

T.C.
AKDENİZ UNIVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

RATLARDA OLUŞTURULAN AKUT SİKLOSPORİN A
(CsA) NEFROTOKSİSİTESİNİN ÖNLENMESİNDE
VERAPAMİL'İN ETKİNLİĞİ

T949/1-1

NEFROLOJİ UZMANLIK TEZİ

Dr. GÜLTEKİN SÜLEYMANLAR

ANTALYA-1991

949

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

RATLARDA OLUŞTURULAN AKUT SİKLOSPORİN A
(CsA) NEFROTOKSİSİTESİNİN ÖNLENMESİNDE
VERAPAMIL'İN ETKİNLİĞİ

NEFROLOJİ UZMANLIK TEZİ

DR. GULTEKİN SULEYMANLAR

ANTALYA--1991

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAC.....	1
MATERYAL VE METOD.....	5
SONUÇLAR.....	9
TARTIŞMA.....	19
ÖZET.....	25
KAYNAKLAR.....	27

GİRİŞ VE AMAC

Tolypocladium inflatum Gams'tan elde edilen, nötral lipofilik, 1203 molekul ağırlıklı ve 11 amino asitten oluşan Siklosporin A (CsA), böbrek, kalb ve karaciğer gibi solid organ transplantasyonlarında (Tx) kemik iliğini suprese etmeksizin, T hücre fonksiyonlarını selektif olarak inhibe ederek allograft ve hasta yaşam sürelerinde önemli düzelme sağlamıştır(1-4,14). Ayrıca, otoimmün hastalıkların ve steroide dirençli nefrotik sendromun tedavisi ile graft versus host hastalığının önlenmesinde alternatif bir ilaç olmuştur(5-7). CsA, kuvvetli bir immunosupresif ajan olmasına rağmen sahip olduğu sistemik yan etkileri yaygın klinik kullanımını sınırlandırmaktadır. Önemli yan etkileri arasında nefrotoksisite, hipertansiyon, hepatotoksisite, nörotoksisite, hipertrikozis, gingival hiperplazi, oportunistik infeksiyonlar ve tümör gelişimi sayılabilir(2,4, 10,14). Nefrotoksisite, CsA tedavisinin sık rastlanan ve klinik açıdan en önemli komplikasyonudur denebilir(8-14). Hayvan modellerinde daha önce gösterilmesine rağmen insanlarda immunosuppresif dozlarda kullanılan CsA'nın nefrotoksik özelliği ilk kez Calne ve arkadaşları tarafından böbrek transplantasyon olgularında gösterilmiştir (2,8). Daha sonraları akut renal disfonksiyonun otoimmün hastalık, kemik iliği Tx, karaciğer Tx ve uveitis nedeniyle CsA tedavisi gören hastalarda da olduğu dikkati çekmiştir. Söz konusu klinik gözlemler ve deneysel çalışmalar hem transplante böbreğin hemde nativ böbreklerin

Siklosporinin toksik etkisine duyarlı olduğunu belgelemektedir(1-10).

Siklosporin nefrotoksitesinin akut ve kronik olmak üzere iki önemli şekli vardır(9,10,13). Akut nefrotoksite Tx' dan hemen veya birkaç hafta sonra ortaya çıkan kısa veya uzun süreli akut böbrek yetmezliği ile kendini belli eder(9,10,13). Çeşitli nedenlerle iskemik zedelenmeye uğramış böbreklerde ve özellikle CsA'nın intravenöz olarak kullanıldığı durumlarda daha sık olarak gelişir. Patofizyolojisi tam olarak anlaşılmamakla birlikte, hayvan çalışmaları ve klinik veriler CsA'nın böbrek damarlarında, özellikle afferent arteriollerde kuvvetli vasokonstriksiyona yol açarak böbrek kan akımını ve glomeruler filtrasyon hızını (GFR) azalttığını ve proximal fraksiyonel reabsorpsiyonu arttırdığını ortaya koymuştur. Bu fonksiyonel bozukluklara ilaveten proximal tubulus hücrelerinde izometrik vakuolizasyon, dev mitokondri, mikrokalsifikasyonlar ve tek hücre nekrozu gibi değişen derecelerde morfolojik bozukluklara da rastlanabilmektedir(9-10). Reversible nitelikteki bu fonksiyonel ve morfolojik değişiklikler CsA dozunun azaltılması veya ilacın kesilmesiyle düzelmektedir (9,10,13). CsA nefrotoksitesinin kronik formu ise insanlarda 6 aydan daha uzun süre CsA kullanımıyla ortaya çıkan kronik azotemi, tubuler disfonksiyon ve ciddi hipertansiyonla kendini belli eder(9,10,12-14). Ancak histolojik özelliklerini açık olarak tanımlamak zordur; çünkü böyle hastalarda sıklıkla kronik rejeksiyonun olaya eşlik etmesi söz konusudur. En önemli morfolojik özellikler ciddi tubuler atrofi, bazal membranda kalınlaşma ve interstisyel fibrozistir. Bu bulgular ilaç kesilse bile devam

etme eğilimindedir(9,10,12-14).

Son zamanlarda CsA nefrotoksitesinin insidensini ve şiddetini azaltmak amacıyla immunosuppresif protokollerin yeniden düzenlenmesi, özellikle CsA dozlarının azaltılması, intraoperatif volem ekspansiyonu ve çeşitli vazodilatörler kullanılması gibi yaklaşımlara başvurulmaktadır(41). CsA nefrotoksitesini önlemek veya azaltmak amacıyla çeşitli farmakolojik ajanlar denenmiştir. Bu ajanlar arasında α -adrenenerjik blokerler, ACE inhibitörleri, prostaglandin sentez inhibitörleri, β -blokerler ve diğerleri sayılabilir(41). Bunların yanısıra, önemli intrarenal etkileri dolayısıyla kalsiyum kanal blokerlerinin(KKB) CsA nın neden olduğu böbrek zedelenmesinin azaltılmasında etkili olabileceği ileri sürülmüştür (23,25,30,34,38-41). KKB'lerinin vasküler ve tubuler etkileri dolayısıyla glomeruler filtrasyon hızını(GFR), renal kan akımını(RKA) ve elektrolit ıtrahını arttırdığı saptanmıştır (20 21,42). Hayvanlarda ve insanlarda yapılan çalışmalar, KKB'lerinin bilinen klasik etkileri yanısıra akut böbrek yetmezliğinin seyrini düzelttiğini ve kronik böbrek yetmezliğinde progresyonu yavaşlattığını göstermektedir (24,28,37). Bu son etkiler KKB'lerinin sistemik antihipertansif ve lokal sitoprotektif etkisi ile ilgili görünmektedir(20-24,28,37). Renal transplantasyondan sonra KKB lerinin böbrek kan akımını düzelttiği ve böylece iskemiye önleyerek posttransplant akut tubuler nekroz insidensini azalttığı gösterilmiştir(30,37-44). Bunlara ilaveten, CsA den önce verilen KKB'lerinin CsA nın yol açtığı böbrek kan akımındaki azalmayı da önlediği bildirilmektedir (23,25,41,42, 45). KKB'lerinin CsA nın yaptığı immuno-

suppresyonla sinerjistik etkileşme göstererek erken dönemdeki rejeksiyon ataklarının sayısını azalttığına dair bazı bilgiler vardır(38,40). Ancak posttransplant böbrek disfonksiyonu ve rejeksiyonda KKB'lerinin etkilerinin tam olarak bilindiği söylenemez. Söz konusu noktaların aydınlatılması amacıyla ileri deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Transplant hastalarında ve deneysel transplantasyon modellerinde KKB'lerinin renal ve sistemik hemodinamik, immunolojik ve metabolik etkilerinin aynı anda değerlendirilmesinin karmaşıklığı ve zorluğu ortadadır. Bu noktadan çıkarak, transplantasyon yapılmamış, normal böbrek fonksiyonlu Sprague-Dawley cinsi ratlarda 15mg/kg CsA verilerek oluşturulan nefrotoksisitede sistemik hemodinamik değişiklik oluşturmayan, fenilalkilamin grubu bir KKB olan verapamilin (0.2mg/kg/gun,SC) etkinliği değerlendirilmiştir.

MATERYAL VE METOD

Deney Hayvanları: Bu çalışmada ağırlıkları 250-370 gram arasında değişen toplam 18 yetişkin erkek Sprague-Dawley cinsi ratlar kullanıldı. Butun deney hayvanları aynı koşullarda standard rat besini ile beslendi ve su serbest olarak verildi. Hayvanlar deney boyunca alternatif olarak 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olan ısı kontrollü(20-22 C) odada barındırıldı.

İlaçlar: Sandoz firmasından sağlanan parenteral form Siklosporin A (Sandimmune^R:50mg/ml) isotonik serum fizyolojik içinde eritilerek 15mg/ml lik son dilue konsantrasyonu elde edildi. Toz halindeki verapamil(VER, Knoll) de isotonik serum fizyolojik içinde eritilerek mililitresinde 0.1mg verapamil içeren solüsyon hazırlandı.

Tedavi gruplarında [GrupII(CsA grubu) ve grupIII(CsA+VER grubu)] dilue CsA solüsyonundan ratlara günde bir kez subkutan (SC) olarak uygulandı. Grup III te CsA ya ilaveten günde 2 kez SC olarak verapamil injekte edildi. Kontrol grubunda(grup I) ise parenteral CsA preperatı içerisinde taşıyıcı madde olarak bulunan kremofor emulsiyonundan ekivalan miktarlarda günde tek doz SC olarak verildi.

Deney Protokolü ve Gruplar: Deney 3 ayrı grupta yürütüldü. Kontrol grubundaki(Grup I) 6 rata, tedavi gruplarında verilen CsA ya ekivalan volümlerde kremofor SC olarak uygulandı. CsA her birinde 6 rat bulunan CsA(grup II) ve CsA+VER(grupIII) gruplarında günde tek doz olarak 15mg/kg lık dozlarda SC injekte edildi. Grup III'de CsA ya ek olarak verapamil(VER) 0.1mg/kg lık dozlarda günde iki kez uygulandı. Butun injeksiyonlar 26 G iğne kullanarak

boyun derisi altına yapıldı. Tedaviye başlamadan önceki gün(bazal değerler) ve tedavinin 5., 10. ve 14. günü (son gün) kan ve idrar örnekleri alındı ve sistolik kan basınçları(SKB) ölçüldü. 14 günlük tedavi sonunda ratlar fenobarbital anestezisi ile sakrifiye edildi ve böbreklerden biri ince dilimlere ayrılarak tamponlu formalin solusyonuna konuldu.

Kan ve İdrar Toplanması: Yukarıda tanımlanan günlerde hafif eter anestezisi altında kuyruk arterinden 1-1.5 ml kan örneği alındı. Heparinize tüplere alınan kan örnekleri 2 saat kadar oda ısısında (21 C) bırakıldı ve daha sonra 15 dakikalık 3000 rpm de santrifuj edilerek plazması ayrıldı. Elde edilen plazmanın büyük bir kısmı rutin biyokimyasal ölçümler(BUN, SCr, Na, K), kalanı da daha sonra plazma CsA düzey tayininde kullanılmak üzere -20 C de muhafaza edildi.

İdrar örnekleri ise ratlar özel metabolik kafeslere yerleştirilerek toplandı. İdrarın dıskı ile kontaminasyonunu önlemek için 16 saatlik overnight dönemde besin verilmeksizin normal su alımı altında idrar toplandı. Deneye başlamadan önce 2 gün süreyle ratlar metabolik kafeslerde tutularak en az stress ile bu deney koşullarına adapte olmaları sağlandı.

Biyokimyasal Analiz ve Hesaplamalar: Plazma ve idrar örneklerinde kan ure nitrojeni(BUN) ve serum kreatinin düzeyi(SCr) Beckman-2 Urea ve Beckman-2 Creatinine analizörleri ile otomatik teknikle ölçüldü (Beckman Instruments Inc., Fullerton CA, USA). Sodyum(Na) ve potasyum (K) konsantrasyonları flame fotometri (Instrumentation Laboratory, Lexington,MA,USA) ile ölçüldü. Aşağıdaki fonksiyonel parametreler deney protokolunde bildirilen

günlerde hesaplandı; idrar volumu (V , $\mu\text{L}/\text{dak}/100\text{mg}$ vücut ağırlığı,VA), İdrar sodyum ıtrahı ($U_{\text{Na}}V$; $\mu\text{L}/\text{dak}$), Kreatinin klirensi (CCr , yani $[(U_{\text{Cr}}/P_{\text{Cr}})V]$, $\mu\text{L}/\text{dak}/100\text{grVA}$] fraksiyonel sodyum ıtrahı [FE_{Na} , yani $(U_{\text{Na}}.V/P_{\text{Na}} .\text{CCr}) . 100, \%$].

Kan Basıncı Ölçümü: Protokolde tanımlanan günlerde kan ve idrar örneklerinin toplanmasından sonra, sistolik kan basınçları rat kuyruk pletismografisi sistemi (Harvard Apparatus 52-0338 Indirect BP System, South Natick, MA, USA) ile ölçüldü. Sonuçlar mmHg cinsinden ifade edildi.

Plazma Siklosporin A Tayini: Besinci, 10. ve 14.günlerde son CsA dozundan 20-24 saat sonra alınan kan örnekleri 2 saat oda ısısında tutulduktan sonra (bu süre plazma CsA ölçümlerinde kanın şekilli elemanları ile plazma arasında dengelenme için gerekli olan optimal süredir) plazmaları ayrıldı. Elde edilen bu matriksde Cyclo-Trac SP I^{125} RIA kiti ile "through" plazma CsA düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar ng/ml cinsinden ifade edildi.

Histolojik Değerlendirme: Deney bitiminde sakrifiye edilen hayvanların sağ böbrekleri uzaklaştırılarak %10'luk fosfat tamponlu formalinde fikse edildi ve parafin blok içinde yapılan kesitler ışık mikroskopunda incelendi. $3\mu\text{m}$ kalınlığındaki kesitler hemotoksilen-eozin boyası ile boyandı ve tubulointerstisyel lezyonların derecesi semikantitatif olarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz: Butün veriler ortalama \pm standard hata olarak tanımlandı. Üç grubun çeşitli değişkenlere göre karşılaştırılması tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. F değerinin anlamlı bulunması halinde post-hoc test olarak seçilen Scheffe testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı. Ayrıca her bir grubun

5.,10. ve 14. günlerde elde edilen verileri tekrarlayan lcmler icin geliştirilmiş varyans analizi(ANOVA) ile karşılaştırıldı. CsA ve CsA+VER grupları arasındaki plazma CsA düzeyleri Mann-Withney U testi ile karşılaştırıldı. Butün değerlendirmelerde istatistiksel anlamlılık sınırı olarak $p<0.05$ kabul edildi.

SONUÇLAR

Deney sırasında CsA grubundan iki rat kaybedildi. Kontrol ve CsA+VER gruplarında bulunan ratlar ise 14 günlük deney süresini tamamladılar.

VER alsın veya almasın CsA ile tedavi edilen ratlarda 5. günden itibaren belirgin ağırlık kaybı oldu ($p < 0.001$). Her bir grupta kendi bazal değeri esas alınarak oluşan vücut ağırlığındaki değişiklikler yüzde olarak şekil 1 de gösterilmiştir.

İndirekt kuyruk pletismografisi ile ölçülen SKB ları tablo 1 de izlenmektedir. Üç grup arasında SKB ları açısından fark bulunmadığı gibi VER inde SKB'ni etkilemediği görülmüştür (Şekil 2).

Deney sırasında oluşan idrar volüm değişiklikleri Tablo 2 de sunulmuştur. CsA alan hayvanlarda sureyle ilgili olarak idrar volümünün artma eğilimi gösterdiği, ancak bunların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Bununla beraber, VER'in idrar volümünü daha fazla arttırdığı ve bu artışın 14.günde istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0.05$).

Kan kimyası ile ilgili sonuçlar tablo 1 de sunuldu. Sadece CsA ile tedavi edilen ratlarda BUN ve SCr değerlerinin 5.günden sonra yükseldiği ve bu artışların 10. ve 14. günlerde kontrol grubuna göre anlamlı olduğu ($p < 0.01$) dikkati çekti (Şekil 3 ve 4). CsA+VER grubunda ise BUN ve SCr artışlarının daha az olduğu ve kontrole göre artışın $p < 0.05$ düzeyinde anlamlılık gösterdiği saptandı. Son gün itibarıyla SCr açısından CsA ile CsA+VER grupları arasında anlamlı farklılık gözlemlendi ($p < 0.05$). Kreatinin klirensi değerleri tablo 1 de ve grafik gösterimi ise şekil 5 de sunulmuştur. CsA+VER grubundaki CCr değerlerinin kontrol

değerlerine yakın olduğu , buna karşın CsA grubunda anlamlı düzeyde azalma olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). Serum Na ve K değerleri açısından üç grup arasında anlamlı farklılık olmadığı saptandı. Fraksiyonel Na ıtrah sonuçları da tablo 2 de görülmektedir. CsA grubundaki FE_{Na} değeri 14. günde kontrol ve CsA+VER gruplarına göre daha yüksek olduğu anlaşıldı ($p < 0.05$).

Monoklonal spesifik RIA kiti ile CsA verilen iki grupta plazma CsA düzeyleri ölçüldü ve VER'in bu deneysel modelde plazma CsA düzeylerini anlamlı şekilde etkilemediği gözlemlendi.

Histopatolojik değerlendirmede, kontrol grubunda ışık mikroskopu düzeyinde değişiklik yoktu. Ancak CsA alan gruplarda proksimal tubulus hücrelerinde (özellikle S3 segmentinde isometrik vakuolizasyon ve tek hücre nekrozu saptandı. Verapamilin morfolojik bulguları etkilemediği dikkati çekti.

Tablo 1: Deney gruplarında elde edilen sistolik kan basıncı ve böbrek fonksiyon testleri sonuçları.

	Gün	N	SKB	SCr	BUN	CCr
Kontrol	0	6	132±2	0.04±0.02	23.1±1.2	547±23
	5	6	130±3	0.41±0.01	25.0±1.8	523±11
	10	6	129±3	0.44±0.02	23.0±0.9	502±29
	14	6	130±3	0.45±0.04	27.6±1.5	492±31
CsA	0	6	131±3	0.32±0.02	19.5±1.2	566±43
	5	5	132±3	0.52±0.02*	31.0±3.0	499±30
	10	5	128±5	0.59±0.03**	41.7±3.8**	394±23*
	14	4	131±5	0.67±0.04**	44.9±1.8**	384±21*
CsA+VER	0	6	130±4	0.35±0.02	20.0±0.6	565±50
	5	6	127±4	0.48±0.03	31.8±2.0	492±27
	10	6	124±4	0.50±0.02*	33.6±3.0*	477±14*
	14	6	128±3	0.48±0.02*	38.5±2.9*	500±12

Kısaltmalar; N:rat sayısı, SKB:Sistolik kan basıncı, SCr:Serum kreatinin düzeyi, BUN:Kan ure nitrojeni, CCr:Kreatinin klirensi. Sonuçlar ortalama±standard hata olarak tanımlandı. İstatistiksel anlamlılık(ANOVA test); *:p<0.05 vs kontrol, **:p<0.01 vs kontrol

Tablo 2: Deney gruplarında elde edilen idrar volümü ($\mu\text{L}/\text{dak}$), idrar sodyum içeriği ($U_{\text{Na}}V$; $\mu\text{L}/\text{dak}$) ve fraksiyonel sodyum itrahi (FE_{Na} ; %) sonuçları.

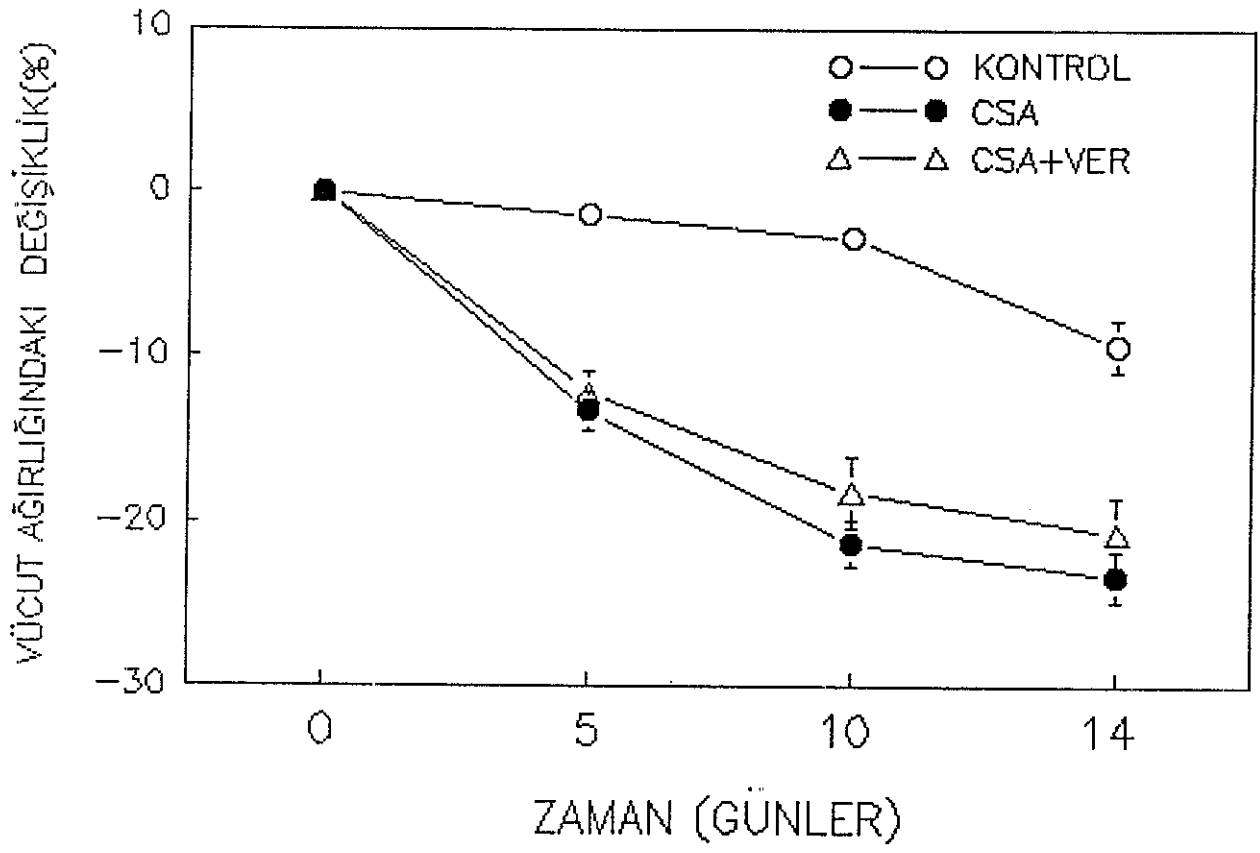
	Gün	N	V	$U_{\text{Na}}V$	FE_{Na}
Kontrol	0	6	5.06 ± 0.75	0.37 ± 0.04	0.26 ± 0.03
	5	6	6.30 ± 1.35	0.68 ± 0.09	0.29 ± 0.03
	10	6	4.38 ± 1.10	0.74 ± 0.15	0.32 ± 0.01
	14	6	4.03 ± 1.13	0.68 ± 0.09	0.34 ± 0.03
CsA	0	6	3.28 ± 0.96	0.18 ± 0.05	0.20 ± 0.04
	5	5	3.30 ± 0.53	0.40 ± 0.09	0.29 ± 0.03
	10	5	4.96 ± 1.03	0.41 ± 0.04	0.35 ± 0.03
	14	4	8.10 ± 1.10	1.03 ± 0.08	$0.51 \pm 0.06^*$
CsA+VER	0	6	3.50 ± 0.12	0.21 ± 0.03	0.24 ± 0.03
	5	6	4.03 ± 0.65	0.49 ± 0.11	0.29 ± 0.02
	10	6	6.10 ± 1.18	0.54 ± 0.15	0.35 ± 0.02
	14	6	8.00 ± 1.60	0.85 ± 0.07	$0.42 \pm 0.03^*$

Sonuçlar ortalama \pm standard hata olarak tanımlanmıştır. İstatistiksel anlamlılık (ANOVA); * $p < 0.05$ vs kontrol.

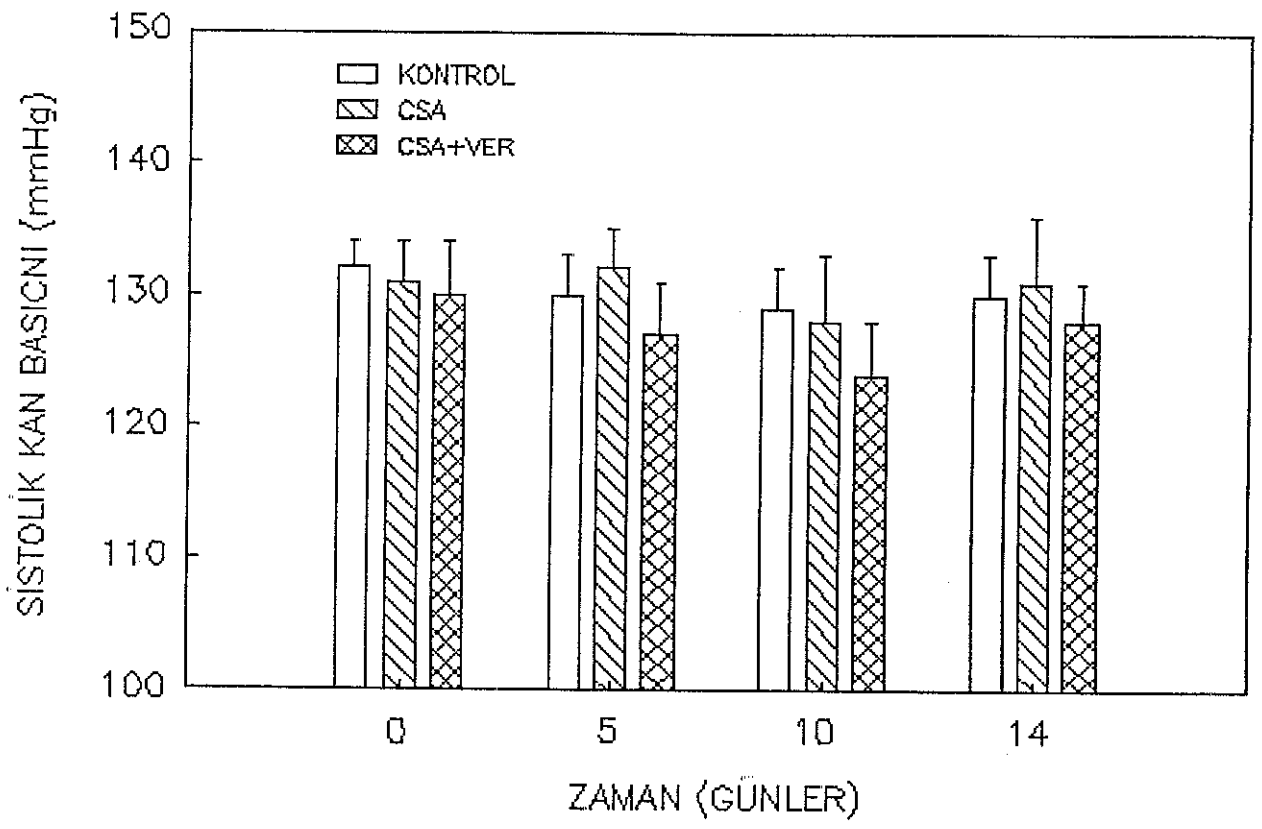
Tablo 3: CsA kullanılan gruplardaki plazma CsA düzeyleri (ng/ml).

	5.gün	10.gün	14.gün
CsA grubu	3285±569	4222±1097	3929±1361
CsA+VER grubu	3019±307	3558±559	3277±298

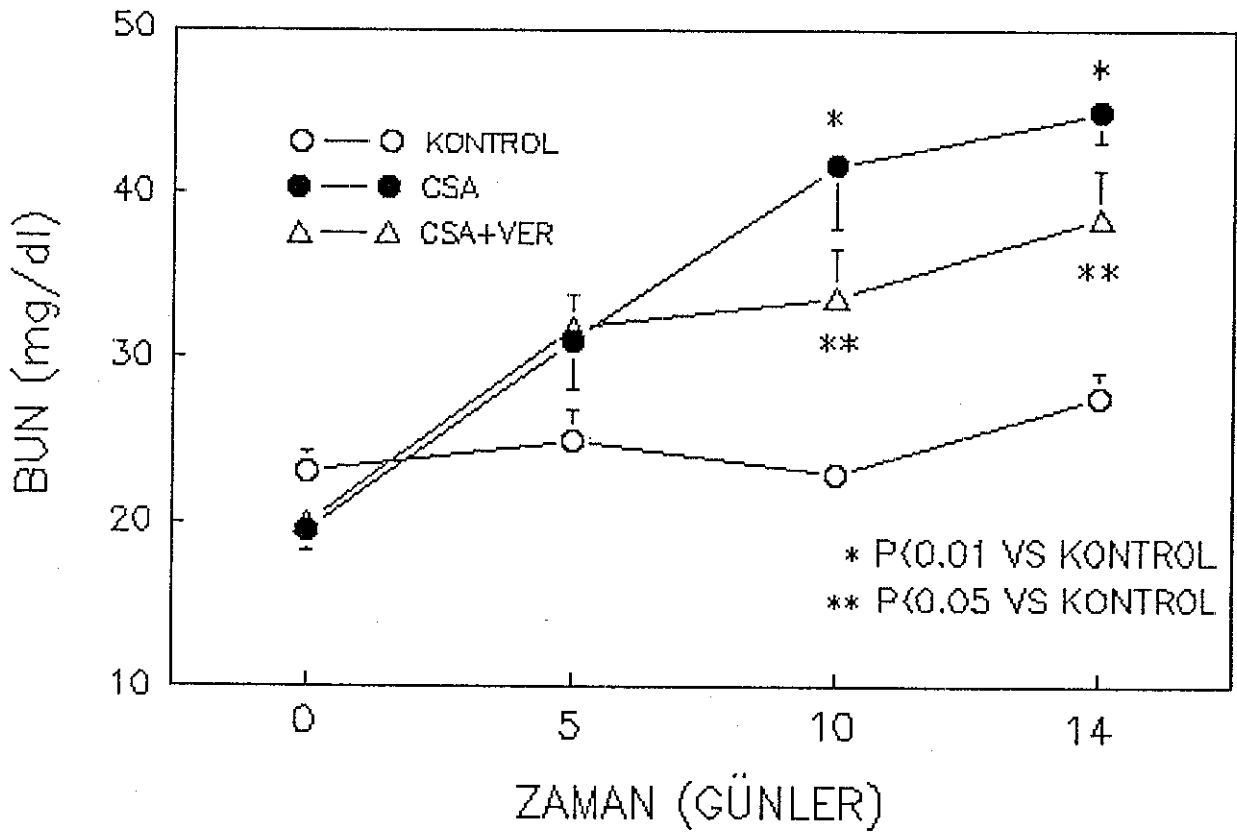
Sonuçlar ortalama±standard hata olarak verilmiştir. Mann-Withney U ile yapılan karşılaştırmalarda iki grup ortalamaları arasında fark bulunmamıştır.



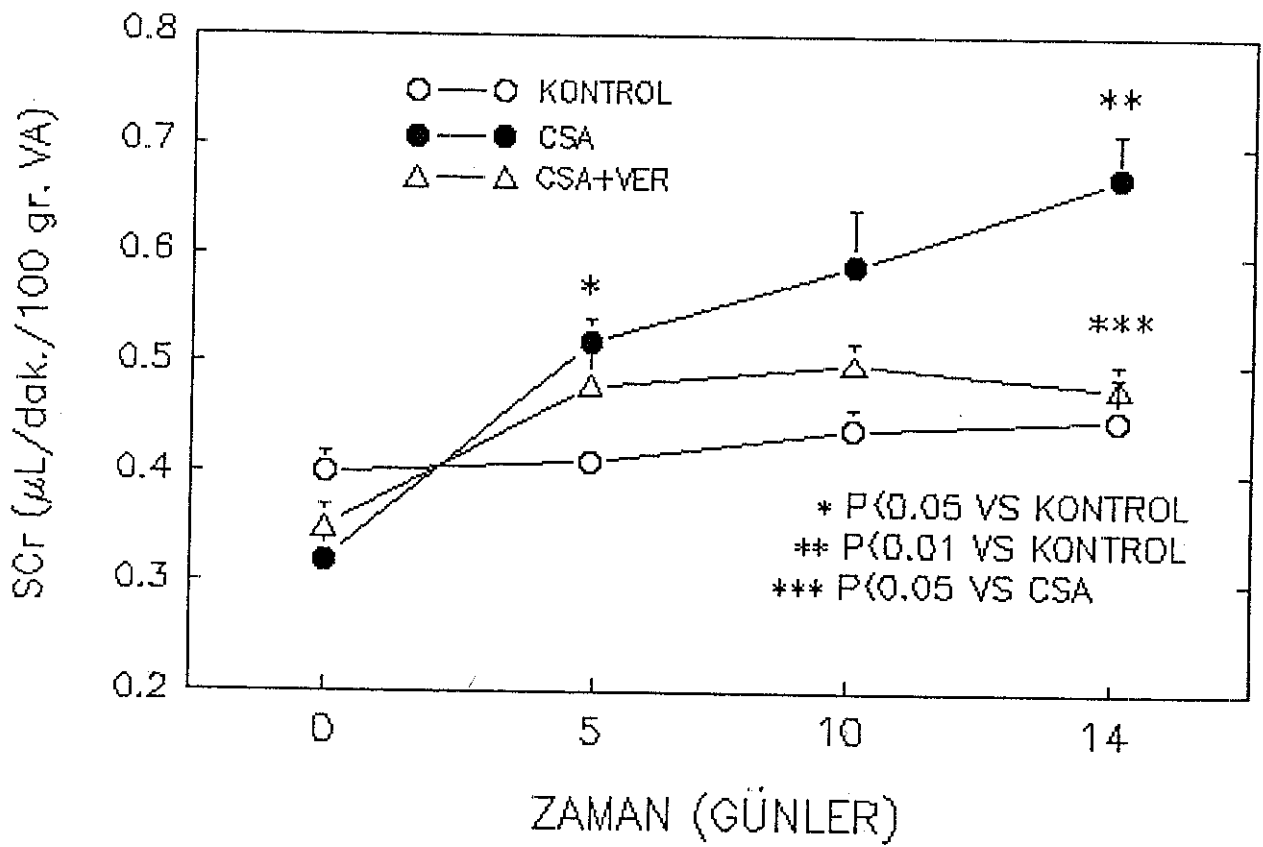
Şekil 1.



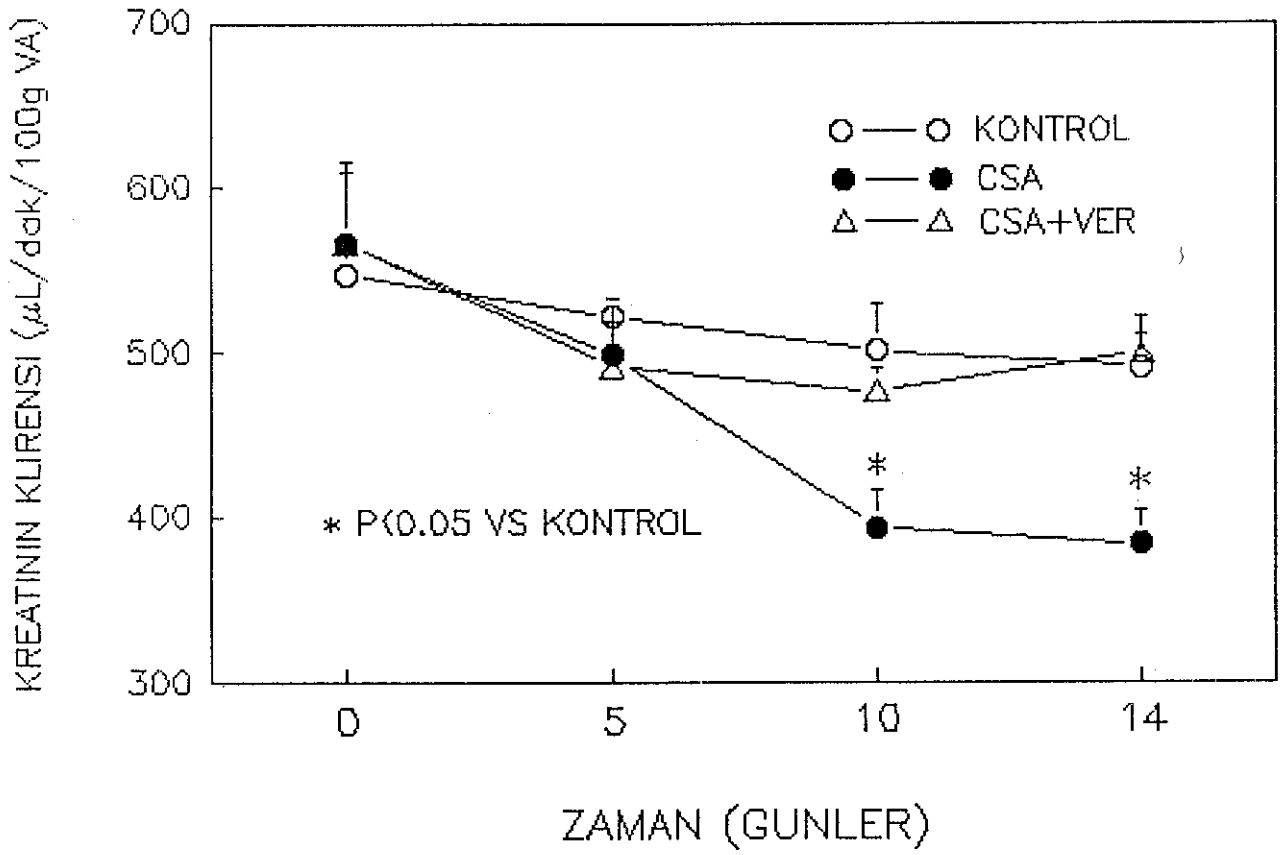
Şekil 2.



Şekil 3.



Şekil 4.



Şekil 5.

TARTIŞMA

Siklosporin A, organ transplantasyonlarındaki en büyük problem olan rejeksiyon olayının önlenmesinde kullanılan önemli bir immunosuppresif ajandır(1-4). Bu ilacın klinik uygulamaya girmesi ile graft yaşam sürelerinde konvansiyonel tedaviye göre %10-20 lik bir artış sağlanmıştır(9,14). Immunosupresyondaki bu carpıcı etkilerine rağmen oluşturduğu nefrotoksisite, CsA'nın yaygın kullanımını sınırlandırmaktadır(7,9,10,14). CsA nefrotoksisitesi akut ve kronik olmak üzere iki önemli klinik formda ortaya çıkar(9-10). Akut CsA nefrotoksisitesi, renal vaskuler (özellikle afferent arteriol düzeyinde) resistans artışı, renal kan akımı ve glomerüler filtrasyon hızında azalma ve proksimal fraksiyonel reabsorpsiyonda artış ile karakterizedir (11,14-19,21). Bunlar yanısıra, morfolojik olarak yegane değişiklik proksimal tubuluslerde ortaya çıkar(9,10). Akut formdaki bu değişikliklere karşılık, potansiyel olarak progresif nitelikteki kronik CsA nefrotoksisitesi arteriolar harabiyet, tubuler atrofi ve interstisyel fibrozis nedeniyle kronik böbrek yetmezliğine ve ciddi hipertansiyona yol açar(9,10,12-14).

Ister akut ister kronik olsun CsA nefrotoksisitesindeki mekanizmalar henüz tam olarak açıklanmış değildir. Akut toksisite de afferent arteriolde vasokonstriksiyona yol açan mekanizmanın multifaktoriyel olduğu görülmektedir. Renin-angiotensin ve sempatik sinir sistemlerindeki aktivasyon, eikozonoid metabolizmasındaki değişiklikler(TxA_2 sentezinde artış, PGI_2 ve PGE_2 sentezinde azalma gibi), endotelial kökenli faktörlerdeki(endotelin ve EDRF-NO gibi) değişiklikler ve direkt vasokons-

triktif etkinin renal hemodinamik değişikliklerde önemli rol oynadığını telkin eden birçok deneysel çalışmalar vardır(9-11,14,15,25).

Son zamanlarda CsA nefrotoksitesinin önlenmesi veya azaltılmasına yönelik çeşitli yaklaşımlara başvurulmaktadır. Bunlar içinde renal hemodinamik bozukluğa etki ettiği düşünölen vazodilatörlerden kalsiyum kanal blokerleri büyük ilgi odağı oluşturmıştır(20-22,42,43,45). İnsanlarda ve deney hayvanlarında yapılan çalışmalar, KKB'lerinin CsA nefrotoksitesinin önlenmesinde etkili olabileceğini düşündürmektedir(11,15,17,19,24,). Bizim çalışmanın sonuçları da, bir papaverin derivativesi olan verapamilin invivo rat modelinde GFR a yararlı etkileri olduğunu ortaya koymaktadır. Bilindiği gibi, KKB'leri kalb ve vasküler düz kas hücrelerindeki transmembran Ca^{++} un influx ını önleyerek myokard kontraksiyonunu ve periferik vazokonstriksiyonu deprese etmektedir(20,21,37,42). Bu hemodinamik etkiler, kullanılan spesifik ilaca ve dozuna göre değişiklik gösterebilir(37,41,42). Verapamil ve diltiazem hem kalbi hemde periferik arteriel direnci etkilerken, nifedipin primer olarak arteriel bir vazodilatördür(37). İnsanlarda KKB'lerinin renin-angiotensin-aldosteron ve sempatik sinir sistemlerini pek etkilemediği bildirilmektedir(37). Hayvan deneyleri ve klinik çalışmalarda, KKB'lerinin böbrek kan akımını ve glomeruler filtrasyon hızı ile idrar miktarı ve elektrolit ıtrahını arttırdığını gösterilmiştir(20,21,37,41). Direkt ve indirekt kanıtlar KKB'lerinin özellikle afferent arterioldeki resistansı azalttığını düşündürmektedir(9,10,20,21,41,42). KKB'lerinin bu vasodilator etkisinin, bazal renal vasküler tonus

duzeyine ve temeldeki vazokonstriksiyonun naturune bağı olduğu da gsterilmiſtir(41). Selluler kalsiyum birikiminin iskemik ve toksik hucre zedelenmesinin oluſumunda rol oynayan major fizyopatolojik olaylardan birisi olduğunu dſundüren bir ok deneysel alıſma vardır(16, 32, 33,37). Son yıllarda Colorado Universitesinde Schrier ve arkadaşlarının yaptığı bazı alıſmalar iskemik ve nefrotoksik akut böbrek yetmezliği modellerinde KKB'lerinin koruyucu etkisi olduğunu ortaya koymuſtur(29,32,37,43). Ancak bu alıſmalarda KKB'lerinin protektif etkisinin primer olarak vasküler mi yoksa tbuler epiteldeki direkt etkisinden mi kaynaklandığı dkumante edilememiſtir.

Chan ve arkadaşları izole perfüze rat böbrek modeli kullanarak yaptıkları alıſmalarda KKB'lerini hem sıcak hem de soğuk iskemide renal zedelenmeyi azaltmada etkili bulmuſlardır(29,37,43). Duggan ve arkadaşları, Verapamilin böbreklerin ıkarılmasından önce donörlere verildiğinde renal transplant alıcılarında erken dönemdeki renal fonksiyonları düzelttiğini gstermiſlerdir(44). Verapamille muamele edilen böbreği alan hastalarda akut rejeksiyon epizodlarının insidensinin daha az olduğu saptanmıſtır(38-40). CsA ve prednizon alan transplant hastalarında diltiazem kullanan Wagner ve arkadaşları da benzer gözlemi yapmıſlardır(39-40). Wagner'in bu alıſmasında postoperatif akut böbrek yetmezliği insidensi %41 den %10 inmiſtir ve ilk aydaki rejeksiyon sayısı daha az bulunmuſtur (39). Diğer taraftan Dawidson ve ark., verapamilin renal transplant hastalarında CsA nin yolactığı kan akımındaki azalmayı önlediğini bildirmiſlerdir(41). Iaina ve arkadaşlarının

invivo rat modelinde yaptıkları deneysel bir çalışmada, kısa bir iskemik zedelenmeden hemen sonra verilen CsA nin akut böbrek yetmezliği oluşturduğu ve verapamilin iskemik-toksik ABY nin siddetini, zedelenmenin iskemik komponentini giderek düzelttiği ileri sürülmüştür(30). Bizim yaptığımız çalışmada 14 gün süreyle 15mg/kg CsA verilerek oluşturulan toksisite modelinde böbrek fonksiyonları 5. günden itibaren bozulmaya başladı. Onuncu ve 14. günlerde kreatinin klirenslerinde belirgin azalma saptandı. Nispeten ufak dozlarda verapamil verilen ratlarda, CsA nin yolacağı GFR inhibisyonunu önlediği gözlemlendi. Bu bulgular, CsA nefrotoksitesinin azaltılmasında verapamilin etkili olabileceğini telkin etmektedir. Histolojik bulgular açısından CsA ve CsA+VER grupları arasında dikkati çeken bir fark olmamasına rağmen, artmış $U_{Na}V$ ve FE_{Na} değerlerinin proksimal tubuluslerdeki zedelenmenin göstergesi olarak değerlendirilebilir. Ancak bu bulgu, proksimal tubulusten sodyum ve su reabsorpsiyonun arttığını gösteren çalışmalarla uyusmamaktadır.

Klinik gözlemlere dayanarak, KKB'lerinin antihipertansif etkisinin böbrek fonksiyonlarının korunmasına katkıda bulunabileceğine inanılmaktadır. CsA verilisiyle ortaya çıkan kan basıncı cevabının hayvan türleri arasında büyük değişkenlik gösterdiği bildirilmektedir. Örneğin CsA, Spontan olarak Hipertansif Ratlarda (SHR) kan basıncını yükseltirken Sprague-Dawley ve Munich-Wistar cinsi ratlarda uzun süreli tedaviye rağmen kan basıncında değişiklik olmamaktadır. Mevcut çalışmada da, CsA alan ratlarda kuyruk cuff pletismografisi ile ölçülen sistolik kan basınçları kontrol grubundakilerden farklı değildi.

Diğer taraftan da verapamilin kullandığımız dozlarda sistolik kan basıncına etkisi olmadığı ve dolayısıyla verapamilin renal protektif etkisinin kan basıncı değişikliğinden çok primer renal etkilerle ilgili olabileceği düşünüldü. Bunke ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 7 gün süreyle günde 20mg/kg a CsA a maruz bırakılan Sprague-Dawley cinsi ratlarda yüksek dozlarda verilen verapamil (5mg/kg bid,SC) in böbrek fonksiyonlarında önemli korunma sağlandığı bildirilmiştir(25).

Bir çok klinik çalışmada, KKB'li kullanan hastalarda CsA kan düzeylerinin önemli derecede daha yüksek olduğu bulunmuştur(26,27 31,36). CsA kan düzeylerindeki bu artışın CsA ile KKB'leri arasında mikrozomal P-450 enzim sistemi düzeyinde oluşan etkileşmeden kaynaklanması olasıdır(31,36). Renal transplant hastalarında verapamil, diltiazem ve nikardipin gibi KKB'leri sitokrom P-450 e bağımlı biotransformasyonu inhibe ederek , kandaki CsA düzeylerini önemli derecede arttırdığı gözlenmiştir. Bu hastalarda, CsA dozunun graft fonksiyonunu tehlikeye sokmaksızın %20-30 oranında azaltılması mümkündür(38,41). Bununla beraber nifedipinin CsA farmakokinetiğine etkisi olmadığı ve dolayısıyla herhangi bir doz ayarlamasına gerek olmadığı bildirilmektedir(36,41). Bunke'nin çalışmasında olduğu gibi bizim çalışmamızda da CsA grubu ile CsA+VER grubu arasında kan CsA düzeyleri arasında fark bulunmamıştır(25).

Bu çalışmadaki verilerimiz kısaca özetlendiğinde, 15mg/kg /gün CsA verilerek nefrotoksisite oluşturulan ratlarda, sistemik kan basıncı değişikliği oluşturmayan dozlarda verilen verapamilin GFR daki azalmayı anlamlı derecede önlediği dikkati çekmiştir.

Verapamilin morfolojik değişiklik yaratmaksızın, sadece fonksiyonel bozukluğun düzeltilmesinde etkili olduğu görünmektedir.

Sonuç olarak, akut CsA nefrotoksisitesinin önlenmesinde farmakolojik bir girişim olarak KKB'leri etkili olabilir. Ancak bu grup ilaçların kronik CsA nefrotoksisitesinin önlenmesindeki tam rolunun aydınlatılması amacıyla ileri deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

Siklosporin A (CsA), organ transplantasyonlarında allograft yaşam süresini anlamlı şekilde uzatmasına rağmen, yol açtığı nefrotoksisite (NT) sık rastlanan ciddi bir komplikasyon olma özelliğini korumaktadır. Ratlarda yapılan bu çalışmada, bir kalsiyum kanal blokeri olan Verapamilin (VER) akut CsA nefrotoksisitesini önlemedeki etkinliği değerlendirilmiştir.

Deney herbiri 6 yetişkin erkek Sprague-Dawley cinsi rattan oluşan üç grupta yürütülmüş ve 14 gün devam etmiştir. CsA ve CsA+ VER gruplarında, CsA 15mg/kg SC olarak tek dozda verilmiştir. İkinci tedavi grubuna, ayrıca 0.1mg/kg VER SC olarak günde iki kez injekte edilmiştir. Kontrol grubundaki ratlara ise taşıyıcı bileşik olan kremofor uygulanmıştır. Tedavi öncesi ve sırasındaki 5., 10. ve 14.günlerde kan kimyası, kreatinin klirensi (CCr), fraksiyonel sodyum ekskresyonu, plazma CsA düzeyleri ve sistolik kan basınçları ölçüldü. Deney bitiminde böbreklerden biri histopatolojik olarak değerlendirildi.

CsA grubunda 10. ve 14. günlerde BUN ve SCr değerleri kontrole göre anlamlı şekilde yükselirken ($p < 0.01$), CCr'in deprese olduğu ($p < 0.05$) saptandı. Buna karşılık, CsA+VER grubunda BUN ve SCr artışının daha az olduğu ($p < 0.05$) ve CCr'indeki azalmanın anlamlı olmadığı gözlemlendi. Verapamil alan ve almayan gruplar arasında plazma CsA düzeyleri ve sistolik kan basınçları açısından farklılık yoktu. Yukarıdaki fonksiyonel değişikliklere karşın, CsA ile CsA+VER grupları arasında histolojik bulgular açısından farklılık bulunmadı.

Eldeki bulgular, invivo rat modelinde oluşturulan akut CsA nefrotoksisitesinde kalsiyum kanal blokerlerinin renal disfonksiyonu sınırlandırmada etkili olduğunu vurgulamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H: Biologic effects of cyclosporin A: A new antilymphocyte agent. Agents Actions 6: 468-475, 1976.
2. Cohen DJ, Loertscher R, Rubin M, et al.: Cyclosporine: A New immunosuppressive agent for organ transplantation. Ann Intern Med 101:667-682, 1984.
3. Calne RY, Thiru S, McMaster P, et al.: Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. Lancet 2:1323-1327, 1978.
4. Canadian Multicenter Transplant Study Group: A randomized clinical trial of cyclosporine in cadaveric renal transplantation: analysis at three years. N Engl J Med 314:1219-1225, 1986.
5. Schmitz-Schumann, M: Interim report of clinical studies presented at the international symposium on cyclosporin in autoimmune diseases, Basel March 18-20, 1985; in Borel, Cyclosporin. Prog Allergy 38:436-446, 1986.
6. Williams R, Blackburn A, Neuberger J, Calne RY: Long-term use of cyclosporin in liver grafting. Q J Med 57:897-905, 1985.
7. Austin III HA, Palestine AG, Sabnis SG et al.: Evolution of cyclosporin nephrotoxicity in patients treated for autoimmune uveitis. Am J Nephrol 9:392-402, 1989.
8. Curtis JJ, Luke RG, Dubovsky E et al.: Cyclosporin in therapeutic doses increases renal allograft vascular resistance. Lancet 2:477-479, 1986.

9. Kahan BD: Cyclosporine nephrotoxicity: Pathogenesis, Prophylaxis, Therapy and Prognosis. Am J Kidney Dis 8:323-331, 1986.
10. Kopp JB and Klotman PE: Cellular and molecular mechanisms of cyclosporin nephrotoxicity. J Am Soc Nephrol 1:162-179, 1990.
11. English J, Evan A, Houghton DC, Bennet WM: Cyclosporin-induced acute renal dysfunction in the rat. Transplantation 44:135-141, 1987.
12. Myers BD, Ross J, Newton L, Leutscher J, Perlroth M: Cyclosporine-associated chronic nephropathy. N Engl J Med 311:699-709, 1984.
13. Myers BD: Cyclosporine nephrotoxicity. Kidney Int 30:968-974, 1986.
14. Morris PJ: Cyclosporine, In Morris PJ: Kidney Transplantation; Principles and Practice, Third edition, W.B. Saunders Company, 1988, p.285-317.
15. Murray BM, Paller MS, Ferris TF: Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. Kidney Int 28:767-774, 1985
16. Weinberg JM: Issues in the pathophysiology of nephrotoxic renal tubular cell injury pertinent to understanding cyclosporine nephrotoxicity. Transplant Proc 17(Suppl 1): S81-S90, 1985.
17. Barros EJM, Boim MA, Ajzen H et al.: Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. Kidney Int 32:19-25, 1987.
18. Whithing PH, Simpson JG: Lithium Clearance measurements as an

- indication of cyclosporine A nephrotoxicity in the rat. Clin Sci 74:173-178, 1988
19. Dieperink H, Starklint H, Leyssac PP: Nephrotoxicity of cyclosporine- An animal model: Study of the nephrotoxic effect of cyclosporine on overall renal and tubular function in conscious rats. Transplant Proc 15(Suppl1):2736-2741, 1983
 20. Bell PD: Calcium antagonists and intrarenal regulation of glomerular filtration rate. Am J Nephrol 7:suppl 1,pp24-31, 1987.
 21. Loutzenhiser R, Epstein M: Modification of the renal hemodynamic response to vasoconstrictors by calcium antagonists. Am J Nephrol 7(Suppl1):S7-S16, 1987.
 22. Puschett JB: Do calcium channel blockers protect against renal ischemia ?. Am J Nephrol 7:suppl 1,pp49-56, 1987.
 23. Rooth P, Davidson I, Diller K, Taljedal IB: Protection against cyclosporine-induced impairment of renal microcirculation by verapamil in mice. Transplantation 45:433-437, 1988.
 24. Harris DCH, Hammond WS, Burke TJ, Schrier RW: Verapamil protects against progression of experimental chronic renal failure. Kidney Int 31:41-46, 1987.
 25. Bunke M, Wilder: Effect of verapamil on glomerular filtration rate and glomerular prostaglandin production during cyclosporine administration. Transplantation 46:919-921, 1988.
 26. Wagner K, Phillip Th, Heinemeyer G, Brocmuller F, Roots I, Nuemayer HH: Interaction of calcium blockers and cyclosporine. Transplant Proc 21:1453-1456, 1989.

27. Lindholm A, Henricsson S: Verapamil inhibits cyclosporine metabolism. *Lancet* 1:1262, 1987.
28. Pelayo JC, Harris DCH, Shanley PF, Miller GJ, Schrier RW: Glomerular hemodynamic adaptations in remnant nephron: effects of verapamil. *Am J Physiol* 254:F425-431, 1988.
29. Shapiro JI, Cheung C, Itabashi A, Chan L, Schrier RW: The effect of verapamil on renal function after warm and cold ischemia in isolated perfused rat kidney. *Transplantation* 40:596-600, 1985.
30. Iaina A, Herzog D, Cohen S, Gamendo S, Kapuler S, Serban GS, Eliahou HE: Calcium entry blockade with verapamil in cyclosporine A plus ischemia induced acute renal failure. *Clin Nephrol* 25(Suppl1):S168-S170, 1986.
31. Renton KW: Inhibition of hepatic microsomal drug metabolism by the calcium channel blockers diltiazem and verapamil. *Biochem Pharmacol* 34:2549-2555, 1985.
32. Schrier RW, Arnold PE, Van Putten VJ, Burke T: Pathophysiology of cell ischemia. In Schrier RW and Gottschalk CW (eds): *Diseases of the Kidney, Fourth Edition*, Little, Brown and Company, Boston/Toronto, 1988, p.1379.
33. Sumpio B, Baue AE, Chaudry IH: Treatment with verapamil and adenosine triphosphate $MgCl_2$ reduces cyclosporine nephrotoxicity. *Surgery* 101:315-322, 1987.
34. Scolbe JE, Senior JCM, Chan P, Varghese Z, Sweny P, Moorhead JF: In vitro cyclosporine toxicity. The effect of verapamil. *Transplantation* 47:647-650, 1989.
35. Pochet JM, Pirson Y: Cyclosporine-diltiazem interaction.

- Lancet 1:979, 1986.
36. McNally P, Mistry N, Idle J, Walls J, Feehally J: Calcium channel blockers and cyclosporine metabolism. Transplantation 47:1071, 1989.
 37. Chan L, Schrier RW: Effects of calcium channel blockers on renal function. Annu Rev Med 41:289-302, 1990.
 38. Dawidson I, Rooth P, Daniel F et al.: Verapamil ameliorates acute cyclosporine (CsA) nephrotoxicity and improves immunosuppression after cadaver renal transplantation. Transplant Proc 21:1511-13, 1989.
 39. Wagner K, Albrecht S, Neumayer HH: Prevention of posttransplant acute tubular necrosis by the calcium antagonist diltiazem: A prospective randomized study. Am J Nephrol 7:287-291, 1987.
 40. Neumayer HH, Wagner K: Prevention of delayed graft function in cadaver kidney transplants by diltiazem: outcome of two prospective, randomized clinical trials. J Cardiovasc Pharmacol 10 (Suppl 10):S170-S177, 1987.
 41. Dawidson I, Rooth P: Effects of calcium antagonists in ameliorating cyclosporine A nephrotoxicity and posttransplant ATN, in Epstein M, Loutzenhiser R (eds): Calcium antagonists and the kidney. Philadelphia, Hanley and Belfus, 1990, p 233.
 42. Loutzenhiser R, Epstein M: The renal hemodynamic effects of calcium antagonists, in Epstein M, Loutzenhiser R (eds): Calcium antagonists and the kidney. Philadelphia, Hanley and Belfus, 1990, p.33.

43. Nakamoto M, Shapiro JI, Mills SD, Schrier RW and Chan L:
Improvement of renal preservation by verapamil with 24-hour
cold perfusion in the isolated rat kidney. Transplantation
45:313-15, 1988.
44. Duggan GA, MacDonald GJ, Charlesworth JA, Pussel BA: Verapamil
prevents posttransplant oliguric renal failure. Clin Nephrol
24:289-291, 1985.
45. McNally PG, Baker F, Mistray N, Walls J, FeeHally J: Effect
of nifedipine on renal haemodynamics in an animal model of
cyclosporine A nephrotoxicity. Clin Sci 79:259-266, 1990.

ARDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ