

Siklosporin A nefrotoksisitesine karşı vitamin E'nin etkisi

Dr. Mahmut ÖZDEMİR¹, Dr. Yasemin AKTAN¹, Dr. Emine DÜNDAR², Dr. Ömer ÇOLAK³, Dr. M.Ýpek CÝNGÝ¹, Dr. Nilüfer TEL².

Osmangazi Üniversitesi Týp Fakóltesi Farmakoloji¹, Patoloji² ve Biyokimya³ Anabilim Dallarý, Meþelik-ESKÝPEHÝR.

ÖZET:Siklosporin A (CsA) organ transplantasyonlarýnda ve otoimmün hastalýklarýn tedavisinde sýklýkla kullanýlan immünosüpresif bir ilaçtır. Nefrotoksik etkisi en ciddi yan tesiridir ve doz kýsýtlayýcý özellik gösterir. CsA'nýn preglomerüler arteriyollerde vazokonstriksiyon yaparak nefrotoksisiteye neden olabileceði ileri sürülmüşse de bu yan tesirinin mekanizması halen tam olarak açıklanamamýştır. Vitamin E (Vit E) antioksidan özelliði ile peroksidleri ve serbest oksijen radikallerini nötralize eder. Bu etkisi ile hücre membranýný oksidatif zedelenmeye karşı korur.

Bu çalışmada CsA nefrotoksisitesine karşı Vit E'nin protektif etkisi araştırýldý. Bu amaçla 3 gruba ayrılan sıçanlarýn (n=7) I. Grubuna serum fizyolojik (i.p.), II.Grubuna 30 mg/kg/gün dozunda CsA (oral), III.Grubuna ise aynı doz CsA ile birlikte 10 mg/kg/gün dozunda Vit E (i.p.) olarak 10 gün süreyle uygulandı. 10.gün sonunda hayvanlarýn 24 saatlik idrarları toplandı, kan örnekleri alındý ve histopatolojik inceleme için böbrekleri çıkarýldý. Ýdrarda Na⁺, kreatinin ve ürik asid, plazmada ise bunlara ilave olarak kan üre azotu düzeyleri ölçüldü. Kreatinin klerensi (CICr), fraksiyonel sodyum ekskresyonu (FENa) standart formüller kullanýlarak hesaplandı. Sonuçlar ANOVA ve Fisher Tam Olasýlýk Testi kullanýlarak karşılaştırýldý.

Biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler sonucunda Vit E'nin CsA nefrotoksisitesine karşı protektif etkinlik gösterdiði bulundu.

Anahtar kelimeler: Siklosporin A, Vitamin E, nefrotoksisite, sıçan.

GÝRÝÞ

Siklosporin A (CsA) organ transplantasyonlarýnda ve çeþitli otoimmün hastalýklarýn tedavisinde immünosüpresif olarak kullanýlan ajanlardan biridir¹¹. Ancak nefrotoksik etkisi ciddi bir yan tesiri olup doz kýsýtlayýcý özellik gösterir. Akut CsA nefrotoksisitesi renal kan akýmýnýn ve glomerüler filtrasyon hızýnýn düşmesi ile karakterizedir^{10,16,12}. CsA'nýn preglomerüler arteriyollerde vazokonstriksiyon yaparak nefrotoksisiteye neden olabileceði ileri sürülmüşse de bu yan tesirin mekanizması halen tam olarak açıklanamamýştır^{2,4,14}.

Vazokonstriksiyona baðlý olarak gelişen iskemi ve nekroz sırasında açýða

çıkan serbest oksijen radikalleri de CsA'nýn nefrotoksik etkisinde rol oynayabilir.

Vitamin E (Vit E) oksijen radikallerinin hücre membraný lipidlerine karşı baþlatýlıklarý oksidatif reaksiyonu antioksidan etkisi ile önler. Ve sitoprotektif etkinlik gösterir^{7,13}. Yapýlan çalışmalarda Vit E'nin böbrek, karaciðer ve myokard iskemisine karşı protektif etkinlik gösterdiði saptanmýştır^{8,5,6}.

Bu çalışmada sıçanlarda CsA nefrotoksitesine karşı Vit E'nin protektif etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Çalışmada 140-200 g ağırlığında 21 albino erkek sıçan kullanıldı. Bütün hayvanların deney süresince yeterli miktarda yem ve su almaları sağlandı. Sıçanlar 7'perli 3 gruba ayrıldı:

Grup I (Kontrol): Serum fizyolojik (i.p.).

Grup II (CsA): 30 mg/kg/gün CsA (Sandimmune, mide sondası ile oral yoldan)

Grup III (Vit E+ CsA): 10 mg/kg/gün Vit E (Ephynal, i.p.)+30 mg/kg/gün CsA (Sandimmune, mide sondası ile oral yoldan)

Yiğiller hayvanlara 10 gün süreyle uygulandı. 10.gün sonunda sıçanlar metabolizma kafeslerine alınarak 24 saatlik idrarları toplandı. Daha sonra eter anestezisi altında intrakardiyak kan örnekleri alınarak böbrekleri histopatolojik inceleme için çıkarıldı. Kan örnekleri heparinli tüplere alınarak 2 saat oda sıcaklığında (21°C) bekletildi, daha sonra 1 dakika santrifüj edilerek (3000 rpm) plazmaları ayrıldı. Plazmada Na⁺, kreatinin, üre azotu ve ürik asit, idrarda ise Na⁺, kreatinin ve ürik asit düzeyleri otoanalizörde ölçüldü. Kreatinin klerensi (Cl_{Cr}) ve fraksiyonel sodyum ekskresyonu (FENa) aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı:

$$U_{cr} \times U_v (24 \text{ saat})$$

$$Cl_{Cr} = \frac{U_{cr} \times U_v (24 \text{ saat})}{P_{cr} \times 1440 (\text{dak})}$$

$$FENa = \frac{U_{Na} \times P_{cr}}{P_{Na} \times U_{cr}}$$

Cl_{Cr}= Kreatinin klerensi (ml/dak)

FENa=Fraksiyonel sodyum ekskresyonu (%)

U_{Cr} = İdrar kreatinin konsantrasyonu (mg/dL)

P_{Cr} = Plazma kreatinin konsantrasyonu (mg/dL)

U_{Na} = İdrar sodyum konsantrasyonu (mmol/L)

P_{Na} = Plazma sodyum konsantrasyonu (mmol/L)

U_v = İdrar hacmi (ml)

Histopatolojik değerlendirme için böbrekler formalin ile tesbit edildikten sonra parafin bloklara alındı. Daha sonra bu bloklardan hazırlanan 5-6 mikronluk kesitler Hematoksilen-Eosin ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Böbreklerin histopatolojik incelemesinde;

- Konjesyon

-Tübül epitelinde hidropik şişme, epitel yassılaşması ve atrofi

-Tübül lümeninde eozinofilik madde, nekrotik artık ve proteinöz materyal

-Tübüllerde nekroz, interstisyel fibrozis, dilatasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonu

- Bowman kapsül mesafesinde daralma kriterleri gözönüne alınarak değerlendirme yapıldı. Bulgular (-) yok, (+) hafif, (++) orta ve (+++) şiddetli olarak değerlendirildi.

Histopatolojik sonuçlar Fisher Tam Olasılık testi, biyokimyasal sonuçlar ise Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

BULGULAR

Kan ve idrarda elde edilen biyokimyasal sonuçlar Tablo-1'de gösterilmiştir. CsA verilen grupta idrar hacmi (3.28 ± 0.56 ml) kontrol grubuna göre düşük bulundu (5.26 ± 0.80 ml) (p<0.01). Vit E idrar hacmini 4.92 ± 1.17 ml'ye yükseltti.

Cl_{Cr} CsA alan grupta anlamlı şekilde azalırken (0.17 ± 0.08 ml/dak) (p< 0.001) Vit E Cl_{Cr}'ni 0.39 ± 0.07 ml/dak'ya yükseltti (Bekil-1). CsA grubunda FENa (%) değeri kontrol grubuna göre önemli ölçüde artarken (0.65 ± 0.09) (p< 0.01) E vitamini bu değeri (0.40 ± 0.13) düşürdü .

CsA verilen grupta yükselen plazma Na⁺, ürik asit ve BUN değerleri Vit E tarafından düşürüldü. Vit E verilen grupta bu değerler sırasıyla 145.71 ± 4.11 mmol/L, 1.12 ± 0.15 mg/dL ve 19.42 ± 2.50 mg/dL olarak bulundu. CsA idrar sodyum ve ürik asit düzeylerini kontrole göre düşürürken Vit E bu

değerleri sırasıyla 44.20 ± 4.32 mmol/L ve 8.17 ± 1.02 mg/dL'ye yükseltti (Tablo-1).

Renal histopatolojik bulgular Tablo-2'de gösterilmiştir. CsA verilen grupta böbreklerde konjesyon ($p<0.05$), hidropik şişme ($p<0.01$),

tübüler atrofi ve epitel yassılaşması ($p<0.05$), nekrotik artık ve proteinöz materyal ($p<0.01$) ve tübüler dilatasyon ($p<0.05$) gelişirken Vit E'nin bu değişikliklerin oluşumunu önlediği görüldü. (Resim1 ve Resim 2)

Tablo I: CsA ve Vit E uygulanan gruplarda elde edilen biyokimyasal sonuçlar.

	Kontrol	CsA	CsA + Vit E
Ydrar hacmi (ml)	526 ± 0.80	$3.28 \pm 0.56^{**}$	4.92 ± 1.17
ClCr (ml/dak)	0.40 ± 0.07	$0.17 \pm 0.08^{***}$	0.39 ± 0.07
Plazma Na ⁺ (mmol/L)	143.14 ± 5.55	$160.00 \pm 3.52^{**}$	145.71 ± 4.11
BUN (mg/dL)	19.57 ± 1.51	$24.85 \pm 2.91^{**}$	19.42 ± 2.50
Plazma ürik asid (mg/dL)	1.15 ± 0.26	$1.50 \pm 0.12^{**}$	1.12 ± 0.15
Ydrar Na ⁺ (mmol/L)	45.85 ± 6.6	$36.42 \pm 4.85^*$	44.20 ± 4.32
Ydrar ürik asid (mg/dL)	8.45 ± 1.00	$6.00 \pm 1.15^{**}$	8.17 ± 1.02
FENa (%)	0.35 ± 0.08	$0.65 \pm 0.09^{**}$	0.40 ± 0.13

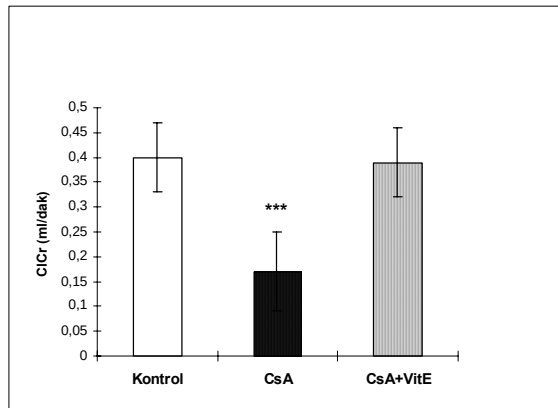
CsA: Siklosporin A; Vit E: Vitamin E; ClCr: Kreatinin klerensi, BUN: Kan üre azotu; FENa: Fraksiyonel sodyum ekskresyonu. (Değerler Ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.)
n=7 * $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$

Tablo II: Böbreklerin histopatolojik incelemesinde elde edilen sonuçlar.

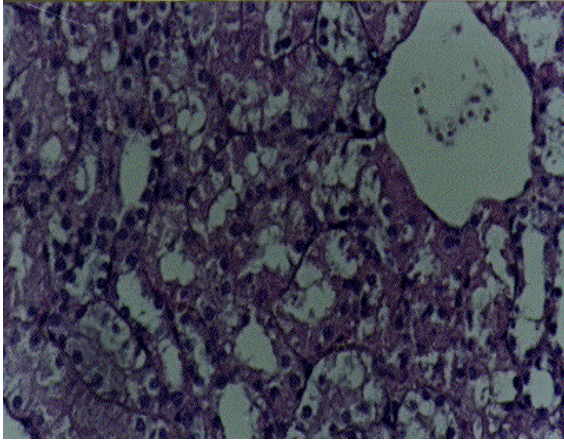
	Kontrol				CsA				CsA + Vit E			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Konjesyon	-	7	-	-	-	3	2	1*	-	7	-	-
Hidropik şişme	-	5	-	-	-	-	4	3**	-	4	3	-
Tübüler atrofi ve epitel yassılaşması	3	4	-	-	-	4	2	1*	2	-	5	-
Eozinofilik madde	3	4	-	-	2	3	2	-	5	2	-	-
Nekrotik artık ve proteinöz materyal	7	-	-	-	-	5	2	-**	7	-	-	-
Tübüler nekroz	5	2	-	-	-	2	5	-**	-	7	-	-
Interstisyel fibrozis	7	-	-	-	7	-	-	-	7	-	-	-
Mononükleer hücre infiltrasyonu	5	2	-	-	3	4	-	-	4	3	-	-
Bowman kapsül mesafesinde daralma	7	-	-	-	1	-	-	-	7	-	-	-
Tübüler dilatasyon	-	7	-	-	-	4	3	-*	-	7	-	-

(-) Yok (+) Minimal (++) Orta (+++) İddetli n=7 * $p<0.05$ ** $p<0.01$

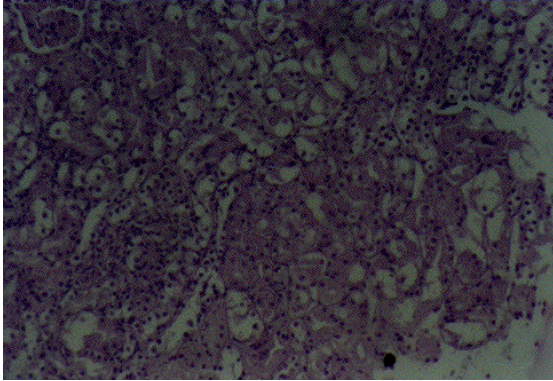
ClCr: Kreatinin klerensi, CsA: Siklosporin A, Vit E: Vitamin E (Ortalama $\pm$ SD) *** $p<0.001$



Şekil-1: Kontrol ve ilaç uygulanan gruplarda kreatinin klerensi düzeyleri



Resim1: Siklosporin A grubunda tübülüs epitel hücrelerinde hidropik şişme (H+E x 400).



Resim 2: Siklosporin A grubunda nekrotik değişiklikler (H+E x 200).

TARTIÖMA

Bu alışmada Vit E'nin CsA ile oluşan idrar hacmindeki ve kreatinin klerensindeki azalmayı, plazma Na^+ , BUN ve ürik asid düzeylerindeki artmayı, idrarla atılan Na^+ ve ürik asid miktarındaki azalmayı önlediği bulunmuştur. Bunun yanında FENa değerini olumlu yönde etkilediği saptanmıştır. Elde ettiğimiz histopatolojik bulgular da bu biyokimyasal sonuçları desteklemektedir. Histopatolojik incelemelerde CsA'nın neden olduğu tübüler nekrozun Vit E tarafından önlediği saptanmıştır.

CsA'nın en önemli yan tesirlerinden biri olan nefrotoksitesinin patogenezi halen tam olarak açıklanamamıştır. Ancak yapılan çalışmalarda CsA'nın preglomerüler arteriyollerde yaptığı vazokonstriksiyonun nefrotoksik etkisinde rol

oynayabileceği ileri sürülmüştür^{2,4,14}. Vazokonstriksiyona bağlı olarak gelişen iskemi nekroza neden olmaktadır. Ayrıca iskemi sırasında ortaya çıkan serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu da Cs A'nın nefrotoksik etkisinde rol oynamaktadır^{3,1}.

Vit E oksijen radikallerinin hücre membranı lipidlerine karşı başlattıkları oksidatif reaksiyonları antioksidan etkisiyle önler ve sitoprotektif etki gösterir^{7,13}. Yapılan alışmalarda Vit E'nin böbrek, karaciğer ve kalpte iskemiyeye bağlı hasarı önlediği bildirilmiştir^{8,15,5,17}. Takenaka ve ark. böbrek iskemisi yapacakları sıçanlara 2 ve 10 mg/kg dozlarında Vit E uygulamaları, Vit E alan ve 120 dakika iskemide kalan grupta yapama oranını %46,7 oranında yüksek bulmuşlardır. Marubayashi ve ark. ise iskemik sıçan karaciğerindeki hasarın 10 mg/kg dozunda Vit E ile önlediğini bildirmektedir.

De Lorgeil ve ark. kalp transplantasyonu uygulanan hastalarda CsA nefrotoksisinin Vit E ile azaldığını, kan kreatinin düzeyinin anlamlı ölçüde düştüğünü ($p<0.01$) bildirmektedir. Aynı alışmada Vit E'nin trombosit agregasyonunu da önlediği bildirilmektedir. Bu alışmalar bizim bulgularımızı desteklemektedir.

CsA'nın nefrotoksik etkisinde oluşturduğu vazokonstriksiyona bağlı olarak gelişen iskemi önemli rol oynamaktadır. İskemi sırasında ortaya çıkan serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu CsA'nın nefrotoksik etkisine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır^{3,1}. Vit E antioksidan özeliği ile hücreleri koruyabilir ve CsA nefrotoksitesini azaltabilir. Bunun yanında Vit E'nin endotel hücrelerinde prostasiklin üretimini arttırdığı bildirilmiřtir⁶. Prostrasiklin vazodilatör etkisi ile CsA'nın neden olduğu vazokonstriksiyonu önleyebilir. Bazı alışmalarda Vit E'nin CsA'nın plazma konsantrasyonunu ve immunosupresif etkisini değiştirmedeği bildirilmiřtir³. Ancak bu konunun deneysel olarak araştırılmasının uygun olacağı kanısındayız.

Sonuç olarak CsA nefrotoksisitesine karþý hastalara Vit E uygulanmasý renal hasarý önlemede klinik aýýdan yarar saðlayabilir.

SUMMARY

Effects of vitamin E on cyclosporine A nephrotoxicity

Cyclosporine A (CsA) is the major agent used to immunosuppression. Nephrotoxicity is the most serious side effect of CsA. The pathogenesis of CsA nephrotoxicity is still unclear, however, many experimental studies suggested that nephrotoxicity depends on preglomerular vasoconstriction. Vitamin E (Vit E) is an antioxidant and free radical scavenger. It may prevent cell membrane from oxidative damage.

In this study the protective effect of Vit E on CsA nephrotoxicity was investigated. Animals were randomly divided into three experimental groups (n=7). Group I (Control group) received isotonic saline i.p. Group II received CsA (30 mg/kg/day, orally). Vit E (10 mg/kg/day i.p.) and CsA (30 mg/kg/day, orally) were administered to the animals in Group III. Kidneys were removed for the histopathological assessment after blood and urine samples of animals were collected at the end of 10 th day. Concentrations of sodium, creatinine, uric acid and urea nitrogen (only plasma) were measured in plasma and urine. Creatinine clearance (ClCr) and fractional sodium excretion (FENa) were calculated using standard formulas. ANOVA and Fischer's test were used for statistical analysis.

Our results suggest that Vit E has protective effect to CsA nephrotoxicity.

Keywords: Cyclosporine A, Vitamin E, nephrotoxicity, rat.

KAYNAKLAR

1. Chancerelle Y, De Lorgeil M, Viret R, et al: Increased lipid prooxidation in cyclosporin-treated heart transplant recipients . Am J Cardiol 1991, 68:813.
2. Dawidson I, Rooth P, Fry WR, et al: Prevention of acute cyclosporine induced renal blood inhibition and improved immunosuppression with verapamil. Transplantation 1989, 48:4:575-80.
3. De Lorgeil M, Boissonnat P, Salen P, et al: The beneficial effect of dietary antioxidant supplementation on platelet aggregation and cyclosporine treatment in heart transplant recipients. Transplantation 1994, 58:2:193-95.
4. 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.
5. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, et al: Role of oxygen in myocardial ischaemic and reperfusion damage:effect of alfa-tocopherol. Acta Vitaminol Enzymol 1985, 7Suppl:61-70.
6. Kunisaki M, Umeda F, Inoguchi T, et al: Vitamin E binds to specific binding sites and enhances prostacyclin production by cultured aortic endothelial cells. Thromb Haemost 1992, 68:774.
7. 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.
8. Marubayashi S, Dohi K, Ochi K, et al: Role of the free radicals in ischemic rat liver cell injury: prevention of damage by α -tocopherol administration. Surgery 1986, 99:2:184-191.
9. Mason J, Welsch J, Torhorst J: The contribution of vascular obstruction to the functional defect that follows renal ischemia. Kidney Int 1987, 31:65-71.
10. Murray BM, Paller MS, Ferris TF: Effects of CsA administration on renal hemodynamic in conscious rats. Kidney Int 1985, 28:767-74.
11. Nussenblatt RB, Palestine AG: Cyclosporine immunology, pharmacology and therapeutic uses. Surv Ophthalmol 1986, 31:159.
12. Orugun EO, Smart LM, Whiting PH: The effect of calcium blockade with verapamil on experimental cyclosporine nephrotoxicity. Transplant Proc 1991, 23:1:354-5.
13. Pascoe GA, Reed DJ: Cell calcium, vitamin E and the thiol redox system in cytotoxicity. Free Radical Biology and Medicine 1989, 6:209-24.
14. 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 1992, 50:2053-58.
15. Slakey D, Roza G, Johnson C, et al: Ascorbic acid and α -tocopherol prolong rat cardiac allograft survival. Transplant Proc 1993, 25:1:610-11.
16. Strzelecki T, Kumar S, Khauý R, et al: Impairment by cyclosporine of membrane-mediated functions in kidney mitochondria. Kidney Int 1988, 34:234-240.

17. Takenaka M, Tatsukawa Y, Dohi K, et al: Protective effect of α -tocopherol and coenzyme Q10 on warm ishchemic damages of the rat kidney.

Yazýpma Adresi:

Dr. Mahmut ÖZDEMÝR
Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalý
MEPELÝK -ESKÝPEHÝR