

Tavşan torasik aortasında Ach gevşeme cevapları üzerine siklosporin A askorbik asit ve alfa tokoferol'ün etkileri[§]

Dr. H. İbrahim KARABACAK*, Dr. Hülagü BARIŞKANER*, Dr. Aytekin KAYMAKÇI**,
Dr. Etem ÖMEROĞLU***, Dr. Ekrem ÇİÇEK****

* S.Ü.T.F. Farmakoloji Anabilim Dalı, **S.Ü.T.F. Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı,
*** S.Ü.T.F. Patoloji Anabilim Dalı, ****S.D.Ü.T.F. Farmakoloji Anabilim Dalı,

OZET

Sunulan bu invitro çalışmada tavşan torasik aortasında asetilkolin (Ach) ile oluşan gevşeme cevapları üzerine Siklosporin A (Cs A), askorbik asit (Vit.C) ve α -tokoferol Vit.E'nin etkileri araştırılmıştır. Ayrıca siklosporin A'nın tavşan karaciğer ve böbreklerinde oluşturduğu histopatolojik değişiklikler üzerine vitamin C ve vitamin E'nin etkilerine bakılmıştır.

Çalışma Cs A uygulanan (n=6), Cs A+ vitamin C+ vitamin E uygulanan (n=8), vitamin E+ vitamin C uygulanan (n=6) ve kontrol grubu (n=6) olmak üzere 4 grupta yapılmıştır. Kontrol grubunun dışındaki diğer gruplara 10 gün süre ile ilaç uygulanmıştır. Tüm deney gruplarında torasik aortalar 3×10^{-5} M noradrenalin (NA) ile kasılarak elde edilen maksimum kasılma cevapları %100 kabul edilmiş ve kümülatif uygulanan Ach (10^{-9} - 10^{-4} M) ile kontrol grubunda %94' lük, Cs A+ vitamin C+ vitamin E verilen grupta %27' lik ve vitamin E+ vitamin C verilen grupta %64' lük bir gevşeme cevabı alınmıştır. Cs A verilen grupta ise Ach' ne gevşeme cevabı alınmamıştır. NA ile elde edilen kasılma cevapları ortama NG - nitro- L- arginin metil ester (L-NAME, 10^{-4} M) ilavesi ile CsA verilen grup dışında diğer gruplarda anlamlı olarak artmıştır ($p < 0.05$). Ayrıca 10^{-4} M L-NAME, Ach ile elde edilen gevşeme cevaplarını tüm gruplarda inhibe etmiştir.

CsA karaciğer ve böbrek dokusunda histopatolojik değişikliklere neden olmuş, vitamin C ve vitamin E ise bu değişikliklere kısmen engel olmuştur. Elde edilen sonuçlar, CsA tavşan torasik aortasında Ach bağlı gevşeme cevaplarını tamamen ortadan kaldırırken, antioksidan etkili olan askorbik asit ve α -tokoferol buna tamamen olmasa da kısmen engel olmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Siklosporin A, α -Tokoferol, Askorbik Asit, Asetilkolin, Noradrenalin, Tavşan Torasik Aortası.

SUMMARY

The effects of cyclosporine A, ascorbic acid and α -tocopherol on vasodilatation responses due to acetylcholine (ACh) in rabbit thoracic aorta

In the present in-vitro study, the effects of Cyclosporin A (Cs A), ascorbic acid (vitamin C) and α -tocopherol (vitamin E) on the acetylcholine (ACh)-induced relaxation responses in the rabbit thoracic aorta were investigated. Also vitamin C and Vitamin E effects, on cyclosporin A- induced effects had been histo-pathological differences in the rabbit liver and kidneys were investigated.

In this study there were four groups: control group (n=6), applied Cs A (n=6), applied Cs A+VitC+VitE (n=8) and applied VitE+VitC (n=6). During ten days, drugs were applied in all groups except the control group. In all experimental groups maximum contractile responses, that were maintained by contracting thoracic aortas with 3×10^{-5} M noradrenaline(NA) were taken as 100%. Relaxation responses in all groups, which were cumulative applied of Ach (10^{-9} - 10^{-4} M), were found as 94 %, 27%, 64% control group, Cs A + vit C + vit E, vit C + vit E groups respectively. Acetylcholine did not cause relaxation response in the applied CsA group. In the presence of L-NAME (NG -nitro-L-arginine methylester) (10^{-4} M), contractile responses due to NA was significantly increased in all groups except applied CsA group ($p < 0.05$). Also inhibition responses due to Ach was inhibited in all groups by L-NAME (10^{-4} M).

CsA induced some histo-pathological differences on the rabbit liver and kidneys. Vitamin C and Vitamin E were partly prevented from these changes. In the rabbit thoracic aorta, cyclosporin A completely interrupted the relaxation responses to Ach and Vit C and Vit E, which have antioxidant effect, partly prevented this effect.

KeyWords: Cyclosporin A, Alpha-tocopherol, Ascorbic acid, Acetylcholine Noradrenaline, rabbit thoracic aorta

Haberleşme Adresi: Uzm. Dr. H. İbrahim Karabacak, S.Ü.T.F. Farmakoloji Anabilim Dalı, KONYA

[§] XIV. Ulusal Farmakoloji Kongresinde sunulmuştur. Kasım 1997 ANTALYA.

GİRİŞ:

Vasküler düz kaslı yapıların mekanik cevapları endotel hücrelerinden salınan endotelin, PGI₂, tromboksan A₂, endotele bağlı hiperpolarize edici faktör (EDHF) ve endotele bağlı gevşetici faktör (EDRF, EDNO) gibi maddeler tarafından regüle edilmektedir. Nitrik oksid (NO) vasküler düz kas hücrelerinde ACh ile oluşan vazodilatasyondan sorumludur (1).

Askorbik asit ve alfa-tokoferol oksidatif ürünlerin endojen düzenlenmesinde önemli olan antioksidan bileşiklerdir (2). Aynı zamanda askorbik asit, NO metabolizmasında önemli modülatör görev yapmaktadır (3).

Siklosporin A, Tolypocladium inflatum mantarının bir metaboliti olup, antifungal ve immünoşüpresif etkisi bulunan bir ilaçtır (4). Organ transplantasyonlarından sonra, uveitis, psöriazis, tip I diabetes mellitus, myastenia gravis (5) ve nefrotik sendrom (6) gibi vakalarda kullanılmaktadır. Bilinen en önemli yan etkileri nefrotoksite ve hepatotoksitesidir (5). Makrofaj kültürlerinde (3), kalp kası hücrelerinde (6) CsA'nın Ca²⁺ bağımlı ATP_{AZ}'i ve NO sentezini inhibe ettiği ve yine aynı şekilde rat aortu düz kas hücrelerinde NO sentezini bozduğu gösterilmiştir (7).

Yapılan bu invitro çalışmada tavşan torasik aortasında ACh ile oluşan gevşeme cevapları üzerine CsA'nın etkileri ve bu etkiler üzerine, askorbik asit ve alfa-tokoferol'ün etkileri araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT:

Bu çalışmada New Zeland türü (1,5-2kg) tavşanlar 4 gruba ayrılarak çalışılmıştır. Birinci gruba, kontrol gruba (n=6) oluşturdu. İkinci gruba (n=6) 10 gün süre ile CsA (25mg/kg/gün/oral). Üçüncü gruba (n=8) CsA (25mg/kg/gün/oral)+ askorbik asit (200mg/kg/gün/IV) + α-tokoferol (100mg/kg/gün/IM) ve son gruba (n=6) askorbik asit (200mg/kg/gün/IV) + α-tokoferol (100mg/kg/gün/IM) verildi. Bu sürenin sonunda tavşanlar boyunlarından kesilerek öldürüldü. Hızlı bir şekilde göğüs kafesi ve karın boşluğu açılarak torakal aortası, böbrekleri ve karaciğerleri çıkartıldı. Torakal aorta normal krebs solüsyonunda muhafaza edi-

lirken, böbrek ve karaciğer dokularından alınan parçalarda Cs A'nın yapmış olduğu histo-patolojik hasarın derecesini belirlemek ve antioksidan etkili olan vit.C ve vit.E'nin bu hasar üzerine etkisi olup olmadığını göstermek için patoloji kliniğine gönderildi.

Torakal Aortanın Hazırlanması; Normal krebs solüsyonu içindeki torakal aorta petri kutusuna alınarak çevre dokulardan temizlendi ve 3 mm kalınlığında ring şeklinde preparatlar hazırlandı. Hazırlanan preparatlar %95 O₂ ve %5 CO₂ ile gazlandırılan 25 ml'lik organ banyolarına 1g gerilim uygulanarak asıldı. İki saatlik dinlenme periyodunu takiben 3x10⁻⁵ M NA ile dokular kasıldı. Maksimum cevabın kararlı duruma ulaştığı noktada kümülatif konsantrasyonda ACh (10⁻⁹-10⁻⁴ M) uygulandı. Uygulama tamamlandıktan sonra dokular yıkandı, 1 saat dinlendirildi ve ortama 10⁻⁴ M L-NAME (NO sentez inhibitörü) ilave edilip, 20 dakikalık inkübasyondan sonra NA (3x10⁻⁵) ile tekrar kasılıp maksimum kasılmanın elde edildiği noktada kümülatif olarak Ach (10⁻⁹-10⁻⁴ M) tekrar verildi. Bu işlemler tüm gruplar için tekrar edildi. Çalışmada kullanılan Krebs-Henseleit solüsyonunun içeriği mM olarak şöyledir; NaCl 119.0, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.5, NaHCO₃ 25, glukoz 11.0. Kullanılan ilaçlar; Siklosporin A (Sandoz), askorbik asit (Roche), α-tokoferol (Roche), NA (Sigma), ACh (Sigma) ve L-NAME (Sigma) temin edilmiştir.

Çalışmada elde edilen değerler ortalama ± standart hata şeklinde verilmiş olup, gruplar arası karşılaştırma için varyans analizi (tek yönlü ANOVA) ve posthoc Tukey HSD testlerinden yararlanılmıştır. p Değerinin 0.05' den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR:

1-Histopatolojik Bulgular

2-Farmakolojik Bulgular

1-Histopatolojik Bulgular:

Böbreklerde sadece Cs A verilen grupta, glomerüller yumakta sellüler proliferasyon, tübülüs lümenlerinde kistik genişlemeler izlendi. Ayrıca damar yapılarının çoğunda konjesyon ve in-

tersisyumda bağ dokusu artışı gözlemlendi. Karaciğerde ise, periportal mesafelerde bağ dokusu artışı ile beraber parankim hücrelerinde hidropik dejenerasyon izlendi. Cs A ile birlikte vitamin (askorbik asit + α -tokoferol) verilen grupta, böbreklerde glomerüller yumakta hafif sellülerite artışı, tubulus epitellerinde yer yer hidropik dejenerasyonlar, damar yapılarında hafif konjesyon ve intersisyumda hafif bağ dokusu artışı izlendi. Karaciğerde ise, periportal mesafelerde hafif bağ dokusu artışı ve parankim hücrelerinde yer yer hidropik dejenerasyon gözlemlendi. Sadece vitamin (askorbik asit + α -tokoferol) verilen grupta ise, böbrek glomerüllerinde eritrosit artışı ve damar yapılarında hafif konjesyon izlendi. Tubulus epitellerinde herhangi bir patoloji gözlemlenmedi. Karaciğerde parankim hücrelerinde minimal düzeyde hidropik dejenerasyon mevcutken, periportal mesafelerde patoloji izlenmedi. Kontrol grubunda ise böbrek ve karaciğer dokularında herhangi bir histopatolojik özellik izlenmedi.

2-Farmakolojik Bulgular:

Tüm deney gruplarında tavşan torasik aortasında, NA ile elde edilen maksimum kasılma cevabı %100 kabul edilerek, kümülatif uygulanan ACh ile elde edilen gevşeme cevapları, kontrol grubunda %94, askorbik asit + α -tokoferol verilen grupta %64 ve siklosporin A + askorbik asit + α -tokoferol verilen grupta ise %27 olarak bulunmuştur. Buna karşın siklosporin A verilen grupta ise ACh ile gevşeme cevabı alınmamıştır (Şekil 1). Cs A verilen gruptaki cevap ile Cs A + vit E + vit C verilen grubun arasındaki gevşeme cevapları ve Cs A verilen grup ile kontrol grubu arasındaki gevşeme cevapları anlamlı olarak farklı bulundu ($p<0.05$).

Tablo 1. Tavşan torasik aortasında Noradrenalin (NA) 3×10^{-5} M ile oluşan kasılma cevaplarının ortama N-G-nitro-L- arginin metil ester (L-NAME) 10^{-4} M ilavesiyle oluşan % değişimi

Gruplar	NA	Ach	NA+L-NAME
Kontrol	100	94 \pm 3.9	129 \pm 6
CsA	100	0	100 \pm 0
CsA+VitE+VitC	100	27 \pm 4.4	136 \pm 7
VitE+VitC	100	64 \pm 5.4	154 \pm 18

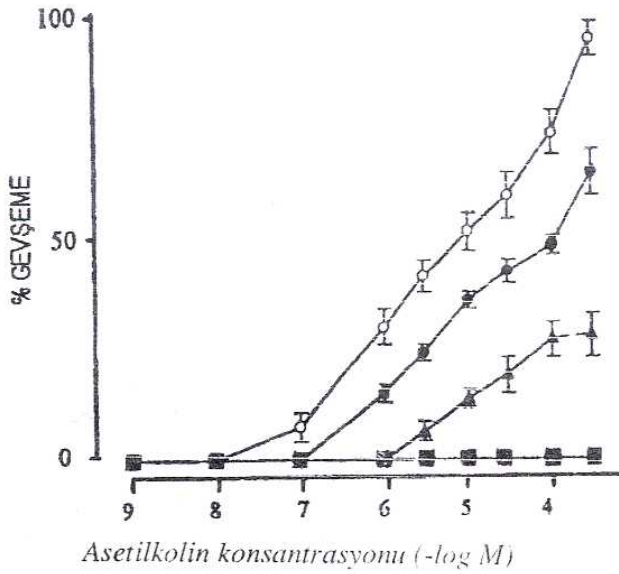
Tavşan torasik aortasında endotelinin zarar görüp, görmediğini anlamak için NO sentez inhibitörü olan L-NAME ortama ilave edildiğinde Cs A verilen grupta artış gözlemlenmedi. Cs A + vit E + vit E verilen grupta ise Cs A verilen gruptaki cevaptan anlamlı olarak farklı bulundu ($p<0.05$). Kontrol grubu ile vit C + vit E verilen grup arasındaki cevapların farklı olmadığı bulundu ($p>0.05$) (Tablo 1). Bununla beraber ACh gevşemeleri de L-NAME ile tamamen inhibe olmuştur.

TARTIŞMA

Tavşan torasik aortasında ACh, gevşeme cevapları üzerine CsA, askorbik asit ve α -tokoferol'ün etkilerini araştırmak amacı ile yapılan bu in vitro çalışmada, CsA tavşan torasik aortasında ACh'ne bağlı gevşeme cevaplarını tamamen ortadan kaldırırken, antioksidan etkili olan (α -tokoferol ve askorbik asit kısmen bu etkiye engel olmaktadır. Aynı şekilde bu antioksidan ajanlar CsA'nın tavşan, karaciğer ve böbrek dokusunda meydana getirdiği histopatolojik değişiklikleri de olumlu yönde etkilemişlerdir.

Bilindiği üzere NO yaygın olarak endotelde L-arginin' den sentezlenmekte ve salınmaktadır. Fizyolojik olarak kan akımının düzenlenmesinde önemli rol alır (8,9). ACh endotele bağlı mekanizmalarla düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyon ve damarlarda gevşetici etkiler oluşturur (1). Ragazzi ve ark. (10) tavşan aortasında CsA uygulaması sonucunda ACh' le oluşan gevşeme cevaplarında azalma olduğunu göstermişlerdir. Rat aortasında yapılan bir başka çalışmada ise CsA' nın nitrik oksid sentezini olumsuz yönde etkilediği tesbit edilmiştir (9). Rat femoral arterinde CsA' nın endoteli etkileyerek ACh' ne bağlı gevşeme cevaplarını anlamlı olarak azalttığı ve ortama ilave L-arginin ile gevşeme cevaplarındaki bu azalmanın ortadan kalktığı görülmüştür (11). Bizim de bu çalışmada bulduğumuz gibi CsA, endoteli zedelemesi sonucu ACh' e bağlı gevşeme cevaplarını inhibe etmektedir.

Askorbik asit ve alfa-tokoferol bilinen en etkili antioksidan ajanlardır (2,12). Kasiba ve ark (13) askorbik asidin NO metabolizmasında önemli modülatör olabileceğini bildirmişlerdir. Rat beyininde sinapslarda peroksinitritle oluşan hasarların



Şekil 1. Tavşan torasik aortasında noradrenalin (3×10^{-5}) M ile oluşan kasılma cevapları üzerine asetilkolinin gevşetici etkisi. Kontrol (o), Vitamin E+Vitamin C (●), Siklosporin A+Vitamin E+Vitamin C (▲), Siklosporin A (■)

önlenmesinde antioksidan etkili olan askorbik asit ve alfa-tokoferol' ün önemli rolünün olduğunu tesbit edilmiştir (14). Süperoksit anyonlarından olan carboxy-PTIO (phenyl tetramethylimidazolin oxide)' le yapılan fare anococcygeus kasındaki çalışmada nitrik okside bağlı gevşeme cevaplarını inhibe ettiğini ve bu etkisinin askorbik asit ve alfa-tokoferol tarafından azaltıldığı gösterilmiştir (15). Bizde yukarıdaki çalışmalara paralel olarak askorbik asit ve alfa-tokoferol' ün CsA' nın damar endotelini zedelemesi sonucu ACh ile oluşan gevşeme cevaplarını inhibe edici etkisini azalttığını bulduk. Bu etkisinde NO modülatörü olması ve oksidatif ürünlerin endojen düzenlenmesinde rol oynamasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda CsA' nın böbrekler üzerine yapmış

olduğu histopatolojik değişiklikleri Falkenhain ve ark (16) insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, renal arteriollerde hyalinizasyon, intertisyumda bağ dokusu artışı, glomerüllerde skleroz geliştiğini gözlemişlerdir. Griffiths ve ark (17) ise CsA uyguladıkları hastalardan aldıkları böbrek biopsisi sonucu, glomerüllerde ve vasküler yatakta trombotik mikroangiopati, yer yer segmental glomerülosklerozis ve glomerüler iskemi geliştiğini göstermişlerdir. Bir başka çalışmada (18) ise CsA verilen kişilerden alınan iğne biopsisi sonucu böbreklerde interstitial alanlarda fibrozis ve tubüler atrofi geliştiği bununla beraber karaciğer dokusunda parankimal alanda da fibrozis oluştuğunu gösterilmiştir (18). Belirtilen çalışmalardan elde edilen sonuçlar bizim elde ettiğimiz CsA' nın oluşturduğu histopatolojik değişikliklerle benzerlik göstermektedir. Literatürde Cs A' nın yapmış olduğu karaciğer ve böbrek dokularındaki histopatolojik değişiklikler üzerine vit E ve vit C' nin etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamıştır. Bizim elde ettiğimiz histopatolojik değerlendirmeler doğrultusunda antioksidan etkili vit C ve vit E' nin bu değişiklikler üzerine tam olmamakla beraber kısmen olumlu yönde etkisi olduğunu bulduk. Bu olumlu etkinin nedeninin vit E ve vit C' nin hücrelerde oluşan zararlı süperoksit ve peroksinitrit gibi anyonları regüle etmesinden dolayı olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Sonuç olarak, CsA tavşan torasik aortasında ACh' e bağlı gevşeme cevaplarını inhibe ederken, antioksidan etkili olan α -tokoferol ve askorbik asit buna kısmen engel olmaktadır. Ayrıca yine bu iki ajanın CsA' nın nefrotoksitite ve hepatotoksitesine karşı olumlu etkilerinin olduğu söylenebilir. Ancak bu etkinin daha ileri araştırmalarla desteklenmesi gereklidir.

KAYNAKLAR

- 1- Christopher J, Garland Grant McPherson. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. Br. J. Pharmacol. 1992;105:429-435.
- 2- Vera R, Peter M, Geoffery B. Effects of chronic vitamin E deficiency on vascular function a study of sympathetic nerves smooth muscle and endothelium of the mesenteric arterial bed of the rat. Br. J. Pharmacol 1995;116:2983-2988.
- 3- Conde M, Andrade J, Bedoya FJ, Santa-maria C, Sebrino F. Inhibitory effect of cyclosporin A and FK 506 on nitric oxide production by cultured macrophages evidence of a direct effect on nitric oxide synthase activity. Immunology 1995; 84: 476-81.
- 4- Burkart V, Gross Elck A, Bellmann K, Rodons J, Kolb H. Suppression of nitric oxide toxicity in islet cells by alpha tocoferol. FEBS-lett. 1995; 364:259-63.

- 5- Shindo T, Ikeda U, Ohkawa F, Kawahara Y, Yokayama M. Nitric oxide synthesis in cardiac myocytes and fibroblasts by inflammatory cytokines. *Cardiovasc. Res.* 1995; 29:813-9.
- 6- Hutcheson AE, Rao MR, Olinde KD, Markov AK. Myocardial toxicity of cyclosporin A inhibition of calcium AT-Pase and nitric oxide synthase activities and attenuation by fructose 1-6-diphosphate in vitro. *Res. Com. Pathol-Parmacol.* 1995; 89:17-26.
- 7- Marumo T, Nakaki T, Hishikawa K, Suzuki H, Kato R, Saruta T. Cyclosporin A inhibits nitric oxide synthase induction in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1995; 25:764-8.
- 8- Dusting GJ, Macdonald PS. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. *Ann-Med.* 1995; 27:395-406.
- 9- Dustig GJ. Nitric oxide in cardiovascular disorders. *J. Vasc. Res.* 1995; 32:143-6.
- 10-Ragazzi E, Meggiato C, Chinellato A, Haliano G, Pagano F, Calabra A. Chronic treatment with cyclosporin A in New Zealand rabbit aortic and erectile tissue. alterations. *Urol. Res.* 1996; 24:6, 323-8.
- 11-Gallego MJ, Lopez Farre A, Riesco A, Manton M, Grandes SM, Barat A, Hernando L, Casoda S. Blockade of endothelium-dependent responses in conscious rats by cyclosporin A effect of L-arginine. *Am. J. Physiol.* 1993; 264:708-14.
- 12-Halliwell B, Hu ML, Louie S, Duvall TR, Tarkington BK, Cross CE. Interaction of nitrogen dioxide with human plasma antioxidant depletion and oxidative damage. *FEBS lett* 1992; 313:62-6.
- 13-Kashiba M, Yamaguchi M, Inoue M. Role of ascorbic acid in the metabolism of S-nitroso-glutathione. *FEBS-lett.* 1996; 389:149-52.
- 14- Vatossery GT. Oxidation of vitamin E, vitamin C and thials in rat brain synaptosomes by peroxynitrite. *Biochem-Pharmacol.* 1996; 52:579-86.
- 15- Elliot Lilley, Alan Gibson. Antioxidant protection of NO-induced relaxations of the mouse anococcygeus against inhibition by superoxide anions hydroquinone and carboxy PTIO. *Br. J. Pharmacol.* 1996 ; 119:432-438.
- 16-Falkenhain ME, Casio FG, Sedmak DD. Progressive histologic injury in kidneys from heart and liver transplant recipients receiving cyclosporine. *Transplantation.* 1996; 62:364-70.
- 17-Griffiths MH, Crowe AV, Papadoki L, Banner NR, Yacoub MH, Tompson FD, Neild GH. Cyclosporine nephrotoxicity in heart and lung transplant patients. *Q.J.M.* 1996; 89:751-763.
- 18-Gregory MJ, Smoyer WE, Sedman A, Kershaw DB, Valentini RP, Johnson K. Long-term cyclosporine therapy for pediatric nephrotic syndrome a clinical and histologic analysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1996; 7:543-549