

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
NEFROLOJİ BİLİM DALI**

**RATLARDA SİKLOSPORİNE BAĞLI NEFROTOKSİSİTEYİ
ÖNLEMEDE KARVEDİLOL VE ATORVASTATİNİN
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**YAN DAL UZMANLIK TEZİ
DR. KORAY ULUDAĞ**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MUSA BALI**

**ANKARA
OCAK 2011**

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
NEFROLOJİ BİLİM DALI**

**RATLARDA SİKLOSPORİNE BAĞLI NEFROTOKSİSİTEYİ
ÖNLEMEDE KARVEDİLOL VE ATORVASTATİNİN ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**YAN DAL UZMANLIK TEZİ
DR. KORAY ULUDAĞ**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MUSA BALI**

**Bu Tez İç Hastalıkları Mezuniyet Sonrası Eğitim Derneği
Tarafından Desteklenmiştir.**

**ANKARA
OCAK 2011**

TEŐEKKÖR

Gerek eğitim sűrecimde gerekse tez çalıŐmalarımda kıymetli rehberlik ve katkıları için değerli hocam Prof. Dr. Musa Bali'ye,

Kendilerinden ok Őey öđrendiđim deđerli hocalarım Prof. Dr. Őűkrű Sindel, Prof. Dr. Turgay Arınsoy, Prof. Dr. Yasemin Erten, Prof. Dr. Galip Gűz, Prof. Dr. Ŭlver Derici ve Doç. Dr. Kadriye Altok Reis'e çok teŐekkűr ederim.

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER	4
GEREÇ VE YÖNTEMLER	18
İSTATİKSEL ANALİZ.....	24
SONUÇLAR	24
2.TARTIŞMA	44
KAYNAKLAR.....	57
ÖZET	67
ABSTRACT:.....	69
ÖZGEÇMİŞ:.....	71

SİMGELER VE KISALTMALAR

- (O₂-):** Süperoksit radikali
ACE: Anjiotensin Converting Enzim
Ang II: Anjiotensin II
AT-1: Anjiotensin-I
BUN: Kan üre azotu
Ca: Kalsiyum
Cl: Klor
COX2: Siklooksijenaz 2
Cr: Serum kreatinin
CrCl: Kreatinin klirens
CsA: Siklosporin
DM: Diabetes Mellitus
ECM: Ekstra selüler matriks
Hb: Hemoglobin
H-E: Hematoksilen-Eozin
HT: Hipertansiyon
IL-x: İnterlökin-x
K: Potasyum
LDL: Düşük dansiteli lipoprotein
MDA: Malondialdehid
Mg: Magnezyum
Na: Sodyum
NF-AT: *Nuclear factor of activated T cell*
NO: Nitrik oksit
NSAİ: Non steroid antiinflamatuvar
OSP: Osteopontin
P: Fosfor
PA1: Plazminojen aktivatör inhibitörü
PTH: Paratroid hormon
RAS: Renin Anjiotensin Sistem
SOD: Süperoksit Dismutaz
TGF-β1: Transforming Growth Faktör-1
TNF-α: Tümör Nekroz Faktör α

ŞEKİLLER VE TABLOLAR

Tablo 1. Grupların böbrek fonksiyon testleri yönünden karşılaştırılması	26
Tablo 2. Grupların böbrek dokusu MDA, SOD, NO düzeyleri yönünden karşılaştırılması.....	34
Tablo 3. Grupların histopatolojik bulgular yönünden karşılaştırılması. .	36
Tablo 4. Grupların immünohistokimyasal ve histopatolojik bulgular yönünden karşılaştırılması.....	36
Grafik 1. Çalışma Gruplarının Böbrek Fonksiyon Testleri Açısından Karşılaştırılması.....	27
Grafik 2.Çalışma Gruplarının Böbrek Dokusu MDA (nmol/g) Düzeyi Açısından Karşılaştırılması.....	29
Grafik 3. Çalışma Gruplarının Böbrek Dokusu SOD (U/g) Düzeyi Açısından Karşılaştırılması.....	31
Grafik 4. Çalışma Gruplarının Böbrek Dokusu NO (µmol/g) Düzeyi Açısından Karşılaştırılması.....	33
Grafik 5. Çalışma Gruplarının Apoptozis Varlığı Açısından Karşılaştırılması.....	38
Grafik 6. Çalışma Gruplarının Osteopontin Varlığı Açısından Karşılaştırılması.....	39
Şekil 1. Tübül epitelinde apikal tomurcuklanma, (H-E, X400).....	40
Şekil 2. İntratübüler hyalen silenderler, (H-E, X400).....	41
Şekil 3. Tübül epitelinde apoptozis (siyah ok) ve mitoz (mavi ok), (H-E, X400).....	42
Şekil 4. İmünohistokimyasal olarak osteopontin ile kuvvetli (+3) pozitif boyanma, (H-E, X100).....	43

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Siklosporin (CsA) transplantasyon ve otoimmün hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan immünsupresif bir ajandır (1). CsA'nın 1980'lerin başında solid organ transplantasyonunda klinik kullanıma girmesini takiben 1 yıllık greft yaşam süresi %50'lerden %80'lere yükselmiştir (2). Ancak CsA kullanımı ile sağlanan bu faydalara rağmen klinik kullanımda hem transplantasyonlu hastalarda hem de diğer grup hastalarda çok sayıda yan etkisi (nefrotoksisite, nörotoksisite, hepatotoksisite, hipertansiyon, dislipidemi, kozmetik sorunlar, malignensi ve kardiyovasküler olaylarda artma) bildirilmiştir. Bu yan etkiler içinde en önemlisi kronik CsA nefrotoksisitesidir (3,4). Nanakivel ve ark'ları 10 yıldan uzun süre CsA kullanan bütün hastalarda kronik CsA nefrotoksisitesinin geliştiğini göstermişlerdir (5). Kronik CsA nefrotoksisitesi böbreğin arteriol, tübülointertisyel doku ve glomerüllerinde oluşan geri dönüşümsüz histolojik hasarlanma ile ilişkilidir. Klinikte bu hasarlanma progresif renal disfonksiyon ile sonuçlanmaktadır. Bazı vakalar son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyebilmektedir. Bu toksisitede histopatolojik olarak afferent arteriolopati, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, yama tarzında tubulointertisyel fibrozis ve glomerüler (fokal ve/veya global) sklerozis izlenmektedir (6).

Günümüzde henüz bu komplikasyonun mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Buna karşın pek çok olası mekanizma öne sürülmüştür. Bu konuda yapılan hayvan modellerinde çok sayıda immünolojik ve nonimmünolojik mekanizmaların CsA ile ilişkili kronik renal hasarlanmada rolü olduğu gösterilmiştir (3). Vazokonstriksiyon ve arteriolopati gelişimine bağlı oluşan kronik iskemi bu mekanizmalar arasında önemli bir yer tutmaktadır. Kronik iskemi intertisyel fibrozis ile birlikte glomerülosklerozis oluşumuna yol açmaktadır. Oksidatif stres artışı kronik

nefrotoksisitede etkili olan bir başka mekanizmadır. Artan oksidatif stres varlığı renal hücre harabiyeti ve apoptozis yaparak klinikte renal disfonksiyon oluşmasına neden olmaktadır (3,6,7). CsA'nın direkt etkisi ile artış gösteren Transforming Growth Faktör-1 (TGF- β 1) renal intertisyel fibrozis gelişiminde önemli bir rol oynar. CsA hem hemodinamik hem de direkt etki ile Renin Anjiotensin Sistem (RAS) aktivasyonuna da yol açmaktadır. RAS aracılığıyla artan Anjiotensin II (Ang II)nin hemodinamik etkileri ile birlikte fibrotik etkileri de kronik CsA nefrotoksisitesinde etkili olur. Bu pleotropik etkiler arasında aldosteron, TGF- β 1 artışı, tübüler transporta etkileri, proinflamatuvar, profibrojenik ve Anjiotensin-I (AT-1) reseptörleri aracılığıyla oluşan büyüme stümulatör etkileri vardır (3,6-11).

Kronik nefrotoksisitede etkili bir diğer faktör CsA aracılığıyla oluşan kalsinörin enzim inhibisyonudur. Bu enzimin inhibisyonu apoptozis genlerinde aktivasyona, hücre ölümüne, tübüler atrofi ve intertisyel fibroze yol açar (3,6,9,12). Tübüler hasarlanmayı takiben periglomerüler fibrozis oluşumu da izlenir. CsA kullanımı tübüler fonksiyon değişikliğine de yol açabilmektedir. Buna bağlı olarak çeşitli elektrolitlerde (potasyum, kalsiyum, magnezyum vb) değişiklik görülebilir (3,6,7). Ayrıca CsA aracılığıyla üre taşınmasında ve aquaporin sentezinde oluşan azalma, idrar konsantrasyon yeteneğinde bozulmaya neden olabilir (3,13).

Kronik CsA nefrotoksisitesinin altında yatan patofizyolojik mekanizmalar halen tam olarak açık değildir. Lokal renal faktörlerin rolünün sistemik CsA etkisinden daha fazla önemli olabileceği de düşünülmektedir. Bu lokal faktörler arasında p glikoprotein, sitokrom p450 3A4 ve A5 enzim ekspresyonu ve aktivitesi, ileri böbrek yaşı, tuz eksikliği, Non steroid antiinflamatuvar (NSAI) kullanımı, TGF-

β 1 ve Anjiotensin Converting Enzim (ACE) genlerini içeren gen polimorfizmi yer almaktadır (6).

Kronik CsA nefropatisinin önlenmesinde CsA'nın kesilmesi ve doz azaltılmasının yanında farmakolojik ajanlar da öne sürülmektedir. Bu ajanlar arasında kalsiyum kanal blokörleri, RAS inhibitörleri, endotelin reseptör blokerleri, Nitrit oksit (NO) prekürsörleri gibi hemodinamik dengeye etki eden ajanların yanı sıra TGF- β 1 antikorları, statinler, vitamin E, rosiglitazon, spironolakton gibi antifibrotik ajanlarda yer almaktadır. Bu ajanlardan öne çıkan ikisi statinler ve β blokerlerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bu iki ajanın asıl kullanım amaçlarının dışında; antioksidan, antifibrotik ve antiinflamatuvar etkinliğini ortaya koymuştur. Ancak halen CsA nefrotoksitesini önlemede, statinler ve β blokerlerle yapılmış yeterli çalışma bulunmamaktadır (6). Sonuç olarak; kronik CsA nefrotoksitesini böbreğin bütün kompartmanlarında (glomerül, tübülointerstisyel doku, arterioller) oluşan geri dönüşümsüz histolojik hasarlanma ile ilişkilidir. Yeni immünsupresif ajanlara karşın CsA halen hem transplant hem de nontransplant hastalarda major bir immünsupresiftir (3,6,7,14). Bu nedenle kronik CsA nefropatisinin progresyonunu geciktirici farmakolojik yaklaşımların tanımlanması CsA kullanımına bağlı uzun dönem sonuçlarını iyileştirmek için gereklidir.

Bu çalışmada amacımız, kronik CsA kullanımının biyokimyasal ve histopatolojik olarak böbrek fonksiyonlarına, renal dokudaki serbest oksijen radikallerine, antioksidan enzimlere, osteopontin ve NO düzeyleri üzerine olan etkilerini araştırmak ve kronik CsA kullanımında karvedilol ve atorvastatin tedavilerinin ayrı ayrı ve birlikte böbrek fonksiyonları üzerine, biyokimyasal ve

histopatolojik düzeyde koruyucu etkilerini değerlendirmek ve bu olası koruyucu etkilerin serbest oksijen radikalleri, antioksidan enzimler, osteopontin ve NO düzeyleri ile ilişkisinin araştırılmasıdır.

GENEL BİLGİLER

SİKLOSPORİN

Tanım ve Metabolizması

CsA kalsinörin inhibitör grubu immünsupresif bir ajandır. 1980'li yılların başından itibaren solid organ transplantasyonu başta olmak üzere pek çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (3,6,7). CsA Tolypocladium İnflatum mantarından üretilen 11 aminoasitten oluşan lipofilik yapıda siklik bir polypeptiddir. Molekül ağırlığı yaklaşık 1202 daltondur (15,16). CsA'nın oral uygulama sonrasında emilimi değişkendir. Biyoyararlanımı %20-50 arasında değişmektedir. İlacın kan konsantrasyonu yaklaşık 2-4 saat sonra pik yapmaktadır. CsA'nın gastrointestinal sistemden emilimi en çok terminal ileumda gerçekleşmektedir. Gastrointestinal emilim eşlik eden yiyecek, ilaç, diyabet varlığı, ırk, üremi ve diyare varlığından etkilenmektedir. CsA'nın oral formlarının yanı sıra intravenöz, oftalmik ve topikal formları da mevcuttur (3,15,16).

CsA plazmada %90'dan fazla oranda α 1-asid-glikoprotein, albumin, globulin, lipoprotein benzeri proteinlere bağlanmaktadır. CsA hücre içine düşük dansiteli lipoprotein reseptörü aracılığıyla endositoz yoluyla girmektedir. Buna göre düşük dansiteli lipoprotein reseptör varlığına göre karaciğer, böbrek, yağ dokusu, endokrin bezler ve eritrositlerde birikim yapmaktadır. Buna karşın bağırsak ve beyin hücrelerinde çok az bulunmaktadır. İnsanlarda hastalığın tipine, kullanım sürelerine

ve uygulama yoluna göre değişim olmakla birlikte CsA'nın tedavi dozları 5-25 mg/kg arasında değişmektedir (3,6,7,15,16)

CsA esas olarak karaciğer ve gastrointestinal sistemde sitokrom p450 (CYP450) (özellikle CYP3A4, CYP3A5) enzim sistemi aracılığıyla hidroksilasyon ve demetilasyon yoluyla metabolize edilmektedir. Metabolizasyondan sonra metabolitler safra yoluyla atılmaktadır. Eliminasyon yarılanma ömrü yaklaşık yetişkinlerde 10-27 saat arasında değişebilmekle birlikte ortalama 19 saattir. Otuz'un üzerinde farklı metaboliti tanımlanmıştır. CsA'nın metabolitleri büyük oranda safra ve gayta yoluyla elimine edilmektedir. Metabolitler %5'den az oranda idrarda bulunmaktadırlar (3).

İlaç Etkileşimleri

CYP450 izoenzimlerini ve p glikoprotein gibi transporterları etkileyebilen ilaçlar CsA farmokokinetiğini değiştirebilmektedir. Buna göre ketakanazol, flukanazol, klaritromisin, eritromisin, sertralin, fluvoxamin, verapamil, diltiazem, allopürinol, atorvastatin, simvastatin bu enzim sistemini inhibe ederek CsA seviyesini artırmaktadır. Tam tersine rifampisin ve antikonvülzanlar gibi enzim sistemini indükleyicilerde CsA'nın metabolizmasını artırarak CsA seviyesini azaltmaktadır. P glikoprotein CsA'nın intestinal hücrelerden lümene geçişini sağlayan bir transporterdır. Digoksin bu protein düzeyinde inhibisyon yaparak CsA'nın serum seviyesini artırabilmektedir (3,17-19)

Etki Mekanizması

CsA bir kalsinörin enzim inhibitörüdür. Kalsinörin enzimi, T hücrelerine antijen sunumundan sonra İnterlökin-2 (IL-2) başta olmak üzere pek çok sitokinin salınımında rol oynayan sitoplazmik bir fosfatazdır. Bu enzimin inhibisyonu ile birlikte T helper lenfositlerden özellikle IL-2 olmak üzere İnterlökin-3 (IL-3),

İnterlökin-4 (IL-4), Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) gibi sitokinlerin salgısı ve üretimi baskılanır. CsA bu etkiyi T helper lenfositlerin sitoplazmasında bulunan sitoplazmik reseptör proteini siklofiline bağlanarak gerçekleştirir. Siklofilin-siklosporin kompleksi ise kalsinörin enziminin fosfatazik aktivitesini inibe eder. Bu durum *nuclear factor of activated T cell* (NF-AT) gibi proteinlerin fosforlanmış bir şekilde birikimine yol açar. NF-AT IL-2, IL-3, IL-4, TNF- α gibi sitokinlerin üretim ve transkripsiyonunu, T ve B lenfositlerin proliferasyon ve büyümesini kontrol eden düzenleyici bir proteindir. Kalsinörin enzim inhibisyonu nedeniyle ortamda biriken NF-AT'in fosforlanmış hali çekirdek içine giremez. Sonuçta sitokin üretimi ve salınımı baskılanmış olur. IL-2 üretiminin engellenmesi T helper ve T sitotoksik lenfositlerin aktivasyonunu ve proliferasyonunu durdurur. CsA, B lenfositlerde antikor yapımını ve makrofajların aktivasyonunu da önler. Böylece humoral ve hücrel immün yanıt engellenmiş olur. CsA kemik iliğindeki kök hücreler, myeloid ve eritroid hücreler üzerine etki göstermez. Bu nedenle myelosupresyon yapmaz (3,6,7,16,20).

SİKLOSPORİNİN KLİNİK KULLANIMI

Solid Organ ve Kemik İliği Transplantasyonu

CsA üç dekadı aşan süre boyunca başta böbrek olmak üzere kalp, karaciğer, akciğer gibi solid organ transplantasyonunda; hasta greft yaşam sürelerinde belirgin olarak iyileşme sağlamıştır. Aynı zamanda CsA kemik iliği transplantasyonu sonrasında greft reddinin ve greft versus host hastalığının önlenmesinde de kullanılmaktadır (21,22).

Otoimmün Hastalıklar

CsA nefrotik sendrom (steroid dirençli veya steroid bağımlı pek çok glomerüler kaynaklı hastalıklarda), romatoid artirit, psöriazis, atopik dermatit, pyoderma gangrenosum, liken planus, otoimmün büllöz hastalıklar, skleroderma gibi dermatolojik hastalıklarda, üveit, posterior blefarit, atopik keratokonjunktivit gibi göz hastalıklarında, otoimmün hepatit, primer biliyer siroz gibi karaciğer hastalıklarında kullanılmaktadır (23-26).

YAN ETKİLER

CsA'nın en önemli yan etkisi nefrotoksitedir. Bunun yanı sıra birçok sistemde zararlı etkileri bulunmaktadır. Aşağıda bu etkiler açıklanmıştır.

Metabolik Komplikasyonlar

Glukoz intoleransı, hiperlipidemi, hiperürisemi önemli metabolik komplikasyonlardır. Bu metabolik komplikasyonların oluşumunda etkili olan en önemli faktör CsA ile birlikte görülen oksidatif stres varlığıdır. Oksidatif stres LDL kolesterolün oksidasyonunu artırarak daha aterosjenik olmasına ve arteriyal hipertansiyon gelişimine yol açabilir. Sonuçta CsA'ya bağlı gelişen glukoz intoleransı, oksidatif stres oluşumu, arteriyal hipertansiyon ve dislipidemi kardiyovasküler morbidite ve mortalite artışına yol açabilmektedir. Son dönemlerde CsA'nın osteoporoz gelişiminde de etkili olduğu öne sürülmüştür (27,28).

Nörolojik Komplikasyonlar

Daha çok yaşam kalitesinde bozulmaya yola açan tremor, baş ağrısı gibi komplikasyonlar izlenir.

Diş Eti Hiperplazisi ve Hirsutizm

Diş eti hiperplazisi, hirsutizimden daha sık izlenmektedir. Her iki komplikasyon da kozmetik olarak ciddi sorun yaratmaktadır. Erkeklerde prolaktin düzeyinde artışa bağlı olarak oluşabilen jinekomasti de bir diğer kozmetik sorundur (29).

Hepatotoksisite

Transaminazlarda yükselme ile karakterizedir. Tedavinin erken dönmelerinde daha sık izlenmektedir (29).

Maligniteye Eğilim

CsA'nın uzun dönem kullanımı yarattığı immünsupresif etki sonucunda onkogenik virüslerin (EBV, CMV) çoğalmasına, sebep olabilir. Bunun yanı sıra malign dönüşümünde tetikleyici olan protoonkogenlerin (transkriptif faktör EA2 ve Pax-8 gib) ekspresyonunu artırabilir. Ayrıca TGF-β1 üretiminde oluşan artış da malignite gelişiminde rol oynayabilir (30).

Nefrotoksisite

CsA tedavisi ile akut renal disfonksiyon ilişkisi ilk kez CsA'nın böbrek transplantasyonunda kullanımı sırasında tanımlanmıştır. Benzer şekilde renal disfonksiyon CsA'nın otoimmün hastalıklar, kemik iliği ve karaciğer transplantasyonunda kullanımı sırasında da izlenmiştir. Bu durum transplante böbrek yanında nativ böbreğinde CsA'nın toksik etkisine hassas olduğunu düşündürmüştür. İlk dönemlerde CsA'ya bağlı renal toksisitenin sadece fonksiyonel değişikliklere bağlı geliştiği, bu nedenle de geri dönüşümlü bir toksisite olduğu düşünölmüştür. Bu klinik tablo akut CsA nefrotoksisitesi olarak isimlendirilmiştir. Buna karşın 1984 yılında Myers ve ark'ları kalp transplant alıcılarında ilk kez uzun dönem CsA

kullanımının sadece geri dönüşlü nefrotoksisite ile değil geri dönüşsüz renal fonksiyon kaybı ile sonuçlanabildiğini göstermiştir. Bu toksik etki progresif tübülointerstisyel hasarlanma ve glomerülosklerozise bağlı gelişmektedir ve kronik CsA nefrotoksisitesi olarak adlandırılmaktadır (3,6,7).

AKUT SİKLOSPORİN NEFROTOKSİSİTESİ

Vasküler Etkiler (Akut Arteriopatı)

İlk kez 1985 yılında Murray ve ark'ları CsA kullanımının neden olduğu reversibl renal fonksiyon bozukluğunun afferent arteriolde görülen vazokonstriksiyona bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir (31). Daha sonra yapılan çalışmalarda CsA kullanımı ile afferent arteriol çapında ve kan akımında azalmalar olduğu gösterilmiştir. Bu durum endotelin, tromboksan gibi vazokonsriktör maddelerde artma ve RAS'da aktivasyon, buna karşın prostasiklin, prostoglandin E2 ve NO gibi vazodilatör maddelerde azalma ile ilişkilidir (6). Ayrıca serbest radikal oluşumu ve sempatik sinir sistemi aktivasyonu da akut nefrotoksisitede rol oynamaktadır. Serbest radikallerin ortaya çıkışı ile hücre membranındaki doymamış yağ asitleri oksidasyona uğrar ve oksidatif hücre hasarı meydana gelir. Malondialdehid bu yolakta oluşan bir son ürün olup, lipid peroksidasyonunun göstergesidir. Organizmanın bu hasara karşı en önemli savunma yollarından birisi superoksid dismutaz enzim sistemidir. Bu sistem, süperoksid radikallerini hidrojen perokside çevirerek hücreyi hasarlanmadan korumaktadır. Hemodinamik değişikliklerin yanı sıra geri dönüşlü tübüler disfonksiyonda akut CsA toksisitesinin sonucu olarak tanımlanmaktadır (3,6,7).

Endotelin böbrek ve vasküler yataktan salınım gösteren güçlü bir vazokonstriktördür. Renal epitelial hücre kültüründe CsA'nın endotelin salınımını

artırdığı tespit edilmiştir. Bu sonuç insan ve hayvan çalışmalarında da doğrulanmıştır. Ayrıca deneysel hayvan çalışmalarında anti-endotelin antikorları akut CsA nefrotoksitesini önlemiştir (3,6,7,32,33).

RAS sisteminin etkilenmesi hem direkt olarak CsA'nın jukstaglomerüler hücreleri etkilemesi hem de renal hemodinamik değişikliklere sekonder gelişmektedir. Ayrıca CsA kullanımı ile birlikte renin salgılayan hücreler afferent arteriole göç etmektedirler. Ayrıca renin sekresyon artışı jukstaglomerüler aparatusun hiperplazisi ile de ilişkili olabilir. CsA sadece RAS'da artış yapmaz. Ang II'nin düz kas hücrelerindeki vazokonstriktör etkisini de güçlendirir (3,6,7,34).

CsA araşidonik asit metabolitlerini etkileyerek de vazokonstriksiyona yol açmaktadır. Höcherl ve ark'ları ratlarda yaptıkları çalışmalarında CsA ile birlikte selektif siklooksijenaz 2 (COX2) enzim ekspresyonunda inhibisyon olduğunu göstermişlerdir (3,6,7). Bu inhibisyon vazodilatör ve vazokonstriktör metabolitler arasında dengesizliğe neden olmaktadır. Prostaglandin E2 deki azalma afferent arteriolde vazokonstriksiyon, glomerüler filtrasyon hızında azalma, potasyum ve sodyum retansiyonu oluşturmaktadır. Ek olarak COX2 kökenli prostanoidler jukstaglomerüler aparatustan reninin sentez ve sekresyonunun kontrolünde ve tübüllerin tuz ve su tutulumunda etkili olmaktadır. Bu nedenle CsA nefrotoksitesinde COX2 inhibisyonu önem taşımaktadır (3,6,7). Akut CsA nefrotoksitesinde önemli etkenlerden bir diğeri de endotelial disfonksiyondur. Bu durumda NO sentezi ve endotelial NO kontrollü renal vazodilatasyon inhibe olmaktadır. CsA aracılığıyla artan serbest oksijen radikalleri ve süperoksid oluşumu NO'nin biyouyumluluğunu azaltmaktadır. Ayrıca CsA endotelial NO sentaz bağımlı

NO üretimini çeşitli mekanizmalar aracılığıyla baskılamaktadır. NO üzerindeki bu etkiler vazodilatasyonda azalmaya ve vazokonstriksiyonda artışa yol açmaktadır (3,6,7,36,37). Son olarak CsA aracılığıyla nativ böbrekte artan sempatik aktivite renal vazokonstriksiyon artışına ve glomerüler filtrasyon hızında azalmaya yol açabilmektedir. Ancak transplante böbrekte innervasyon yokluğu nedeniyle bu aktivasyon izlenmemektedir (6,38).

Tübüler Etki (Toksik Tübülopati)

Akut CsA nefrotoksitesisi histolojik olarak tübüler stoplazmanın izovolumetrik vakuolizasyonu ile ilişkilidir. Tübüler vakuolizasyon renal disfonksiyon olmadan da CsA kullanımı ile birlikte oluşabilir. Bu görünüm genel olarak CsA'nın akut toksisite bulgusu olarak kabul edilmektedir (3,6,7,14,39).

Trombotik Mikroanjiopati

De novo trombotik mikroanjiopati pek çok faktöre bağlı olarak transplantasyon sonrasında oluşmaktadır. Bunlar arasında iskemi-reperfüzyona bağlı endotelial hasar, renal infeksiyon, rejeksiyon, malignite ve çeşitli ilaçlar yer almaktadır. CsA transplantasyon sonrasında trombotik mikroanjiopati için önemli bir risk faktörüdür. Vazokonstriksiyona sekonder oluşan iskemi buna katkıda bulunmaktadır. Ayrıca CsA platelet agregasyonunu artırmakta ve protrombotik faktörlerin salınımını indüklemektedir (6).

KRONİK SİKLOSPORİN NEFROTOKSİTESİ

CsA'nın renal yapıda geri dönüşümsüz hasar yaptığı ilk kez Myers ve ark'ları tarafından kalp transplantasyonu yapılan hastaların renal biyopsilerinde fokal glomerüler sklerozun, intertisyel fibrozisin ve tübüler atrofinin gösterilmesi ile tanımlanmıştır (40). Daha sonraki çalışmalarda da kronik CsA kullanımı ile böbreğin

yapısında geri dönüşümsüz değişiklikler izlenmiştir. Buna göre damarlarda arterioller hyalinozis, tübülointertisyumda tübüler atrofi ve intertisyel fibrozis, glomerüllerde bowman kapsülünde fibrozis ve kalınlaşma, fokal segmental veya global glomerüloskleroz tespit edilmiştir (6,14). Nanakivel ve ark'ları ise 10 yıldan sonra CsA kullanan bütün hastalarda kronik CsA nefrotoksisitesini göstermişlerdir (41). Bu komplikasyonun mekanizması henüz tam anlaşılamamıştır. Buna karşın çok sayıda olası mekanizma önerilmiştir. Kronik CsA nefrotoksisite etyolojisinde CsA ile ilişkili hemodinamik nedenlere bağlı kronik iskemi ve tübüler epiteliyal hücelere direkt toksisite etkili olmaktadır (6).

Kronik Siklosporin Nefrotoksisitesinde Vasküler Etkiler

Afferent arteriolün media tabakasında oluşan noduler hyalinozis arterioller hyalinozis olarak isimlendirilir ve CsA nefrotoksisitesinin önemli bir belirteçidir. Genellikle afferent arteriollerde ve küçük interlobuler arterlerin periferik kısımlarında izlenir. Arterioller hyalinozis düz kas hücelerinin eozinofilik granülasyonu ile birlikte başlar, bunu düz kas hücelerinde vakuolizasyon izler. Takiben nekrotik düz kas hücelerinin yerini fokal ya da sirküler düzende hyalin depozitler alır. Bu nodüler hyalinozis genellikle damar lümeninde daralmaya yol açar ve genel olarak geri dönüşümsüzdür. Arteroller hyalinoziste moleküler mekanizma tam olarak açıklanmasa da düz kas hücelerinde CsA NF-AT ilişkisi ile bağlantılı olabilir. Ayrıca CsA aracılığıyla gelişen uzamış vazokonstriksiyonda bu olaya katkıda bulunmaktadır (3,6,14,39).

Kronik Siklosporin Nefrotoksisitesinde Tübüler- İntertisyel Etkiler

CsA kullanımına bağlı gelişen kronik nefrotoksisitede izlenen intertisyel fibrozis, tübüler atrofi ve glomerüler skleroz gelişiminin başlıca sebepleri arterioller

değişiklikler ve damar lümenindeki daralmadır. Tübüointertisyel alanda oluşan lokal iskemi serbest oksijen radikallerinin oluşumuna yol açmaktadır. CsA nefrotoksisitesinde serbest radikallerin önemi ilk kez vitamin E'nin lipid peroksidasyonu ve CsA'nın nefrotoksik etkisine faydasının gösterilmesiyle tanımlanmıştır. CsA aracılığıyla oluşan renal vazokonstriksiyon renal hipoperfüzyona ve hipoksi reoksijenizasyon hasarlanmasına yol açmaktadır. Bu hasarlanmayı takiben oluşan serbest oksijen radikalleri ise hücre harabiyeti ile birlikte apoptozis aracılı hücre ölümünü meydana getirmektedir. Ayrıca CsA'nın direkt etki ile serbest oksijen radikallerinin oluşumuna da yol açtığı düşünülmektedir. Bu hipotezi destekleyen bulgu ise rat proximal tübül epitelyum hücrelerine direkt CsA maruziyetinin, hücre içinde reaktif oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyon ürünlerinin birikimine yol açmasıdır (3,6,14,39,42,43).

Kronik CsA nefrotoksisitesinde önemli olan bir diğer etken TGF- β 1 seviyelerindeki artışıdır. CsA direkt etki ederek tübüler epiteliyal hücrelerde TGF- β 1 ekspresyonunu artırmaktadır. Bu etki hemodinamik etkilerden bağımsız olarak izlenmektedir. TGF- β 1 ekstra sellüler matris proteinin üretiminde artma, yıkılımlında ise azalmaya yol açmaktadır. Ayrıca TGF- β 1 epiteliyal mezenjial hücre dönüşümünde indüklemektedir. Bu dönüşüm sonucunda tübüler epiteliyal hücreler epiteliyal fenotiplerini kaybederek, mezenjial hücrelerin özelliklerini kazanırlar. Bu durum hücre migrasyon ve invazyonunda artmaya, sonuçta renal intertisyel fibrozis gelişimine yol açmaktadır (44-48).

Ang II sadece hemodinamik etkiler ve akut CsA nefrotoksisitesinde değil aldosteron salınımında, tübüler transportta, proinflamatuvar ve profibrojenik etkilerde

ve Anjiotensin-I (AT-I) reseptörleri aracılığıyla oluşan büyüme stümlatör etkilerinde ve TGF- β 1'in artışında sonuçta bu pleotropik etkiler ile kronik toksisitede de rol oynamaktadır. Böylece RAS aktivasyonu sadece hemodiyamik değişikliklere değil kronik intertisyel fibrozise ve kronik CsA toksisitesine de yol açmaktadır. RAS aktivasyonuna bağlı olarak artan aldosteron, büyüme faktörleri ve serbest oksijen radikalleri aracılığıyla ekstra selüler matriks (ECM) yıkılımını azaltarak intertisyel fibrozisi artırmaktadır (10,11,49-52).

Kronik toksisitede bir başka mekanizma da direkt kalsinörin inhibisyonunun apoptoz genlerini aktive etmesine bağlı olabilir. Bunun sonucu olarak tübüler ve intertisyel hücrelerde apoptozis artmaktadır. Böylece tübüler atrofi indüklenir. Ayrıca makrofaj infiltrasyonu ile oluşan inflamasyon da kronik CsA nefrotoksitesini ile ilişkilidir. Son olarak CsA p glikoprotein gibi tübüler epiteliyal hücrelerde ilaç taşıyıcısı olarak etki eden maddeleri inhibe etmektedir. Bu inhibisyon endojen toksik maddelerin atılımında azalma ile beraber lokal toksik madde birikimine yol açmaktadır (3,6,7,14,39).

Kronik Siklosporin Nefrotoksitesinde Glomerüler Etkiler

Kronik CsA kullanımının neden olduğu en yaygın glomerüler değişiklik global glomerülosklerozdur. CsA'ya bağlı arterioller hyalinozis ve arteriolopatiye bağlı oluşan glomerüler iskemiye sekonder gelişmektedir. Ayrıca tübüler hasarlanma tübüler glomerül gelişimine de yol açabilir. Bu durum periglomerüler fibrozis ile sonuçlanır. Ayrıca CsA kullanımı arteriyoller hyalinozis ve global glomerüloskleroz aracılığıyla hiperfiltrasyon yaratarak fokal glomerüler skleroz gelişimine yol açabilir (3,6,7,14,39).

Elektrolit Bozuklukları

CsA kullanımı renal hemodinamik ve yapı değişikliğinin yanı sıra tübüler fonksiyon değişikliği yaparak iyon dengesinde bozulmaya yol açabilir. Buna göre hiperkalemi, hipomagnezemi, hiperkloremik metabolik asidoz görülebilir. Tübüler fonksiyonlar üzerindeki bu etkiler tübül epitelindeki Sodyum (Na), potasyum (K), Klor (Cl) kotransporter ekspresyonundaki azalma ile açıklanabilir. Ayrıca hiperkalemi görülen vakaların çoğunda mineralokortikoid reseptör sayısında azalma ile beraber aldesteron direnci vardır (3,6,7,14,39).

Siklosporin Kronik Nefrotoksitesinde Yeni Tanımlanan Olası Mekanizmalar

CsA alımı renal dokuda Toll reseptörlerinin ligantlarında artışa yol açar. Bu durum makrofajların eliminasyonunu azaltarak inflamasyonu artırır. CsA üre taşınmasında ve aquoporin sisteminde azalma yaparak idrar konsantrasyon yeteneğini azaltır. CsA aracılığıyla distal nefronda kalsiyum bağlayıcı protein kalbindin azalır. Bu duruma serum kalsiyumunda azalma ve idrar kalsiyumunda ise artma eşlik eder (7). Bunların dışında Palet ve ark'ları CsA'nın renal tübüler hücrelerde endoplazmik stresi indüklediğini göstermişlerdir. Endoplazmik stres aşırı arttığında ve uzadığında ise apoptozis meydana gelmektedir. Çalışmalarda uzamış endoplazmik retikulum stresinin kronik CsA nefropatisi olan ratlarda apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. Bu durum kronik CsA toksitesinde öne sürülen bir diğer mekanizmadır (7,53,54,).

SİKLOSPORİN NEFROTOKSİTESİ İÇİN RİSK FAKTÖRLERİ

Siklosporinin Sistemik Seviyesi

Renal transplantasyon sonrasında ana konu etkinlik ve toksisite arasındaki dengenin sağlanmasıdır. CsA'nın tahmin edilemez doz-konsantrasyon ilişkisi

mevcuttur. Bu durum absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve metabolitlerin eliminasyonundaki yüksek değişkenlikten kaynaklanmaktadır (7). Hesselink ve ark'ları daha sonra Anglicheau ve ark'ları CYP3A4 ve A5 nükleotid polimorfizminin CsA farmokinetiğinde etkili olduğunu göstermişlerdir (6,7). Klinikte CsA tedavisinin erken dönemlerinde doz ayarı hastanın kilosu temel alınarak yapılmaktadır (6). Bu dönemde doz ayarlanması sadece yan etki geliştiğinde uygulanmaktadır. Buna karşın Klintalm ve ark'ları ise ilk kez CsA dozu, plazma seviyesi ve renal allograft intertisyel fibrozisi arasında ilişki olduğunu göstermişlerdir (55). Bu ilişki başka gruplar tarafından yapılan çalışmalarda da tanımlanmıştır. Bu nedenle klinik yan etki gözlenmeden de CsA'ya bağlı olarak kronik renal toksisitenin başlayabileceği kabul edilmektedir (6,7).

Terapotik İlaç Görüntüleme

Yüksek oranda değişken farmakokinetik özellik, konsantrasyon toksisite ilişkisi nedeniyle CsA'nın terapötik görüntülenmesi faydalı olmaktadır. Günümüzde CsA'ların rutin görüntülenmesi pratik kullanımda yaygındır. Çoğu merkez CsA dozunu doz öncesi (C0) ile ayarlamaktadır. Bununla birlikte C0 seviyesi ve total maruziyet arasındaki kötü korelasyon nedeniyle ilaç alımından 2 saat sonra ölçülen seviyeler (C2), C0'a göre daha avantajlı görünmektedir. Bazı çalışmalarda kronik CsA nefroksisite lezyonları daha yüksek CsA maruziyeti ile ilişkili bulunurken, bazı çalışmalarda ise göreceli olarak daha düşük seviyelerin histolojik değişiklik ile ilişkili olabileceği bulunmuştur. Bu nedenle ilaç seviyeleri dar hedef değerlerde tutulmaktadır (56,57).

Lokal Renal Siklosporin Maruziyeti

Sistemik CsA toksisitesinin yakın görüntülenmesine karşın kronik CsA nefrotoksitesinin önlenememesindeki ana sebep böbrekte oluşan lokal yüksek seviyeler olabilir. Böbrekte yüksek CsA düzeylerinin oluşumunda pek çok faktör rol oynayabilir. mTOR inhibitörlerinin CsA ile birlikte kullanımları p glikoprotein için yarışma içine girmelerine ve tübüler epteliyal hücrelerde CsA birikimine yol açabilir. Lokal yüksek CsA konsantrasyonu p glikoprotein ekspresyon ve fonksiyonu ile de ilişkilidir. 1994 yılında Morales ve ark'ları lokal p glikoprotein ekspresyonundaki değişkenliğin kronik CsA nefrotoksitesi ile ilişki olduğunu göstermiştir (60). Bu ilişki insan çalışmalarında da izlenmiştir. Ancak bu konuda prospektif çalışmalara da ihtiyaç vardır. Ayrıca tübüler p glikoprotein ekspresyon düzeylerindeki farklılığın CsA nefrotoksite gelişiminde önceden bilgi verici olabileceği de düşünülmektedir (6,7). Lokal renal faktörlerde CsA toksisite gelişiminde lokal CsA seviyesinden bağımsız etki edebilirler. Bu renal faktörler arasında böbrek yaşı, Nonsteroid antiinflamatuvar (NSAI) kullanımı, rölatif tuz eksikliği ile beraber oluşan RAS aktivasyonu, TGF- β 1, ACE geni, CYP 3A4 ve A5 gibi genlerin polymorfizmi kronik CsA nefrotoksitesi ile ilişkili olabilir(3,6,7,39).

SİKLOSPORİN NEFROTOKSİTESİNİN ÖNLENMESİ VE TEDAVİSİ

Siklosporinden Kaçınılması, Kesilmesi ve Minimalize Edilmesi

CsA'dan başlangıç tedavisinde kaçınılması yetersiz akut rejeksiyon profilaksisine neden olduğundan daha çok ileri dönemlerde CsA'nın kesilmesi daha uygun bir tercih olabilir. Buna göre akut rejeksiyon riskinin yüksek olduğu erken dönemden sonra CsA tedavisinin kesilmesinin kısa dönemde olumlu sonuçlarına karşın, uzun dönemdeki etkileri henüz tam olarak bilinmemektedir. CsA dozlarının

minimalize edilmesi de bir başka yaklaşım olabilir. Ancak bu konuda da yeterli çalışmalar mevcut değildir (58,59).

Farmakolojik Yaklaşımlar

CsA toksisitesinde artmış vazokonstriksiyon nedeniyle vazodilatör ilaçların faydalı olabileceği düşünülmüştür. Kalsiyum antagonistleri bu konuda çalışılan ilaçlardandır. İlk çalışma CsA ve nifedipin kombinasyonu ile yapılmıştır. Bu çalışmada nifedipinin olumlu etkileri izlenmiştir. Benzer şekilde lacipidin ile yapılan çalışma da olumlu etkiler görülmüştür (60,61). RAS inhibisyonun da CsA nefrotoksitesini önleyebileceği düşünülmektedir. Ancak çalışmalarda RAS inhibisyonunun intertisyel fibrozisi engellemesine karşın renal fonksiyonlarda iyileşme sağlamamaktadır (6,62). Bu konuda çalışılan bir diğer ilaç spiranolaktondur. Deneysel çalışmalara karşın, in vivo CsA nefrotoksitesini önlediğine dair bir çalışma mevcut değildir. Vazodilatör prostanooidlerde de çalışma yapılmış ancak bu konuda da çalışma sayısı azdır (63). Ratlarda PG E2 ve PG E1 siklosporin nefrotoksitesini azaltmıştır. L arginin, Molsidomin gibi NO prekürsörleri, TGF- β 1 antikörleri, antioksidanlar, statinler CsA nefrotoksitesinin önlenmesinde etkili olabileceği düşünülen olası ajanlardır (6). Ancak halen bu ilaçlar hakkında yeterli çalışma bulunmamaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi deney hayvanları etik kurul merkezinden onay alındıktan sonra Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Merkezinde gerçekleştirildi. (Etik kurul onay tarihi: 22/03/2010, sayı no: B.30.2.GÜN.0.05.06.00/ 94-4824). Biyokimyasal analizler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda, histopatolojik ve immünohistokimyasal

incelemeler Patoloji Ana Bilim Dalı'nda, böbrek dokusunda Malondialdehid (MDA), Süperoksit Dismutaz (SOD) ve NO düzeylerinin ölçümü ise Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde gerçekleştirildi.

HAYVANLAR VE ÇALIŞMA PROTOKOLÜ

Çalışmaya 30 adet erişkin 200-250 gram ağırlığında Wistar tipi erkek albino rat alındı. Deney öncesi tüm hayvanlar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık odalarda tutulurken, standart yem ve su ile beslendi. Denekler her grupta 6 rat olmak üzere randomize olarak toplam 5 gruba ayrıldı.

Grup 1 (Kontrol grubu); Bu gruptaki deneklere 2 ml serum fizyolojik cilt altına uygulandı.

Grup 2 (CsA grubu); Bu gruptaki deneklere 25 mg/kg/gün dozunda CsA cilt altına uygulandı.

Grup 3 (CsA+Karvedilol grubu); Bu gruptaki deneklere 25 mg/kg/gün dozunda CsA ve 4 mg/kg dozunda karvedilol cilt altına uygulandı.

Grup 4 (CsA+Atorvastatin grubu); Bu gruptaki deneklere 25 mg/kg/gün dozunda CsA ve 10 mg/kg dozunda atorvastatin cilt altına uygulandı.

Grup 5 (CsA+Karvedilol+Atorvastatin grubu); Bu gruptaki deneklere 25 mg/kg/gün dozunda CsA, 4 mg/kg dozunda karvedilol, 10.mg/kg dozunda atorvastatin cilt altına uygulandı.

Çalışmada uygulanan tedavilerin hepsi deneklere 21 gün boyunca verildi. Tüm denekler çalışmanın 21. günde metabolik kafese alındı. Metabolik kafeste 24 saatlik idrarları toplanarak, 24 saatlik idrar kreatinin düzeyleri ölçüldü ve kreatinin

klirensleri hesaplandı. Çalışmanın 22. gününde denekler 40 mg/kg ketamin HCl anestezisi ile uyutuldu. Takibinde serum kan üre azotu (BUN) ve kreatinin düzeyi çalışılmak üzere intrakardiyak yol ile kanları alındı. Sonrasında böbrek dokusu çıkarılan denekler, sakrifiye edildi. Sol böbrek enzimatik analizler için -80 C'de saklandı, sağ böbrekler ise patolojik inceleme için %10 formalin içine kondu.

BİYOKİMYASAL ANALİZLER

Deneklerin serum BUN, kreatinin ve 24 saatlik idrar kreatinin düzeyi ölçümleri otoanalizör cihazı ile (Architect16000, Abbott) spektrofotometrik yöntem kullanılarak çalışıldı. Deneklerin kreatinin klirens (CrCl) değerleri $CrCl (ml/dk) = (UCR \times uV) / (SCR \times 1440)$ formülü kullanılarak hesaplandı (64). (UCR:24 saatlik idrar kreatinini, uV:24 saatlik idrar volümü, SCR:serum kreatinini)

BÖBREK DOKUSUNDA MALONDİALDEHİD DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ

Malondialdehid (MDA) düzeylerinin ölçümü için spektrofotometrik bir metod kullanıldı. Dokular %0,15 M'lık KCl çözeltisi içinde homojenize edilerek süpernatantları alındı. Süpernatantlar deproteinize edildikten sonra TBA ile muamele edilerek renk oluşumu sağlandı. 535 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı ve sonuçlar nmol/g doku olarak hesaplandı (65).

BÖBREK DOKUSUNDA SÜPEROKSİT DİSMUTAZ DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ

Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesi Sun ve ark'ları tarafından tanımlanan ksantin, ksantin oksidaz ile süperoksit radikali (O₂⁻) oluşturması ve bu radikalinde NBT ile oluşturduğu renkli bileşiğin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Ortamdaki SOD aktivitesi ne kadar fazla ise oluşan rengin şiddeti o kadar az olacaktır. Deney için dokular serum fizyolojik içinde homojenize edildi, santrifüj sonrası elde edilen süpernatandan SOD aktivitesi çalışıldı. Aktivitenin %50

inhibisyonun 1Ü enzim aktivitesi tarafından sağlandığı düşünülerek sonuçlar U/g doku cinsinden hesaplandı (66).

BÖBREK DOKUSUNDA NO DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ

Doku NO düzeyleri Miranda ve ark'ları tarafından tarif edilen metoda göre çalışıldı. Yöntem, iki basamaktan oluşmaktadır. Birinci basamak nitratın nitrite Vanadyum (III) tarafından indirgenmesi, ikinci basamak ise Griess reaktifinin ortamdaki nitriti mor renkli azo ürüne çevirmesidir. Oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçüldü. Dokular, tampon içinde homojenize edildikten sonra santrifüjlendi ve deproteinize edilen süpernatandan NO çalışıldı. Sonuçlar µmol/g doku şeklinde hesaplandı(67).

HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Morfolojik İnceleme:

Rat böbrekleri %10'luk nötral formalin içerisinde 24 saat tespit edildikten sonra parafine gömüldü. Rutin doku takibi sonrası 5 mikrometrelik kesitler alınarak deparafinize edilip, Hematoksilen-Eozin (H-E) ile boyandı. Tüm olgulara ait H-E kesitler apoptozis, apikal tomurcuklanma, interstisyel vakuolizasyon, hyalen silender ve tübül içi kalsifikasyon varlığı açısından bir patolog tarafından incelendi. Bu değişiklikler mevcut ise "pozitif", mevcut değil ise "negatif" olarak değerlendirildi.

Histokimyasal Boyama:

Rat böbreklerine ait parafin bloklara tübülointerstisyel fibrozis ve arteriolopatiji değerlendirmek amacı ile Masson Trikrom (Bio – Optica, 04-010802) boyası uygulanmış olup, aşağıdaki prosedüre göre boyandı.

Polilizinli lam üzerine alınan 4 mikronluk kesitler 56 °C'de etüvde 2 saat deparafinize edildi. Kesitler daha sonra distile su ile yıkanıp, Reagent A'dan 6 damla, Reagent B'den 6 damla damlatılarak 10 dakika bekletildi. Üzerine Reagent C'den 10 damla eklenip, 4 dakika bekletildi. 3-4 saniyede hızla distile sudan geçirilip, Reagent D'den 10 damla eklenerek, 4 dakika bekletildi. Daha sonra distile su ile yıkandı. Reagent E'den 10 damla eklenip, 10 dakika bekletildi. Yıkamadan Reagent F'den 10 damla eklenip, 5 dakika bekletildi. Distile su ile yıkandı. Alkolde dehidrate edildi. Saf alkolde 1 dakika bekletildi. Ksilen ile şeffaflandırıldı ve kapatıcı ile kapatıldı. Rat böbreklerine ait parafin bloklara glomerüler bazal membran kalınlaşmasını değerlendirmek amacı ile Periodic asid Schiff (PAS) (Bio – Optica, 130802) boyası uygulanıp, aşağıdaki prosedüre göre boyandı.

Polilizinli lam üzerine alınan 4 mikronluk kesitler 56 °C'de etüvde 2 saat deparafinize edildi. Kesitler distile su ile yıkandı. Reagent A'dan 10 damla damlatıldı. 10 dakika bekletildi. Distile su ile yıkandı. Reagent B'den 10 damla damlatılıp, 20 dakika bekletildi. Distile su ile yıkandı. Üzerine Reagent C'den 10 damla eklenip, 2 dakika bekletildi. Yıkamadan, Reagent D'den 10 damla eklenip, 2 dakika bekletildi. Distile sudan geçirildi. Reagent E'den 10 damla eklenip, 3 dakika bekletildi. Musluk suyunda 5 dakika yıkandı. Alkolde dehidrate edildi. Ksilen ile şeffaflandırılıp, kapatıcı ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal Boyama

Osteopontin (OSP) 34 kilo Dalton ağırlığında bir ekstrasellüler matriks proteindir. Osteopontin ekspresyonunu belirlemek için streptavidin-biyotin üçlü indirekt immünperoksidaz yöntemi kullanılarak boyama yapılmıştır. OPN (klon OP3N, mouse monoklonal, IgG1, Novacastra) antikoru 1/50 oranında dilüe

edilmiştir. Biotinlenmiş bağlayıcı (sekonder) antikor, streptavidin-biyotin kompleksi ve kromojen olarak kullanılan 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC) ticari olarak kullanıma hazır kitler şeklindedir. OPN antikorunun pozitif kontrolü olarak safra kesesi kullanılmıştır. Rat böbreklerine ait parafin bloklardan hazırlanan kesitler OPN antikorları ile aşağıdaki prosedüre göre boyanmıştır.

Polilizinli lam üzerine alınan 4 mikronluk kesitler 56 °C'de etüvde gece boyunca deparafinize edilmiştir. Kesitler ksilolde 30 dakika bekletilmiştir. Fiksasyon için %96'lık alkolde 15 dakika tutulmuştur. Kesitler önce çeşme suyuyla, ardından distile su ile yıkanmıştır. Antijen retrieval işlemi, OPN antikoruna boyama için sitrat buffer (Ph 6.0) içinde mikrodalgada yüksek sıcaklıkta 20 dakika bekletilmiştir. Endojen peroksidazı bloke etmek için oda sıcaklığında %3'lük hidrojen peroksitte 10 dakika bekletilmiştir. Kesitler önce distile su ile, ardından phosphate buffered saline (PBS) ile yıkanmıştır. Protein bloklama için non-immün protein bloklama serumunda 20 dakika tutulmuş ve ardından kurulanmıştır. Primer antikor olan OPN lam üzerindeki doku kesitlerini kapatacak şekilde damlatılmış olup, oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. Sonra kesitler PBS ile yıkanmıştır. Bağlayıcı (sekonder) antikor ile oda sıcaklığında 20 dakika süre ile inkübasyon yapılmıştır. Kesitler PBS ile yıkanmıştır. Streptavidin-biyotin kompleksi uygulanarak 20 dakika bekletilmiştir. Kesitler PBS ile yıkanmıştır. Renk vererek görüntülemeyi sağlamak amacıyla AEC ile 10 dakika süre ile inkübasyon yapılmıştır. Kesitler distile su ile yıkanmıştır. Mayer's hematoksilen ile zemin boyası yapılmıştır. Kesitler PBS ile yıkanmıştır ve havada kurutulmuştur. Su bazlı kapatıcı ile kapatılmıştır.

İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesi:

Böbrek tübül epitelinde OPN için sitoplazmik boyanma pozitif kabul edildi. OPN için boyanma varlığı pozitif/negatif olarak değerlendirildi. Ayrıca OPN için boyanma şiddeti de incelendi. Buna göre, OPN boyanması zayıf ise: +1, orta derecede ise +2, kuvvetli ise: +3 olarak skorlandı.

İSTATİKSEL ANALİZ

Çalışmadaki veriler ortalama±standart deviasyon veya denek sayısı olarak verildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda iki grup varlığında Mann Whitney U ve çoklu gruplarda Kruskal Wallis testleri, kategorik verilerin karşılaştırmalarında ise Ki-kare testi kullanıldı. İstatiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Tüm istatistiksel işlemler SPSS.18 paket programında gerçekleştirildi.

SONUÇLAR

BÖBREK FONKSİYONLARI

Çalışmamızda 22. gün serum BUN seviyelerinde kontrol grubuna göre CsA grubunda, CsA+karvedilol grubunda, CsA+atorvastatin grubunda ve CsA+atorvastatin+karvedilol grubunda yüksek bulundu (sırasıyla $p:0,02$; $p:0,002$; $p:0,002$; $p:0,02$)(Tablo 1)(Grafik 1). CsA alan grup ile tedavi grupları (CsA+karvedilol; CsA+atorvastatin; CsA+karvedilol+atorvastatin) karşılaştırıldığında ise CsA+karvedilol, CsA+atorvastatin ve CsA+karvedilol+atorvastatin gruplarında, BUN seviyesi CsA grubuna göre daha düşük bulundu (Tablo 1)(Grafik 1). Ancak istatistiksel anlamlılık sadece CsA+karvedilol+atorvastatin grubunda görüldü ($p:0,03$) (Tablo 1). Tedavi gruplarının birbiriyle karşılaştırılmalarında ise en düşük serum BUN düzeyleri CsA+karvedilol+atorvastatin grubunda izlendi. Gruplar arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı ($p:0,01$).

Çalışmamızın 22. gün serum kreatinin seviyeleri kontrol grubuna göre CsA grubunda anlamlı yüksek bulundu (p:0,002). Buna karşın tedavi gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik saptanmadı (Tablo 1)(Grafik 1). CsA grubu ile tedavi gruplarının karşılaştırılmasında ise her üç tedavi grubunda CsA grubuna göre kreatinin daha düşük iken, istatistiksel anlamlılık sadece CsA ile CsA+karvedilol+atorvastatin grubunda izlendi (p:0,03). Tedavi gruplarının birbiriyle olan karşılaştırmalarında ise anlamlı farklılık görülmedi (Tablo 1)(Grafik 1).

Çalışmamızın 22. gün kreatinin klirensi düzeylerinin karşılaştırılmasında kontrol grubuna göre CsA ve tedavi gruplarının hepsinde kreatinin klirensi düşük bulundu ancak istatistiksel anlamlılık gözlenmedi (Tablo 1). CsA grubu ile tedavi gruplarının karşılaştırılmasında ise kreatinin klirensinin en düşük CsA grubunda olduğu görüldü. Buna karşın istatistiksel anlamlılık sadece CsA+karvedilol+atorvastatin grubunda izlendi. Tedavi grupları arasında da anlamlı farklılık izlenmedi (p:0,02) (Tablo1)(Grafik1).

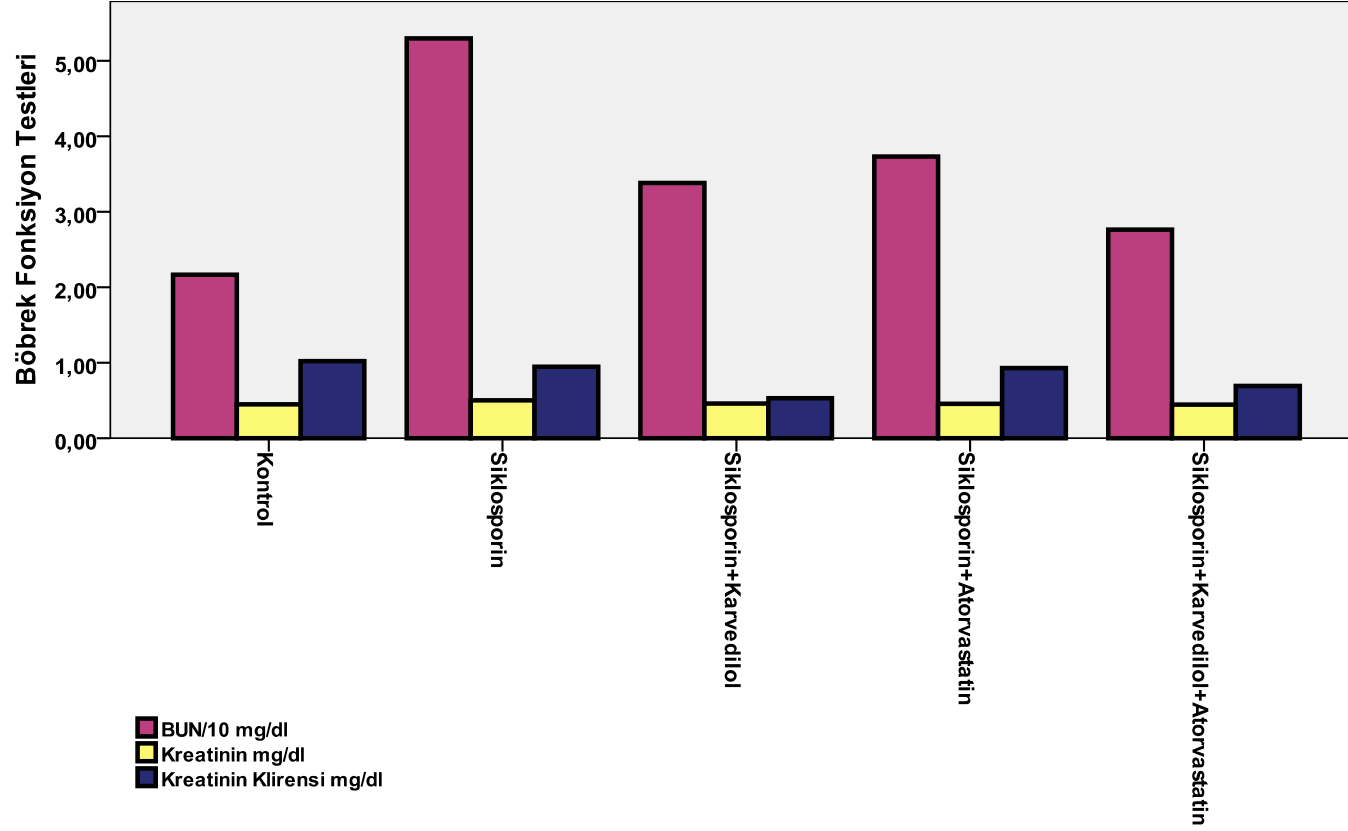
Tablo 1. Grupların böbrek fonksiyon testleri yönünden karşılaştırılması

	Kontrol	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
BUN(mg/dl)	21,66±5,31	53,00±25,51&	33,83±5,34&	37,33±6,74&	27,66±2,87&€
Kreatinin(mg/dl)	0,45±0,02	0,50±0,02&	0,46±0,04	0,45±0,05	0,44±0,02€
Ccr(ml/dl)	1,02±0,43	0,53±0,10	0,69±0,30	0,93±0,42	0,95±0,34€

Grup 2: CsA alan grup; Grup 3: CsA+karvedilol alan grup; Grup 4: CsA+atorvastatin alan grup;

Grup 5: CsA+karvedilol+atorvastatin alan grup.

& kontrol grubu ile karşılaştırma p<0,05, € CsA grubu ile karşılaştırma p<0,05

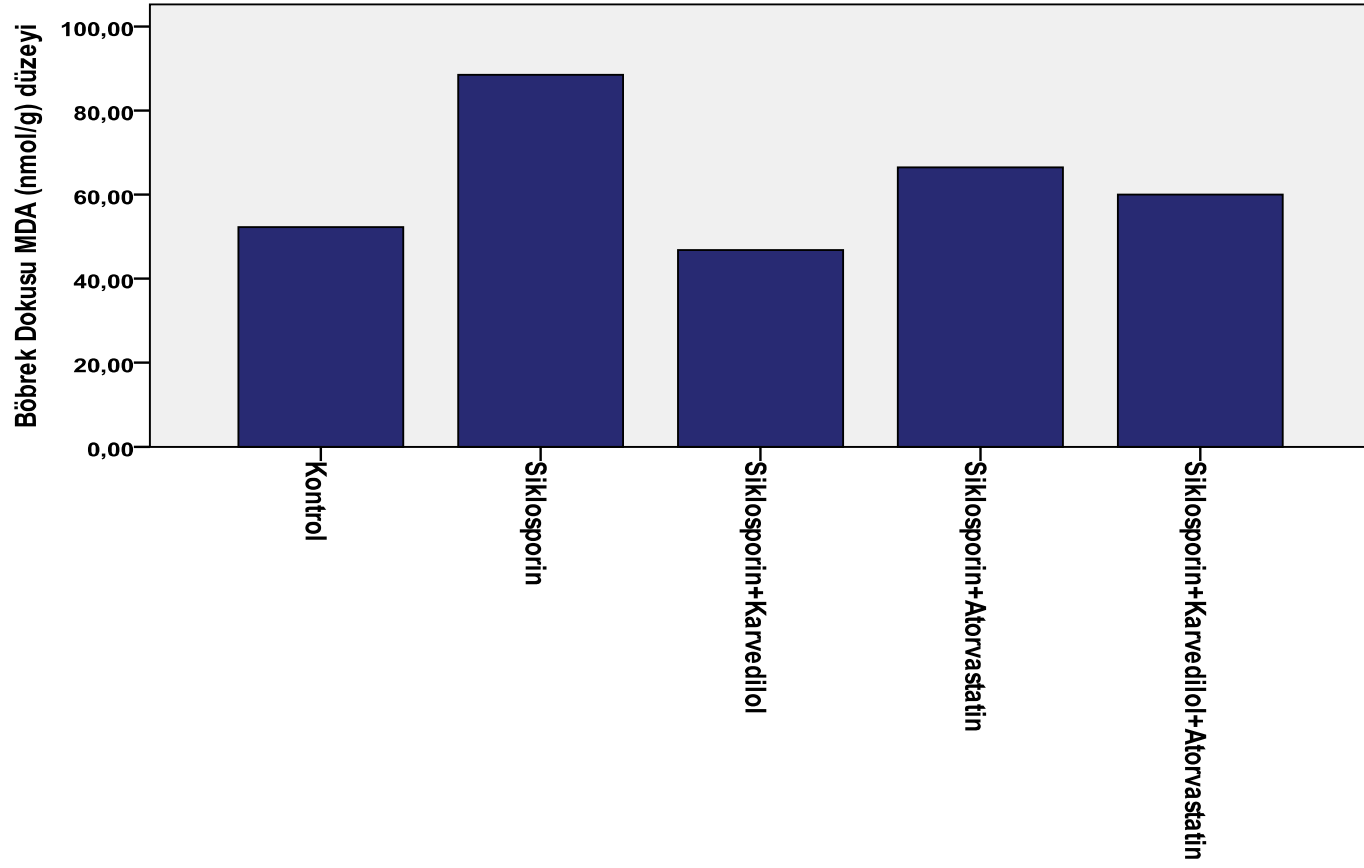


Grafik 1. Çalışma Gruplarının Böbrek Fonksiyon Testleri Açısından Karşılaştırılması

5.1 DOKU MDA SEVİYESİ

Kontrol grubuna göre böbrek dokusu MDA seviyesinde en yüksek değerler CsA grubunda görüldü (p:0,002). Tedavi gruplarına bakıldığında ise CsA+atorvastatin, CsA+karvedilol+atorvastatin grubunda kontrol grubuna göre yüksek olmakla birlikte istatistiksel anlamlılık CsA+atorvastatin grubunda gözlemlendi (p:0,01). CsA+karvedilol grubunda ise kontrol grubuna göre sınırdan anlamlılık gösteren bir düşüklük izlendi (p:0,05)(Tablo 2)(Grafik 2).

CsA ve tedavi gruplarının karşılaştırılmasında ise CsA grubuna göre CsA+karvedilol, CsA+atorvastatin, CsA+karvedilol+atorvastatin gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde MDA seviyelerinin daha düşük olduğu saptandı (sırasıyla p:0,002; p:0,004; p:0,004) (Tablo 2)(Grafik 2). Tedavi gruplarının karşılaştırılmasında ise en düşük MDA düzeylerinin CsA+karvedilol grubunda olduğu izlendi ve gruplar arası farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p:0,005) (Tablo 2)(Grafik 2).

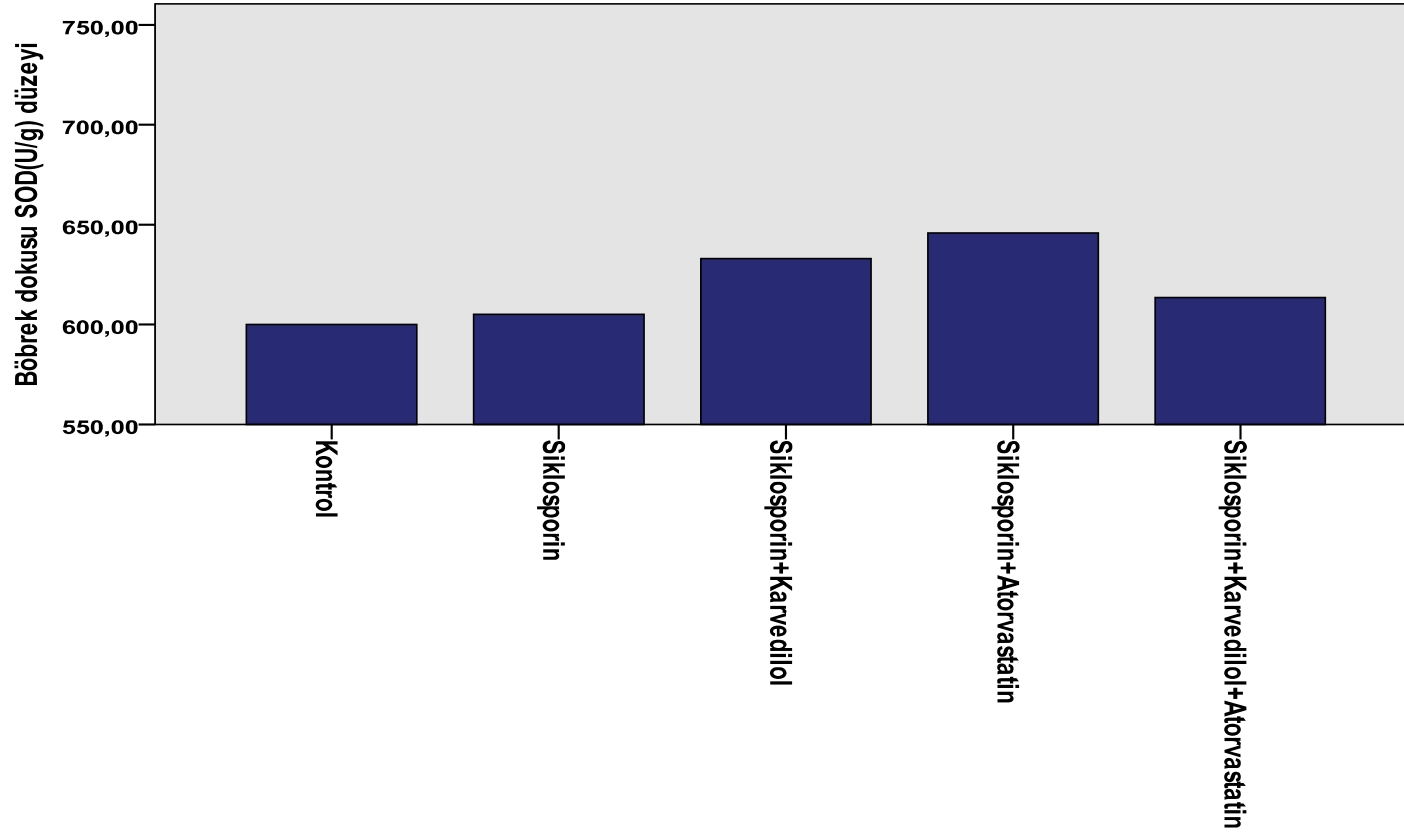


Grafik 2.Çalışma Gruplarının Böbrek Dokusu MDA (nmol/g) Düzeyi Açısından Karşılaştırılması

5.2 DOKU SOD SEVİYESİ

Böbrek dokusu SOD aktivitesinde kontrol grubuna göre CsA grubunda anlamlı bir farklılık görülmedi. Buna karşın tedavi gruplarının hepsinde kontrol grubuna göre yüksek gözlemlendi. Ancak istatistiksel anlamlılık sadece CsA+karvedilol ve CsA+atorvastatin gruplarında izlendi (sırasıyla p:0,009; p:0,002)(Tablo 2)(Grafik 3).

CsA ve tedavi gruplarının karşılaştırılmasında ise her üç tedavi grubunda CsA grubuna göre SOD aktivitesi yüksek bulundu (Grafik 3). CsA+karvedilol ve CsA+atorvastatin gruplarındaki bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla p:0,04; p:0,01). Tedavi gruplarının karşılaştırılmasında ise SOD aktivitesi açısından anlamlı farklılık izlenmedi (Tablo 2).

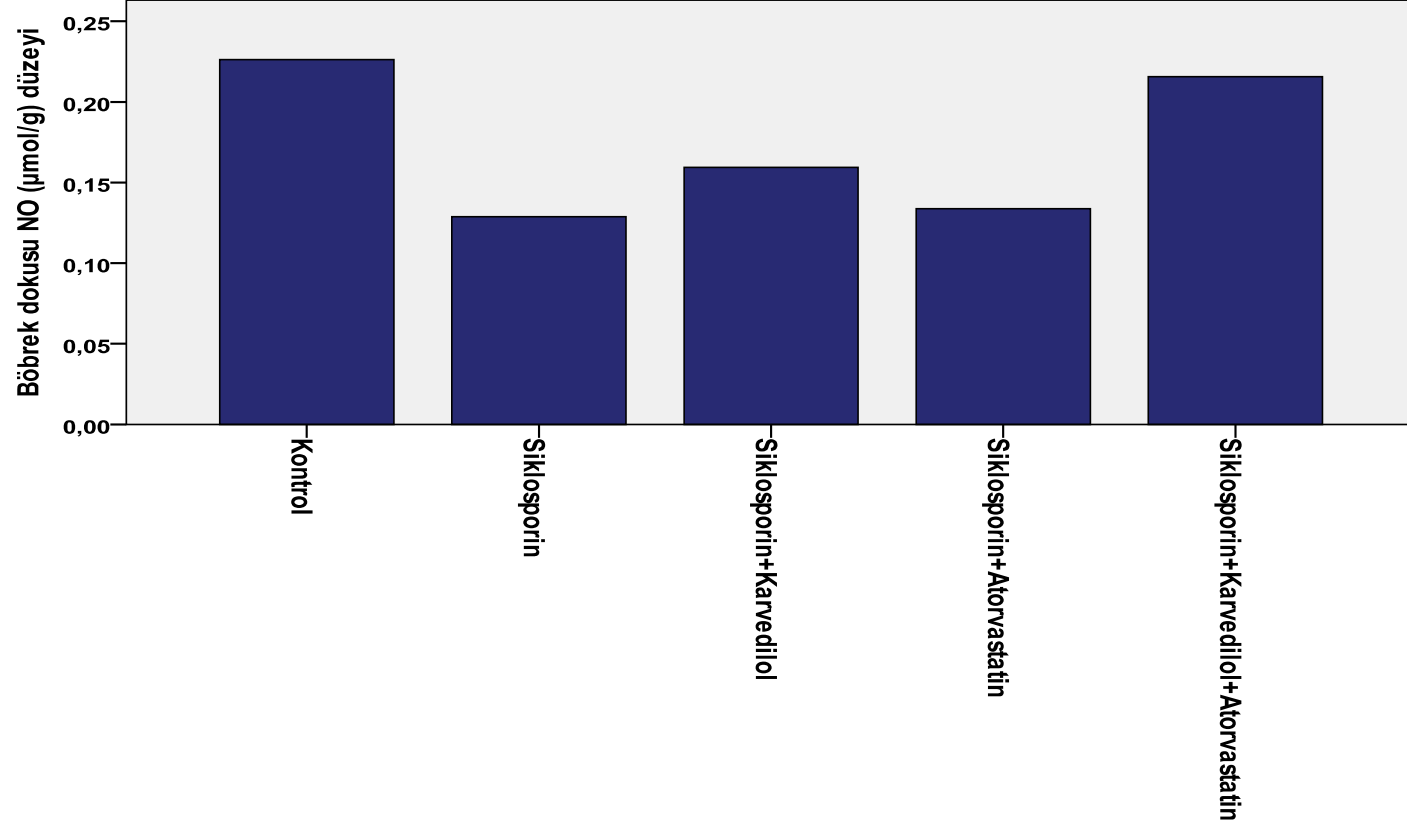


Grafik 3. Çalışma Gruplarının Böbrek Dokusu SOD (U/g) Düzeyi Açısından Karşılaştırılması

5.3 DOKU NO SEVİYESİ

Doku NO seviyesi kontrol grubuna göre en düşük olarak CsA grubunda izlendi (p:0,006) (Tablo 2)(Grafik 4). Kontrol grubuna göre tedavi gruplarına bakıldığında NO düzeyinin CsA+karvedilol ve CsA+atorvastatin gruplarında anlamlı düşük olduğu görüldü (sırasıyla p:0,04; p:0,004). CsA+karvedilol+atorvastatin grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı değişiklik bulunmadı (Tablo 2)(Grafik 4)

NO seviyeleri CsA grubu ile karşılaştırıldığında ise her üç tedavi grubunda da yüksek olduğu izlendi. Ancak istatistiksel anlamlılık sadece CsA+karvedilol+atorvastatin grubunda saptandı (p:0,006). Tedavi gruplarının kendi aralarında karşılaştırmalarında ise en yüksek NO seviyesinin CsA+karvedilol+atorvastatin grubunda olduğu görüldü. Bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (p:0,01)(Tablo 2)(Grafik 4)



Grafik 4. Çalışma Gruplarının Böbrek Dokusu NO (µmol/g) Düzeyi Açısından Karşılaştırılması

Tablo 2. Grupların böbrek dokusu MDA, SOD, NO düzeyleri yönünden karşılaştırılması

	Kontrol	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
MDA nmol/g	52,26±6,63	88,53±10,21&	46,82±5,74€	66,45±8,00€&	60,05±7,96€
SOD U/g	599,99±13,93	605,09±27,52	633,12±13,55&,€	645,85±18,63&,€	613,58±40,74
NO µmol/g	0,22±0,05	0,12±0,02&	0,15±0,04&	0,13±0,02&	0,21±0,02€

Grup 2: CsA alan grup Grup 3: CsA+karvedilol alan grup; Grup 4: CsA+atorvastatin alan grup Grup 5: CsA+karvedilol+atorvastatin alan grup.

& kontrol grubu ile karşılaştırma p<0,05, € siklosporin grubu ile karşılaştırma p<0,05

HİSTOPATOLOJİK, HİSTOKİMYASAL VE İMMÜNHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Hematoksilen eozin boyalı kesitlerin ışık mikroskobu ile değerlendirilmesinde glomerüller, tübüller, vasküler yapılar ve interstisyum incelenmiştir. Glomerüllerde H-E ve PAS boyaları ile bazal membran kalınlaşması veya spesifik patolojik değişiklik gözlenmedi. Tübüler sistemde apikal tomurcuklanma, hyalen silendirler CsA grubunda tedavi gruplarına göre anlamlı oranda yüksek bulundu (sırası ile p:0,01; p:0,04)(Tablo 3)(Şekil 1 ve 2). Tübüler sistemde tüm grupların bazı örneklerinde kalsifikasyon saptandı ancak istatistiksel olarak anlamsızdı. Tübül epitelyal hücrelerinde özellikle CsA grubunda yaygın apoptozis dikkati çekti (Şekil 3), Buna karşın tedavi gruplarında apoptozis varlığında belirgin azalma olduğu görüldü. Gruplar arasında apoptozis varlığı açısından izlenen farklılığın anlamlı olduğu saptandı (p:0,006) (Tablo 4)(Grafik 5). İnterstisyel fibrozis Masson trikrom boyası ile değerlendirildi. Ancak hiçbir örnekte saptanmadı. Bunun dışında interstisyumda vakuolizasyon, arterioller ve arterlerde duvar kalınlaşması, hyalin birikim, lümende daralma gözlenmedi. Osteopontin (OSP) özellikle CsA grubunda kuvvetli pozitiflik gösterdi. OSP için belirgin boyanma sitoplazmik granüler tarzda olmak üzere tübüllerde ve medüller bölgede görüldü (Şekil 4). Tedavi gruplarında ise OSP varlığının daha az sıklıkta ve yoğunlukta olduğu saptandı. Siklosporin ve tedavi grupları arasındaki OSP boyanma farklılığının istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (p:0,04)(Tablo 4)(Grafik 6).

Tablo 3. Grupların histopatolojik bulgular yönünden karşılaştırılması

	Apikal tomurcuklanma		Hyalen silendir	
	Var	Yok	Var	Yok
Kontrol	0	6	1	5
Grup 2	6	0	5	1
Grup 3	1	5	2	3
Grup 4	1	5	0	6
Grup 5	1	5&	1	5€

Grup 2:CsA alan grup, Grup 3:CsA+karvedilol alan grup,

Grup 4: CsA+atorvastatin alan grup,

Grup 5:CsA+karvedilol+atorvastatin alan grup

&: Apikal tomurcuklanma için gruplar arası farklılık p<0,05

€: Hyalen silendir için gruplar arası farklılık p<0,05

Tablo 4. Grupların immünohistokimyasal ve histopatolojik bulgular yönünden karşılaştırılması

	Apopitozis		Osteopontin		
	Var	Yok	Negatif	Zayıf	Kuvvetli
Kontrol	0	6	5	1	0
Grup 2	4	2	0	2	4

Grup 3	1	5	2	3	1
Grup 4	0	6	2	3	1
Grup 5	0	6€	4	2	0&

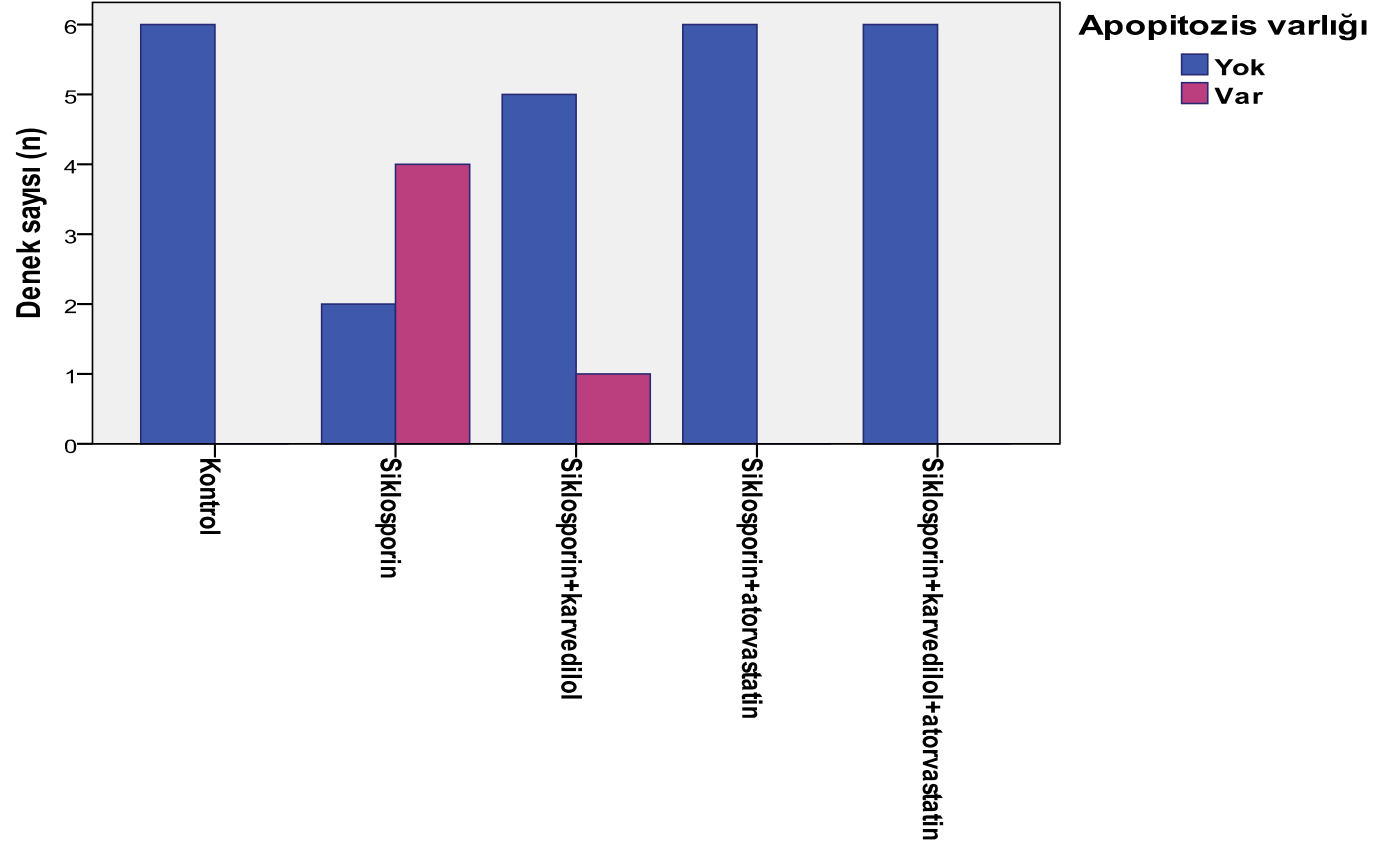
Grup 2:CsA alan grup, Grup 3:CsA+karvedilol alan grup,

Grup 4: CsA+atorvastatin alan grup,

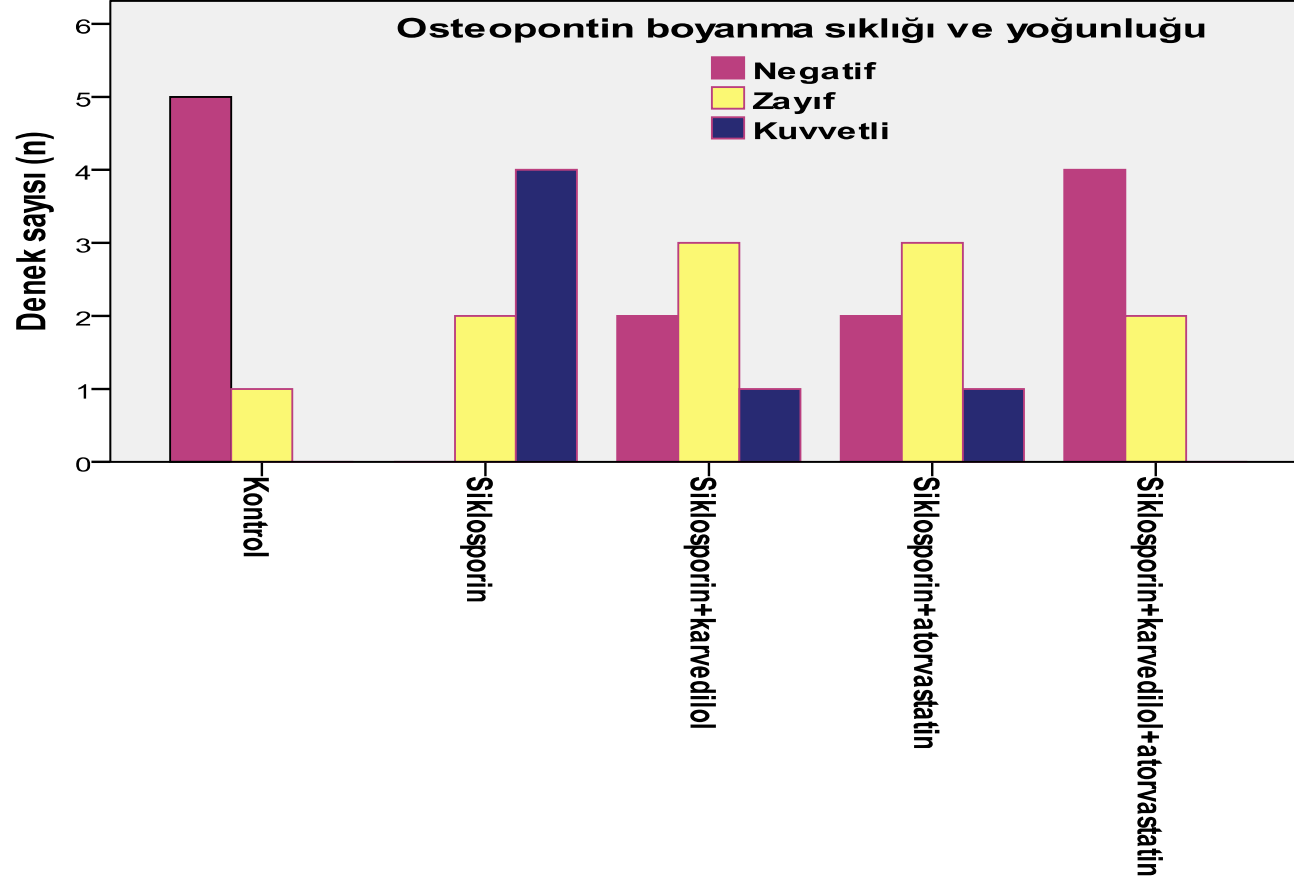
Grup 5:CsA+karvedilol+atorvastatin alan grup

&: Apoptozis için gruplar arası farklılık $p<0,01$

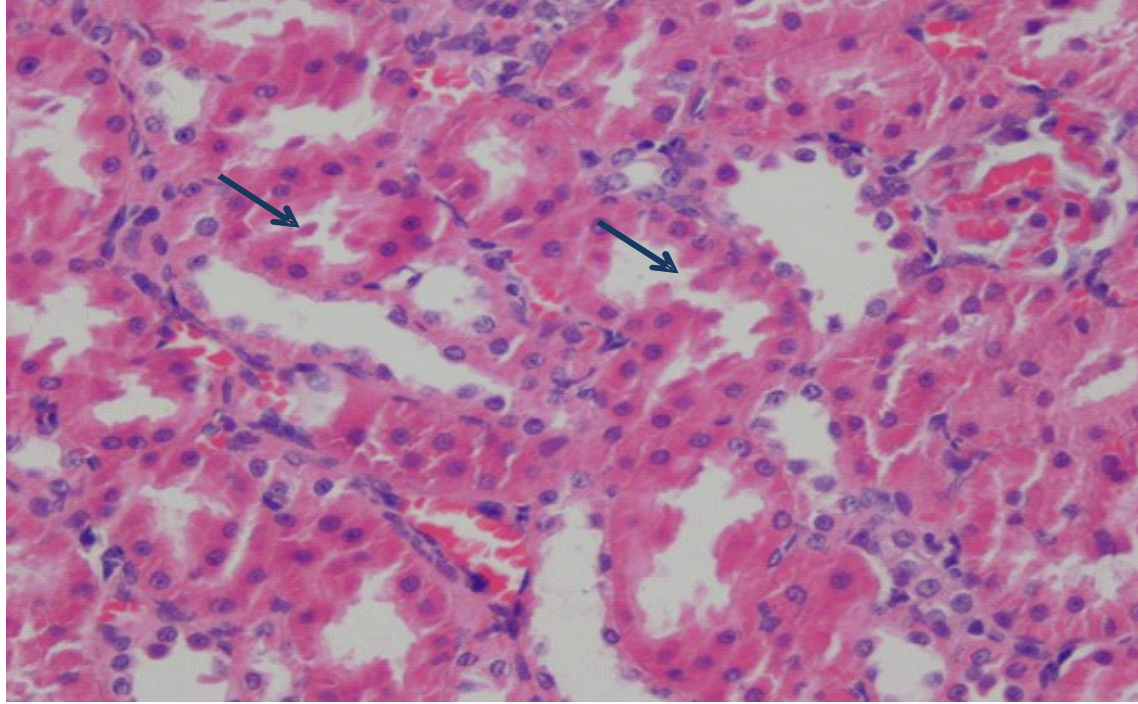
€: Osteopontin için gruplar arası farklılık $p<0,05$



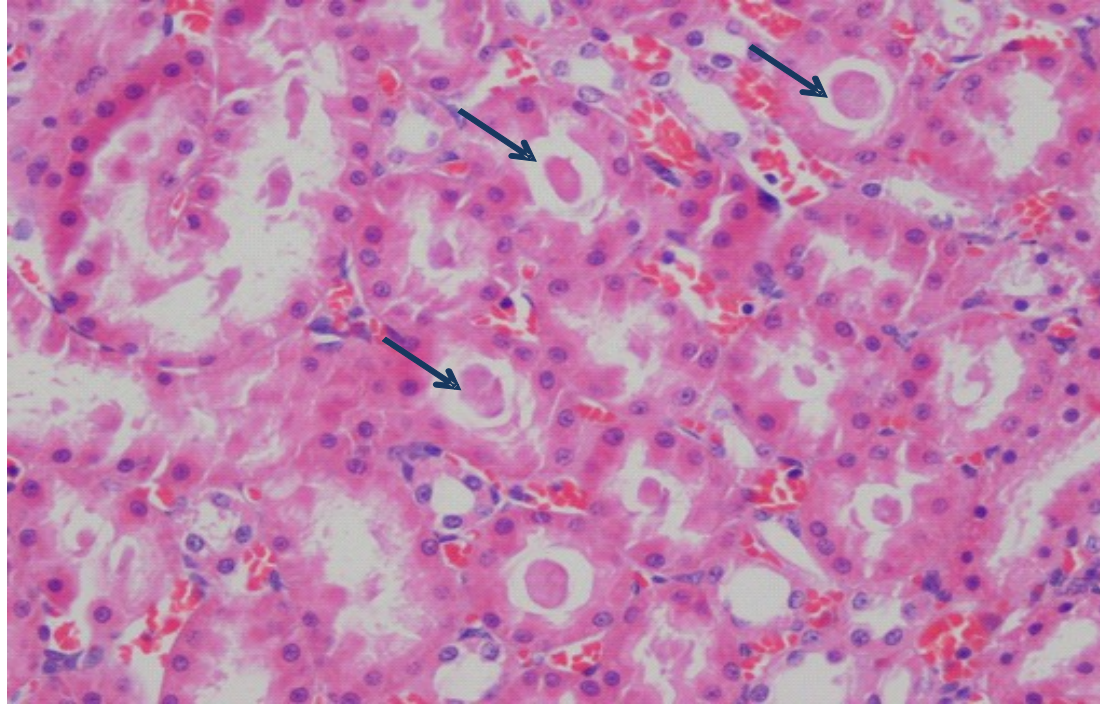
Grafik 5. Çalışma Gruplarının Apoptozis Varlığı Açısından Karşılaştırılması



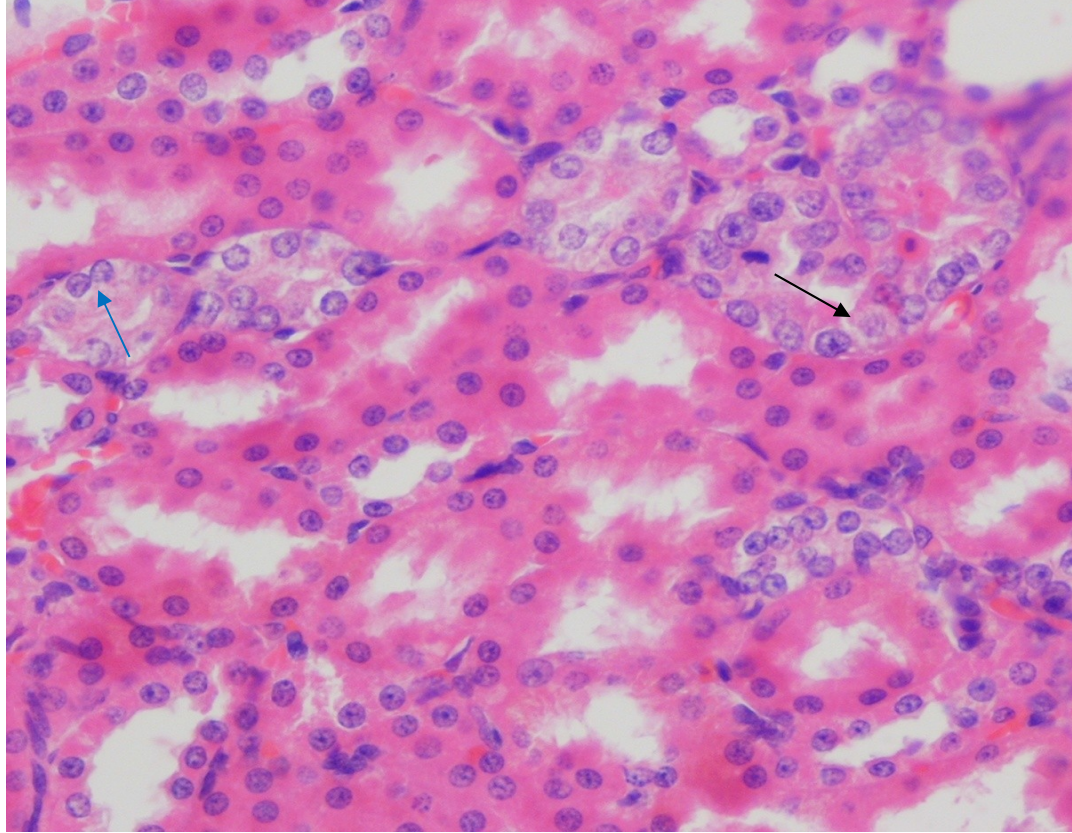
Grafik 6. Çalışma Gruplarının Osteopontin Varlığı Açısından Karşılaştırılması



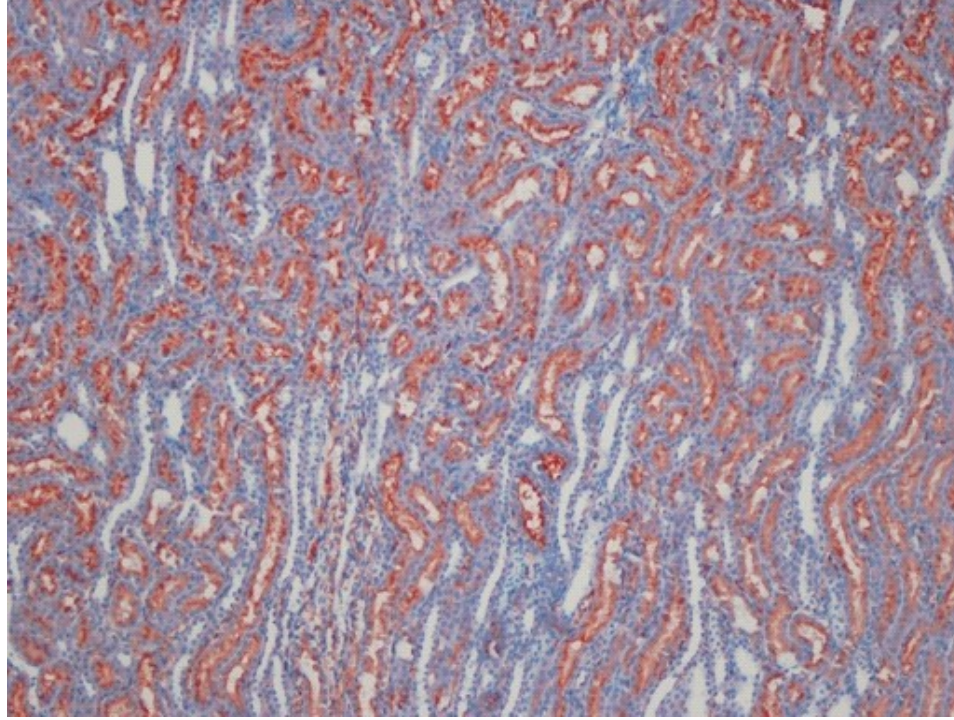
Şekil 1. Tübül epitelinde apikal tomurcuklanma, (H-E, X400)



Şekil 2. İnatübüler hyalen silenderler, (H-E, X400)



Şekil 3. Tübül epitelinde apoptozis (siyah ok) ve mitoz (mavi ok), (H-E, X400)



Şekil 4. İmünhistokimyasal olarak osteopontin ile kuvvetli (+3) pozitif boyanma, (H-E, X100)

2. TARTIŞMA

Çalışmamızda böbrek fonksiyon testlerinden serum BUN ve kreatinin düzeyleri, CsA grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu. Kreatinin klirensi değerleri ise anlamlı olmasa da azalma gösterdi. Tedavi gruplarına (CsA+karvedilol; CsA+atorvastatin; CsA+karvedilol+atorvastatin) bakıldığında ise kontrol grubuna göre serum BUN düzeyleri yüksek olmasına karşın, kreatinin düzeylerinde ve kreatinin klirenslerinde anlamlı bir fark bulunmadı. CsA grubu ile tedavi gruplarının karşılaştırılmasında her üç tedavi grubunda da serum BUN, kreatinin ve kreatinin klirens değerlerinin CsA grubuna göre daha iyi olduğu saptandı. Ancak bu iyilik halinin sadece kombine tedavi alan grupta (CsA+karvedilol+atorvastatin) istatistiksel anlamlılık gösterdiğini tespit ettik.

Oksidatif stresin göstergesi olarak, doku MDA düzeylerine bakıldığında; CsA grubunda; kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu. Tedavi gruplarından CsA+karvedilol grubunda kontrol grubuna göre sınırdan anlamlı düşük saptandı. CsA+atorvastatin grubunda ise anlamlı bir yükseklik izlenmedi. Kombine tedavi grubunda ise anlamlı bir değişiklik görülmedi. Doku MDA düzeylerinin CsA grubu ile karşılaştırılmasında tüm tedavi gruplarında anlamlı şekilde daha az olduğu tespit edildi. Ayrıca tedavi gruplarının içinde en düşük MDA seviyesi CsA+karvedilol grubunda bulunmuştur. Antioksidan parametre olan doku SOD düzeyleri CsA grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik göstermedi. Doku SOD düzeyinin, sadece kombine tedavi grubunda istatistiksel anlamı olmakla birlikte, tüm tedavi gruplarında CsA'ye göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

Doku NO değerlerinin ise kontrol grubuna göre CsA grubunda en düşük değerde olduğu izlenmiştir. Ayrıca kombine tedavi grubu hariç, diğer tüm gruplarda düşük olduğu grlmştir. CsA grubuna göre tedavi gruplarına bakıldığında ise doku NO düzeyinde yükselme olduğu bulunmuştur. Ancak istatistiksel anlamlılık sadece kombine tedavi grubunda bulunmuştur.

Histopatolojik bulguların değerlendirmesinde ise özellikle CsA grubunda tübüler hasarlanma ile beraber artmış apoptozis ve OSP varlığı izlenmiştir. Tedavi gruplarında ise apikal tomurcuklanma, hyalen silendir oluşumu gibi tübüler hasarlanma bulgularının yanı sıra apoptozis ve OSP varlığının anlamlı şekilde düşük olduğu grlmştir.

CsA başta solid organ transplantasyonu olmak üzere pek çok alanda yaygın olarak kullanılan önemli bir immünsupresif ilaçtır. CsA'nın yaygın kullanımına karşın tanımlanan pek çok yan etkisi mevcuttur (1,3,4). Klinikte izlenen en önemli yan etki nefrotoksisitedir. CsA aracılığıyla oluşan nefrotoksisite akut ve kronik olmak üzere iki farklı formda görülebilmektedir (3,6,7,14,39). Akut toksisite esas olarak hemodinamik değişikliklere bağlı gelişmekte ve geri dönüşümlü olmaktadır. CsA etkisiyle oluşan vazokonstriksiyon veya vasküler direnç artışı glomerüler filtrasyon hızında ve renal kan akımında azalmaya yol açmaktadır (6). Kronik nefrotoksisite ise böbreğin tüm kompartmanlarında meydana gelen hasarlanmayla karakterizedir. Bu hasarlanmada arterioler sistemde hyalin arteriolapati, intertisyel fibrozis, tübüler atrofi ve glomerüler alanda fokal ve/veya global glomerülosklerozis gelişmektedir (3,6,7,14,39).

Kronik CsA nefrotoksitesitesi hem geri dönüşümsüz hem de progresif olması nedeniyle klinikte akut toksisiteye göre daha önemlidir. Bu toksisitenin etyolojisinde rol oynayan patogenetik mekanizmalar tam olarak aydınlatılmamıştır. Buna karşın öne sürülen pek çok mekanizma bulunmaktadır. Bu mekanizmalar arasında en önemli yeri renal dokuda gelişen kronik iskemik süreç oluşturmaktadır. Kronik iskeminin tetiklediği inflamasyon ve oksidatif stres varlığı ise artmış apoptozis ile hasarlanma sürecinin ilerlemesine neden olmaktadır (3,6,7,14,39,42,43).

CsA'ye bağlı gelişen kronik iskemi vazokonstriksiyon veya vasküler direnç artışı ile başlamakta ileri dönemde arterioller hyalinozis ile devam etmektedir. İntrarenal RAS aktivasyonu, prostaglandin-tromboksan salınımı arasındaki dengesizlikler, endotelial disfonksiyona bağlı NO ekspresyonundaki azalma CsA'ya bağlı vazokonstriksiyondan sorumlu mekanizmalar arasında yer almaktadır. Ek olarak endotelin-1'in aşırı sekresyonu da CsA'nın indüklediği vazokonstriksiyonda önemli rol oynamaktadır (3,6,7,14,32-39). Bütün bu mekanizmalar üzerinde CsA'nın doğrudan etkisi bulunmaktadır. Örneğin endotelin-1 böbrek ve vasküler yataktan CsA aracılığıyla salınır. Vasküler tonusu artırarak kan akımını ve glomerüler filtrasyon hızını azalttığı gibi ECM artışı ve intertisyel fibrozis gelişimine de neden olmaktadır. Böbrek dokusunda RAS aktivasyonu da CsA'nın doğrudan etkisi ile oluşmaktadır (6,32,33). Genel olarak kabul edilen mekanizma CsA'nın jukstaglomerüler hücrelerden renin salınımını artırmasıdır. RAS aktivasyonu hem hemodinamik hem de nonhemodinamik yolla renal hasar oluşturmaktadır. RAS hemodinamik vazokonstriksiyonu kontrol ederek düşük dereceli iskemi yaparken, nonhemodinamik olarak tübülointertisyel inflamasyon ve TGF- β 1 ekspresyonunu aktive etmektedir. Bu aktivasyon hücre hasarlanmasını takiben tübülointertisyel ve glomerüler fibrozis

artışını da beraberinde getirmektedir. Kan akımındaki azalma prostanoidler üzerindeki azalmayla beraber tromboksan artışı ile de ilişkilidir. Tromboksan üretiminden sorumlu böbrek içi hücreler tam olarak ayırt edilememekle birlikte, CsA etkisiyle renal dokuda artan trombositler, monositler, mezenjial hücreler ve makrofajlardan salınım olduğu düşünülmektedir(3,6,34,49-52).

Kronik CsA nefrotoksitesinde önemli olan bir başka mekanizma NO sentezinde ve biyoyararlanımında olan değişikliklerdir. NO vazodilatör bir ajandır ve böbreklerde vasküler tonusun sağlanmasında anahtar rol oynamaktadır. Kronik CsA nefrotoksitesinde NO'nun azalması vazokonstriksiyona yol açmanın yanı sıra glomerüler tromboz ve iskemi, mezenjial hücre proliferasyonunu, ECM protein sentezini ve intertisyel inflamatuvar hücre infiltrasyonunu artırmaktadır(6).

Kronik CsA nefrotoksitesinde izlenen vazoaktif maddelerin kontrolündeki dengesizlik bu toksisitenin önlenmesinde vazodilatör ajanların etkili olabileceğini düşündürmüştür. Bu konuda yapılan çalışmalarda çok sayıda olası ajan denenmiştir. Bu ajanlar arasında RAS blokörleri önemli bir yer tutmaktadır. Bunun dışında endotelin ve tromboksan reseptör antikörleri, NO sentez prekürsörü olan L arginin diğer olası ajanlardır (6,60-62,68,69). Ancak halen net sonuçlar elde edilememiştir. Bu nedenle bu konuda daha fazla çalışma gereklidir.

Kronik CsA nefrotoksitesinde oluşturulan deneysel çalışmamızda, CsA'ya bağlı kronik hasarlanmada olası koruyucu etkinliği olabilecek iki çeşit ajan değerlendirilmiştir. Bu ajanlardan biri karvediloldür. Karvedilol β_1 ve β_2 reseptörleri yanında α_1 reseptörlerini de bloke eden güçlü bir vazodilatördür. Karvedilolün CsA'nın kronik nefrotoksitesindeki olası koruyuculuğunda adrenerjik sistem

üzerine olan etkilerinden başka antioksidan, antifibrotik ve endotelial disfonksiyon üzerine olan olumlu etkilerinin rol oynadığı düşünülmektedir. Karvedilolün sergilediği adrenerjik etki CsA aracılığıyla oluşan sempatik aktivite artışını bloke etmenin yanı sıra β reseptör bloke edici etkisi ile RAS sistemini baskılayarak Ang II'nin artmış aktivitesini de engelleyebilmektedir. Böylece renal kan akımında ve glomerüler filtrasyon hızında azalma önlenmiş olmaktadır (70-73). Karvedilolün olası olumlu etkilerine karşın literatürde karvedilol ve CsA'nin beraber kullanıldığı çalışmalar oldukça az sayıdadır. Genel olarak in vitro olan bu çalışmalarda kronik nefrotoksisite üzerinde karvedilolün olumlu etkileri gözlenmiştir (74). Aynı şekilde çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında karvedilol alan grupta CsA grubuna göre hasarlanma bulgularının hem biyokimyasal olarak hem de histopatolojik olarak daha az olduğu görülmüştür.

CsA kullanımına bağlı nefrotoksisite gelişiminde önde gelen mekanizmalardan biri NO salınımındaki azalmadır. Karvedilol aracılığıyla oluşan endotelial disfonksiyonun düzelmesi özellikle NO başta olmak üzere pek çok vazodilatör ajanın salınımına yardımcı olmaktadır (75-77). Çalışmamızda karvedilol grubunda NO seviyelerinde siklosporin grubuna göre istatistiksel anlamlılık olmasa da yükselme olduğu görülmüştür. NO seviyelerinde sağlanan yükselmeler hemodinamik etkilerin yanı sıra antifibrotik ve antiinflamatuvar etkilerin oluşmasına da katkı sağlamaktadır. Yapılan çok sayıdaki in vitro ve in vivo çalışmada endotelial NO sentaz aracılığıyla meydana gelen NO salınımının antifibrotik etkiler aracılığıyla glomerüler ve intertisyel fibrozisi azalttığı gösterilmiştir (69,78,79). Bu çalışmalarda antifibrotik etkinliğin oluşmasında NO aracılığıyla inhibe olan Tip 4 kollajenin, matriks proteinlerinin, plazminojen aktivatör-1'in, α - düz kas aktin'in ve TGF- β 1'in

etkili olabileceği öne sürülmüştür. NO tarafından azaltılan makrofaj infiltrasyonunun da antifibrotik etkinliğe katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Ayrıca NO tarafından inhibe edilen adhezyon moleküllerinin ve platelet agregasyonunun lökositler üzerine olan kemotaktik etkiyi azaltarak antiinflamatuvar etkiye neden olduğu öne sürülmektedir (78,79). Çalışmamızda da karvedilol grubunda izlenen yüksek NO seviyelerinin yukarıda bahsedilen etkiler aracılığıyla koruyuculuğu olduğu düşünülebilir. Ancak NO seviyesindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmaması bu konudaki hipotezimizin tam olarak desteklenmesini engellemektedir. Buna karşın karvedilol ile uygulanan tedavi süresinin daha uzun olması durumunda NO düzeyindeki artışın istatistiksel olarak anlamlılık kazanabileceği de düşünülmüştür.

Çalışmamızda karvedilol tedavisinin bir diğer olumlu etkisi de oksidatif stres parametrelerinden MDA düzeyinde yaptığı azalmadır. Karvedilol ve CsA'nın beraber verildiği gruplarda MDA düzeylerinin CsA alan gruba göre ve hatta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olduğu izlenmiştir. Ayrıca doku MDA'larındaki azalmanın tedavi grupları içinde en fazla karvedilol grubunda olduğu görülmüştür. Benzer şekilde literatürdeki in-vitro çalışmaların sonuçlarında da karvedilolün antioksidan etkisi özellikle vurgulanmıştır (70-74). Kronik CsA nefrotoksitesinin oluşumunda artan oksidatif stresin ne kadar etkili olduğu göz önünde tutulursa, MDA düzeylerinde sağlanan bu azalmanın CsA nefrotoksitesinin önlenmesinde büyük önem taşıyabileceği düşünülebilir.

Kronik CsA nefrotoksitesinde oksidatif stres artışı direk olarak CsA'nin uyarıcı etkisiyle olabileceği gibi kronik iskemik sürecin tetiklemesi ile de olmaktadır. Oksidatif stres varlığında oluşan serbest oksijen radikalleri hücre harabiyetine ve

sonuçta apoptozis aracılığıyla hücre ölümüne sebep olmaktadır. Artan hücre ölümü beraberinde tübüler atrofi ile birlikte intertisyel fibrozis oluşumuna yol açmaktadır (6). Bu nedenle apoptozis varlığı kronik CsA nefrotoksitesine giden yolda başlangıç noktasını oluşturmaktadır. Oksidatif stresin kronik CsA nefrotoksitesindeki olumsuz etkileri ilk kez CsA tedavisi verilen ratlarda antioksidan özellikteki Vitamin E'nin böbrek üzerine koruyucu etkilerinin gösterilmesi ile konulmuştur. Wang ve ark'larının uninefrektomize ratlarda yaptıkları çalışmada 8 hafta sonunda, vitamin E antioksidan etkinliği ile lipid peroksidasyonunu ve serbest oksijen radikallerini ortamdaki uzaklaştırarak hücre ölümünde ve hasarlanmasında azalma sağlamıştır (43). Bu sonuçlar oksidatif stresin CsA toksitesindeki önemini desteklemiştir. Çalışmamızda hem CsA hem de kontrol grubuna göre karvedilol aracılığıyla sağlanan MDA düzeylerindeki belirgin azalma bu tedavinin kronik CsA nefrotoksitesinde koruyucu olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda bu görüşü destekler şekilde bu grupta kronik hasarlanmanın başlangıç noktası olan apoptozis varlığında belirgin azalma izlenmiştir.

Karvedilolün oksidatif stresi azaltıcı etkisi vazodilatasyon aracılığıyla oluşan kronik iskemik süreçteki azalmanın yanı sıra antioksidan parametrelerde artış yaparak serbest oksijen radikallerinin ortamdaki temizlenmesine de bağlı olabilir. Çalışmamızda MDA gibi oksidan göstergelerde azalma ile beraber antioksidan bir parametre olan doku SOD seviyesinde artış izlenmiştir. Buna göre doku SOD düzeyleri karvedilol grubunda hem kontrol, hem de siklosporin grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç karvedilolün oksidatif stresi belirgin olarak azaltıcı etkisini açıklamaya yardımcı olmaktadır. Histopatolojik değerlendirme göz önüne alındığında karvedilolün olası antioksidan etkinliğinin yanı sıra endotelial

fonksiyon üzerine olan olası olumlu etkilerinin bu grupta tübüler toksisite ile beraber apoptozisin azalmasında etkili olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda değerlendirilen diğer bir tedavi atorvastatindir. Atorvastatin statin grubunda yer alan antilipidemik bir ilaçtır. Statinler HMG CoA redüktaz inhibit r d rl r ve güçlü bir Şekilde kolesterol biyosentezini engellemektedirler. Bu etkilerinden bağımsız olarak statinlerin pleotropik etkileri de mevcuttur. Bu etkiler arasında endotelial fonksiyonun normalizasyonu ve restorasyonu, NO sentezinin artırılması, oksidatif stresin ve inflamasyonun azaltılması yer almaktadır. Bu pleotropik etkiler aracılığıyla statinlerin kronik CsA nefrotoksitesinde intertisyel inflamasyonu, oksidatif stresi ve fibrozisi iyileştirebileceği düşünülmektedir. Ayrıca yapılan deneysel çalışmalarda statinlerin kronik böbrek hasarlanma sürecinde mezanjial ve vazk ler düz kas hücre proliferasyonunu bozarak, mezanjial matriks ekspansiyonunu ve makrofaj infiltrasyonunu engelleyerek renal hasarlanmayı azaltabildiği gösterilmiştir (80-82). Bu sebeple statinlerin progresif bir hasarlanma süreci olan kronik CsA nefrotoksitesinin yavaşlatılmasında da faydalı olabileceği d ş n lm ştir. Buna karşın bu konuda az sayıda çalışma yapılmıştır. Bu alışmalar içerisinde Li ve ark'larının, 6 grup oluşturarak toplam 40 ratla yaptıkları deneysel çalışmalarında pravastatin tedavisinin CsA kronik nefrotoksitesinde etkili olabileceği öne s r lm ştir. Bu çalışmada, pravastatin verilen ratların böbrek dokularında inflamasyon ve fibrozisin yavaşladığı izlenmiştir (81). Çalışmamızda da benzer Şekilde böbrek fonksiyon testlerinin ve histopatolojik bulguların atorvastatin grubunda CsA grubuna göre daha iyi olduğu gözlenmiştir. Bu olumlu etkinin oluşmasında atorvastatinin yukarıda bahsedilen pleotropik etkileri rol oynayabilir. Bu pleotropik etkiler içinde antioksidan etki nefrotoksitenin önlenmesinde büyük önem

taşımaktadır. Literatürde Zhouu-Seng ve ark'larının 35 ratla yaptıkları, 10 hafta süren deneysel çalışmalarında statin tedavisi alan ratlarda renal dokuda oksidatif stresin baskılanabildiğini öne sürmüşlerdir (80). Aynı şekilde çalışmamızın sonuçlarına baktığımızda da statin tedavisi alan grupta oksidatif stresin göstegesi olan doku MDA düzeylerinin CsA alan gruba göre anlamlı olarak azaldığı izlenmiştir. Ayrıca antioksidan parametre olan doku SOD düzeylerinde de hem kontrol grubuna hem de siklosporin grubuna göre anlamlı düzeyde artış olduğu izlenmiştir. Bu sonucun atorvastatin grubunda izlenen biyokimyasal ve histopatolojik renal iyilik halinin açıklanmasında etkili olabileceği düşünülmüştür.

Statin tedavisinin renal dokuda oluşturduğu bir başka olumlu etki de NO seviyelerinde sağlanan yükselmedir. Statin tedavisi hem eNOS ekspresyonunda artma yaparak NO sentezini artırırken, hem de NO'nun biyoyararlılığında artışa neden olmaktadır. NO biyoyararlılığının özellikle serbest oksijen radikalleri aracılığıyla bozulduğu göz önünde tutulursa, statin tedavisi ile sağlanan antioksidan etkinin aynı zamanda NO biyoyararlılığına da katkı sağlayabileceği öne sürülmektedir. Literatürde renal dokuda NO ve serbest oksijen radikallerinin beraber değerlendirildiği çalışmalarda statin tedavisinin iki faktör üzerine olan karşıt etkisi izlenmiştir. Ancak bu çalışmalarda statin tedavisinin NO üzerine olan etkisi sadece serbest oksijen radikallerinin azaltıcı yöndeki etkisi ile değil doğrudan NO sentazı artırıcı etki ile de olduğu öne sürülmüştür. Statinlerin, bu şekilde böbrek dokusunda NO üretiminde artışa yol açarak, oksidatif stresi azalttığı, renal hasarda gerileme sağladığı sonucuna varılmıştır (3,80-82). Çalışmamızın sonuçlarına baktığımızda atorvastatin grubunun NO değerlerinin CsA grubuna göre yüksek seyrettiği görülmüştür. Ancak tedavi

süresinin kısa olması nedeniyle bu yükselmenin istatistiksel anlamlılığa ulaşmadığı düşünülmüştür.

Kronik CsA nefropatisinde yaygın fibrozis gelişimi kronik hasarlanmada son noktayı oluşturmaktadır. Bu hastalarda renal dokuda artmış inflamatuvar süreç fibrozisin oluşmasında önemli rol oynamaktadır (6,7). Statin tedavisi ile sağlanan antiinflamatuvar etki bu nedenle büyük önem taşımaktadır (80-82). Antiinflamatuvar etkinin oluşmasında kronik CsA nefrotoksitesinde önemli yeri olan OSP ekspresyonunun supresyonu etkili olabilir. OSP yüksek oranda asidik fosfoprotein içermektedir. Bu özelliği nedeniyle makrofaj ve monositler için kemotaktik faktör olarak etki etmektedir. CsA aracılığıyla renal dokuda OSP ekspresyonunun artması kemotaktik etki ile makrofaj ve monosit infiltrasyonunu artırmaktadır. Sonuçta inflamasyon artışı ile beraber fibrozis gelişmektedir (3,6,7,14,39). Yapılan deneysel çalışmalarda OSP ekspresyonu olmayan ratlarda kronik CsA nefrotoksitesinin iyileştiği görülmüştür. Bu nedenle OSP'nin CsA'nin indüklediği renal hasarda patogenetik olduğu düşünülmektedir (3,6,7,14,39). Çalışmamızda atorvastatin grubunda daha belirgin olmak üzere tedavi gruplarında CsA grubuna göre daha az sıklıkta ve yoğunlukta OSP boyanması olduğu görülmüştür. Bu sonucun oluşmasında atorvastatinin doğrudan OSP'yi baskılayıcı etkisinin yanı sıra antioksidan etkisinin de etkili olabileceği düşünülebilir. Benzer şekilde karvedilol grubunda da izlenen antioksidan etki OSP baskılanmasında etkili olabilir.

Statin tedavisi ile supresyon sağlanan bir başka parametre TGF- β 1 sitokindir (80-82). Glomerüler ve tübülointertisyel fibrozis ile karakterize böbrek hastalıklarında TGF- β 1 anahtar moleküldür. İn vitro ve in vivo çalışmalarda CsA

eklenmesi ile doz bağımlı olarak TGF- β 1 ekspresyonunun arttığı görülmüştür. TGF- β 1 ECM üretimini ve yıkımını etkileyerek tübülointerstisyel fibrozise yol açar (3,6,7,14,39). Yapılan deneysel çalışmalarda TGF- β 1'i nötralize eden antikorlar CsA nefropatisinde izlenen morfolojik değişikliklerde düzelme sağlamışlardır (83). Statin tedavisi ile de TGF- β 1 başta olmak üzere PA1 de sağlanan baskılanma kronik siklosporin nefrotoksitesindeki fibrozisin azalmasını sağlamaktadır (80-82). Çalışmamızda TGF- β 1 ekspresyonunun değerlendirilmemiş olması eksiklik olarak düşünülebilir. Ancak karvedilol grubunda olduğu gibi atorvastatinin grubunda da izlenen apoptozis varlığındaki azalma ile TGF- β 1 ekspresyonu ile birlikte fibrozis gelişiminde belirgin azalma olabileceği düşünülebilir.

Çalışmamızda elde edilen bir diğer sonuç karvedilol ve atorvastatinin kombine kullanıldığı grupta böbrek fonksiyon testlerinin ve histopatolojik bulguların genel olarak hem CsA grubuna hemde diğer tedavi gruplarına göre daha iyi olmasıdır. Bu sonuç tedavi seçeneklerinin ayrı ayrı etkileri düşünüldüğünde beklenen bir sonuçtur. Kronik CsA nefrotoksitesinde karvediloloün adrenerjik sistem üzerine olan etkileri, atorvastatinin doğrudan anti-inflamatuvar etkileri dışında her iki ilacın oksidasyonu ve OSP ekspresyonunu engelleyici, NO sentezini ve biyoyumluluğunu artırıcı etkileri ortaktır. Çalışmamızda CsA grubuna göre çalışma parametreleri üzerine kombine tedavinin etkilerine bakıldığında OSP varlığının ve MDA'nın daha düşük, SOD ve NO değerlerinin daha yüksek olduğu izlenmiştir. Sonuçta kombine tedavinin inflamasyon, oksidatif stres ve NO sentezi üzerine olan bu olumlu etkilerinin biyokimyasal olarak böbrek fonksiyonlarının daha iyi korunmasına ve histopatolojik olarak apoptozisin azalmasına yardımcı olduğu düşünülmüştür.

Çalışmamızda karvedilol ve atorvastatinin oksidatif stres, antioksidan etki, NO ve OSP gibi proinflamatuvar faktörler üzerine olan etkilerine bakılmıştır. Buna karşın TGF- β 1, fibronektin gibi profibrotik belirteçlere olan etkiler değerlendirilmemiştir. Bu durum karvedilol ve atorvastatinin CsA bağlı kronik hasarlanmada fibrozis üzerine olan etkilerini doğrudan yorumlamayı zorlaştırmıştır. Bunun dışında çalışmamızdaki bir diğer zayıf nokta da histopatolojik olarak kronik toksisite bulgularının tam olarak izlenmemesidir. Çalışma süremizin kısa oluşu bu histopatolojik bulguların yeterince ortaya çıkmasına engel olmuş olabilir. Buna karşın özellikle CsA grubunda izlenen yoğun apoptozis varlığının CsA'ya bağlı renal dokuda oluşan kronik hasarlanma sürecinin göstergesi olduğu düşünülmüştür. Literatürde benzer modellemelerin yapıldığı çalışmalarda özellikle apoptozis varlığı kronik CsA nefrotoksitesinin göstergesi olarak kabul edilmiştir (64,84). Apoptozisin bu hasarlanmada öncü lezyon olması nedeniyle, çalışmamızın devamı durumunda artmış apoptozisi, fibrozis başta olmak üzere diğer histopatolojik bulguların izleyebileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak; kronik CsA nefrotoksitesi böbreğin bütün kompartmanlarında oluşan geri dönüşümsüz histolojik hasarlanma ile ilişkilidir. Geri dönüşümsüz ve ilerleyici olması nedeniyle klinikte son dönem böbrek yetmezliğine kadar ilerleyebilmektedir. Biyokimyasal olarak renal fonksiyonlar stabil bile olsa histopatolojik olarak bozulma mevcut olabilir. Bu nedenle CsA'nın kronik nefrotoksitesinin önlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalarda pek çok farmakolojik ajan denenmiştir. Ancak halen kesin olarak tanımlanmış bir ajan bulunmamaktadır. Kronik CsA nefrotoksitesinin etyopatogenezi göz önünde bulundurulduğunda NO başta olmak üzere vazoaktif

maddelere etkisi olan, antiinflamatuvar, antioksidan, antifibrotik ilaçların koruyucu özellikte olabileceği öne sürülmüştür. Çalışmamızda kullanılan atorvastatin ve karvedilol tedavilerinin bu etkileri içeren ajanlar olması nedeniyle kronik CsA nefropatisinde koruyucu olabilecekleri düşünülmüştür.

Sonuçta çalışmamızda karvedilol ve atorvastatin tedavilerinin kronik CsA nefropatisine karşı hem biyokimyasal hem de histopatolojik düzeyde koruyucu özellikte olduğu görülmüştür. Bu ajanlar ile renal dokuda proinflamatuvar, oksidan parametrelerde azalma ve NO düzeyinde artış izlenmiştir. Bu etkilerin böbrek fonksiyonlarının histopatolojik ve biyokimyasal olarak korunmasında fayda sağlamış olabileceği düşünülmüştür. Bu tedavilerin ayrı ayrı böbrek fonksiyonlarında sağladığı koruyucu etki kombine tedavi ile daha belirgin olmuştur. Ancak bu tedavilerin koruyucu etkilerinin daha iyi tanımlanabilmesi için in vitro çalışmaların yanı sıra in vivo çalışmalara da ihtiyaç vardır. Ek olarak kronik CsA nefrotoksitesinin etyopatogenezinin çok faktörlü olduğu göz önüne alındığında, bu toksisiteye karşı renal koruyuculukta tek bir ajanın yeterli olmayabileceği düşünülebilir. Bu nedenle bu konuda çoklu tedavi kombinasyonlarının birlikte kullanıldığı in vivo çalışmalar daha fazla fayda sağlayabilir.

KAYNAKLAR

1. Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med*. 1989 Dec;321(25):1725-38.
2. Shi SH, Zheng SS, Jia CK, Zhu YF, Xie HY. Inhibitory effect of tea polyphenols on transforming growth factor-beta1 expression in rat with cyclosporine A-induced chronic nephrotoxicity. *Acta Pharmacol Sin*. 2004 Jan;25(1):98-103.
3. Li C, Lim SW, Sun BK, Yang CW. Chronic cyclosporine nephrotoxicity: new insights and preventive strategies. *Yonsei Med J*. 2004 Dec 31;45(6):1004-16.
4. Rezzani R, Rodella L, Bianchi R. Early metabolic changes in peripheral blood cells of renal transplant recipients treated with cyclosporine A. *Int J Immunopharmacol*. 1999 Jul;21(7):455-62.
5. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Chapman JR, Allen RD. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation*. 2004 Aug 27;78(4):557-65.
6. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009 Feb;4(2):481-508.
7. Yoon HE, Yang CW. Established and newly proposed mechanisms of chronic cyclosporine nephropathy. *Korean J Intern Med*. 2009 Jun;24(2):81-92.
8. Yang CW, Ahn HJ, Kim WY, Li C, Jung JY, Yoon SA, Kim YS, Cha JH, Kim J, Bang BK. Synergistic effects of mycophenolate mofetil and losartan in a model of chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation*. 2003 Feb 15;75(3):309-15.
9. Thomas SE, Andoh TF, Pichler RH, Shankland SJ, Couser WG, Bennett WM, Johnson RJ. Accelerated apoptosis characterizes cyclosporine-associated interstitial fibrosis. *Kidney Int*. 1998 Apr;53(4):897-908.

10. Shihab FS, Bennett WM, Tanner AM, Andoh TF. Angiotensin II blockade decreases TGF-beta1 and matrix proteins in cyclosporine nephropathy. *Kidney Int.* 1997 Sep;52(3):660-73.
11. Pichler RH, Franceschini N, Young BA, Hugo C, Andoh TF, Burdmann EA et al. Pathogenesis of cyclosporine nephropathy: roles of angiotensin II and osteopontin. *J Am Soc Nephrol.* 1995 Oct;6(4):1186-96.
12. Shihab FS, Andoh TF, Tanner AM, Yi H, Bennett WM. Expression of apoptosis regulatory genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity favors apoptosis. *Kidney Int.* 1999 Dec;56(6):2147-59.
13. Lim SW, Li C, Sun BK, Han KH, Kim WY, Oh YW et al. Long-term treatment with cyclosporine decreases aquaporins and urea transporters in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004 Jul;287(1):F139-51.
14. Liptak P, Ivanyi B. Primer: Histopathology of calcineurin-inhibitor toxicity in renal allografts. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2006 Jul;2(7):398-404.
15. Bennett WM, Norman DJ. Action and toxicity of cyclosporine. *Annu Rev Med.* 1986;37:215-24.
16. Suthanthiran M, Morris RE, Strom TB. Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action. *Am J Kidney Dis.* 1996 Aug;28(2):159-72
17. Levy GA. Long-term immunosuppression and drug interactions. *Liver Transpl.* 2001 Nov;7(11 Suppl 1):S53-9.
18. Maes BD, Lemahieu W, Kuypers D, Evenepoel P, Coosemans W, Pirenne J et al. Differential effect of diarrhea on FK506 versus cyclosporine A trough levels and resultant prevention of allograft rejection in renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2002 Nov;2(10):989-92.

19. Lemahieu W, Maes B, Verbeke K, Rutgeerts P, Geboes K, Vanrenterghem Y. Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein activity and assimilation of tacrolimus in transplant patients with persistent diarrhea *Am J Transplant*. 2005 Jun;5(6):1383-91.
20. Kansu E. İmmünesupresif Ajanların Genel Özellikleri ve Etki Mekanizmaları *Ankem Derg* 2002;16(No.3):194-198.
21. de Jonge H, Kuypers DR. Pharmacogenetics in solid organ transplantation: current status and future directions. *Transplant Rev (Orlando)*. 2008 Jan;22(1):6-20.
22. Duncan N, Craddock C. Optimizing the use of cyclosporin in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006 Aug;38(3):169-74.
23. Zhang C, Zhang J, Yang B, Wu C. Cyclosporin A inhibits the production of IL-17 by memory Th17 cells from healthy individuals and patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 2008 Jun;42(3):345-52.
24. Madan V, Griffiths CE. Systemic ciclosporin and tacrolimus in dermatology. *Dermatol Ther*. 2007 Jul-Aug;20(4):239-50.
25. Donnenfeld E, Pflugfelder SC. Topical ophthalmic cyclosporine: pharmacology and clinical uses. *Surv Ophthalmol*. 2009 May-Jun;54(3):321-38.
26. Czaja AJ. Progress in the diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. *Minerva Med*. 2008 Dec;99(6):549-68.
27. Lo A. Immunosuppression and metabolic syndrome in renal transplant recipients. *Metab Syndr Relat Disord*. 2004 Fall;2(4):263-73.

28. Bozkaya G, Nart A, Uslu A, Onman T, Aykas A, Doğan M et al. Impact of calcineurin inhibitors on bone metabolism in primary kidney transplant patients. *Transplant Proc.* 2008 Jan-Feb;40(1):151-5.
29. Magnasco A, Rossi A, Catarsi P, Gusmano R, Ginevri F, Perfumo F et al. Cyclosporin and organ specific toxicity: clinical aspects, pharmacogenetics and perspectives. *Curr Clin Pharmacol.* 2008 Sep;3(3):166-73
30. Magee CC, Pascual M. Update in renal transplantation. *Arch Intern Med.* 2004 Jul 12;164(13):1373-88.
31. Murray BM, Paller MS, Ferris TF. Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. *Kidney Int.* 1985 Nov;28(5):767-74.
32. Kon V, Sugiura M, Inagami T, Harvie BR, Ichikawa I, Hoover RL. Role of endothelin in cyclosporine-induced glomerular dysfunction. *Kidney Int.* 1990 Jun;37(6):1487-91.
33. Perico N, Dadan J, Remuzzi G. Endothelin mediates the renal vasoconstriction induced by cyclosporine in the rat. *J Am Soc Nephrol.* 1990 Jul;1(1):76-83.
34. Lassila M. Interaction of cyclosporine A and the renin-angiotensin system; new perspectives. *Curr Drug Metab.* 2002 Feb;3(1):61-71.
35. Hortelano S, Castilla M, Torres AM, Tejedor A, Boscá L. Potentiation by nitric oxide of cyclosporin A and FK506-induced apoptosis in renal proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Dec;11(12):2315-23.
36. Diederich D, Skopec J, Diederich A, Dai FX. Cyclosporine produces endothelial dysfunction by increased production of superoxide. *Hypertension.* 1994 Jun;23(6 Pt2):957-61.

37. Rouillet JB, Xue H, McCarron DA, Holcomb S, Bennett WM. Vascular mechanisms of cyclosporin-induced hypertension in the rat. *J Clin Invest.* 1994 May;93(5):2244-50.
38. Elzinga LW, Rosen S, Burdmann EA, Hatton DC, Lindsley J, Bennett WM. The role of renal sympathetic nerves in experimental chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation.* 2000 May;69(10):2149-53.
39. Kopp JB, Klotman PE. Cellular and molecular mechanisms of cyclosporin nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol.* 1990 Aug;1(2):162-79
40. Myers BD, Ross J, Newton L, Luetscher J, Perlroth M. Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N Engl J Med.* 1984 Sep;311(11):699-705.
41. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med.* 2003 Dec;349(24):2326-33.
42. Wolf A, Clemann N, Friauff W, Ryffel B, Cordier A. Role of reactive oxygen formation in the cyclosporin-A-mediated impairment of renal functions. *Transplant Proc.* 1994 Oct;26(5):2902-7.
43. Wang C, Salahudeen AK. Lipid peroxidation accompanies cyclosporine nephrotoxicity: effects of vitamin E. *Kidney Int.* 1995 Mar;47(3):927-34.
44. Wolf G, Killen PD, Neilson EG. Cyclosporin A stimulates transcription and procollagen secretion in tubulointerstitial fibroblasts and proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol.* 1990 Dec;1(6):918-22.
45. Prashar Y, Khanna A, Sehajpal P, Sharma VK, Suthanthiran M. Stimulation of transforming growth factor-beta 1 transcription by cyclosporine.

46. Johnson DW, Saunders HJ, Johnson FJ, Huq SO, Field MJ, Pollock CA. Cyclosporin exerts a direct fibrogenic effect on human tubulointerstitial cells: roles of insulin-like growth factor I, transforming growth factor beta1, and platelet-derived growth factor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999 Apr;289(1):535-42.
47. Slattery C, Campbell E, McMorrow T, Ryan MP. Cyclosporine A-induced renal fibrosis: a role for epithelial-mesenchymal transition. *Am J Pathol.* 2005 Aug;167(2):395-407.
48. Hertig A, Anglicheau D, Verine J, Pallet N, Touzot M, Ancel PY et al. Early epithelial phenotypic changes predict graft fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2008 Aug;19(8):1584-91.
49. Ruster C, Wolf G. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Nov;17(11):2985-91.
50. Lee SK, Park JY, Yu ES, Yang WS, Kim SB, Park SK et al. Individual or combined effects of enalapril and verapamil on chronic cyclosporine nephrotoxicity in rats. *J Korean Med Sci.* 1999 Dec;14(6):653-8
51. Yang CW, Ahn HJ, Kim WY, Li C, Jung JY, Yoon SA et al. Synergistic effects of mycophenolate mofetil and losartan in a model of chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation.* 2003 Feb 15;75(3):309-15.
52. Remuzzi G, Cattaneo D, Perico N. The aggravating mechanisms of aldosterone on kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2008 Aug;19(8):1459-62.
53. Pallet N, Bouvier N, Bendjallah A, Rabant M, Flinois JP, Hertig A et al. Cyclosporine-induced endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death. *Am J Transplant.* 2008 Nov;8(11):2283-96.

54. Han SW, Li C, Ahn KO, Lim SW, Song HG, Jang YS et al. Prolonged endoplasmic reticulum stress induces apoptotic cell death in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *Am J Nephrol.* 2008;28(5):707-14.
55. Klintmalm G, Bohman SO, Sundelin B, Wilczek H. Interstitial fibrosis in renal allografts after 12 to 46 months of cyclosporin treatment: beneficial effect of low doses in early post-transplantation period. *Lancet.* 1984 Oct 27;2(8409):950-4.
56. Oellerich M, Armstrong VW. The role of therapeutic drug monitoring in individualizing immunosuppressive drug therapy: recent developments. *Ther Drug Monit.* 2006 Dec;28(6):720-5.
57. Knight SR, Morris PJ. The clinical benefits of cyclosporine C2-level monitoring: a systematic review. *Transplantation.* 2007 Jun 27;83(12):1525-35.
58. Srinivas TR, Meier-Kriesche HU. Minimizing immunosuppression, an alternative approach to reducing side effects: objectives and interim result. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008 Mar;3 Suppl 2:S101-16.
59. Kasiske BL, Chakkera HA, Louis TA, Ma JZ. A meta-analysis of immunosuppression withdrawal trials in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Oct;11(10):1910-7.
60. Morales JM, Rodriguez-Paternina E, Araque A, Andres A, Hernandez E, Ruilope LM et al. Long-term protective effect of a calcium antagonist on renal function in hypertensive renal transplant patients on cyclosporine therapy: a 5-year prospective randomized study. *Transplant Proc.* 1994 Oct;26(5):2598-9.
61. Kuypers DR, Neumayer HH, Fritsche L, Budde K, Rodicio JL, Vanrenterghem Y; Lacidipine Study Group. Calcium channel blockade and preservation of renal graft function in cyclosporine-treated recipients: a

- prospective randomized placebo-controlled 2-year study. *Transplantation*. 2004 Oct;78(8):1204-11.
62. Campistol JM, Iñigo P, Jimenez W, Lario S, Clesca PH, Oppenheimer F. et al. Losartan decreases plasma levels of TGF- β 1 in transplant patients with chronic allograft nephropathy. *Kidney Int*. 1999 Aug;56(2):714-9.
63. Bobadilla NA, Gamba G. New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Jul;293(1):F2-9.
64. Kasap B, Soylu A, Kuralay F, Sarioglu S, Kiray M, Tuğyan K et al. Protective effect of Epo on oxidative renal injury in rats with cyclosporine nephrotoxicity. *Pediatr Nephrol*. 2008 Nov;23(11):1991-9.
65. Buege A, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52: 302-310.
66. [Sun Y](#), [Oberley](#) , [Li Y](#). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34(3):497-500.
67. [Miranda KM](#), [Espey MG](#), [Wink DA](#). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001;5(1): 62-71.
68. Nast CC, Hirschberg R, Artishevsky A, Adler SG. Misoprostol Partially Inhibits the Renal Scarring of Chronic Cyclosporine Nephrotoxicity. *Am J Ther*. 1995 Nov;2(11):882-885.
69. Chander V, Chopra K. Effect of molsidomine and L-arginine in cyclosporine nephrotoxicity: role of nitric oxide. *Toxicology*. 2005 Feb 28;207(3):463-74.

70. Noguchi N, Nishino K, Niki E. Antioxidant action of the antihypertensive drug, carvedilol, against lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol.* 2000 May;59(9):1069-76.
71. Cargnoni A, Ceconi C, Bernocchi P, Boraso A, Parrinello G, Curello S et al. Reduction of oxidative stress by carvedilol: role in maintenance of ischaemic myocardium viability. *Cardiovasc Res.* 2000 Aug;47(3):556-66.
72. Yue TL, Cheng HY, Lysko PG, McKenna PJ, Feuerstein R, Gu JL et al., Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992 Oct;263(1):92-8.
73. Yue TL, McKenna PJ, Gu JL, Cheng HY, Ruffolo RR Jr, Feuerstein GZ. Carvedilol, a new antihypertensive agent, prevents lipid peroxidation and oxidative injury to endothelial cells. *Hypertension.* 1993 Dec;22(6):922-8.
74. Padi SS, Chopra K. Salvage of cyclosporine A-induced oxidative stress and renal dysfunction by carvedilol. *Nephron.* 2002;92(3):685-92.
75. Bank AJ, Kelly AS, Thelen AM, Kaiser DR, Gonzalez-Campoy JM. Effects of carvedilol versus metoprolol on endothelial function and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Hypertens.* 2007 Jul;20(7):777-83.
76. Fu GS, Huang H, Chen F, Wang HP, Qian LB, Ke XY et al. Carvedilol ameliorates endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2007 Jul;567(3):223-30.
77. Nishioka K, Nakagawa K, Umemura T, Jitsuiki D, Ueda K, Goto C et al. Carvedilol improves endothelium-dependent vasodilation in patients with dilated cardiomyopathy. *Heart.* 2007 Feb;93(2):247-8.

78. Shihab FS, Bennett WM, Isaac J, Yi H, Andoh TF. Nitric oxide modulates vascular endothelial growth factor and receptors in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* 2003 Feb;63(2):522-33.
79. Shihab FS, Yi H, Bennett WM, Andoh TF. Effect of nitric oxide modulation on TGF-beta1 and matrix proteins in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* 2000 Sep;58(3):1174-85.
80. Zhou MS, Schuman IH, Jaimes EA, Raij L. Renoprotection by statins is linked to a decrease in renal oxidative stress, TGF-beta, and fibronectin with concomitant increase in nitric oxide bioavailability. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Jul;295(1):F53-9.
81. Li C, Yang CW, Park JH, Lim SW, Sun BK, Jung JY et al. Pravastatin treatment attenuates interstitial inflammation and fibrosis in a rat model of chronic cyclosporine-induced nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004 Jan;286(1):F46-57.
82. Zhang W, Liu M, Wu Y, Zhu P, Yin C, Zhang W, Gu M. Protective effects of atorvastatin on chronic allograft nephropathy in rats. *J Surg Res.* 2007 Dec;143(2):428-36.
83. Islam M, Burke JF Jr, McGowan TA, Zhu Y, Dunn SR, McCue P et al. Effect of anti-transforming growth factor-beta antibodies in cyclosporine-induced renal dysfunction. *Kidney Int.* 2001 Feb;59(2):498-506.
84. Li C, Lim SW, Sun BK, Choi BS, GLowacka S, Cox A et al. Expression of apoptosis-related factors in chronic cyclosporine nephrotoxicity after cyclosporine withdrawal. *Acta Pharmacol Sin.* 2004 Apr;25(4):401-11.

ÖZET

Siklosporin (CsA) transplantasyon ve otoimmün hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan, immünsupresif bir ajandır. Ancak CsA kullanımı ile sağlanan bu terapötik faydalara rağmen klinik kullanımda hem transplantasyonlu hastalarda hem de diğer grup hastalarda çok sayıda yan etkisi (nefrotoksisite, nörotoksisite, hepatotoksisite, hipertansiyon, dislipidemi, kozmetik sorunlar, malignensi ve kardiyovasküler olaylarda artma) bildirilmiştir. Bu yan etkiler içinde en önemlisi kronik CsA nefrotoksisitesidir. Kronik CsA nefrotoksisitesi böbreğin arteriol, tübülointertisyel doku ve glomerüllerinde oluşan geri dönüşümsüz histolojik hasarlanma ile ilişkilidir. Klinikte bu hasarlanma progresif renal disfonksiyon ile sonuçlanmaktadır. Bazı vakalar son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyebilmektedir. Bu nedenle bu toksisitenin önlenmesi büyük önem taşımaktadır. Kronik CsA nefropatisinin önlenmesinde siklosporinin kesilmesi ve doz azaltılmasının yanında farmakolojik ajanlarda öne sürülmektedir. Bizim bu çalışmada amacımız kronik CsA kullanımının biyokimyasal ve histopatolojik olarak böbrek fonksiyonlarına, renal dokudaki serbest oksijen radikallerine, antioksidan enzimlere, osteopontin ve NO düzeyleri üzerine olan etkilerinin araştırılması ve kronik CsA kullanımında karvedilol ve atorvastatin tedavilerinin ayrı ayrı ve kombine olarak böbrek fonksiyonları üzerine, biyokimyasal ve histopatolojik düzeyde, koruyucu etkilerinin değerlendirilmesi ve bu olası koruyucu etkilerin serbest oksijen radikalleri, antioksidan enzimler, osteopontin ve NO düzeyleri ile ilgisinin araştırılmasıdır.

Çalışmaya 30 adet erişkin 200-250 gram ağırlığında Wistar tipi erkek albino rat alındı. Denekler her grupta 6 rat olmak üzere randomize olarak toplam 5 gruba ayrıldı. Birinci gruptakilere (kontrol grubu) 2 ml serum fizyolojik, 2. gruptakilere

(CsA grubu) 25 mg/kg/gün dozunda CsA, 3. gruptakilere (CsA+Karvedilol grubu) 25 mg/kg/gün dozunda CsA ve 4 mg/kg dozunda karvedilol, 4. gruptakilere (CsA+Atorvastatin grubu) 25 mg/kg/gün dozunda CsA ve 10 mg/kg dozunda atorvastatin, 5. gruptakilere (CsA+Karvedilol+Atorvastatin grubu) 25 mg/kg/gün dozunda CsA, 4 mg/kg dozunda karvedilol, 10.mg/kg dozunda atorvastatin 21 gün boyunca cilt altına uygulandı. Tüm deneklerin serum kan üre azotu (BUN) ve kreatinin düzeyi ölçüldü. Kreatinin klirensleri hesaplandı. Böbrek dokusunda MDA, SOD, NO düzeyleri ölçüldü. Histopatolojik değerlendirme yapıldı. İmmünohistokimyasal yöntemle osteopotin varlığı değerlendirildi.

Sonuçta çalışmamızda karvedilol ve atorvastatin tedavilerinin kronik CsA nefropatisine karşı hem biyokimyasal, hem de histopatolojik düzeyde koruyucu etki gösterdiği görüldü. Bu ajanlar ile renal dokuda proinflamatuvar ve oksidan parametrelerde azalma, ayrıca NO düzeyinde artış izlendi.

Anahtar kelimeler: Siklosporin nefrotoksitesi, Atorvastatin, Karvedilol

ABSTRACT:**Effects of Atorvastatin and Carvedilol on chronic Cyclosporine nephrotoxicity in rats.**

Cyclosporine (CsA) is widely used in the treatment of autoimmune diseases and transplantation, as an immunosuppressive agent. Despite the therapeutic benefit provided by the use of CsA, in clinical usage with the large number transplant and other groups of patients, side-effects (nephrotoxicity, neurotoxicity, hepatotoxicity, hypertension, dyslipidemia, cosmetic problems, malignancy, and an increase in cardiovascular events) also have been reported. The most important of these side effects is chronic CsA nephrotoxicity. Chronic CsA nephrotoxicity is associated with irreversible histological damage in renal arterioles, tubulointerstitial tissue and glomerulus. Clinically, this injury results in progressive renal dysfunction. In some cases, end-stage renal failure can be developed. Therefore, prevention of this toxicity is of great importance. Pharmacological agents have also been proposed in addition to discontinuation of cyclosporine and reducing the dose in order to prevention of chronic CsA nephropathy. Our aim of the study was to evaluate the effects of the chronic usage of CsA on biochemical and histopathological effects on kidney, free oxygen radicals by renal tissue, antioxidant enzymes, osteopontin and NO levels, also to determine the effects of chronic therapy with carvedilol and atorvastatin separately and in combination on biochemical and the histopathologic level renal functions, and to investigate the possible protective effects of these therapies on free oxygen radicals, antioxidant enzymes, osteopontin and NO levels.

30 adult male Wistar albino rats weighing 200-250 grams were included. The subjects were randomized to each group of six rats were divided into 5 groups. The

first group (control group) 2 ml of saline, second group (CsA group) 25 mg/kg/day CsA, third group (CsA + Carvedilol group) 25 mg/kg/day CsA and 4 mg/kg carvedilol, fourth group (CsA + atorvastatin group) 25 mg/kg/day CsA and 10 mg/kg atorvastatin, fifth group (CsA + Carvedilol + atorvastatin group) 25 mg/kg/day CsA, 4 mg/kg carvedilol and 10 mg/kg atorvastatin were received subcutaneously for 21 days. All subjects' serum blood urea nitrogen (BUN) and creatinine levels were measured. Creatinine clearance was calculated. Renal tissue MDA, SOD, NO levels were measured. Histopathologic evaluation was performed. The presence of osteopontin was evaluated by immunohistochemistry.

As a result of our study atorvastatin and carvedilol treatments were found to be protective against biochemical and histopathological alterations seen in chronic CsA nephropathy. These agents also decrease the proinflammatory and oxidant parameters of renal tissue and increased NO level.

Key words: Cyclosporine nephrotoxicity, Atorvastatin, Carvedilol

ÖZGEÇMİŞ:

DR. Koray ULUDAĞ

Doğum Tarihi ve Yeri: 1/KASIM/1976 - KAYSERİ

Medeni Hali: Evli

Adres: Mercimek Sok. NO:48/5 Etlik/ANKARA

Telefon: (0312)3253758- (0505)2429159

Mezuniyetler: Ahmet Baldöktü İlkokulu/ Kayseri

Fatih Ortaokulu / Antalya

Gazi Lisesi/ Antalya

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (1994-2000)

Uzmanlık Eğitimi: Numune Hastanesi İç Hastalıkları

(9/Haziran/2000 - 30/Haziran/2005)

Uzmanlık Tezi: Mide Kanserinde Prognostik Faktörler.

Yabancı Dil: İngilizce (2003 ÜDS)

Mesleki Durum: Şubat 2008 tarihinden itibaren Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Nefroloji Bilim dalında yan dal asistanı olarak görev yapmaktayım

Kurum adresi: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Beşevler Ankara

Kurum telefonu: 03122025229

E-mail adres: kuludag@gmail.com