birim zamanda üretilen glomerüler filtrat miktarı glomerüler filtrasyon değeri (GFD) olarak bilinir. Glomerüler filtrasyonun azalması sonucu BUN ve kreatinin serum seviyeleri artmaya başlar (30).

Proksimal tübüllerin özellikle medulla korteks bölgesinde yoğunlaşmış olan son kısmı, CsA metabolizmasında görevli P-450 oksidazları içeren peroksizomlardan çok zengin olup (31,32), bu bölgede CsA'nın metabolitlerine ayrılması esnasında oksidazların inhibe olması nedeniyle hücre içerisinde daha çok madde birikimi meydana gelmektedir. Ayrıca Venkatachalam ve ark., hayvan modellerinde bu bölgenin iskemik hasara en hassas bölge olduğunu bildirmişlerdir (33).

Sitoplazmaya giren CsA'nın detoksifikasyonu amacı ile endoplazmik retikulumun genişlediğini ve bir süre sonrada sitoplazmada vakuolleşmeye gittiğini düşünmekteyiz. Mitokondriyonun enerji üretmemesi ve düz endoplazmik retikulumun sürekli kayba uğraması sonucunda hücrede fonksiyon kaybı, hidropik şişme ve atrofi meydana gelecektir. Kim AY ve ark., yaptıkları çalışmada bazı vakuollerin nötral yağ damlaları, bazılarında ER'un dilatasyonu sonucunda oluşmuş membranla ilişkili yapılar olduğunu; sitoplazmik inklüzyon cisimciklerinde genişlemiş otolizozomlar olduğunu göstermişlerdir (34).

CsA çok lipofilik bir bileşik olup hücre zar yapılarına kolaylıkla bağlanabilir (35). Zarlar ve özellikle ER zarları fazla miktarda doymamış yağ asitleri içermeleri nedeniyle peroksidatif hasara karşı çok duyarlıdır (36,37). Bunun yanısıra zarlar geniş yüzey alanına sahip olduğu için oksidatif atağa maruz kalma olasılığı da sıktır (17). İlaçların etkisiyle oluşan serbest radikaller ve lipit peroksidasyonu, nefrotoksisite ve hücre hasardan sorumlu olası patolojik mekanizmalardan biridir (36). Daha önce yapılan çalışmalarda, CsA'nın nefrotoksik etkilerine katkıda bulunabilecek peroksidatif özellikleri olduğunu göstermiştir (38).

Antioksidan enzimler SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazdır. İlk üç enzim peroksidatif ve süperoksit toksik olmayan türlerini katalizleyerek serbest oksijen radikali hasarını azaltırlar (39).

Mun KC ve ark., yaptıkları bir çalışmada CsA'nın serum BUN kreatinin ve böbrek dokusu lipit peroksidasyon ürünü olan MDA seviyelerinde anlamlı artışlar yaptığını ve antioksidan bir ajan olan melatonin

tedavisinin bu değerlerde önemli düşüşler yaparak serbest radikal hasarını ve CsA nefrotoksisitesini azalttığını göstermişlerdir (40).

Durak I ve ark., tavşanlarda CsA verilen grupta böbrek dokusunda GSH-PX ve katalaz aktivitelerini düşük olarak bulmuşlardır (41).

Özdemir M ve ark., yaptıkları çalışmada CsA verilen grupta yükselen serum ürik asit ve BUN değerlerinin, vitamin E tarafından düşürüldüğünü, ayrıca CsA'nın neden olduğu tübüler nekrozun vitamin E tarafından azaltıldığını göstermişlerdir (42).

Çalışmamızda CsA'nın doğrudan etkisi sonucu oluşan lipit peroksidasyonu ve afferent arteriyoldeki vazokonstriksiyon sonucu oluşan iskemi neticesinde ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin etkisini azaltabileceğini düşünerek CsA ile birlikte E ve C vitaminini kullandık.

Suda çözünen bir vitamin olan C vitaminini, ekstraselüler sıvıda bulunan en önemli antioksidan madde (23,24) ve hücre içinde de antioksidan etkinliği olması nedeniyle; yağda çözünen bir vitamin olan E vitaminini de, hücre membran fosfolipitlerinin oksitlenerek peroksid türevlerine dönüşmelerini hücre membranında önleyebilen en güçlü antioksidan olması sebebiyle kullandık (43). Antioksidan etkinin en üst düzeyde olması için çalışmamızda E ve C vitaminini birlikte kullandık.

Çalışmamızda CsA ve vitamin E+C verdiğimiz sıçan grubunun böbrek dokusunu incelediğimizde tek başına CsA verdiğimiz gruptaki yapısal değişikliklerin büyük oranda devam ettiğini, ancak tek başına CsA verilen gruptaki kadar yoğun olmadığını gördük. Tübüllerdeki patolojik görünümün sürmesine, peritübüler kapiler konjesyon ve kanama alanlarının izlenmesine rağmen Malpighi cisimciği normal histolojik yapıya yakın bir görünümde izlendi. Malpighi cisimlerindeki düzelmenin, E ve C vitaminlerinin iskemik hasarda etkili olan serbest oksijen radikalleri oluşumunu azaltmasına bağlı olduğunu ve proksimal tübüldeki hasarın devam etmesini ise bu bölgenin CsA'ya ilk maruz kalan ve en hassas bölge olması nedeniyle olduğu düşünüldü. CsA ve vitamin E+C verdiğimiz sıçan grubunun biyokimyasal bulgularının literatür bilgileri ile uyumlu olduğu gözlemlendi. CsA ile birlikte vitamin E+C verdiğimiz sıçanların böbrek fonksiyon testlerinde düzelme olduğu saptandı. Serum BUN ve kreatinin değerleri kontrol grubuna göre hala anlamlı olarak yüksek olmakla birlikte, CsA verilen gruba göre anlamlı bir düşüş olması Vitamin E+C'nin koruyucu etkisini gösterdiğini düşündürdü. Böbrek dokusundaki katalaz ve GSH-PX değerlerinin CsA

grubuna göre yükselmiş olması da (istatistiksel olarak anlamlı değil) bunu destekleyen bir bulgu olarak değerlendirildi.

Yapılan deneysel çalışmalarda, CsA kullanımı ile güçlü bir vazokonstrüktör olan tromboksan B2'nin idrarla atılımının arttığı, bir vazodilatator olan PGE2'nin üretiminin azaldığı gösterilmiştir (44,45). Yine sıçanlarda yapılan bir çalışmada, CsA verilen sıçanlardan alınan böbrek biyopsilerinde SEM ile afferent arteriyollerde daralma gösterilmiştir (46). CsA aracılıklı vazokonstrüktör etkiye vasküler düz kas hücrelerindeki artmış kalsiyum hareketi aracılık edebilir. CsA'nın transmembranal kalsiyum iç akımını uyardığı gösterilmiştir. CsA vasküler düz kas hücrelerinde anjiyotensin II'nin neden olduğu kalsiyum akışını; anjiyotensin II'ye duyarlı hücre içi kalsiyum depolarını arttırmaktadır (47). Mansour ve ark., yaptıkları çalışmada sıçan böbreğinde NO üzerinden vazodilatasyon yapan bir ajan olan L-arjininin, CsA'nın neden olduğu böbrek fonksiyonlarındaki ve histolojik yapıdaki bozulmayı azalttığını göstermişlerdir (48). Darlametsos ve ark., CsA ile birlikte Ca⁺⁺ kanal blokleri olan nifedipin verdikleri çalışmalarında nifedipinin, CsA'nın böbrekteki fonksiyonel toksisitesini azaltıcı etkileri olduğunu göstermişlerdir (49). L'Azou ve Ark., izole sıçan glomerülünde, alan değişiklikleri ile ilgili yaptıkları çalışmada, CsA bulunan ortamda glomerül çapının küçüldüğünü ve verapamil ile bu çaptaki değişimin azaldığını göstermişlerdir (50). Bu çalışmalara dayanarak bir kalsiyum kanal blokleri olan verapamili çalışmamızda kullandık. CsA ile birlikte verapamil verdiğimiz sıçan grubunun böbrek dokularını histolojik olarak incelediğimizde CsA uygulaması ile oluşan yapısal değişikliklerin azalmış olduğunu gözlemledik. CsA grubunda çok yaygın olan tübül vakuolizasyonun görüldüğü alanlar bu deney grubunda sadece korteksin derin bölgelerinde izlendi. Verapamilin yaptığı preglomerüler vazodilatasyonun (51), CsA tarafından afferent arteriyolde oluşturulan vazokonstrüksiyon sonucunda gelişen yapısal değişiklikleri azalttığı düşünüldü. Ancak CsA'dan en fazla etkilenen yapı olan proksimal tübüldeki değişiklikleri önlemede yetersiz kaldığı gözlemlendi.

CsA ve verapamil uygulanan grupta biyokimyasal bulgulardan BUN ve kreatinin değerlerindeki, CsA uygulanan gruba göre anlamlı düşüş, histolojik bulgular ile uyumaktadır ve verapamilin koruyucu etkisini göstermektedir. Katalaz ve GSH-PX değerlerinin ise CsA grubuna göre değişiklik

göstermediği saptandı. Bu verilerin sonucunda tek başına verapamilin antioksidan sistem enzimleri üzerine olumlu bir etkisinin olmadığı düşünüldü. CsA + verapamil verilen grupta, CsA+ vitamin verilen gruba göre BUN ve kreatinin değerlerinde anlamlı düşüşün gözlenmesi, verapamilin CsA nefrotoksitesine karşı vitamin E+C'den daha koruyucu olduğunu göstermektedir. Bu bulgu histolojik görünüm ile de uyumludur.

Çalışmamızda CsA + verapamil + Vitamin E ve C'yi birlikte kullandığımız grubun böbrek dokusunu incelediğimizde, CsA uygulaması sonucunda oluşan yapısal değişikliklerin önemli ölçüde azaldığını saptadık. CsA + verapamil + Vitamin E ve C verdiğimiz grubun böbrek dokusunun, CsA+verapamil ve CsA+vitamin E ve C verdiğimiz gruplara göre daha az yapısal değişiklik içerdiğini gözledik. Bununla birlikte hala kortikomedüller bölgedeki tübüllerde vakuolizasyon ve piknotik cisimlere rastlamamız, bu bölgedeki güçlü CsA etkisinin önlenmesinde bu ilaç birlikteliğinin yetersiz kaldığını göstermektedir.

Biyokimyasal olarak böbrek fonksiyon testlerinden BUN ve kreatinin değerlerinin CsA, CsA+ vitamin E ve C verilen gruplardan anlamlı derecede düşük çıkması, bu birlikteliğin koruyuculuğunu gösterse de, özellikle BUN değerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek kalması CsA toksisitesinin yeterince önleyemediğini göstermektedir.

Sonuç olarak böbrek nakillerinde bağışıklık sistemini baskılayıcı olarak kullanılan CsA'nın oluşturduğu nefrotoksitesinin önlenmesinde, hasarı oluşturan mekanizmaları düzeltmek en etkili yöntemdir. Ancak CsA nefrotoksitesinin oluşumunda birden fazla mekanizma rol oynamaktadır. Mekanizmalardan biri olan, antioksidan sistem baskılanmasını önlemeye yönelik verilen vitamin E+C ile, oluşan nefrotoksitesinin, klinik ve yapısal açıdan çok az düzeltilebildiği saptandı. Aynı şekilde afferent arteriyolde meydana gelen vazokonstrüksiyon mekanizmasının sonucu oluşan iskemik böbrek hasarını önlemek amacıyla verilen bir kalsiyum kanal blokleri olan verapamilin de klinik ve yapısal bulguları çok az düzelttiği ortaya kondu.

Bununla birlikte çalışmamızın esas amacını oluşturan ve literatürde hiç rastlamadığımız vitamin + kalsiyum kanal blokleri birlikteliğinin, nefrotoksitesiyi önlemedeki etkisinin bu ajanların tek tek kullanıldığındaki etkilerinden daha yüksek olduğunu saptadık.

CsA kullanımındaki nefrotoksitesinin önlenmesi için

yapılacak diğer çalışmalarda ve klinik uygulamalardaki ilaç seçimlerinde, bu bulgularımızın faydalı olacağı kanaatindeyiz.

Kaynaklar

- Dieperink H. Cyclosporin A nephrotoxicity. Dan.Med.Bull. 36:235-248, 1989
- Bennet WM. The nephrotoxicity of immunosuppressant drugs. Clin Nephrol, 43:s3-7, 1995
- Dieperink H, Frandsen NE, Kemp E. Cyclosporin A. Bright prospects for organ transplantation?. Ugeskr Laeger. 145:36:2749-52,1983
- Borel JF,Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphotic agent, Agents Actions, 43:179-186,1976
- Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Pentlow BD, Rolles K. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. Lancet, 2:1323-1327,1978
- Durkan am,Hodson EM,Willis NS, Craig JC. Immunosuppressive agents in childhood nephrotic syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials. Kidney int. 59,1919-1927, 2001
- High KP. The antimicrobial activities of cyclosporin, FK506 and rapamycin. Transplantation. 57,1689-1700, 1994
- Thiel G, Landmann J, Mihatsch MJ: Ciclosporin:acute or chronic toxicity, or rejection?AM Hassaballah (ed), Excerpta medica, Amsterdam,122-133, 1987
- Murray BM, Paller MS, Ferris TF: Effects of CsA administration on renal hemodynamic in conscious rats. Kidney Int , 28:767-74,1985
- Strzelecki T, Kumar S, Khauli R, et al: Impairment by cyclosporine of membrane-mediated functions in kidney mitochondria. Kidney Int , 34:234-240,1988
- Orugun EO, Smart LM, Whiting PH: The effect of calcium blockade with verapamil on experimental cyclosporine nephrotoxicity. Transplant Proc 1991, 23:1:354-5.
- Dawidson I, Rooth P, Fry WR, et al: Prevention of acute cyclosporine induced renal blood inhibition and improved immunosuppression with verapamil. Transplantation , 48:4:575-80,1989
- Dieperink H, Leyssac PP, Starklint H, et al: Nephrotoxicity of cyclosporine A: a lithium clearance and micropuncture study in rats. Eur J Clin Invest 1986, 16:69.
- Salducci MD, Chauvet-Monges AM, Berland Y, et al: The restoration of ATP synthesis may explain in protective effect of calcium antagonists against Cyclosporine A nephrotoxicity. Life Sciences , 50:2053-58,1992
- Duriebe VA, Okanmah A, Blyden GD. Effect of CsA on rat liver and kidney glutathione content. Pharmacology, 39:205-212,1989
- Inselmann G, Hannemann J, Baumann K. Cyclosporin A induced lipid peroxidation and influence on glucose 6 phosphatase in rat hepatic and renal microzomes. Res Common Chem Pathol Pharmacol, 68:189-203,1990
- Wang CH, Salahudeen AK. Cyclosporin nephrotoxicity: attenuation by an antioxidant inhibitor of lipid peroxidation in vitro and in vivo. Transplantation 58:940-946, 1994
- Inselmann G, Baumann K. Effect of cyclosporin A on accumulation of tetraethylammonium and p-aminohippurat and on lipid peroxidation in rat renal microzomes and cortical slices. Ren Fail.12:165-169, 1990
- MaCay PB, King MM: Vitamin E: Its role as a biological free radical scavenger and its relationship to the microsomal mixed-function oxidase system. Vitamin E, New York, 1980, Marcel Dekker Inc, pp:289-317.
- Pascoe GA, Reed DJ: Cell calcium, vitamin E and the thiol redox system in cytotoxicity. Free Radical Biology and Medicine , 6:209-24,1989
- Marubayashi S, Dohi K, Ochi K, et al: Role of the free radicals in ischemic rat liver cell injury: prevention of damage by a -tocopherol administration. Surgery , 99:2:184-191,1986
- Kunisaki M, Umeda F, Inoguchi T, et al: Vitamin E binds to spsific binding sites and enhances prostacyclin production by cultured aortic endotelial cells. Thromb Haemost , 68:774,1992
- Lunec J, Blake D, Oxygen Free Radicals. Their relevance to disease processes . In : Cohen RD, Lewis B, Albert KGMM. The Metabolic and Moleculer Basis of Acquired Disease. Balliere Tindall, London. 189-212, 1990.
- Jialal I, Fuller CJ. Oxidized LDL and antioxidants . Clin Cardiol . 16: 1-9, 1993.
- Lawry OH, Rosebrough NJ,Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 182:265,1951.
- Mihatsch Mj, Thiel G, Basler V, Ryffel B, et all. Morphological patterns in cyclosporin-treated renal transplant recipients. Transplant Proc,4(suppl 1):101-16,1985
- Thiel G. Experimental cyclosporin nephrotoxicity. Clin Nephrol, 25(suppl 1):205-10,1986
- Zhong Z,Arteel GE, Connor HD, et all. Am J Physiol, 275:F595,1998
- Yang JJ, Finn WF. Ren Fail, 20:85,1998
- Kadayıfçı A. Dahiliye. 1.baskı, Atlas Kitapçılık, Ankara, 199-297, 2001
- Hebert SC,Kriz W. Diseases of kidney. Schrier RW, Gottschalk CW (ed), vol1:3-37,1997
- Tisher CC, Madsen KM. Anatomy of the kidney. Brenner BM (ed), The Kidney,3:62,1996

33. Venkatachalam MA, Bernard DB, Donohoe JF. Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule. *Kidney int*, 14:31-49,1978
34. Kim JY, Suh KS. Light microscobic and electron microscobic features of CyA nephrotoxicity in rats. *J Kor MED Sci*,10:5:352-59,1995
35. Massicot F, Thevenin M, Martin C, et all, Effect of cyclosporin on kidney glutathion mrtabolizm ang ccytocrom p450 in the rabbit. *Drug chem toxicol*,17:449-62,1994
36. Inselmann G, Blank M, Baumann K. Cyclosporin induced lipit peroxidation in microsomes of rat kidney. *Res. Commun. Chem Pathol Pharmacol*,62:207-20,1988
37. Walker PD, Das C, Shah SV. Cyclosporin A induced lipid peroxidation in renal cortical mitochondria. *Kidney int*, 29:311,1986
38. Inselmann G, Barth A, Engemann R, Heidemann H. Cyclosporin A induced lipid peroxidation in human liver microsomes. *Eur J Clin Invest*,21:461-65,1991
39. Ketterer B, Beale D, Meyer D,. The structure of multiple functions of glutathion transferases. *Biochem Soc Trans*, 10:82-84, 1982
40. Mun Kc, Suh SI. Effect of melatonin on renal function in cyclosporin nephrotoxicity. *Transplantation proc*, 32:1919-20,2000
41. Durak I, Karabacak HI, Buyukkocak S, Cimen MY, Kacmaz M ve ark. İmpaired antioxidant defens system in the kidney tissues from rabbits treated with cyclosporin: Protective effects of vitamins E and C. *Nephron*,78(2):207-11,1998
42. Özdemir M, Aktan Y, Dündar E, Çolak Ö, Cingi İM, Tel N. Siklosporin A nefrotoksisitesine karşı vitamin E'nin etkisi. *Çukurova üniv Tıp Fak Derg*, 23:2:67-71,1998
43. Kayaalp O. Tıbbi Farmakoloji. Vitaminler. Cilt 2, 9. Baskı, Hacettepe Taş Kitabevi, 1541-1575, 2000
44. Faustman DL, Hauptfeld V, Davie JM, Lacy PE. İncrase in urinary thromboxane B2 in rats caused by cyclosporine. *Transplant*,40:2:214-17, 1985
45. Petric R, Freeman D, Wallace C, et all. Amelioration of experimental cyclosporin A nephrotoxicity by calcium channel inhibition. *Brief communications*, 1103-1105,1992
46. English J, Evan A, Houghton DC, Bennet WM. Cyclosporin induced acute dysfunction in the rat. *Transplant*,44:1:14-17,1986
47. Bokemeyer D, Friedrichs U, Backer A, et all. Cyclosporin A Enhances total cell calcium independent of NA-K-ATPaz in vasculer smooth muscle cells. *Clin İntestig*, 72:12:992-5,1994
48. Bhardwaj R, Moore PK. The effect of arginin and NO on resistance blood vessels of the perfused rat kidney. *Br J Pharmacol*, 97:739-44,1989
49. Darlametsos IE, Papanikalaou N, Varanos DD. Effect of nifedipine in CyA induced nephrotoxicity in rats. *Prostaglandins leukotriens and essential Fatty acids*,63:5:263-69,2000
50. L'Azou B, Lagroye I, Plande J,et all. Protective effect of verapamil and dopamine against CyA induced vasoconstruction in isolated glomeruli in rats. *Presse Med*, 21:41:2021-3,1992
51. Abraham JS, Bentley FR, Garrison RN. Calcium channel blockade in rats with cyclosporin induced vasoconstriction. *İncvest Surg*, 6:5:401-12,1993