

# HİPERKOLESTEROLEMİNİN SİKLOSPORİN-A NEFROTOKSİSİTESİNE ETKİSİ<sup>(X)</sup>

Güner ÖĞÜNÇ\*, Gülsen ÖNER\*\*

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı\*

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı\*\*

## ÖZET

*Hiperkolesteroleminin Siklosporin-A (CsA) nefrotoksitesine etkisinin araştırıldığı bu deneysel çalışmada erkek albino sıçanlar kullanıldı. Kontrol gurubunu oluşturan 8 hayvan 1 hafta süreyle normal rat yemi ve su ile beslenirken (Grup I), Grup II'de normal yem ve su ile beslenen 8 sıçana üçüncü hafta gavaj yolu ile günde 10 mg/kg CsA tedavisi uygulandı. Grup III'teki 8 hayvan ise 3 hafta süreyle %4 kolesterol içeren diyet aldılar ve 3. hafta bunlar da 10 mg/kg CsA tedavisine maruz bırakıldılar. 7 günlük tedavi sonunda 1 saatlik idrar örneklerinde kreatinin, kan örneklerinde ise serum total kolesterolü, serum kreatinini ve BUN değeri ölçüldü. Sonuçlarımız 3 haftada oluşturulan orta derecedeki hiperkolesteroleminin CsA'nın sebep olduğu nefrotoksik etkiyi anlamlı ölçüde önlediğini göstermesi bakımından ilginç idi.*

**Anahtar sözcükler:** Hiperkolesterolemi, Siklosporin-A nefrotoksitesi

## SUMMARY

*In order investigate the effect of hypercholesterolemia on the Cyclosporin-A (CsA) induced nephrotoxicity, male albino rats were used in this experimental study. 8 animals received normal rat food and tap water for 1 week in the control group (Group I) while 8 animals receiving normal rat food and tap water, were treated with 10 mg/kg of Cyclosporin-A daily with nasogastric tube, during the third week in Group II. 8 animals were kept on a diet of 4% of cholesterol for 3 weeks, which were treated with 10 mg/kg of CsA daily along with the third week in Group III. At the end of the seven days of treatment, urine creatinine and total serum cholesterol, serum creatinine, blood urea nitrogen were determined in the one hour urine collection and blood samples. Our results were remarkable indicating CsA induced nephrotoxicity which was significantly prevented with mild hypercholesterolemia, achieved in three weeks.*

**Key words:** Hypercholesterolemia, Cyclosporin-A nephrotoxicity

Transplant cerrahisi ile uğraşanların korkulu rüyası nakledilen organın reddidir. Bu nedenle immün sistemin normal bir yanıtı olan bu cevabın üstesinden gelmek amacı ile pek çok immünoşüpresif ajan kullanılmaktadır. Bunlar arasında en iyi bilinen ve yaygın kullanım alanı bulanlar, steroidler, Azathioprin ve Cyclosporin-A (CsA)'dır (1-5). CsA güçlü bir immün sistem baskılayıcısı olmasına

karşın yan etkileri klinik kullanımını kısıtlamaktadır. CsA'nın en önemli yan etkisi nefrotoksitesidir (1,6-10). Proksimal renal tübüllerde atrofi ve kortekste yaygın fibrozis yapması (6,8), güçlü vazokonstriksiyona bağlı glomerüler kapiller basınç artışı ve glomerüler filtrasyon hızı (GFR) azalışı (7,8, 11,12) CsA'nın nefrotoksik etkilerinin nedeni olarak ileri sürülmektedir. Kronik

(X). Bu araştırma kısmen Sandoz Ürünleri Ltd. Şti. tarafından desteklenmiştir.

CsA kullanımının böbrek dokusunda Prostaglandin E<sub>2</sub> yapımını azaltıp TxA<sub>2</sub> yapımını arttırarak vazokonstrüksiyona neden olduğu bildiren yayınlarda (6) CsA'nın nefrotoksik etkisi prostanoid yapımındaki değişiklik ile açıklanırken, Pfeilschifter ve arkadaşları (13) CsA nefrotoksitesini hücre içi aşırı kalsiyum girişi ve renal direnç artışına bağlamaktadırlar.

Mekanizması henüz tam olarak açıklanamayan Siklosporin nefrotoksitesini böbrek nakil hastalarının immünoşüpresyon tedavisinde Siklosporin kullanma şansını azaltmaktadır.

Siklosporinin tedavi dozu azaltılmadan, böbrek üzerine olumsuz etkilerinin önlenmesi, renal transplant hastalarının tedavisine çok büyük katkı sağlayacak bir yaklaşımdır.

Kolesterolün renal tübül hücreleri çeşitli nefrotoksik ajanlara karşı koruyucu etkisinden bahseden yayınlar (14-16) dikkate alındığında, hiperkolesterolemide veya kolesterolden zengin diyetle beslenenlerde CsA'nın tübül hasar öncelikli nefrotoksik etkisinin normokolesterolemiklere nazaran daha az olması beklenir. Bu hipotezin doğru olması halinde çok ucuz ve emniyetli bir yaklaşımla Siklosporinin efektif immünoşüpresif dozu uygulanarak, nefrotoksitesite ortaya çıkmadan rejeksiyon önenebilir.

Hiperkolesterolemiye karşı diğer organ damarlarının duyarlı olmasına karşın renal vasküler yatağın dirençli olduğunu bildiren Kamanna ve arkadaşlarının (16) çalışması da

kolesterol artışından böbreğin olumsuz etkilenmediğini düşündürmektedir. Ancak kolesterolün böbreği koruyucu etkisi ile ilgili hipotezimizi destekleyen doğrudan çalışma mevcut değildir. Bu nedenle hiperkolesteroleminin Siklosporin nefrotoksitesini önleyip önlemediği tertiplenen bu deneysel çalışma ile araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada ağırlıkları 200-260 g arasında değişen erkek albino sıçanlar kullanıldı. I. Grubu oluşturan 8 hayvan 1 hafta süreyle normal rat yemi ve su ile beslendi. II. Gruptaki normal yem ve su ile beslenen 8 hayvana 3. hafta 1 hafta süreyle 10 mg/kg/gün CsA solüsyonu (Sandimmun, Sandoz Pharma LTD, EXP 1194/703 MFD 1191) 0.5 ml zeytinyağı içinde gavaj yolu ile verildi. III. Gruptaki 8 hayvan ise 3 hafta süreyle %4 kolesterol içeren diyet ve çeşme suyu ile beslenirken, 3. hafta 10 mg/kg/gün CsA ile Grup II'dekine benzer şekilde tedavi edildiler. CsA tedavisinin başlangıç ve bitiminde tüm hayvanların vücut ağırlıkları kaydedildi.

Tedavi sonunda 16 saat süreyle aç bırakılan sıçanlar (1 g/kg) ürethan anestezisi ile uyutulduktan sonra sol eksternal juguler ven ve sağ karotis artere birer polietilen kateter yerleştirildi. Arter kateterizasyonu kan basıncı monitorizasyonu için kullanılırken, ven kateteri aracılığı ile yapılan serum fizyolojik (SF) infüzyonu ile kan basıncı deney süresince sabit tutuldu. Daha sonra göbek altı orta hat kesisi ile mesaneye 18 numara polietilen kateter yerleştirildi ve 1 saat süreyle bu kate-

terin aracılığı ile idrar toplandı. Alınan idrar ve kan örnekleri ölçüm yapılmaya kadar -20°C'de saklandı.

İdrar örneklerinde kreatinin, juguler venden alınan kan örneklerinde total serum kolesterolü, serum kreatinini ve BUN değerleri ölçüldü. Kreatinin Chasson ve arkadaşları (17) tarafından geliştirilen yöntemle Technicon Axon kreatinin reaktifleri kullanılarak; kolesterol, Allain ve arkadaşları (18) tarafından tanımlanan enzimatik kolesterol değerlendirme metodu ile Technicon Axon sistemi ile, BUN değerleri ise örneklerin deproteinizasyon işleminden sonra Tiffany ve arkadaşları (19) tarafından geliştirilen yöntemle Technicon Axon üre nitrojen reaktifleri kullanılarak otoanalizör (Dacos XL)'de tayin edildi.  $GFR = \frac{\text{idrar kreatinini}}{\text{Plasma kreatinini}} \times \text{İdrar hacmi}$  ( $\mu\text{l/dk}$ ) formülü kullanılarak 100g vücut ağırlığı (v.a.)'na göre hesaplandı.

Sonuçların değerlendirilmesinde "Student'in t testi"nden yararlanıldı.

### BULGULAR

İkinci haftanın sonunda 2 hafta normal sıçan yemi ile beslenen hayvanların ortalama vücut ağırlıkları I. Grupta 233.5±8.46g, II. Grupta 226.2±20.63 g idi, 2 hafta kolesterolden zengin diyetle beslenen III. Grupta vücut ağırlığında saptanan %10.7±0.7'lik artış anlamlı idi (223.7±12.3 g iken 240.0±15.15 g'ya ulaştı, p<0.05).

I. Gruptaki kontrol hayvanlara gavajla 7 gün 0.5 ml SF verilmesi veya II. ve III. Grupta

0.5 ml zeytinyağı içinde 10 mg/kg/gün CsA verilmesinin vücut ağırlığı üstüne önemli etkisi görülmedi.

### Serum kolesterol değerlerindeki değişiklikler

Normal rat yemi ve musluk suyu ile beslenen ve 1 hafta mide yolu ile 0.5 cc serum fizyolojik alan I. Grupta serum kolesterolü 57.37±4.89 mg/dl iken, 7 gün gavajla 10 mg/kg CsA alan grupta 60.2±5.72 mg/dl bulundu ve CsA tedavisinin serum kolesterolü üzerine etkisi anlamlı değildi. Kolesterollü diyetle beslenen ve 10 mg/kg/gün CsA tedavisi gören III. Grupta ise serum kolesterolünün 86.6±5.31 mg/dl'ye çıktığı saptandı ve bu artış istatistiksel öneme sahipti (p<0.05) (Tablo 1) (Şekil 1).

Kan üre nitrojeni (BUN) ve serum kreatinin değerleri tablodan da görüleceği gibi 7 gün CsA tedavisi gören II. Grupta anlamlı artış gösterdi. Bu artışa idrar kreatinindeki yükselme ve 1 saatlik idrar miktarındaki anlamlı düşme eşlik etti (Tablo 1). CsA tedavisine bağlı olarak GFR kontrol değer olan 108.21±15.9  $\mu\text{l/dk}$  100 g vücut ağırlığından 62.31±7.6  $\mu\text{l/dk}$  100 g v.a.'na düştü ve bu azalış çok önemli bulundu (p<0.001).

Aynı doz ve sürede CsA tedavisi görmelerine karşın kolesterolden zengin diyetle beslenen sıçanlarda BUN, serum ve idrar kreatinini değerleri normalden anlamlı fark göstermedi (Şekil 2). GFR ise CsA tedavisi uygulanan normokolesterolemik grup ile (Grup II) karşılaştırıldığında anlamlı derecede artış gös-

tererek  $83.12 \pm 11.5$   $\mu\text{l/dk}$  100 g vücut ağırlığı ( $p < 0.01$ ) ulaştı. Bir saatlik idrar yapımı kontrol grubunda  $78.12 \pm 7.03$   $\mu\text{l/saat}$  iken, III. Grupta  $71.25 \pm 6.94$   $\mu\text{l/saat}$  olarak saptan-

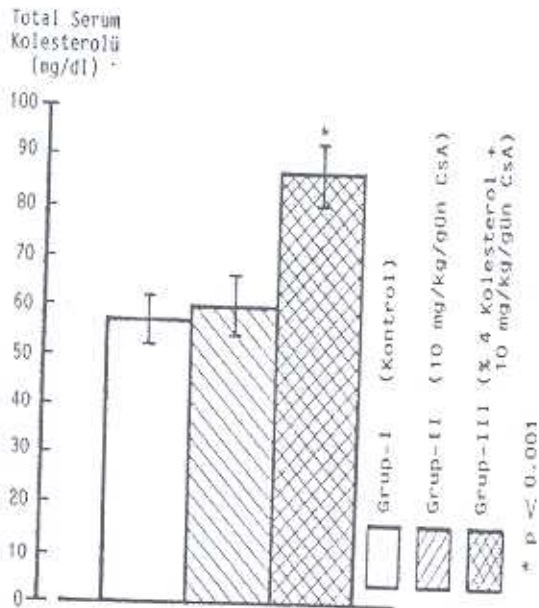
dı (Tablo I).

III. Grupta kolesterol artışının GFR üzerine düzeltici etkisi olmasına karşın korelasyon anlamlı bulunmadı.

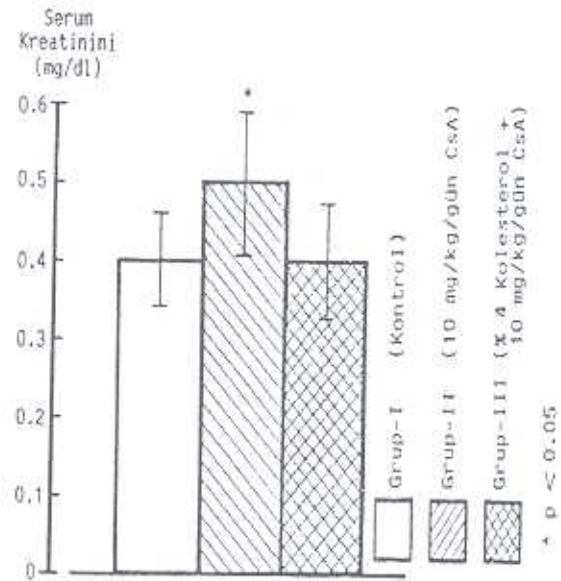
**Tablo I.** Gruplardaki serum kolesterolü ve böbrek fonksiyon testleri sonuçları

GRUPLAR	Total Serum Kolesterolü (mg/dl)	Serum Kreatinini (mg/dl)	BUN (mg/dl)	İdrar Kreatinini (mg/dl)	GFR ( $\mu\text{l/dk}$ ) 100 g v.a)	İdrar Outputu ( $\mu\text{l/Saat}$ )
Grup I Kontrol N=8	$57.3 \pm 4.89$	$0.4 \pm 0.06$	$17.0 \pm 2.32$	$79.1 \pm 4.59$	$108.21 \pm 15.9$	$78.12 \pm 7.03$
Grup II CsA (10 mg/kg/gün n=8)	$60.2 \pm 5.72$	$0.5 \pm 0.09^*$	$21.1 \pm 3.31^*$	$93.4 \pm 12.5^{**}$	$62.31 \pm 7.6^{***}$	$53.75 \pm 10.2^{***}$
Grup III Hiperkolesterolemik diyet + CsA (10 mg/kg/gün) n=9	$86.6 \pm 5.31^{***}$	$0.4 \pm 0.07$	$18.7 \pm 1.58$	$81.0 \pm 4.81$	$83.12 \pm 11.5$	$71.25 \pm 6.94$

\*\*\*  $p < 0.001$  \*\* $p < 0.01$  \* $p < 0.05$



**Şekil 1.** Gruplardaki total serum kolesterolü değerleri



**Şekil 2.** Gruplardaki serum kreatinin değerleri

## TARTIŞMA

Hiperkolesterolemili hayvanlarda gastrik bariyerin daha güçlü olduğunu gösteren önceki yayınlarımız (20,21), böbrek fonksiyonlarının kolesterol artışından olumsuz etkilenmediğini bildiren Kamanna ve arkadaşlarının (16) yayınları, kolesterolden zengin diyet alan hayvanlarda diabetes mellitus renal etkileniminin gözlenmeyişi hiperkolesterolemiye organların farklı yanıt verdiğini düşündürmektedir (14).

10 mg/kg/gün ile 7 günde belirgin nefrotoksisite oluştuğu daha önceki deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (6,8). Bizim çalışmamızda da aynı doz CsA tedavisi ile 7 gün sonra serum kreatinini ve BUN düzeylerinde anlamlı artış, GFR ve idrar yapım hızında önemli azalış saptamamız II. Gupta nefrotoksisitenin oluştuğunun kanıtıdır. Aynı sürede ve aynı doz CsA tedavisine rağmen böbrek fonksiyonlarının normal kalması ise CsA nefrotoksisitesine karşı kolesterolün koruyucu rolünü açıkça göstermektedir.

Kolesterolün CsA nefrotoksisitesini önleyici etkisi ile ilgili çalışma yoksa da fosfolipid-

lerin Gentamisine karşı böbreği koruduğunu bildiren Chan ve arkadaşlarının (22) çalışması bizim bulgularımıza dolaylı destek sağlamaktadır.

Balkan endemik nefropatili hastalarda kolesterolün sağlıklı populasyona göre düşük olduğunu bildiren Pavlovic ve arkadaşlarının (15) çalışmasında kolesterolün böbrekler üzerine koruyucu etkisi olduğu vurgulanmaktadır.

Bizim %4 kolesterollü diyetle 3 hafta beslediğimiz sıçanlarda gözlenen orta dereceli hiperkolesteroleminin CsA'nın nefrotoksik etkisini önlemesi, kolesterolün böbreği toksik etkilere karşı koruduğunu kanıtı ise de ileri çalışmalarla hiperkolesterolemi süresi ve seviyesi ile bu koruyucu etkinin ilişkisi incelenmelidir.

Sonuç olarak bu deneysel çalışmadan elde edilen bulgular, CsA'nın nefrotoksik etkisine karşı, kolesterolün böbrek fonksiyonlarını koruyucu role sahip olduğunu göstermektedir. Bu bulguların renal transplant hastalarının tedavisinde klinik önemi olabileceği kanısındayız.

## KAYNAKLAR

1. Kahan BD, Flecher SM, Lorber MI, Golden D, Conley S, Buren CT. Complications of Cyclosporine-Prednisone immunosuppression in 402 renal allograft recipients exclusively followed at a single center for from one to five years. *Transplantation* 1987; 43 (2): 197-204.
2. Princen MG, Meijer P, Volthers BG, Vonk RJ, Kuipers F. Cyclosporin A blocks bile acid synthesis in cultured hepatocytes by specific inhibition of chenodeoxycholic acid synthesis. *Biochem J* 1991; 275: 501-505.
3. Hricik DE, Mayes JT, Schulac JA. Independent effects of cyclosporine and prednisone on posttransplant hypercholesterolemia. *American Journal of Kidney Diseases* 1991; 18 (3): 353-358.
4. Reese J, Burton F, Lingle D, et al. Peptic

- ulcer disease following renal transplantation in the cyclosporin era. *The American Journal of Surgery* 1991; 162: 558.
5. Norman DJ, Shield CF, Barry JM, et al. Therapeutic use of OKT 3 monoclonal antibody for acute renal allograft rejection. *Nephron* 1987; 46: 41-47.
  6. Mc Nally PG, Feehally J. Pathophysiology of cyclosporin A nephrotoxicity: experimental and clinical observations. *Nephrol Dial Transplant* 1992; 7: 791-804.
  7. Foxwell BMJ, Ruffel B. The mechanisms of action of cyclosporine. *Transplant Immunology* 1989; 79-93.
  8. Berty RM, Adler S. In vivo and in vitro rat model cyclosporine-induced proximal tubular toxicity. *J Lab Med* 1991; 118 (1): 17-23.
  9. Land W, Castro LA, White DJ, et al. Cyclosporine in renal transplantation. *Prog Allergy* 1986; 38: 293-328.
  10. Keown PA, Stiller CR. A double-edged sword. *Hospital Practice* 1987; 207-220.
  11. Churchill PC, Rossi NF, Churchill MC, et al. Acute cyclosporine-induced renal vasoconstriction: lack of effect of theophylline. *Am J Physiol* 1990; 27: 41-45.
  12. Thomson AW, Whiting PH, Simpson JG. Cyclosporin: Immunology, toxicity and pharmacology in experimental animals. *Agent and Actions* 1984; 15: 306-327.
  13. Pfeilschifter J. Cyclosporin A augments vasoconstrictor induced rise in intracellular free calcium in rat renal mesangial cells. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 4205-4210.
  14. Reyes AA, Kissane J, Klahr S. A high cholesterol diet ameliorates renal tubular lesions in diabetic rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990; 194: 177-185.
  15. Pavlovic NM, Varghese Z, Persaud JW, et al. Partial lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency in Balkan endemic nephropathy. *Kidney International* 1991; 40 (34): 102-104.
  16. Kamanna VS, Saied SI, Evans-Hexdall L, Krischenbaum MA. Cholesterol esterase in preglomerular microvessels from normal and cholesterol-fed rabbits. *Am J Physiol* 1991; 261: 163-168.
  17. Chasson AL, Grady HJ, Stanley MA. Determination of creatinine by means of automatic chemical analysis. *Am J Clin Pathol* 1961; 35: 83-88.
  18. Allain CC, Poon LS, Chan CSG, et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974; 20: 470.
  19. Tiffany TO, Jansen JM, Burtis CA, et al. Determination of urea nitrogen. *Clin Chem* 1972; 18: 829.
  20. Ögünç G, Akaydın M, İzgüt N, Öner G. Siklosporin-A'nın mide mukoza bariyeri üzerine etkisi. *Doğa-Tr J of Medical Sciences* 1992; 16: 593-599.
  21. Akaydın M, Ögünç G, Öner G. The effect of plasma lipids on gastric mucosal protection in stress ulcer. *Journal of Islamic Academy Sciences* 1991; 4: 257-259.
  22. Chan MK, Chan KW, Na<sup>2</sup> WL. Amelioration of Gentamicin nephrotoxicity by phospholipids. *Nephrol Dial Transplant* 1991; 6: 608-614.