

2m11. 266 2.2

Université de Montréal

EFFETS DE LA CYCLOSPORINE A SUR LA RÉACTIVITÉ DE LA VEINE
SAPHÈNE CHEZ LE CHIEN

par

Marc-Antoine Despatis
Département de chirurgie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc)
en sciences biomédicales

juin, 1998

© Marc-Antoine Despatis, 1998



w

4

058

1999

V.010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:
Effets de la cyclosporine A sur la réactivité
de la veine saphène chez le chien

présenté par:
Marc-Antoine Despatis

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

*Claude Chartrand
Michel Carmen
Raymond Carmen
Louis Perreault*

Mémoire accepté le:

24. 11. 1998

SOMMAIRE

Définition du problème étudié

Grâce à ses propriétés d'agent immunosuppresseur, la cyclosporine s'est taillée une place importante en transplantation d'organes solides (2, 5). Toutefois, la cyclosporine est responsable d'effets secondaires sérieux tels que l'hypertension artérielle, l'insuffisance rénale, les complications thromboemboliques et la dysfonction hépatique. Vanrenterghem et al.(111) décrivent des complications thromboemboliques chez les transplantés rénaux traités avec la cyclosporine comparés à un groupe historique recevant de l'azathioprine et des stéroïdes. Kroshus et al. (143) décrivent l'incidence élevée de thrombose veineuse profonde et d'embolie pulmonaire, respectivement de 12% et 6% après la transplantation pulmonaire. Plusieurs auteurs ont bien décrit in vivo et in vitro les effets vasoactifs de la cyclosporine. In vivo, la cyclosporine provoque une vasoconstriction des vaisseaux artériels périphériques par la stimulation des récepteurs alpha-adrénergiques et du système nerveux sympathique (107). In vitro, des études ont démontré les effets de vasoconstriction de la cyclosporine directement sur le muscle lisse vasculaire (32, 121). Certains auteurs ont aussi mis en cause le véhicule de la

cyclosporine, le cremophore. Ce dernier induirait une vasoconstriction artérielle périphérique et rénale (108, 109, 110, 122, 123).

Objectif de l'étude et méthodes utilisées

Le but de la présente étude a été d'évaluer les effets vasoactifs de la cyclosporine et de son véhicule le cremophore sur la veine saphène chez le chien dans deux modèles expérimentaux l'un in vivo et l'autre in vitro.

In vivo, nous avons utilisé un modèle de perfusion isolé de la veine saphène où une pompe occlusive à débit constant véhicule le sang de l'artère fémorale droite à la veine saphène gauche. Les variations de la pression de perfusion induites par les injections de norépinéphrine et de cyclosporine ont été enregistrées de façon continue. Des doses de 5, 10 et 20 mg de cyclosporine n'ont pas induit de changements significatifs de la pression de perfusion de la veine saphène. Une brève perfusion de cyclosporine n'a pas entraîné de variation significative de la pression de perfusion veineuse. Par contre, lorsque perfusée sur une période de 60 minutes, la cyclosporine a induit une variation significative de la pression de perfusion ($p < 0.0001$). Après la perfusion de cyclosporine, la norépinéphrine a induit une augmentation significative de la pression de perfusion moyenne ($p = 0.03$). La

sympathectomie lombaire chirurgicale est venue abolir les effets de la cyclosporine ($p= 0.02$) et la potentialisation de la norépinéphrine par la cyclosporine ($p= 0.64$).

In vitro, des anneaux de veines saphènes ont été suspendus entre deux étriers dans la chambre tissulaire contenant une solution de Krebs Ringer. Ils ont été reliés à un capteur de tension afin de mesurer la tension isométrique. La cyclosporine et son véhicule, le cremophore, ont été ajoutés aux bains à des concentrations croissantes de 10^{-9} à 10^{-4} M. L'expérience a été répétée en présence d'un bloqueur de la cyclo-oxygénase, l'indométhacine. À dose croissante, la cyclosporine a induit une vasoconstriction significative de la veine saphène ($p < 0.0001$): Cette vasoconstriction n'est pas dépendante de l'endothélium. Le véhicule de la cyclosporine, le cremophore à dose croissante a aussi induit une vasoconstriction significative de la veine saphène ($p < 0.0001$). Sans l'endothélium, la cyclosporine a induit une vasoconstriction plus importante que le cremophore. (Max: 207 ± 22 vs 162 ± 10 ; CE $4,9 \pm 0,4$ vs $4,3 \pm 0,1$). L'ajout aux bains tissulaires d'indométhacine diminue l'effet vasoactif de la cyclosporine et du cremophore.

Conclusion

In vivo, la cyclosporine diluée dans le plasma de l'animal induit une vénoconstriction périphérique chez le chien. Cette vénoconstriction est secondaire à la stimulation du système nerveux sympathique. La cyclosporine potentialise les effets vasoconstricteurs de la norépinéphrine sur la veine saphène. In vitro, la cyclosporine vasoconstricte la veine saphène grâce à son action directe sur le muscle lisse et grâce aux effets vasoconstricteurs de son véhicule, le cremophore. Puisqu'une partie de la vasoconstriction est inhibée par l'ajout de l'indométhacine, nous proposons la présence d'un prostanoïde vasoconstricteur dans le bain tissulaire. Ce dernier pourrait être libéré par le cremophore. L'endothélium agit comme modulateur dans ce modèle via la relâche des EDRFs.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-----|
| SOMMAIRE..... | iii |
| LISTE DES TABLEAUX..... | x |
| LISTE DES FIGURES..... | xi |
| | |
| 1. INTRODUCTION..... | 1 |
| | |
| 2. ÉTAT ACTUEL DES CONNAISSANCES..... | 3 |
| | |
| 2.1 La cyclosporine..... | 4 |
| 2.11 Pharmacologie..... | 4 |
| 2.12 Indications thérapeutiques..... | 6 |
| 2.13 Les effets secondaires..... | 7 |
| | |
| 2.2 Les effets de la cyclosporine sur la réponse vasculaire artérielle..... | 10 |
| 2.3 La cyclosporine et la réponse vasculaire rénale..... | 18 |
| 2.4 La cyclosporine et le système rénine angiotensine..... | 21 |
| 2.5 La cyclosporine et les prostaglandines thromboxanes..... | 22 |
| 2.6 La cyclosporine et l'endothéline..... | 22 |
| 2.7 Le système veineux périphérique..... | 23 |
| 2.7.1 Effet de la température locale sur la réactivité de la veine saphène.... | 29 |
| 2.7.2 Influence de barorécepteurs et chémorécepteurs sur le système veineux..... | 31 |

| | |
|---|----|
| 3. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE..... | 33 |
| 4. STRATÉGIE DE RECHERCHE..... | 35 |
| 5. MATÉRIEL ET MÉTHODES..... | 37 |
| 5.1 Protocole d'étude de la veine saphène chez le chien..... | 38 |
| 5.2 Préparation des médicaments..... | 44 |
| 5.3 Médicaments..... | 45 |
| 5.4 Calculs et analyses statistiques..... | 46 |
| 6. RÉSULTATS..... | 48 |
| 6.1 Expérience in vivo..... | 49 |
| 6.1.1 Effet dose dépendant de la cyclosporine..... | 49 |
| 6.1.2 Effet d'une brève perfusion de cyclosporine..... | 50 |
| 6.1.3 Effet d'une perfusion prolongée de cyclosporine..... | 51 |
| 6.1.4 Effet de la cyclosporine après sympathectomie lombaire..... | 52 |
| 6.2 Expérience in vitro..... | 53 |
| 6.2.1 Effet de la cyclosporine sur la veine saphène avec et sans endothélium | 53 |
| 6.2.2 Effet du crémosphore sur la veine saphène avec et sans endothélium... | 53 |
| 6.2.3 Effet de l'indométhacine sur la réactivité de la veine saphène à la cyclosporine et au cremophore..... | 54 |

| | |
|-----------------------|----|
| 7. DISCUSSION..... | 55 |
| 8. CONCLUSION..... | 69 |
| 9. BIBLIOGRAPHIE..... | 87 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau I. Température centrale de l'animal et température de l'infusé aux cours des expériences..... | 82 |
| Tableau II. Valeurs du pH, de la PO ₂ , et de la PCO ₂ aux cours des expériences... | 82 |
| Tableau III. Effet de la perfusion de 5mg, 10mg et 20mg de cyclosporine sur la pression veineuse centrale, la pression artérielle moyenne et la pression de perfusion veineuse..... | 83 |
| Tableau IV. Effet de la norépinéphrine sur la pression de perfusion avant et après une courte perfusion de cyclosporine..... | 84 |
| Tableau V. Effet de la norépinéphrine sur la pression de perfusion avant et après une perfusion prolongée de cyclosporine..... | 85 |
| Tableau VI. Mesure de la contraction maximale obtenue lorsque les veines saphènes du chien sont exposées à la cyclosporine et au cremophore avec et sans endothélium et avec et sans indométhacine..... | 86 |
| Tableau VII. Mesure de CE ₅₀ (-logM) obtenue lorsque les veines saphènes du chien sont exposées à la cyclosporine et au cremophore avec et sans endothélium et avec et sans indométhacine..... | 86 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1. Schéma du montage in vitro; chambre tissulaire pour l'étude isolée des vaisseaux sanguins. | 71 |
| Figure 2. Schéma du modèle expérimental in vivo. Perfusion isolée de la veine saphène chez le chien. | 72 |
| Figure 3. Effet de la perfusion de bolus de 5mg, 10mg et 20 mg de cyclosporine sur la pression de perfusion de la veine saphène. | 73 |
| Figure 4. Effet de 12µg de norépinéphrine sur la réactivité de la veine saphène avant et après la perfusion de 5mg, 10mg et 20mg de cyclosporine..... | 74 |
| Figure 5. Variation de la pression veineuse centrale, de la pression de perfusion et de la pression artérielle au cours d'une brève perfusion de 20mg de cyclosporine at au cours de l'expérience..... | 75 |
| Figure 6. Effet de la perfusion prolongée de 30 mg de cyclosporine sur une période de 60 minutes sur la pression de perfusion de la veine saphène chez des chiens sympathectomisés et non sympathectomisés..... | 76 |
| Figure 7. Effet de la cyclosporine sur la veine saphène avec et sans endothélium..... | 77 |
| Figure 8. Effet de la cyclosporine et du cremophore sur la veine saphène canine en présence de l'endothélium..... | 78 |
| Figure 9. Effet de la cyclosporine et du cremophore sur la veine saphène canine sans endothélium..... | 79 |

Figure 10. Effet de la cyclosporine et du cremophore sur la veine saphène canine sans endothélium en présence d'indométhacine..... 80

Figure 11. Effet de la cyclosporine et du cremophore sur la veine saphène canine avec endothélium en présence d'indométhacine.....81

1. INTRODUCTION

La cyclosporine, grâce à ses propriétés d'immunosuppresseur, joue un rôle important dans le domaine de la transplantation et du traitement de certaines maladies autoimmunes (2,5,7).

La cyclosporine inhibe l'activation de la cascade responsable de la fonction immunitaire. Elle prévient la libération, la production et l'action des lymphokines telles que l'Interleukine 2 et l'interferon (2, 6, 124, 125). Les effets secondaires de la cyclosporine sont multiples. Parmi les plus significatifs cliniquement, on identifie l'insuffisance rénale (49, 10,12,13), l'hypertension artérielle (11,14, 17, 18, 24,27, 31), la dysfonction hépatique (9), l'intolérance au glucose (4), les complications thromboemboliques (111, 143), les désordres du système nerveux central (7) et les effets de vasoconstrictions systémiques et rénaux (14,20,21,29,46).

Alors que les effets vasculaires artériels de la cyclosporine ont été étudiés en détails, les effets veineux périphériques de cet immunosuppresseur n'ont pas été investigués. Chez les patients qui reçoivent de la cyclosporine, l'augmentation des évènements cliniques thromboemboliques (111,143) aura motivé notre intérêt à investiguer et à comprendre les effets veineux périphériques de la cyclosporine.

2. ÉTAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

2.1 LA CYCLOSPORINE

2.1.1 Pharmacologie

Découverte par Borel en 1972 (1), la cyclosporine est un polypeptide cyclique lipophile (poids moléculaire 1203) extrait du champignon *Tolypocladium Inflatum* (2). Les acides aminés en positions 11, 1, 2, et 3 forment un site immunosuppresseur hydrophile (2). Stable dans l'huile de castor oxyéthylée ou cremophore et dans l'huile d'olive, cette molécule peut être administrée soit par voie intraveineuse ou soit par voie orale.

L'absorption digestive de la cyclosporine est souvent incomplète avec une variation allant de 2 à 90% de la dose administrée. L'explication physiologique de cette variabilité interindividuelle demeure incertaine mais plusieurs facteurs contributifs ont été identifiés tel que la composition de la bile, la flore intestinale, la densité des récepteurs postulés à la surface des cellules intestinales et la proportion relative du transport s'effectuant via les lymphocytes et les veines (3, 124, 127). La cyclosporine est séparée de son véhicule hydrophobe via l'action des sécrétions digestives. Ces dernières jouent un rôle important dans l'absorption de la

cyclosporine dans un environnement hydrophile. Cependant leur efficacité est très variable d'un individu à l'autre (3) .

60% de la cyclosporine en circulation sanguine se trouve dans les érythrocytes, 10% se lie aux lymphocytes et le reste est transportée par les lipoprotéines HDL et LDL du plasma (4, 128). La cyclosporine s'accumule particulièrement dans les tissus riches en graisse mais aussi dans le foie, les reins ainsi que dans les glandes endocrines.

La cyclosporine est métabolisée dans le foie via l'action des cytochromes p-450 et est ensuite excrétée dans la bile. Les métabolites intermédiaires de la cyclosporine possèdent une action immunosuppressive moindre que la molécule d'origine. Ces derniers sont en partie responsable de la variabilité interindividuelle quand à la toxicité de la cyclosporine. L'élimination urinaire est minime; soit moins de 0.1% de la dose administrée (3) .

L'absorption, le volume de distribution et le métabolisme de la cyclosporine varient beaucoup d'un individu à l'autre. Ainsi un suivi adéquat des concentrations de cyclosporine permet d'ajuster les doses afin d'obtenir une immunosuppression plus précise associée à une toxicité minimale (38, 131, 132).

2.1.2 Indications Thérapeutiques

Grâce à ses propriétés d'agent immunosuppresseur, la cyclosporine s'est taillée une place importante au cours des dix dernières années dans plusieurs types de traitements immunosuppresseurs (117). Elle a permis non seulement d'augmenter la survie des greffons de 10 à 15 % lors de la transplantation d'organes solides (5) mais aussi de diminuer les périodes d'hospitalisation et de réduire le nombre de réadmission hospitalière chez les greffés (2).

La cyclosporine s'attaque au système immunitaire en inhibant l'activation de la cascade responsable des fonctions immunitaires spécifiques telles que la libération et la production des lymphokines comme l'interleukine II et l'interféron (2, 6, 124, 125).

Aux concentrations sériques de 1 à 100 nmol/l la cyclosporine exerce des effets immunosuppresseurs sur les cellules T; à 1 $\mu\text{mol/l}$, elle induit une paralysie des fonctions lymphocytaires et elle bloque l'action des cellules qui présentent l'antigène (macrophages). Une telle concentration de cyclosporine dans le sang est atteinte immédiatement après une infusion intraveineuse. La cyclosporine altère la fonction cellulaire lorsque la concentration sérique atteint 3 $\mu\text{mol/l}$. Des niveaux sanguins de

plus de 10 $\mu\text{mol/l}$ provoquent des changements morphologiques et cytotoxiques irréversibles (1).

La cyclosporine est aussi utilisée dans le traitement de plusieurs maladies auto-immunes dont les uvéites, les néphropathies, l'arthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux. Ses effets thérapeutiques sont discutés dans plusieurs autres pathologies dermatologiques, hématologiques et gastro-entérologiques (7, 129, 130). Les effets antiparasitaires et antifongiques de la cyclosporine ont déjà été étudiés (21).

2.1.3 La cyclosporine et ses effets secondaires

Les effets secondaires de la cyclosporine sont multiples: la dysfonction hépatique, l'insuffisance rénale, les événements thromboemboliques, la néphrotoxicité, l'hypertension, les tremblements, l'hirsutisme et l'hypertrophie gingivale (9, 10, 11, 12, 111-115, 117-120, 126).

Le cremophore, véhicule de transport de la cyclosporine, est aussi responsable d'effets secondaires tel que la néphrotoxicité (108, 110), la vasoconstriction rénale (108, 110, 116) et la vasoconstriction veineuse (123).

De nombreuses études cliniques (11,13, 14, 15, 16, 17, 18, 31, 134, 139) et expérimentales (19, 20, 21, 40, 57, 135, 136) ont rapporté une augmentation de la pression artérielle suite à l'administration aiguë ou prolongée de la cyclosporine.

Chez les greffés rénaux, la cyclosporine est un des facteurs responsables de l'hypertension artérielle et de l'atteinte de la fonction rénale (10, 15, 18, 22, 23, 24, 25, 131, 137). D'autres facteurs étiologiques ont aussi été incriminés chez ce groupe de patients; par exemple la fonction de l'allogreffe, la source de l'allogreffe (moins d'hypertension chez le donneur dans la famille vs un donneur cadavérique) ainsi que la présence d'un rein non fonctionnel chez le receveur. Après la transplantation rénale et cardiaque, les stéroïdes sont tenus responsables de l'hypertension artérielle. Plusieurs études ont démontré que les stéroïdes peuvent contribuer au développement et à la gravité de l'hypertension mais ils ne constituent pas le principal facteur étiologique (20). Les effets hypertenseurs et néphrotoxiques de la cyclosporine ont été étudiés chez des greffés cardiaques (25, 141).

Avant l'introduction de la cyclosporine, moins de 20% des transplantés cardiaques développaient une hypertension artérielle (26). Aujourd'hui, alors que la majorité des greffés cardiaques reçoivent de la cyclosporine de 30 à 90% d'entre eux deviennent hypertendus et nécessitent une médication antihypertensive (27).

Scherrer et al. (14) ont démontré que les patients traités avec de la cyclosporine présentent une pression artérielle significativement plus élevée que les patients des groupes contrôles. Au cours des mois suivant la transplantation cardiaque, Olivari et al (11) ont observé une augmentation progressive de la tension artérielle autant chez les patients traités avec la triple immunothérapie (cyclosporine, azathioprine et prednisone) que chez les greffés traités avec de la prednisone et des doses plus élevées de cyclosporine. Des concentrations sériques plus élevées de cyclosporine et une créatinine sérique plus élevée ont été mesurées dans le groupe prednisone/cyclosporine. Par ailleurs, les deux groupes ont manifesté le même degré d'hypertension. Les auteurs n'ont pu établir de corrélation entre la sévérité de l'insuffisance rénale et le niveau d'hypertension observé.

L'hypertension artérielle associée à la prise de cyclosporine a été rapportée chez plusieurs groupes de patients greffés (11, 14, 15, 18) (coeur-poumons, hépatiques et moëlle osseuse) et également chez des groupe de patients non greffés (maladies auto-immunes ou inflammatoires) (7, 27).

2.2 LES EFFETS DE LA CYCLOSPORINE SUR LA RÉPONSE VASCULAIRE ARTÉRIELLE.

Plusieurs vaisseaux provenant d'espèces différentes ont été étudiés dans des modèles expérimentaux soit *in vivo* ou *in vitro* afin d'évaluer les effets vasculaires de la cyclosporine. La variabilité observée dans la littérature est grande et relève en partie de l'espèce étudiée et des conditions expérimentales.

Modèle *in vitro*

Les modèles expérimentaux *in vitro* utilisent principalement une approche appelée la chambre à organe. Un segment de vaisseau est fixé entre deux triangles de métal à l'intérieur d'un bain contenant une solution physiologique de Krebs (28) oxygénée (95% O₂ et 5% CO₂) (figure 1). Ces triangles sont reliés via un fil à un tensiomètre. Ce dernier permet de mesurer la force que développe le vaisseau entre les triangles. Des agents pharmacologiques sont introduits à des concentrations variées dans cette chambre à organe afin d'évaluer leurs effets sur la contraction ou la dilatation des vaisseaux sanguins. L'artère de rat isolée en chambre tissulaire constitue un modèle d'étude *in vitro* fréquemment utilisé.

Après avoir incubé l'artère de la queue d'un rat normotendu avec de la cyclosporine (10^{-6} M) dans les chambres tissulaires, Lamb et al. (29) ont observé une augmentation significative de la vasoconstriction suite à la stimulation électrique ou suite à l'administration de norépinéphrine ou de KCl. Golub et al. (30) ont traité des rats hypertendus avec de la cyclosporine pendant 14 jours et ils ont étudié l'artère de la queue en chambre tissulaire. Ils ont noté une augmentation significative de la vasoconstriction de l'artère de la queue de rat suite à la stimulation électrique ou à l'administration de norépinéphrine (30, 31). Ces premières études *in vitro* suggèrent que la cyclosporine potentialise l'effet relié aux catécholamines sur l'artère de la queue du rat.

Xue HR et al.(32) ont étudié l'aorte de rats normotendus dans des chambres tissulaires contenant une concentration de 10^{-6} M de cyclosporine. Ils ont enregistré une vasoconstriction artérielle progressive et significative qu'ils pouvaient inhiber par l'ajout aux bains tissulaires de bloqueurs alpha-adrénergiques. Lors de l'addition de KCl au milieu, la vasoconstriction était plus élevée pour les vaisseaux incubés avec la cyclosporine (32). Lorsqu' elle possède son endothélium, l'aorte de rat préincubée pendant 3 heures avec de la cyclosporine (10^{-7} M) a montré une diminution de sa vasodilatation à l'acétylcholine (33). La vasodilatation au nitroprussiate n'était pas différente dans l'aorte de rat avec ou sans endothélium.

Ces études ont suggéré que la cyclosporine peut non seulement vasoconstricter directement le muscle lisse mais aussi influencer la vasodilatation dépendante de l'endothélium.

De nombreuses études ont évalué l'effet de la cyclosporine sur l'endothélium de rat. Dans ces expériences, le rat a été exposé à des doses de cyclosporine variant de 5mg/kg à 30mg/kg avec des taux sanguins variables de 200 à 600 nmol/L. Suite à l'administration de 5 à 10 mg/kg de cyclosporine pendant 3 semaines chez le rat, Rego et al.(34) et Barry et al. (3) ont démontré dans un premier temps une diminution de la relaxation à l'acétylcholine et au nitroprussiate et dans un deuxième temps une vasoconstriction augmentée à la phényléphrine. Suite à l'administration de 20mg/kg de cyclosporine pendant 8 semaines chez le rat, Cartier et al.(28) ont démontré une vasoconstriction augmentée à la norépinéphrine. Les vaisseaux possédants leur endothélium vasoconstrictaient moins que ceux sans endothélium; la vasodilatation au nitroprussiate était diminuée dans le groupe traité à la cyclosporine. S'il y avait cessation du traitement à la cyclosporine une semaine avant de sacrifier le rat, les effets de vasoconstriction associés à la cyclosporine disparaissaient (28). Lors de l'utilisation de doses plus élevées de 50mg/kg de cyclosporine, Diederich et al. (29, 33) ont aussi rapporté une diminution de la vasorelaxation à l'acétylcholine. Lorsqu'ils ajoutaient de l'indométhacine dans les

bains tissulaires, la vasorelaxation des vaisseaux exposés à la cyclosporine et au contrôle était identique. Chez le rat, Bossaler et al. (35) ont démontré une diminution de la vasorelaxation à l'acétylcholine et une diminution de la production endothéliale mesurée de prostacycline. Puisque dans ces études, l'aorte de rat est dénudée de terminaison nerveuse, l'hypertension artérielle associée à la cyclosporine n'est donc pas seulement médiée par un mécanisme neurogénique mais elle résulterait de l'action directe de la cyclosporine sur l'endothélium et sur le muscle lisse.

Gallego et al. (36) ont observé une diminution de la relaxation de l'artère fémorale à l'acétylcholine du rat exposée à 15 mg/kg/jour de cyclosporine pendant 2 semaines. Cette diminution de la vasorelaxation à l'acétylcholine est renversée par l'ajout au bain tissulaire de la l-arginine, un précurseur de la synthèse de l'oxide nitrique. De plus, ces derniers ont montré que les vaisseaux exposés à la cyclosporine contiennent davantage de calcium intracellulaire que les vaisseaux de rat non exposés. L'absence de l'endothélium et l'utilisation d'un analogue compétitif de la L-arginine dans leur étude favorisent aussi l'entrée de calcium en intracellulaire. Selon ces auteurs, la cyclosporine endommage les mécanismes de vasorelaxation qui sont dépendants de l'endothélium et reliés à la production de

l'oxide nitrique. Finalement, la cyclosporine vient interférer avec les mécanismes de régulation responsables de prévenir l'accumulation intracellulaire du calcium (36).

Chez l'homme lors de chirurgies abdominales, des artères sous-cutanées ont été prélevées et incubées pendant une heure avec 10^{-6} M de cyclosporine. Richards et al. ont observé dans la chambre tissulaire une diminution de la relaxation à l'acétylcholine et une augmentation de la réponse de vasodilatation au sodium nitroprussiate de sodium (37).

En résumé, plusieurs auteurs ont démontré les effets de la cyclosporine sur la réactivité artérielle vasculaire. Chez le rat, la cyclosporine potentialise l'effet des catécholamines sur certaines artères. Au niveau de l'aorte de rat, la cyclosporine agit sur le muscle lisse et sur l'endothélium. Elle augmente la contractilité à la phényléphrine et à la norépinéphrine et elle diminue la vasorelaxation à l'acétylcholine. De même, l'endothélium protège en partie contre l'effet vasoconstricteur de la cyclosporine (28, 33). Certains auteurs ont proposé que la cyclosporine induirait la relâche de facteurs vasoconstricteurs de type cyclo-oxygénase (33).

Modèle in vivo

Des études chez le chien ont mis en évidence l'effet de vasoconstriction importante de la cyclosporine. Une cyclosporinémie moyenne de 1000 à 2000nmol/L a été obtenue avec des doses de 5mg/kg. Lorsque la cyclosporine est perfusée sélectivement dans l'artère fémorale du chien, Carrier et al. (38) ont montré que celle-ci induit une vasoconstriction artérielle. Cette vasoconstriction est inhibée par un bloqueur alpha-adrénergique ou par une sympathectomie lombaire (L2-L4). Ainsi, la vasoconstriction artérielle périphérique induite par la cyclosporine nécessite l'activation du système nerveux sympathique. Plusieurs autres études ont rapporté des effets de vasoconstriction artérielle périphérique de la cyclosporine chez le mouton (39) et chez le rat (40).

Lorsque perfusée dans l'artère fémorale chez le chien, Carrier et al. (41) ont démontré que la norépinéphrine induit une vasoconstriction via la stimulation des récepteurs alpha-1 sur le muscle lisse. La vasoconstriction induite lors de la perfusion d'un bolus de 2µg de norépinéphrine était significativement plus grande après la perfusion de 10 ou 20mg de cyclosporine. Ainsi, la cyclosporine potentialisait l'effet de vasoconstriction de la norépinéphrine au niveau de la circulation artérielle périphérique (41).

In vivo et in vitro, O'Neil S et Chester AH ont démontré que la relaxation dépendante de l'endothélium (oxide nitrique) dans les artères coronariennes humaines n'est pas altérée par la présence de cyclosporine (160).

Chez le chien, Tronc F. et al. (41, 107) ont démontré que lorsqu'elle est infusée au niveau des carotides et au niveau de l'oreillette du cœur, la cyclosporine ne cause pas d'augmentation de la vasoconstriction de l'artère fémorale. Après la dénervation des chémorécepteurs et des barorécepteurs, l'injection de cyclosporine dans les carotides n'induit pas de vasoconstriction périphérique. Ces expériences suggèrent que le site d'action de la cyclosporine est périphérique plutôt que central ou réflexe médié par les récepteurs carotidiens. Tronc et al. ont investigué les mécanismes d'action de la cyclosporine et ils ont montré que cette substance agit au niveau artériel périphérique en bloquant le transporteur de la recapture de la norépinéphrine au bouton présynaptique (41, 42, 43).

L'enregistrement de l'activité électrique du système nerveux sympathique périphérique à l'aide d'électrodes a permis de confirmer l'importance de l'activation du système nerveux sympathique par la cyclosporine. En effet, Moss et al. (19) ont enregistré une augmentation de 40 à 60% de l'activité du système nerveux sympathique afférent rénal, génitifémoral et hypogastrique chez le rat soumis à une

perfusion intraveineuse de cyclosporine. Chez les patients transplantés cardiaques traités à la cyclosporine, l'activité du système nerveux sympathique enregistrée au nerf péronier est 3 fois plus élevée que dans le groupe contrôle; de plus, la résistance vasculaire est augmentée dans le mollet (55.2 unités vs 34.2) (14). Des études ont décrit la présence de suractivité du système nerveux sympathique chez un sous-groupe de patients hypertendus et aussi chez un modèle de rats hypertendus (40, 44, 142) de sorte que l'hypertension associée à la cyclosporine pourrait être médiée en partie par l'activation du système nerveux sympathique périphérique.

Au niveau de la cellule musculaire lisse, la cyclosporine semble agir sur des mécanismes dépendants du calcium. Au cours des études *in vitro* chez le rat l'utilisation de bloqueur calcique a empêché l'effet de potentialisation de la cyclosporine sur la stimulation à la norépinéphrine (29). La perméabilité membranaire des hépatocytes de rat à l'entrée de calcium intracellulaire est augmentée par la cyclosporine (45). Gallego et al. ont démontré que la cyclosporine favorise l'entrée du calcium dans les cellules musculaire lisse de l'artère fémorale. Cette entrée de calcium était observée dans les artères dénudées d'endothélium de même que dans les artères traitées avec un analogue de la L-arginine (36). Meyer et al. (46) ont démontré que la cyclosporine stimule le flux transmembranaire de

calcium intracellulaire et qu'elle augmente la vasoconstriction de la cellule musculaire lisse de l'aorte de rat en milieu de culture.

2.3 LA CYCLOSPORINE ET LA RÉPONSE VASCULAIRE RÉNALE

Tel que l'ont rapporté de nombreuses études expérimentales et cliniques, la cyclosporine influence la fonction rénale. Chez le rat et le chez le chien, la perfusion intraveineuse de cyclosporine résulte en une augmentation de la résistance vasculaire rénale et en une diminution significative du flot sanguin rénal (47). Le taux de filtration glomérulaire est diminué (23) et il s'associe à une rétention sodique et hydrique (19, 41, 48, 49) . De plus, ces auteurs ont observé l'augmentation concomitante de la pression artérielle chez les animaux traités avec la cyclosporine.

Chez les patients après transplantation rénale traités avec la cyclosporine plutôt que l'azathioprine, Curtis et al. (24) ont noté une augmentation du volume extracellulaire, une rétention d'eau exagérée et une vasoconstriction rénovasculaire (25). L'arrêt de la cyclosporine chez ces patients a amélioré la fonction rénale et diminué l'effet de constriction rénovasculaire. Chez des volontaires, l'injection de cyclosporine (4mg/kg) a induit une réduction du taux de filtration glomérulaire

sans effet sur le flot sanguin rénal suggérant un effet de vasoconstriction de l'artériole afférente (50, 51).

Chez le rat, Murray et al. (49) ont enregistré une vasoconstriction artérielle rénale lors de l'administration aiguë de la cyclosporine. La dénervation sympathique rénale a empêché la vasoconstriction artérielle et la diminution du taux de filtration glomérulaire (49, 52). Lors de l'administration de la cyclosporine pour 7 à 14 jours chez le rat, ces auteurs ont observé une diminution du flot sanguin rénal et une diminution du taux de filtration glomérulaire. Via l'administration concomitante d'un bloqueur alpha adrénergique, ils pouvaient bloquer les effets vasoconstricteurs de la cyclosporine (49).

Une observation histopathologique du rein de rat soumis à l'administration chronique (14 jours) de cyclosporine a montré principalement des changements vacuolaires sans évidence de nécrose tubulaire. En microscopie électronique, English et al. (53) ont démontré une diminution du diamètre des artérioles afférentes du rein chez le rat traité de façon chronique avec la cyclosporine.

La réactivité vasculaire rénale endothélium-dépendante a aussi été investiguée chez le rat traité avec cyclosporine in vivo. La cyclosporine diminue l'effet de

vasodilatation médiée par l'acétylcholine au niveau de l'artère rénale (54, 55, 56, 57). Dans un modèle expérimental, la L-arginine a amélioré le flot rénal et a diminué les effets de vasoconstriction associés à la cyclosporine.

Chez le chien, Carrier et al. ont démontré que la cyclosporine vasoconstricte l'artère rénale. Cette vasoconstriction est proportionnelle à la dose de cyclosporine. Au contraire des études chez le rat, cette vasoconstriction n'est pas inhibée par la perfusion d'un bloqueur alpha adrénérique ou par une sympathectomie rénale chirurgicale. Ainsi la vasoconstriction rénale ne peut-être attribuée chez le chien à une potentialisation par la cyclosporine du système nerveux sympathique (38).

Toutes ces études ont bien démontré que la perfusion de cyclosporine augmente la résistance vasculaire rénale . Quant à l'implication du système nerveux sympathique dans ce processus de vasoconstriction, les résultats diffèrent selon les espèces. Les études portant spécifiquement sur l'endothélium semblent montrer que la cyclosporine diminue la vasodilatation artérielle rénale dépendante de l'endothélium.

2.4 LA CYCLOSPORINE ET LE SYSTÈME RÉNINE ANGIOTENSINE

Dans les études expérimentales employant des doses élevées de cyclosporine on a observé des taux élevés de rénine (31, 49, 58) . Cependant, avec l'utilisation de doses pharmacologiques de cyclosporine (39), la rénine plasmatique est demeurée normale ou diminuée. Chez le chien lors de la perfusion de la cyclosporine, la vasoconstriction de l'artère rénale n'est pas inhibée par l'ajout d'un inhibiteur de l'angiotensine II (59). De plus, une étude clinique chez les transplantés rénaux traités avec la cyclosporine a démontré que le type d'hypertension rencontré chez ces patients répond bien à la diminution des apports hydriques et sodiques et non pas uniquement à l'utilisation d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion (24). Cette hypertension ressemble à l'hypertension essentielle décrite par Guyton (60). En résumé, la cyclosporine ne semble pas avoir d'effet sur le système rénine angiotensine.

2.5 LA CYCLOSPORINE ET LES PROSTAGLANDINES

THROMBOXANES

Lors de la perfusion de cyclosporine, on observe une vasoconstriction artérielle rénale et on mesure une augmentation de la thromboxane B2 urinaire (61, 62).

Chez le rat, certains auteurs ont démontré que l'utilisation d'inhibiteur de la synthèse des thromboxanes s'accompagne non seulement d'une diminution de la sécrétion urinaire de la thromboxane B2 mais aussi d'une amélioration du taux de filtration glomérulaire (62). Chez le chien, la perfusion locale dans l'artère rénale d'un antagoniste de la thromboxane a empêché la vasoconstriction artérielle rénale enregistrée lors de la perfusion de la cyclosporine (63). Ainsi, la cyclosporine causerait la relâche de thromboxane au niveau de la circulation rénale.

2.6 LA CYCLOSPORINE ET L'ENDOTHÉLINE

L'endothéline est un peptide sécrété par l'endothélium. Il induit des effets importants de vasoconstriction sur le muscle lisse (64). Lors de la perfusion de la cyclosporine, Carrier et al. ont mesuré une augmentation significative des niveaux d'endothéline dans l'artère rénale du chien (59,65). In vitro, les cellules tubulaires rénales humaines relâchent de l'endothéline lorsqu'elles sont mises en contact avec de

la cyclosporine (66, 67). En conclusion, la cyclosporine augmente donc la relâche locale de l'endothéline plasmatique au niveau rénal.

2.7 LE SYSTÈME VEINEUX PÉRIPHÉRIQUE

La veine est composée principalement de collagène, d'élastine et de muscle lisse.

Les veines des membres inférieurs contiennent plus de muscles lisses que les veines des membres supérieurs d'où leur rôle dans le contrôle de la pression hydrostatique.

Les veines du système veineux superficiel ou cutané contiennent plus de muscles lisses que les veines du système veineux profond et ceci reflètent leur rôle actif dans les mécanismes de thermorégulation (68).

Les mécanismes homéostatiques contrôlent la distribution du flot sanguin via leurs actions sur le tonus vasculaire. La régulation du tonus des muscles lisses au niveau des vaisseaux s'effectue via le système sympathique et via l'influence de médiateurs relâchés par l'endothélium. Le système sympathique module le tonus vasculaire en fonction des besoins de perfusion périphérique de l'organisme. L'endothélium influence le tonus par la relâche de plusieurs médiateurs vasoactifs locaux tels que les EDRFs ou "Endothelium-derived relaxing factors" (oxide nitrique,

prostaglandines PGI_2) en réponse aux changements chimiques et physiques locaux (69, 70).

Le système veineux systémique est divisé en trois composantes: les veines splanchniques, les veines squelettiques et les veines cutanées. La capacitance du système veineux splanchnique (foie, rate, intestin) est contrôlée principalement par les baroréflexes de la région du sinus carotidien et de l'arc aortique. Les veines du système squelettique sont influencées par l'activité du système sympathique et par la contraction des muscles squelettiques. Finalement, les veines cutanées sont sous le contrôle des réflexes respiratoires et du système de thermorégulation (68). La veine saphène est le prototype même des veines cutanées; elle joue un rôle clé dans la régulation de la température. Tous ces mécanismes de régulation contrôlent la quantité de sang dans le pool systémique veineux. Ils ont donc un rôle vital dans l'ajustement des pressions de remplissage du cœur et par conséquent du volume d'éjection systolique (71, 72).

Le calcium entre dans la cellule musculaire lisse via des canaux calciques. Il induit la contraction du muscle lisse dans la paroi de la veine. Lors de l'arrivée de l'influx nerveux dans le muscle lisse les canaux calciques s'ouvrent via un mécanisme voltage dépendant. L'interaction d'un agoniste-vasoconstricteur avec les récepteurs

sur la membrane cellulaire résulte aussi en l'ouverture des canaux calciques. Le calcium peut aussi être relâché du réticulum sarcoplasmique. Au niveau des muscles lisses des veines splanchniques, l'activation de la cellule musculaire lisse est liée à l'entrée extracellulaire du calcium alors qu'au niveau des muscles lisses des veines cutanées, la mobilisation intracellulaire sarcoplasmique du calcium est plus importante (71, 73).

La paroi de la veine est très élastique. Lorsque la pression s'élève dans la veine, la distension de la veine est limitée par son contenu en collagène et par la contraction des muscles lisses (68). En 1969, Vanhoutte et al. (74) ont étudié in vitro la variation de la pression dans la veine en fonction de son étirement. Ils ont noté que lorsque la veine est étirée, l'augmentation initiale du volume s'accompagne d'une augmentation minime de la pression. L'augmentation progressive du volume dans la veine résulte éventuellement en une augmentation rapide de la pression veineuse. Dans une autre série d'expériences, ces auteurs ont stimulé la veine à l'aide d'un courant électrique constant après chaque augmentation de son volume. Ils ont enregistré alors une augmentation encore plus rapide de la pression veineuse jusqu'à un plateau maximal (74).

Le modèle de perfusion de la veine saphène chez le chien est décrit et utilisé par plusieurs auteurs. Dans ces expériences, lorsque la veine saphène est perfusée à débit constant à l'aide d'une pompe occlusive, tout changement dans la résistance de la veine se reflète dans la pression de perfusion mesurée à l'entrée de la veine saphène (75, 76, 77). En 1968, Webb-Peploe et al. (78, 79, 80) ont mesuré cette variation de la pression de perfusion dans la veine saphène en fonction d'une stimulation sympathique croissante. Ils ont noté que la pression de perfusion dans la veine saphène augmente avec la stimulation sympathique. Ils ont aussi observé que la veine saphène se contracte non seulement plus rapidement mais aussi avec une plus grande force lorsqu'elle est plus distendue avant d'être stimulée. Ainsi la pression dite de base dans la veine saphène influençait la réponse à la stimulation sympathique. Cette pression de base est déterminé par le débit de la pompe occlusive. Utilisant le même modèle, Vanhoutte et al. en 1973 (81) ont appliqué un stimulus sympathique constant de 15Hz pour 10 secondes en variant le débit de la pompe occlusive. Ils ont observé que la force de contraction de la veine saphène chez le chien augmente pour chaque augmentation de débit avec une force de contraction maximale quand la perfusion était fixée à environ 100ml/minute. Lorsque la veine devient trop distendue la force de contraction diminue (77, 78, 79). La pression veineuse mesurée en périphérie dépend de la pression artérielle, de

l'effet de la gravité et de l'effet de la pression dans le système veineux central (PVC).

Dans toutes les veines, la contraction des muscles lisses est liée à la présence de médiateurs neurohumoraux. Les catécholamines et particulièrement la norépinéphrine libérée des terminaisons nerveuses jouent un rôle important. Via l'activation des récepteurs alpha sur le muscle lisse, les catécholamines causent la contraction des muscles lisses dans la paroi des veines. On reconnaît deux sous-types de récepteurs, alpha 1 et alpha 2 (71, 73, 82). En 1948, Ahlquist a démontré que l'effet d'excitation médié par la norépinéphrine est secondaire à la stimulation des adrénorécepteurs alpha 1 (43). Ces récepteurs sont retrouvés surtout à la surface de la cellule musculaire lisse.

Les récepteurs alpha 2 sont retrouvés au bouton terminal en présynaptique ainsi qu'en postsynaptique au niveau de la jonction noradrénergique sur les cellules cibles. En présynaptique, ils contrôlent l'émission d'impulsions par le neurone; en postsynaptique, leur stimulation induit une vasoconstriction des cellules musculaires lisses des vaisseaux. En périphérie, on les définit comme extrasynaptiques plutôt que post synaptiques parce que leur activation se fait principalement par les

catécholamines circulantes et moins par la relâche de la norépinéphrine au niveau de la terminaison nerveuse (43).

Le degré d'innervation adrénergique des veines varie et ce sont les veines cutanées et splanchniques qui ont l'innervation la plus dense. Les veines principales et celles qui drainent les membres inférieurs reçoivent peu d'innervation adrénergique (72).

Les changements dans le diamètre veineux médié par le système neurogénique se produisent surtout au niveau des veines cutanées et splanchniques, alors que les autres veines ont un rôle plus passif. Par contre, quand les niveaux de catécholamines circulantes sont élevés, la majorité des veines peuvent se contracter à l'unisson avec les veines cutanées et splanchniques. De façon plus spécifique, le contrôle sympathique des veines cutanées est dominé par le centre hypothalamique. Par exemple, lors d'une diminution de la température corporelle, l'hypothalamus induit une augmentation du flot sympathique avec comme résultat une contraction des veines cutanées.

2.7.1 Influence de la température locale sur la réactivité de la veine saphène

Dans les veines sans rythmicité myogénique et en absence de stimulation sympathique, les variations de température locale n'influencent pas la pression dans les veines (83,84). La stimulation du nerf sympathique induit une vasoconstriction de la veine saphène. Le réchauffement local diminue cette vénoconstriction alors que le refroidissement local l'augmente (78). Les mêmes phénomènes peuvent être illicites in vitro (84). Des inhibiteurs de la recapture de la norépinéphrine et des inhibiteurs des enzymes monoamines oxydases et catéchol-O-méthyltransférase ne préviennent pas les effets de potentialisation observés lors du refroidissement local (72, 85, 86).

Ainsi, une diminution de la température locale favorise la vasoconstriction du système veineux cutané et la vasodilatation du système veineux profond (72, 79). La vénoconstriction cutanée liée au refroidissement empêche la perte de chaleur et dirige le flot sanguin vers les veines profondes qui se dilatent parce que le sang provenant des veines superficielles est froid. Cette dilatation du système veineux profond diminue le flot sanguin veineux. Ceci permet une augmentation du temps d'échange de la chaleur entre le réseau veineux et le réseau artériel via un système

de contre-courant. Ainsi le sang sera réchauffé avant de retourner à la circulation centrale (68, 78).

La modulation de la réponse adrénergique induite par le refroidissement ou par le réchauffement local est secondaire respectivement à l'augmentation ou à la diminution de la réactivité des adrénorécepteurs alpha-2 postsynaptiques. Certains auteurs ont démontré que la diminution de la température locale inhibe la réponse à l'activation des récepteurs alpha-1. Cependant, lorsque la réponse alpha-1 est évoquée par un agoniste spécifique tel que la norépinéphrine ou la phényléphrine, la grande réserve d'adrénorécepteurs alpha-1 retrouvée au niveau de la veine saphène viendra contrebalancer l'effet d'inhibition du froid sur les récepteurs alpha-1 (87). Les récepteurs alpha-2 activés lors de ce processus de stimulation adrénergique pourront exprimer leur effets. En bloquant les récepteurs alpha-1 via la phénoxybenzamine, Vanhoutte et al. ont démontré que le refroidissement inhibe la réponse adrénergique de vasoconstriction observé dans la veine saphène (88). La modulation du système sympathique via les variations de la température peut impliquer des neurotransmetteurs autres que la NE comme par exemple l'ATP relâchée au niveau de la terminaison nerveuse (43).

Les veines profondes ne contiennent que très peu de récepteurs alpha 1 et alpha 2. Lorsque la température diminue les récepteurs alpha-1 sont inhibés par le froid. Ainsi lorsqu'elles sont soumises au froid, les veines du système profond se dilatent (89).

2.7.2 Influence des barorécepteurs et des chémorécepteurs sur le système veineux cutané

L'importance de ces réflexes dans la régulation de la pression artérielle est connue depuis le début des années 1930 (68). Chez le chien les veines cutanées ne montrent pas de réponse aux changements dans l'activité des barorécepteurs. Par contre si les niveaux circulants de catécholamines augmentent alors le tonus s'élève dans les veines cutanées. Les veines splanchniques vasoconstrictent lorsque le sinus carotidien est stimulé (68, 90). Les veines cutanées chez le chien ne sont pas affectées par un changement d'activité au niveau des récepteurs cardio-pulmonaires lorsque le volume sanguin est maintenu normal (77, 90, 91, 92).

Les chémorécepteurs artériels ont un rôle important dans le contrôle de la respiration et ils influencent aussi le tonus de la circulation. L'activation des chémorécepteurs causes une dilatation des veines cutanées (93, 94, 95, 96).

Lorsque la pO_2 est inférieure ou égale à 70 mmHg ou que la pCO_2 est supérieure ou égale à 39 mmHg, Pelletier et al 1972 (93, 94) ont observé une dilatation réflexe de la veine saphène. Cette vénodilatation n'est pas affectée par des inhibiteurs de l'acétylcholine et par l'histamine ou par un bloc de l'activité adrénergique. Une stimulation très intense des barorécepteurs vient inhiber la vénodilatation induite lors de la stimulation des chémorécepteurs (97).

3.0 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

L'introduction de la cyclosporine dans les régimes d'immunosuppression a permis d'améliorer la survie des greffés en prévenant les phénomènes de rejet.

L'hypertension artérielle, l'insuffisance rénale, le taux élevé de complications thromboemboliques, l'atteinte hépatique et les épisodes de convulsions rapportés chez les patients traités avec la cyclosporine reflète la morbidité non négligeable associée avec ce médicament. L'étude des effets de la cyclosporine sur le système vasculaire périphérique nous amène à comprendre ses mécanismes d'actions et nous permet d'expliquer ses effets secondaires. Plusieurs auteurs ont investigué les effets vasoactifs artériels de la cyclosporine mais très peu se sont interrogés sur les effets veineux de la cyclosporine. Une meilleure compréhension des effets veineux de la cyclosporine pourrait nous aider à comprendre pourquoi l'incidence de thrombophlébite et d'embolie pulmonaire est plus élevée chez les patients traités à la cyclosporine (111, 143).

Nous proposons par ce travail de répondre aux questions suivantes: Quels sont les effets de la cyclosporine et de son véhicule le cremophore sur le tonus de la veine saphène canine et la réactivité de la veine saphène ? Quels sont les mécanismes d'actions de la cyclosporine sur le tonus de la veine saphène canine in vivo ? Quels sont les mécanismes d'actions de la cyclosporine et de son véhicule le cremophore sur la réactivité du muscle lisse veineux et sur la réactivité endothéliale ?

4. STRATÉGIE DE RECHERCHE

Afin de répondre aux questions posées et aux objectifs du projet, plusieurs séries d'expériences en laboratoire expérimental ont été faites. Un modèle *in vivo* chez le chien a permis de mettre en évidence les effets vasoactifs de la cyclosporine sur la veine saphène et d'expliquer les mécanismes d'actions de la cyclosporine. Un modèle *in vitro* a permis l'étude des effets de la cyclosporine et de son véhicule, le cremophore sur la réactivité du muscle lisse et de l'endothélium de la veine saphène canine. Finalement, l'investigation s'est intéressée aux mécanismes d'actions de ces agents sur la veine saphène canine dans la chambre tissulaire.

5. MATÉRIEL ET MÉTHODE

5.1 PROTOCOLE D'ÉTUDE DE LA VEINE SAPHÈNE CHEZ LE CHIEN

In Vivo

29 chiens pesant de 20 à 25 kg sont anesthésiés avec du pentobarbital sodique (30 mg/Kg), intubés et ventilés avec un respirateur de type Harvard (Natick South Mass, USA). Un cathéter est introduit dans l'artère brachiale pour la mesure continue de la pression artérielle moyenne. La pression veineuse centrale est monitorisée via un cathéter inséré dans la veine fémorale droite en regard de la veine cave inférieure.

Après héparinisation (1000 unités/kg), l'artère fémorale droite et la portion distale de la veine saphène superficielle gauche sont canulées. Une pompe occlusive à débit constant véhicule le sang de l'artère fémorale droite à la veine saphène gauche. Interposés sur le circuit, un dépulsateur et un échangeur thermique permettent respectivement de maintenir un flot sanguin constant à une température constante de 37.5° Celsius. Un thermomètre sur le circuit nous assure que la température de l'infusate demeure constante. Un thermomètre rectal mesure la température centrale de l'animal. Un monitoring de la pression dans le circuit juste avant l'entrée dans la veine saphène enregistre la pression de perfusion de la veine saphène. Maintenu

constant tout au long de l'expérience, le débit de la pompe est fixé à 100 ml/minute. Les variations de la pression de perfusion induites par des modifications physiologiques ou pharmacologiques sont enregistrées de façon continue. La pression artérielle moyenne systémique est maintenue au dessus de 100 mmHg par une perfusion de soluté Lactate Ringer (figure 2).

Au cours des expériences, le pH sanguin, la PO_2 et la PCO_2 sont contrôlés et corrigés avec l'ajustement de la ventilation. Une ampoule de bicarbonate (44.5 mEq) est ajoutée au premier litre de soluté Lactate Ringer perfusé chez le chien. Les prélèvements pour les niveaux sanguins de cyclosporine sont effectués via la veine fémorale droite.

La réactivité de la veine saphène est testée à l'aide de la norépinéphrine. Cette dernière est perfusée sous forme de bolus à différentes concentrations. Entre chaque bolus de norépinéphrine un temps d'attente minimal de 5 à 7 minutes est observé afin de permettre à la pression artérielle, à la pression de perfusion et à la pression veineuse centrale de revenir à leur niveau respectif de base avant la prochaine stimulation à la norépinéphrine.

Les chiens sont divisés en quatre groupes. Dans le premier groupe de 7 chiens, des doses de 5 mg, 10 mg et 20 mg de cyclosporine sont dissoutes dans le plasma de l'animal. La cyclosporine a été perfusée directement dans la veine saphène sur une période de 10 minutes. Une injection contrôle est effectuée avec 25 ml de plasma. Avant le début de la perfusion de cyclosporine et 15 minutes après, la réactivité de la veine saphène est testée avec 12 µg de norépinéphrine administré en bolus. Les niveaux sanguins de cyclosporine sont mesurés à la fin de chaque injection.

Dans le deuxième groupe de 8 chiens, une dose de 20 mg de cyclosporine est perfusée sur une période de 20 minutes après dissolution dans 30 ml de plasma. La réactivité de la veine saphène est testée avec des injections en bolus de norépinéphrine de 6 µg, 12 µg et 24 µg avant la perfusion de cyclosporine, pendant et après la perfusion. La cyclosporinémie est mesurée à la fin de la perfusion.

Chez un troisième groupe de 7 chiens, une dose de 30 mg de cyclosporine est perfusée sur une période de 60 minutes. Avant et après la perfusion de la cyclosporine, la réactivité de la veine saphène est testée avec des injections en bolus de 3 µg, 6 µg, et 12 µg de norépinéphrine. La cyclosporinémie est également mesurée à la fin de la perfusion.

Ces mêmes injections sont faites chez un dernier groupe de 7 chiens après sympathectomie lombaire. La sympathectomie lombaire est complétée par la section de la chaîne sympathique latéro-vertébrale gauche au niveau de L3 et la section des rameaux nerveux des ganglions sympathiques de L3 à L5.

In Vitro

Les neuf chiens utilisés pour cette étude sont de taille moyenne, pesant de 25 à 30 kg. Après une anesthésie avec le pentobarbital sodique (20 à 25 mg/kg), les donneurs sont intubés et ventilés avec un respirateur de type Harvard (Natick South Mass, USA). Une incision longitudinale d'environ 10cm est pratiquée sur la face antérieure de la patte le long du territoire de la veine saphène superficielle. Chacune des branches de la veine saphène est isolée et ligaturée. La veine est excisée et placée dans une solution de Krebs-Ringer à 4°C dont la composition est la suivante: 118,3 mmol/L de NaCl; 4,7 mmol/L de KCl; 1,2 mmol/L de MgSO₄; 1,22 mmol/L de KH₂PO₄; 2,5 mmol/L de CaCl₂; 25,0 mmol/L de NaHCO₃ et 11,1 mmol/L de glucose.

Les veines saphènes sont ensuite sectionnées en anneaux d'environ 4 à 5 mm chacun. Certains anneaux sont dénudés mécaniquement de leur endothélium et ce, à l'aide d'une pince forceps introduite à l'intérieur de la lumière animée d'un mouvement de roulement. Entre 2 tiges d'acier inoxydable, chaque anneau est ensuite suspendu à l'intérieur d'une chambre tissulaire d'une capacité de 25 ml. L'une des tiges est fixée au fond de la chambre alors que l'autre est mobile et reliée à un lecteur de tension (Statham-Gould, modèle UC2, Maryland) pour mesurer la tension isométrique. Les chambres sont irriguées par une solution de Krebs-Ringer oxygénée (95% O₂ - 5% CO₂), maintenue à 37° C et équilibré à un pH de 7,4 (figure 1). Les anneaux sont ensuite mis sous tension jusqu' à ce que leur ratio "étirement-tension" soit optimal, ce qui se vérifie par une stimulation au chlorure de potassium (20 mmol KCL). La présence et l'absence d'endothélium est confirmée par une dose-test d'acétylcholine (10⁻⁶ M) après précontraction avec 30mmol de KCL. Les anneaux sont ensuite laissés au repos pour une période de 45 minutes avant la stimulation pharmacologique.

Des anneaux de veines saphènes sont étudiés en parallèle dans les chambres tissulaires. Un groupe reçoit de la cyclosporine et l'autre du cremophore, véhicule de dilution de la cyclosporine. Chaque segment pourvu d'endothélium est comparé

à un segment sans endothélium provenant du même vaisseau de façon à mieux mettre en évidence la réponse endothéliale du vaisseau étudié.

Tous les vaisseaux sont pré-constrictés avec 30 mmol de KCl. Lorsqu' un niveau stable de pré-contraction est obtenu, les vaisseaux sont exposés dans les bains aux concentrations croissantes de cyclosporine et de cremophore. Entre chaque courbe dose réponse, le vaisseau est lavé avec la solution Krebs-Ringer afin d'éliminer toute trace de cremophore ou de cyclosporine.. La concentration de cyclosporine ou de cremophore n'a pas été mesuré après le lavage des bains tissulaires avec la solution Krebs Ringer, cependant l'effet vasoactif disparaissait complètement. Au cours de ces expériences, la constance de la réponse endothéliale aura été vérifiée.

Le même protocole sera répété suite à l'ajout d'indométhacine (10^{-5} M) à la solution de Krebs-Ringer. Les vaisseaux sont préincubés dans les bains tissulaires environ 40 minutes avec la solution de Krebs-Ringer plus indométhacine afin de prévenir la synthèse de prostanoïdes.

5.2 PRÉPARATION DES MÉDICAMENTS

In vivo

Des quantités de 5 mg, 10 mg, 20 mg et 30 mg de cyclosporine pure en poudre sont pesées. La cyclosporine est ensuite diluée dans 30 ml de plasma. Ce plasma est obtenu suite à la centrifugation à 20 °C, pendant 20 minutes à 2000 tours/minutes d'un volume d'environ 80 ml de sang prélevé chez l'animal avant de débiter l'expérience.

In vitro

Tous les médicaments et composés pharmaceutiques utilisés (acétylcholine, norépinéphrine, indométhacine) sont préparés la journée même de l'expérience. Ils sont tous dilués à l'aide d'eau distillée, leurs concentrations sont exprimées en concentration molaire et calculées en tenant compte du volume (25ml) de chaque bain d'organe.

5.3 MÉDICAMENTS

In vivo

La cyclosporine (Sandoz) en poudre est utilisée dans notre étude.

Formule moléculaire de la cyclosporine: $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$

Poids moléculaire de la cyclosporine: 1202.64 daltons

Une dose de 3 mg de norépinéphrine (Sandoz) est diluée dans 500-ml de dextrose 5%. Des volumes de 0,5 ml, 1 ml, 2 ml, et 3 ml sont administrés en bolus pour des concentrations respectives de 3 μ g, 6 μ g, 12 μ g, et 24 μ g de norépinéphrine.

In vitro

La norépinéphrine et l'acétylcholine proviennent de la compagnie Sigma (St Louis, Mo). La cyclosporine intraveineuse (Sandimmune) est obtenue de la compagnie Sandoz (113). Sa composition est faite de 50 mg/ml de cyclosporine, 278 mg/ml d'éthanol (94%) et de 650 mg/ml d'huile de castor (polyoxyéthylée). Le véhicule utilisé dans le groupe contrôle est reconstitué au laboratoire en utilisant du cremophore EL auquel on ajoute l'éthanol dans les mêmes proportions que la formulation ci-haute et ce conforme aux concentrations décrites par la compagnie Sandoz (113).

5.4 CALCULS ET ANALYSES STATISTIQUES

In vivo

Les résultats sont présentés en valeur moyenne et écart-type à la moyenne. Dans la première expérience, alors qu'on utilisait une seule concentration de norépinéphrine avant et après la perfusion de cyclosporine, les variations de la pression de perfusion, de la pression artérielle et de la pression veineuse centrale sont étudiées à l'aide du test de t de student . Dans les cas où la réponse pharmacologique à plusieurs concentrations de norépinéphrine est comparée avant et après la cyclosporine, une analyse de variance à mesure répétée est réalisée (98). Des comparaisons intergroupes sont possibles avec le test de Fisher. Le degré de signification est établi à 95% donnant une valeur de $p < 0.05$. Toutes les opérations statistiques sont accomplies à l'aide du logiciel SOLO de BMDP (99) .

In vitro

Les résultats sont exprimés en moyenne et écart type à la moyenne. La réponse à la stimulation est exprimée en pourcentage de la contraction maximale initiale obtenue avec 30 mmol de KCl. Pour chaque courbe dose réponse, la valeur de concentration à laquelle on observe 50% de l'effet maximal (ou CE50) et la valeur de contraction maximale sont obtenues. Celles-ci sont exprimées en moyenne et

écart type à la moyenne et elles sont comparées à l'aide du test de t de student pour mesure appariée. Toutes les opérations statistiques sont accomplies à l'aide du logiciel de SOLO de BMDP (99).

6. RÉSULTATS

6.1 EXPÉRIENCE IN VIVO

Pour chaque expérience, la température de l'animal et la température de l'infusât demeurent constantes. Toute variation est immédiatement corrigée. Au cours de chaque expérience, des gaz artériels évaluent les valeurs du Ph, de la PO₂, de la PCO₂ et du bicarbonate chez l'animal. Ces variables demeurent constantes et nous nous assurons de les contrôler si nécessaire à l'aide de la ventilation mécanique ou de la perfusion de bicarbonate (tableaux 1 et 2).

6.1.1 Effet dose dépendante de la cyclosporine.

Les doses de 5 mg, 10 mg et 20 mg de cyclosporine induisent des changements non significatifs de la pression de perfusion de l'ordre de 0 ± 1 , 1 ± 1 , 0 ± 1 mmHg respectivement lorsqu'elles sont perfusées sur une période de 10 minutes dans la veine saphène (figure 3). Pour chacune des doses injectées, les niveaux sanguins de cyclosporine mesurés dans la veine iliaque sont respectivement de 159 ± 72 , 377 ± 73 , 694 ± 93 mmol/L et donc significativement différentes ($p < 0.05$). La pression artérielle (106 ± 7 mmHg) et la pression veineuse centrale (6 ± 1 mmHg) n'ont pas varié de façon significative au cours des perfusions de cyclosporine tel que le démontre le tableau 3.

La norépinéphrine est utilisée pour tester la réactivité de la veine saphène au début et à la fin de l'expérience. La réactivité de la veine saphène est démontrée par une augmentation moyenne de la pression de perfusion de 22 ± 5 mmHg suite à l'injection d'un bolus de 12 μ g de norépinéphrine. Après la perfusion de cyclosporine, la veine saphène répond à l'injection d'un bolus de 12 μ g de norépinéphrine avec une vénoconstriction beaucoup plus grande de 45 ± 12 mmHg ($p=0.04$) (figure 4).

6.1.2 Effet d'une brève perfusion de cyclosporine

Lorsque perfusée sur une période de 20 minutes dans la veine saphène, une dose de 20 mg de cyclosporine entraîne une variation non significative de la pression de perfusion de la veine saphène de 2 ± 1 mmHg ($p=0.07$). La concentration sanguine de cyclosporine atteinte est de 771 ± 137 nmol/l. La pression artérielle, la pression de perfusion et la pression veineuse centrale n'ont pas varié pas de façon significative au cours de la perfusion de cyclosporine et au cours de l'expérience (figure 5).

La réactivité de la veine saphène est démontrée par une augmentation de la pression de perfusion lors de l'injection des bolus de 6 μ g, 12 μ g et 24 μ g de norépinéphrine avant, pendant et après la perfusion de la cyclosporine. Il n'y a pas de différence

significative entre les variations de la pression de perfusion de la veine saphène avant, pendant ou après la perfusion de la cyclosporine (tableau 4).

6.1.3 Effet d'une perfusion prolongée de cyclosporine

Perfusée pendant 60 minutes dans la veine saphène du chien non sympathectomisé, une dose de 30 mg de cyclosporine entraîne une variation significative dans le temps de la pression de perfusion passant de 44 ± 2 mmHg à 59 ± 5 mmHg ($p < 0.0001$) (figure 6). La pression artérielle (112 ± 8 mmHg, $p = 0.99$) et la pression veineuse centrale (7 ± 1 mmHg, $p = 0.11$) demeurent constantes pendant la perfusion de cyclosporine et entre les doses de norépinéphrine.

Chez le chien non sympathectomisé, l'injection de 3 μ g, 6 μ g et 12 μ g de norépinéphrine cause une augmentation de la pression de perfusion moyenne de 25 ± 6 , 39 ± 9 et 53 ± 10 mmHg avant la cyclosporine et de 45 ± 7 , 69 ± 13 et 84 ± 8 mmHg après, une augmentation significative ($p = 0.03$) (Tableau 5).

6.1.4 Effet de la cyclosporine après sympathectomie lombaire

Perfusée pendant 60 minutes dans la veine saphène d'un chien ayant subi une sympathectomie lombaire, une dose de 30 mg de cyclosporine entraîne une variation non significative de la pression de perfusion moyenne passant de 40 ± 2 à 41 ± 2 mmHg (figure 6). L'effet de la perfusion prolongée de la cyclosporine est significativement différente entre les groupes sympathectomisés et non sympathectomisés (groupe témoin) (figure 6) ($p=0.02$). Les niveaux de cyclosporine mesurés entre les deux groupes sont similaires soient de 360 ± 38 nmol/L pour le groupe témoin et de 322 ± 40 nmol/L pour le groupe avec sympathectomie chirurgicale ($p=0.43$). Chez le chien sympathectomisé, la pression artérielle (108 ± 3 mmHg, $p=0.99$) et la pression veineuse centrale (3 ± 1 mmHg, $p=0.24$) demeurent constantes pendant la perfusion de cyclosporine et entre les doses de norépinéphrine.

Chez le chien sympathectomisé, l'injection de 3 μ g, 6 μ g et 12 μ g de norépinéphrine cause une augmentation de la pression de perfusion moyenne de 45 ± 12 , 54 ± 14 et 67 ± 19 mmHg respectivement avant la cyclosporine et de 35 ± 12 , 48 ± 15 et 56 ± 12 mmHg respectivement après, une différence non significative ($p = 0.64$) (Tableau5).

6.2 EXPÉRIENCE IN VITRO

6.2.1 Effet de la cyclosporine sur la veine saphène avec et sans endothélium

La cyclosporine induit une vasoconstriction significative de la veine saphène intacte ($p=0.0001$). Cette vasoconstriction est proportionnelle à la dose de cyclosporine utilisée. Lorsque la veine est dénudée de son endothélium, la vasoconstriction observée est un peu plus importante mais non statistiquement significative (figure 7).

6.2.2 Effet du cremophore sur la veine saphène avec et sans endothélium

Le véhicule de la cyclosporine, le cremophore induit une vasoconstriction dose dépendante de la veine saphène intacte ($p<0.0001$). En présence de l'endothélium, cette vasoconstriction est similaire à celle de la cyclosporine (figure 8). Par contre lorsque l'endothélium est dénudé, la cyclosporine induit une vasoconstriction plus importante que son véhicule (figure 9). Le maximum de contraction atteint est plus élevé ce qui démontre une plus grande activité de la cyclosporine (Max 207 ± 22 vs Max 162 ± 10). La courbe de la cyclosporine est déplacée vers la gauche indiquant une sensibilité accrue de la veine saphène à la cyclosporine (CE50 $4,9\pm 0,4$ vs CE50 $4,3\pm 0,1$) lorsque comparé au cremophore.

6.2.3 Effet de l'indométhacine sur la réactivité de la veine saphène à la cyclosporine et au cremophore.

En absence d'endothélium, l'ajout d'un bloqueur de la cyclo-oxygénase vient contrer en partie l'effet vasoactif de la cyclosporine. De plus, il abaisse de façon significative les valeurs maximales de contraction observées pour la cyclosporine et pour le cremophore (figure 10).

De la même façon, en présence d'endothélium, les valeurs maximales de contraction pour la cyclosporine et pour le cremophore sont aussi significativement diminuées (figure 11). La CE50 est identique pour les groupes avec et sans indométhacine, par contre la contraction maximale observée est diminuée dans tous les cas en présence d'indométhacine (tableaux 6 et 7).

7. DISCUSSION

Dès son introduction dans les régimes d'immunosuppression, la cyclosporine a permis d'améliorer le devenir des patients greffés ce qui a engendré une croissance exponentielle des programmes de transplantation d'organes dans les années 1980 (2, 5). Plus récemment, cette molécule est utilisée avec succès dans le traitement de plusieurs maladies autoimmunes (7).

La cyclosporine est cependant responsable d'effets secondaires sérieux.

L'hypertension artérielle touche de 60 à 90 % des patients greffés (14, 51). La cyclosporine est devenue une des plus fréquentes causes d'hypertension secondaire et les mécanismes responsables demeurent énigmatiques. L'insuffisance rénale s'installe chez les immunosupprimés avec une créatinine sérique atteignant 150 à 200 $\mu\text{mol/l}$ deux ans après la transplantation (11, 52). Vanrenterghem et al. décrivent des complications thromboemboliques chez les transplantés rénaux traités avec cyclosporine comparés à un groupe historique recevant de l'azathioprine et des stéroïdes. Kroshus et al. (143) décrivent l'incidence élevée de thrombose veineuse profonde et d'embolie pulmonaire, respectivement de 12% et 6% après la transplantation pulmonaire. Des complications neurologiques sont associées à la cyclosporine allant des tremblements et de l'encéphalopathie aux convulsions tonico-cloniques (126). La compréhension des mécanismes responsables de ces effets secondaires passe par l'étude des effets vasculaires de la cyclosporine.

Plusieurs études chez l'homme et l'animal ont démontré que la cyclosporine potentialise l'aggrégation plaquettaire et prolonge le temps de thromboplastine (119). La cyclosporine peut amener une atteinte de la fonction endothéliale et une vasoconstriction du système veineux. Bombeli et al. (144) démontrent que lorsqu'exposées à des doses thérapeutiques de cyclosporine, les veines ombilicales humaines perdent une partie de leurs cellules endothéliales. La surface de la veine non protégées par l'endothélium devient alors thrombogénique.

Le modèle de perfusion de la veine saphène utilisé lors des expériences *in vivo* chez le chien est bien décrit dans la littérature. Des expériences démontrent que la variation de la pression de perfusion dans la veine saphène est le reflet de sa vasoconstriction (76, 93, 95). La pression de perfusion dans la veine saphène au début de l'expérience dépend du tonus de cette dernière et du débit de la pompe occlusive (78). Tel que démontré par Vanhoutte et al. (103), lors de la stimulation adrénergique, la réactivité de la veine saphène est maximale lorsque le débit de la pompe est fixé à 100 ml/minute. Ainsi pour chacune de nos expériences, le débit de la pompe occlusive est fixé à 100 ml/minute. La pression de perfusion au début de chaque expérience varie entre 30 et 45 mmHg selon le tonus de base de la veine saphène. Cette pression dans le système veineux saphène du chien correspond aux pressions physiologiques enregistrées chez l'animal au repos.

Dans notre étude *in vivo*, les paramètres hémodynamiques tels que la pression artérielle moyenne et la pression veineuse centrale demeurent constants pour chaque expérience (Tableau 3). Chez le chien, Edwards et al. (102) montrent que la pression artérielle moyenne et les résistances vasculaires périphériques ne changent pas lors d'une perfusion intraveineuse de cyclosporine d'une durée de 30 minutes. Navaro et al. (145) ont perfusé en intraveineux de la cyclosporine chez l'homme à raison de 5 mg/kg. Ils enregistrent une augmentation significative de la pression artérielle après 120 et 150 minutes de perfusion. Ces auteurs (102, 145) constatent que le volume d'éjection systolique et le débit cardiaque chutent au moment de l'augmentation des résistances vasculaires périphériques seulement après une perfusion prolongée de plus de 120 minutes. Ainsi, dans notre expérience la durée maximale de perfusion de la cyclosporine d'une heure ne semble pas assez longue pour développer une augmentation significative de la pression artérielle. Il semble donc nécessaire de perfuser la cyclosporine par voie intraveineuse assez longtemps pour obtenir un effet sur la pression artérielle moyenne systémique.

Concernant les effets de la cyclosporine sur le système veineux périphérique canin, notre étude démontre que la perfusion prolongée de 60 minutes de cyclosporine dans la veine saphène provoque une vénoconstriction significative ($p < 0.0001$). L'augmentation de la pression de perfusion veineuse ne se manifeste de façon soutenue qu'après 30 minutes. (figure 6). Lorsque la cyclosporine est perfusée sur une courte période de temps, les variations dans la pression de perfusion de la veine saphène sont non significatives (figure 3). Bien que les niveaux de cyclosporine soient élevés après les perfusions brèves de 10 mg et 20 mg de cyclosporine, nous croyons que la courte période de perfusion et d'analyse n'a pas permis de mettre en évidence l'effet de stimulation de la cyclosporine. Seulement une perfusion continue d'une heure avec le maintien d'une concentration sanguine élevée de cyclosporine a permis d'obtenir une vénoconstriction significative.

Les hypothèses pour expliquer l'effet in vivo de vasoconstriction de la cyclosporine proviennent principalement d'études sur le système artériel périphérique: l'activation du système nerveux sympathique (44), le bloc de la recapture de la norépinéphrine (44), l'action directe de la cyclosporine sur le muscle lisse (28), l'atteinte de la vasodilatation dépendante de l'endothélium vasculaire telle que démontrée chez le rat (30, 31, 32, 33, 34, 57), la relâche d'endothéline par la

cyclosporine (24, 102), l'atteinte de la vasodilatation périphérique chez l'humain (146).

Chez le chien et chez l'homme, la littérature sur la réactivité veineuse périphérique montre que les veines ont une réactivité différente des artères périphériques. Les veines sont plus sensibles à la stimulation par l'endothéline (149), elles sécrètent moins de prostacyclines vasodilatatrices (148), elles expriment, à l'inverse des artères, une vasoconstriction endothélium dépendante lorsque stimulées avec l'acide arachidonique (150), elles relâchent de plus faibles quantités d'EDRF (Endothelium-Derived-Relaxing-Factor : oxide nitrique) que les artères en intra-luminal (147), elles expriment préférentiellement une vasoconstriction endothélium dépendante en réponse à certaines stimulations pharmacologiques (151). Ainsi, in vivo et in vitro, les études démontrent qu'après stimulation par des agents pharmacologiques, comme au repos, les veines périphériques ont une forte tendance à la vasoconstriction.

Dans notre étude, la cyclosporine potentialise la vénoconstriction médiée par la norépinéphrine. Lors de la première expérience, les effets de la norépinéphrine sur la pression de perfusion sont enregistrés avant et après l'ensemble des bolus de 5 mg, 10 mg et 20 mg de cyclosporine. Une dose totale de 35 mg de cyclosporine

donnée sur une période d'environ une heure potentialise l'effet de la norépinéphrine sur la pression de perfusion de la veine saphène (figure 4). De la même façon, lorsque 30mg de cyclosporine est perfusé sur une période prolongée de une heure on observe cet effet de potentialisation de la cyclosporine sur la vasoconstriction veineuse à la norépinéphrine (tableau 5). Cet effet de potentialisation par la cyclosporine sur la réponse à la norépinéphrine est décrit pour le système artériel périphérique chez le chien (38, 41, 104). Garr et al. l'ont également démontré chez le rat. Ce phénomène de potentialisation de la cyclosporine s'explique soit par une augmentation de la neurotransmission adrénergique (44), soit par son action directe sur le muscle lisse (28) ou soit par blocage de la recapture de norépinéphrine et/ou modulation des récepteurs présynaptiques (44).

Dans la dernière partie de l'expérience in vivo chez le chien, la sympathectomie lombaire chirurgicale prévient la vasoconstriction de la veine saphène lors de la perfusion prolongée de cyclosporine. Les niveaux de cyclosporine demeurent élevés dans les groupes de chiens sympathectomisés et non sympathectomisés (figure 6). Ainsi, lors de la perfusion prolongée, l'atteinte de taux sérique élevés mais surtout soutenus de cyclosporine stimule le système nerveux sympathique pour induire une vasoconstriction veineuse périphérique. L'enregistrement de l'activité électrique du système nerveux sympathique périphérique à l'aide d'électrodes a déjà permis de

confirmer l'importance de l'activation du système nerveux sympathique par la cyclosporine. En effet, Moss et al. (19) ont enregistré une augmentation progressive de l'activité du système nerveux sympathique afférent rénal, génitifémoral et hypogastrique chez le rat, augmentation atteignant des valeurs significatives de 60 % environ 70 minutes après le début de la perfusion intraveineuse de cyclosporine.

Chez le chien, *in vivo*, Carrier et al. ont bien démontré que la vasoconstriction artérielle périphérique induite par la cyclosporine nécessite la présence du système nerveux sympathique (38). Au niveau des carotides et au niveau de l'oreillette du cœur du chien, la perfusion de cyclosporine ne cause pas d'augmentation de la vasoconstriction de l'artère fémorale (41, 107). Après la dénervation des chémorécepteurs et des barorécepteurs, l'injection de cyclosporine dans les carotides n'induit pas de vasoconstriction périphérique. Ces expériences suggèrent qu'un des sites d'action de la cyclosporine sur le système artériel est périphérique plutôt que central ou réflexe médié par les récepteurs carotidiens. Tronc et al. ont montré que la cyclosporine agit au niveau artériel périphérique en bloquant le transporteur de la recapture de la norépinéphrine au bouton présynaptique (41, 42, 43).

La vasoconstriction artérielle est immédiate lorsque la cyclosporine est perfusée dans l'artère canine périphérique (44). Par contre, lors d'une perfusion intraveineuse de cyclosporine la vasoconstriction artérielle périphérique apparaît plus tardivement (102, 145). Nos résultats confirment ces observations puisque la pression artérielle est demeurée constante pendant la perfusion intraveineuse de cyclosporine d'une heure. L'augmentation de la pression veineuse périphérique débute environ 30 minutes après le début de la perfusion et elle est très significative à 60 minutes. Cette augmentation dans la résistance veineuse périphérique est complètement bloquée par la sympathectomie lombaire chirurgicale. Dans le groupe de chiens sympathectomisés, l'effet de potentialisation de la norépinéphrine disparaît (tableau 5). L'effet de potentialisation de la cyclosporine sur la veine saphène nécessite que l'influx du système sympathique soit intact. La cyclosporine traverse la barrière hémato-encéphalique et elle est responsable parfois de toxicité neurologique (118, 119). Étant donné le délai prolongé avant la mise en évidence de la vénoconstriction, nous postulons l'existence d'un mécanisme de stimulation central pour expliquer l'augmentation progressive de l'activité du système nerveux sympathique périphérique. Les mécanismes de cette stimulation sont inconnus. Toutefois, ceci n'exclut pas qu'un effet périphérique se conjugue à l'effet central. L'ajout de bloqueur de la NE dans la veine saphène aurait pu infirmer l'existence d'un effet local de la cyclosporine.

Dans le modèle expérimental *in vivo* la cyclosporine est utilisée sous sa forme pure diluée dans le plasma de l'animal. Cela permet l'étude des effets de la cyclosporine seule sur le système veineux périphérique. Cependant en clinique, la cyclosporine doit être diluée dans un véhicule liposoluble pour l'injection intraveineuse. Sa formulation est composée de cyclosporine diluée dans l'huile de castor oxyéthylée, le cremophore. Dans le modèle expérimental *in vitro*, la cyclosporine est toujours diluée dans le cremophore et son groupe contrôle est constitué de cremophore seul.

In vitro, la cyclosporine induit une vasoconstriction significative de la veine saphène intacte. Cette vasoconstriction est proportionnelle à la dose utilisée (figure 7). En présence de l'endothélium, la veine saphène se contracte moins que sans endothélium bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative (figure 7). En accord avec nos résultats la littérature nous révèle que la cyclosporine vasoconstricte le muscle lisse vasculaire (28, 32, 121). L'endothélium exerce un effet vasodilatateur via la production de prostacyclines vasodilatatrices (148) et/ou via la production d'EDRFs (146, 154, 155). Dans notre expérience, en présence d'endothélium, la dilatation de la veine saphène est non significative. Ceci peut s'expliquer en partie par la faible quantité d'oxide nitrique relaché par les veines tel que l'on démontré plusieurs auteurs (101, 149, 161).

Tout comme la cyclosporine, le cremophore induit une vasoconstriction proportionnelle à la dose utilisée sur la veine saphène intacte (figure 8). Puisque les deux courbes de vasoconstriction sont superposables, le cremophore semble responsable à lui seul de cette vasoconstriction (figure 8). La littérature rapporte que le cremophore vasoconstricte le système artériel rénal et qu'il diminue le taux de filtration glomérulaire (108, 109, 110, 111). Chez le lapin, le cremophore induit une vasoconstriction dose dépendante de la veine jugulaire (123). Cet effet vasoconstricteur du cremophore est inhibé par l'ifetroban et le glyburide, deux antagonistes des récepteurs de la thromboxane A2. De plus, une des composantes principales du cremophore, l'acide ricinoléique est capable d'activer les récepteurs de la thromboxane A2.

La cyclosporine inhibe la relaxation endothélium-dépendante (3, 30, 31, 33, 35, 36, 37) et favorise la contraction musculaire lisse vasculaire (153). Selon Gallego et al. (36) la cyclosporine endommage les mécanismes de vasorelaxation dépendant de l'endothélium reliés à la production de l'oxide nitrique.

Lorsque la veine est dénudée de son endothélium, la cyclosporine induit une vasoconstriction plus importante que le cremophore seul. Le maximum de

contraction atteint est significativement plus élevé ce qui démontre une plus grande activité de la cyclosporine et la courbe de la cyclosporine est déplacé vers la gauche indiquant une sensibilité accrue de la veine saphène à la cyclosporine (figure 9).

Ainsi, l'action de la cyclosporine est mise davantage en évidence lorsque l'endothélium est dénudé. Ces résultats sont compatibles avec la production par l'endothélium d'une substance vasodilatatrice qui s'oppose à l'effet vasoconstricteur de la cyclosporine. Cette substance pourrait être un des EDRFs relâché par l'endothélium veineux.

L'ajout d'indométhacine dans la chambre tissulaire bloque la cyclo-oxygénase et conséquemment la production de toutes les prostanoïdes relâchées par la veine. Les valeurs de contraction maximales de la veine saphène s'abaissent de façon significatives en présence d'indométhacine (figure 10 et 11) autant pour la cyclosporine que le cremophore et ce avec ou sans endothélium (tableau 6). Les valeurs de concentration auxquelles on obtient 50% de l'effet maximal sont identiques avec ou sans indométhacine (tableau 7). En présence d'indométhacine, les valeurs maximales observées sont significativement plus faibles dans toutes les expériences. Nous concluons à la présence d'un prostanoïde vasoconstricteur dont la relâche pourrait être stimulée par le cremophore, le seul agent pharmacologique présent en tout temps dans le bain tissulaire. La littérature rapporte que la veine

saphène intacte produit aussi des prostanoïdes vasodilatateurs et inhibiteurs de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire. Nos résultats évoquent davantage la prédominance d'un effet vasoconstricteur des prostanoïdes.

In vitro, lorsque la veine saphène sans endothélium est exposée à l'indométhacine dans le bain tissulaire on constate que la cyclosporine induit une vasoconstriction plus importante que le cremophore. La différence est significative pour les concentrations de 10^{-5} M et $10^{-4.5}$ M et non significative pour la valeur de concentration maximale (10^{-4} M). Cette dernière valeur maximale atteint presque la signification statistique (figure 10). Dans les mêmes conditions expérimentales, lorsque la veine saphène intacte est exposée à l'indométhacine, les courbes de vasoconstriction de la cyclosporine et du cremophore sont superposables (figure 11). L'indométhacine ne bloque pas l'effet de vasodilatation conféré par l'endothélium. Ainsi, on postule que l'agent relâché par l'endothélium n'est pas de la famille des prostanoïdes cyclo-oxygénase dépendant. Cet agent pourrait être un des EDRFs non lié aux prostanoïdes tel que l'oxide nitrique..

L'agent prostanoïde vasoconstricteur peut provenir de plusieurs sources. Schultze et al 1984 (156) démontrent que la cyclosporine (Sandoz) entraîne la relâche de prostanoïdes par des monocytes-macrophages. Grace et al. (157) démontrent que la

cyclosporine stimule la relâche de thromboxane A₂ des plaquettes. La présence de plaquettes ou de cellules immunitaires dans le bain tissulaire peut expliquer la présence de facteurs prostanoïdes. Cette hypothèse est faible puisque les veines saphènes sont bien rincées dans le bain tissulaire avec la perfusion de Krebs Ringer. Ce prostanoides pourrait être relâché par l'endothélium. En l'absence d'endothélium, certains auteurs démontrent que les cellules myointimale de la veine sécrètent des prostacyclines vasoconstrictrices (158). D'autres études portant sur la préservation des veines démontrent la production de prostaglandines et de thromboxanes par le muscle lisse de la veine saphène canine (159). Dans notre étude, la présence de l'endothélium n'influence pas l'effet inhibiteur de l'indométhacine sur la vasoconstriction. Ainsi, cet agent prostanoides pourrait être relâché par les cellules myointimales de la veine saphène. Quand à l'adventice, aucunes études ne s'est interrogée sur la possibilité que l'adventice puisse être la source des prostanoïdes.

8. CONCLUSION

In vivo, nous avons démontré que la cyclosporine cause une vénoconstriction du système périphérique chez le chien et qu'elle potentialise les effets vasoconstricteurs de la norépinéphrine sur la veine saphène. Cette vénoconstriction est secondaire à la stimulation du système nerveux sympathique. Nous croyons que la cyclosporine agit au niveau du système nerveux central pour augmenter l'activation du système nerveux sympathique périphérique. In vitro, le véhicule de la cyclosporine, le cremophore cause une vasoconstriction veineuse significative. Nous croyons que le cremophore induit la relache d'un prostanoidé vasoconstricteur dans le bain tissulaire. La cyclosporine induit une vasoconstriction de la veine saphène canine par son action directe sur le muscle lisse. Dans ce système, l'endothélium agit comme modulateur via la production de substances venodilatatrices.

Figure 1. Schéma du montage in vitro; chambre tissulaire pour l'étude isolée des vaisseaux sanguins.

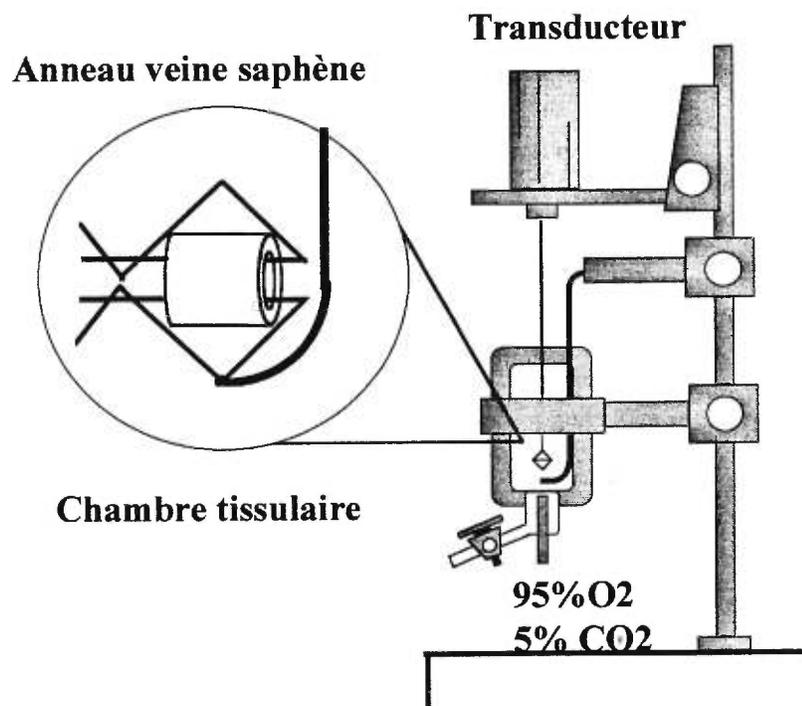


Figure 2. Schéma du modèle expérimental in vivo.
Perfusion isolée de la veine saphène chez le chien.

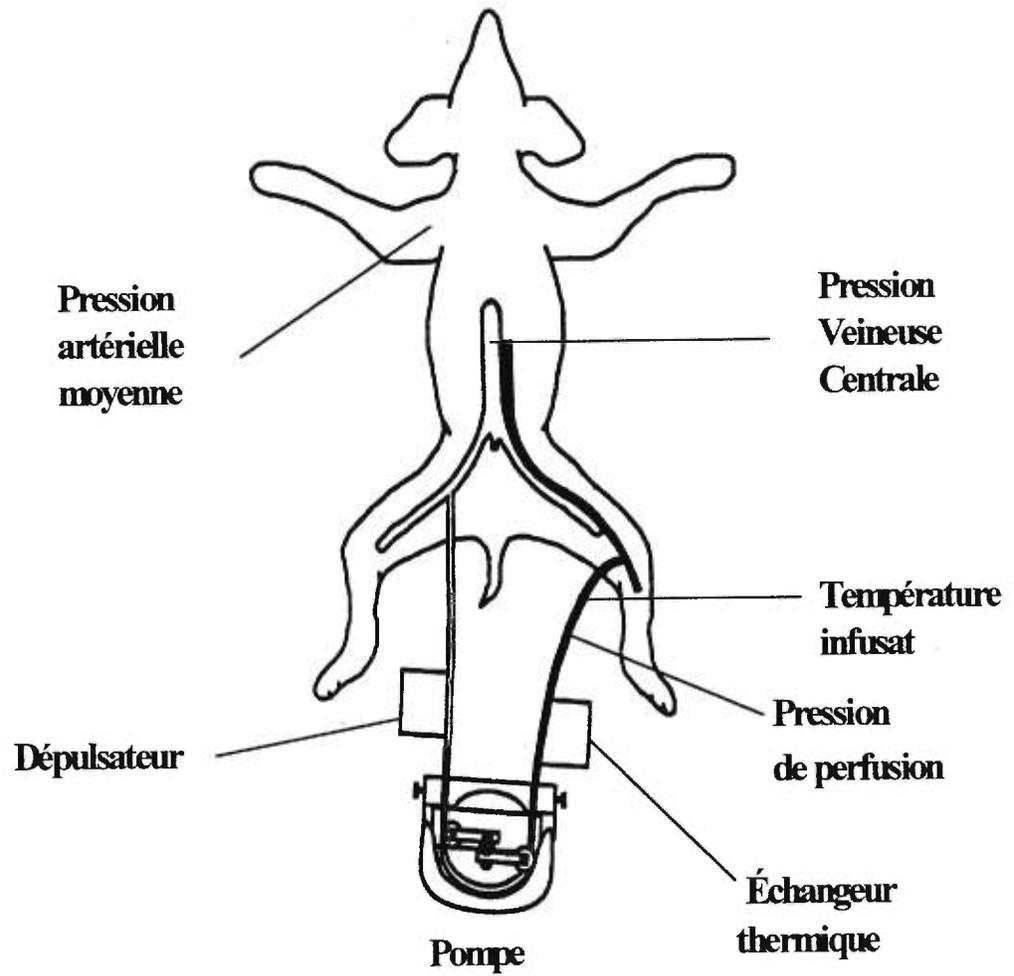
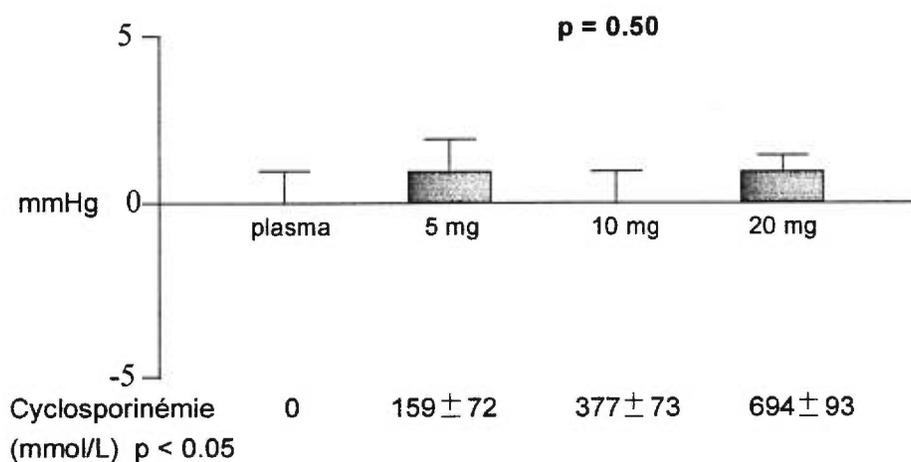


Figure 3. Effet de la perfusion de bolus de 5mg, 10mg et 20 mg de cyclosporine sur la pression de perfusion de la veine saphène.



La cyclosporine n'induit pas de changement significatif de la pression de perfusion de la veine saphène.

Légende:

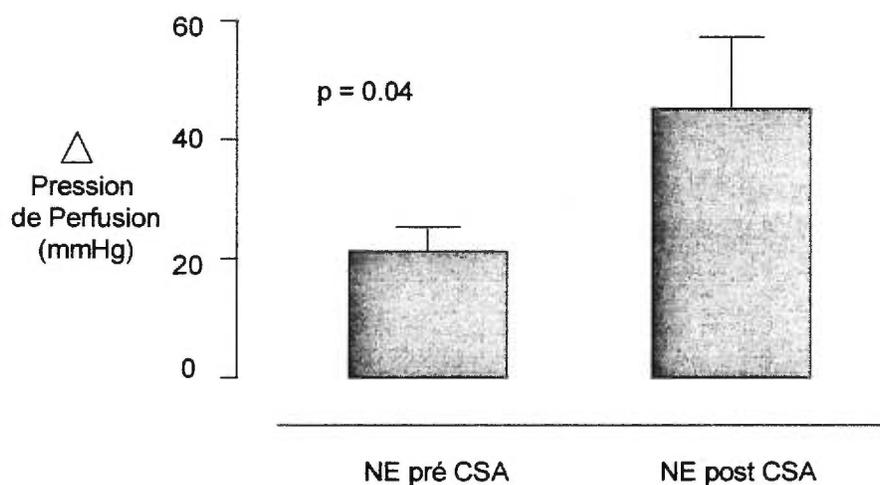
Plasma = perfusion de 25cc de plasma en 10 minutes.

5 mg = perfusion de 5mg de cyclosporine diluée dans 25cc de plasma en 10 minutes.

10 mg = perfusion de 10mg de cyclosporine diluée dans 25cc de plasma en 10 minutes.

20 mg = perfusion de 20 mg de cyclosporine diluée dans 25cc de plasma en 10minutes

Figure 4. Effet de 12 μ g de norépinéphrine sur la réactivité de la veine saphène avant et après la perfusion de 5mg, 10mg et 20mg de cyclosporine.



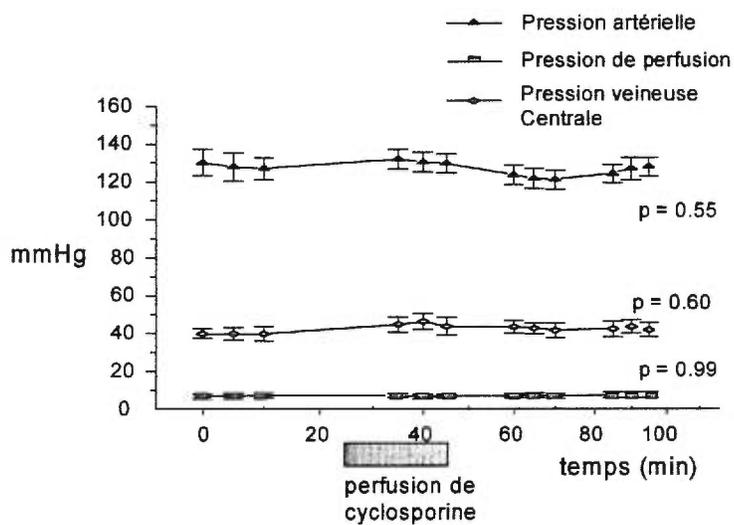
La cyclosporine potentialise l'effet de la norépinéphrine sur la pression de perfusion de la veine saphène ($p = 0.04$).

Légende:

NE = Norépinéphrine; CSA = Cyclosporine.

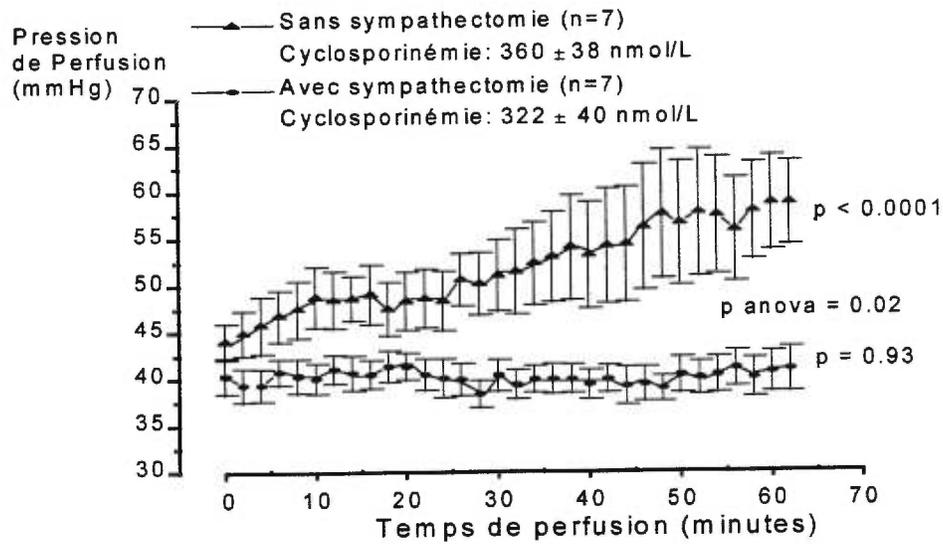
Δ Pression de Perfusion = La variation de la pression de perfusion.

Figure 5. Variation de la pression veineuse centrale, de la pression de perfusion et de la pression artérielle lors d'une brève perfusion de 20mg de cyclosporine au cours de l'expérience.



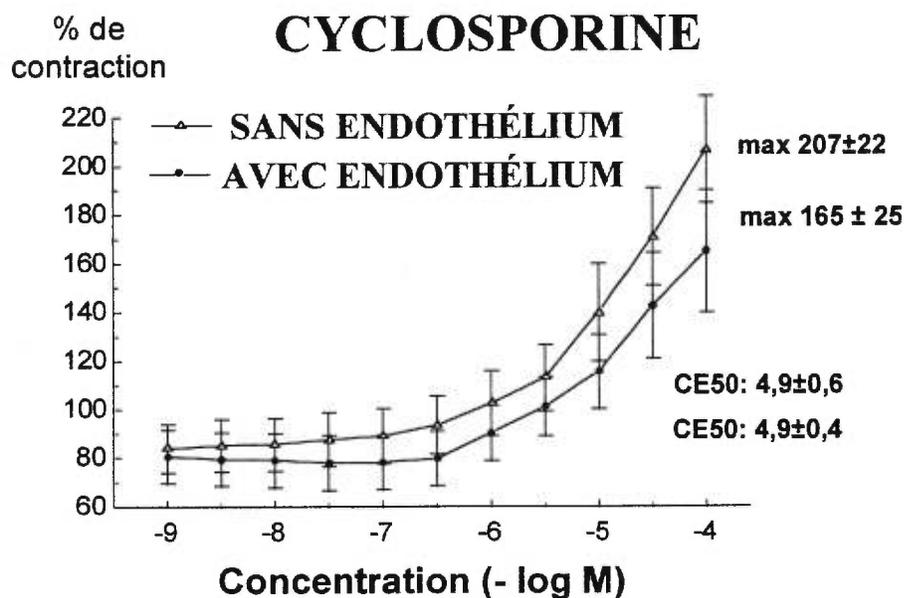
Au cours de l'expérience, on ne note aucun changement significatif dans la pression veineuse centrale, la pression de perfusion et la pression artérielle moyenne.

Figure 6. Effet de la perfusion prolongée de 30 mg de cyclosporine sur une période de 60 minutes sur la pression de perfusion de la veine saphène chez des chiens sympathectomisés et non sympathectomisés.



Une élévation significative ($p < 0.0001$) de la pression de perfusion de la veine saphène est observée dans le groupe sans sympathectomie alors que la pression de perfusion n'augmente pas chez les chiens après une sympathectomie lombaire.

Figure 7. Effet de la cyclosporine sur la veine saphène avec et sans endothélium.



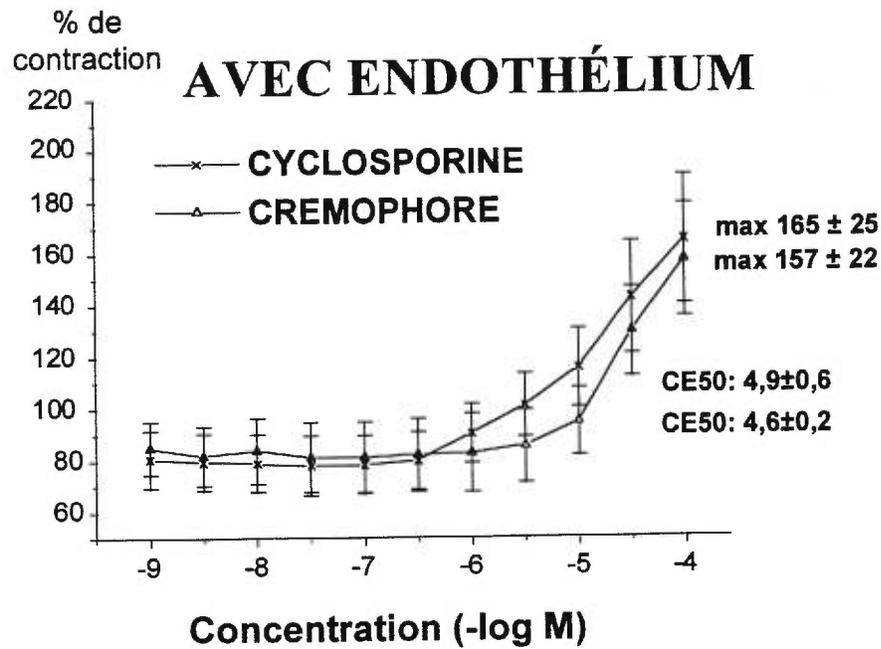
La cyclosporine induit une vasoconstriction statistiquement significative de la veine saphène intacte ($p < 0,0001$). Cette vasoconstriction est dépendante de la dose utilisée. La présence de l'endothélium n'influence pas la vasoconstriction médiée par la cyclosporine.

Légende:

CE50 = Concentration efficace pour obtenir 50% de l'effet maximal

Max = Contraction maximale.

Figure 8. Effet de la cyclosporine et du cremophore sur la veine saphène canine en présence de l'endothélium



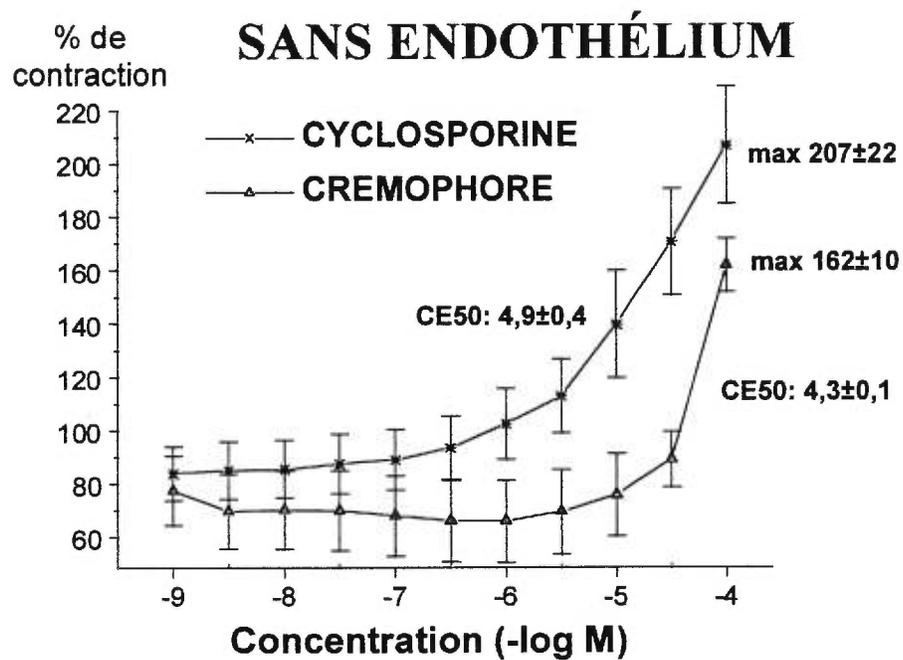
Le cremophore induit une vasoconstriction similaire à celle de la cyclosporine (CE50 et max).

Légende:

CE50 = Concentration efficace pour obtenir 50% de l'effet maximal

Max = Contraction maximale.

Figure 9. Effet de la cyclosporine et du cremophore sur la veine saphène canine sans endothélium.



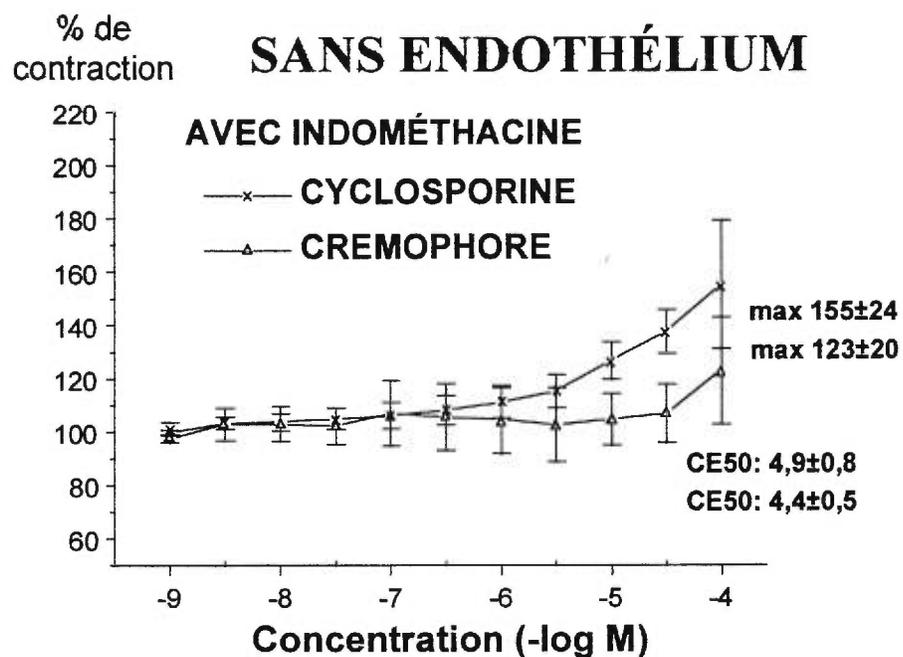
La cyclosporine induit une vasoconstriction statistiquement plus importante que son véhicule, le cremophore (CE50 et max).

Légende:

CE50 = Concentration efficace pour obtenir 50% de l'effet maximal

Max = Contraction maximale.

Figure 10. Effet de la cyclosporine et du cremophore sur la veine saphène canine sans endothélium en présence d'indométhacine.



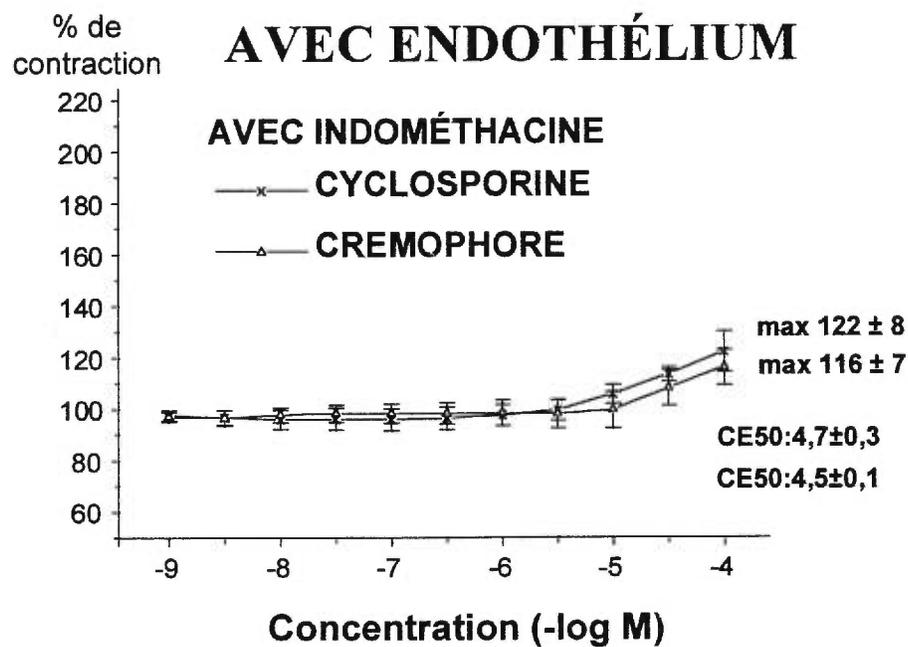
La cyclosporine induit une vasoconstriction similaire au cremophore (CE50 et Max).

Légende:

CE50 = Concentration efficace pour obtenir 50% de l'effet maximal

Max = Contraction maximale.

Figure 11. Effet de la cyclosporine et du cremophore sur la veine saphène canine avec endothélium en présence d'indométhacine.



La cyclosporine induit une vasoconstriction similaire au cremophore (CE50 et Max).

Légende:

CE50 = Concentration efficace pour obtenir 50% de l'effet maximal

Max = Contraction maximale.

Tableau I. Température centrale de l'animal et température de l'infusât aux cours des expériences.

| Expérience | Température centrale | Température infusât | Poids |
|----------------|----------------------|---------------------|------------|
| 1 | 38.0±.1 | 37.4±.1 | 23.6±1.4 |
| 2 | 37.5±.2 | 37.7±.1 | 22.8±1.4 |
| 3 | 38.1±.1 | 37.5±.2 | 22.4±.2 |
| 4 | 38.2±.3 | 37.7±.1 | 22.3±.3 |
| P anova | .06 | .23 | .83 |

Tableau II. Valeurs du Ph, de la PO₂, et de la PCO₂ aux cours des expériences.

| Expérience | pH | PCO ₂ | PO ₂ |
|----------------|------------|------------------|-----------------|
| 1 | 7.41±.02 | 39.95±1.50 | 263±23 |
| 2 | 7.40±.01 | 34.13±1.69 | 218±45 |
| 3 | 7.39±.02 | 36.37±2.26 | 148±4 |
| 4 | 7.41±.01 | 35.97±1.35 | 161±37 |
| p anova | .29 | .142 | .07 |

Légende:

Expérience 1: Effet dose dépendante de la cyclosporine.

Expérience 2: Effet d'une brève perfusion de cyclosporine.

Expérience 3: Effet d'une perfusion prolongée de cyclosporine.

Expérience 4: Effet de la cyclosporine après une sympathectomie lombaire.

Tableau III. Effet de la perfusion de cyclosporine de 5mg, 10mg et 20mg sur la pression veineuse centrale, la pression artérielle moyenne et la pression de perfusion veineuse.

| | plasma | 5mg | 10mg | 20mg | p |
|------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------|
| Δ PVC (mmHg) | 0.4 \pm 0.3 | 0.2 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.1 | 0.1 \pm 0.1 | 0.68 |
| Δ PAM (mmHg) | 4 \pm 3 | 4 \pm 2 | 2 \pm 1 | 5 \pm 2 | 0.38 |
| Δ PP (mmHg) | 0 \pm 1 | 1 \pm 1 | 0 \pm 1 | 1 \pm 1 | 0.81 |
| Cyclosporinémie (mmol/Litre) | 0 | 159 \pm 72 | 377 \pm 73 | 694 \pm 93 | < 0.05 |

La Pression veineuse centrale (PVC), la pression artérielle moyenne (PAM) et la pression de perfusion (PP) n'ont pas varié de façon significative au cours des perfusions de cyclosporine.

Légende:

Δ PVC : Variation de la pression veineuse centrale.

Δ PAM : Variation de la pression artérielle moyenne.

Δ PP : Variation de la pression de perfusion.

Tableau IV. Effet de la norépinéphrine sur la pression de perfusion avant et après une courte perfusion de cyclosporine.

| | (mmHg) | <i>Avant la perfusion de CSA</i> | <i>Pendant la perfusion de CSA 20 mg</i> | <i>Après la perfusion de CSA 20mg</i> | <i>p anova</i> |
|----------------|--------------------------------|----------------------------------|--|---------------------------------------|----------------|
| 6 µg NE | <i>Press. perf. Base</i> | 40±2 | 45±4 | 44±5 | .21 |
| | <i>Press. perf. Max</i> | 69±9 | 73±7 | 63±4 | .45 |
| | <i>Aug. de la Press. perf.</i> | *28±8 | **28±8 | ***19±5 | .34 |
| 12µg NE | <i>Press. perf. base</i> | 40±3 | 46±4 | 43±3 | .07 |
| | <i>Press. perf. Max</i> | 91±13 | 89±11 | 82±6 | .60 |
| | <i>Aug. de la Press. perf.</i> | *51±13 | **43±11 | ***39±7 | .48 |
| 24µg NE | <i>Press. perf. base</i> | 40±4 | 44±3 | 42±4 | .09 |
| | <i>Press. perf. Max</i> | 98±11 | 101±13 | 95±7 | .84 |
| | <i>Aug. de la Press. perf.</i> | 58±11 | **57±13 | ***54±8 | .89 |

* p=.03 ** p=.005 *** p<.001

Légende:

Press. Perf. = Pression de perfusion; Aug. = Augmentation

NE = norépinéphrine ; µg = microgramme

Tableau V. Effet de la norépinéphrine sur la pression de perfusion avant et après une perfusion prolongée de cyclosporine.

| | Groupe Témoin | | Sympathectomie Chirurgicale | |
|-----------------|---------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| | avant CSA (mmHg) | après CSA (mmHg) | avant CSA (mmHg) | après CSA (mmHg) |
| 3 µg NE | 25±6 | 45±7 | 45±12 | 35±12 |
| 6 µg NE | 39±9 | 69±13 | 54±14 | 48±15 |
| 12 µg NE | 53±10 | 84±8 | 67±19 | 56±12 |
| P | 0.03 | | 0.64 | |

Légende:

µg = microgramme

NE = norépinéphrine

CSA = Cyclosporine

Tableau VI. Mesure de la contraction maximale (%) obtenue lorsque les veines saphènes du chien sont exposées à la cyclosporine et au cremophore avec et sans endothélium et avec et sans indométhacine.

| | | Contraction maximale (%) | | |
|--------------|---------------|--------------------------|---------------|-------|
| | | Sans | Avec | p |
| | | Indométhacine | Indométhacine | |
| Cyclosporine | Endothélium + | 165 ± 25 | 122 ± 8 | <0.05 |
| | Endothélium - | 207 ± 22 | 155 ± 24 | <0.05 |
| Cremophore | Endothélium + | 157 ± 22 | 116 ± 7 | <0.05 |
| | Endothélium - | 162 ± 10 | 123 ± 20 | <0.05 |

NS = Non significatif; Contrôle = Cremophore, véhicule de la cyclosporine.

Tableau VII. Mesure de CE₅₀ (-logM) obtenue lorsque les veines saphènes du chien sont exposées à la cyclosporine et au cremophore avec et sans endothélium et avec et sans indométhacine.

| | | CE ₅₀ (-logM) (g) | | |
|--------------|---------------|------------------------------|---------------|----|
| | | Sans | Avec | p |
| | | Indométhacine | Indométhacine | |
| Cyclosporine | Endothélium + | 4,9 ± 0,6 | 4,7 ± 0,3 | NS |
| | Endothélium - | 4,9 ± 0,4 | 4,9 ± 0,8 | NS |
| Cremophore | Endothélium + | 4,6 ± 0,2 | 4,5 ± 0,1 | NS |
| | Endothélium - | 4,3 ± 0,1 | 4,4 ± 0,5 | NS |

CE₅₀ = Concentration efficace pour induire 50% de l'effet maximal;

NS = Non significatif; Contrôle = Cremophore, véhicule de la cyclosporine.

BIBLIOGRAPHIE

1. Borel JF, Feurer C, Magnee C, Stahelin H. Biological effects of cyclosporine A: a new antilymphocytic agent. *Agents and actions* 6: 468-475, 1976
2. Kahan BD, *CSA N.Engl.J.Med.* 321, 1725-28, 1989.
3. Kahan BD, Grevel J Optimization of cyclosporine therapy in renal transplantation by a pharmacokinetic strategy, *Transplantation*, 46, 631-644, 1988.
4. Wood AJ. Pharmacologic aspects of cyclosporine therapy, pharmacokinetics. *Transplantation Proceedings*; vol 17; 2732-2733, 1990.
5. European Multicenter Trial Group. Cyclosporine in cadaveric renal transplantation: one year follow up of a Multicenter trial. *Lancet* 1, 986-990, 1983.
6. Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC, *Principles of Surgery*, Mc Graw Hill, 6th ed , 377-455, 1994.
7. Faulds D, Gao K, Benfield P. Cyclosporine, a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs* 45, 6, 953-1040, 1993.
8. Kivisto KT, A review of assay methods for cyclosporin Clinical implication, *Clin. Pharmacokin.* 23, 3, 173-190, 1992.

9. Whiting PH, Thomson AW, Simpson JG. Cyclosporine: toxicity, metabolism, and drug interactions-- implications from animal studies. *Transplantation Proceedings XVII*, 4, suppl 1, 1985.
10. Mc Griffin DC, Kirklin JK, Naftel DC. Acute renal failure after heart transplantation and cyclosporine therapy. *Heart Transplant*, 4, 396-399, 1985.
11. Olivari MT, Antolick A, Ring WS. Arterial hypertension in heart transplant recipients treated with triple drug immunosuppressive therapy. *J. Heart Transplant* 8, 34-39, 1989.
12. Bennet WM, Pullman JP, Cyclosporine A Nephrotoxicity, *Ann. Inter. Med.* 305, 267-273, 1983.
13. Gao SZ, Schoeder JS, Aldermen EL, et al. Prevalence of accelerated coronary artery disease in heart transplant survivors, comparison of cyclosporine and azathioprine regimens. *Circulation* 80: (suppl): III100- III105, 1989.
14. Scherrer U, Vissing SF, Morgan BJ et al. CSA induced sympathetic activation and hypertension after heart transplantation. *N.Engl.J.Med.* 323, 693-699, 1990.
15. Kirk AJ, Omar B, Bateman DN, Dark JH Cyclosporine associated hypertension in cardiopulmonary transplantation. Beneficial effect of nifedipine on renal function. *Transplantation*, 48, 428-430, 1989.

16. Thompson ME, Shapiro AP, Johnsen AM et al. New onset of HTA following cardiac Transplant. *Transplant. Proc.* 15 suppl 1, 2573-77.
17. Bellet M, Cabrol C, Sassano P, Leger P, Courol P, Menard J. Systemic Hypertension after cardiac transplant: Effect of cyclosporine on the renin angiotensin-aldosterone system. *Am J Cardiol.* 56, 927-31, 1985.
18. Kaye D, Thompson J, Jennings G, Esler M. Cyclosporine therapy after cardiac transplantation causes hypertension and renal vasoconstriction without sympathetic activation. *Circulation* 88, 1101-1109, 1993.
19. Moss NG, Powell SL, Salk RJ. Intravenous CSA activates afferent and efferent renal nerves and causes Na⁺ retention in innervated kidney rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 8222-8226, 1985.
20. Morgan BJ, Scherrer U, Pryor SL, Kim C, Victor RG. Cyclosporine reflexly increases arterial pressure in rats. *FASEB J*, 3, A1145, 1989.
21. Whithworth et al. Hemodynamic effects of Cyclosporine A in Sheep. *Clin. and exp. pharm and phys.* 14, 573-580, 1987.
22. Chapman JR, Marcen R, Arias M, Raine AEG, Dunnill MS. More HTA after renal transplantation a comparison of CSA immunosuppression, *Transplantation*, 43, 860-64, 1987.

23. Kiberd BA, Cyclosporine induced renal dysfunction in human renal allograft recipients. *Transplantation* 48, 965-969, 1989.
24. Curtis JJ, Luke RG, Jones P and Diethelm AG. Hypertension in cyclosporine treated renal transplant is Na-dependent. *Am.J.Med.* 85, 134-138, 1988.
25. Curtis JJ, Dubovsky E, Welchel JD, Luke RG, Diethelm AG and Jones P. Cyclosporine A in therapeutic doses increases renal allograft vascular resistance. *Lancet* 2, 477-479, 1986.
26. Oyer PE, Stinson EB, Jamieson SW, et al. *Transplantation* proceeding 15, 1247, 1983.
27. Weidle PJ, Wasse PH. Systemic hypertension associated with cyclosporine. *Review Drug Intell. Clin. Pharm.* 22,443-450, 1988.
28. Cartier R, Dagenais F, Hollman C, Cambron H, Buluran J Chronic exposure to cyclosporin affects endothelial and smooth muscle reactivity in the rat aorta. unpublished.
29. Lamb FS et al. CSA augments reactivity of isolated blood vessels. *Life Science*, 40, 2571-2578, 1987.
30. Golub MS, Lustig S, Berger ME, Lee DBN. Altered vascular responses in CSA treated rats. *Transplantation* 48, 116-118, 1989.

31. Lustig S, Stern N, Lee DBN et al. Mechanisms of cyclosporine A hypertension. *Transplantation Proc.* 19, 1262-64, 1987.
32. Xue HR, Bukoski RD, Mc Carron A and Bennett WM. Induction of contraction in isolated rat aorta by cyclosporine. *Transplantation* 43, 715-718, 1987.
33. Diederich D, Zhihong Y, Luscher TF Chronic cyclosporine therapy impairs endothelium-dependant relaxation in the renal artery in the rat. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2, 1291-97, 1992.
34. Rego A, Vargas R, Foegh ML, Ramwell PW. Effects of CSA treatment on vascular reactivity of the thoracic aorta. *Transplant Proc.* 20 (suppl 3) 572-577, 1988.
35. Bossaler C, Forsterman U, Hertel R, Olbright C, Reschke V, Fleck E Cyclosporine inhibits endothelium dependent vasodilatation and vascular prostacycline production. *Eur. J. Pharmacology* 165, 165-169, 1989.
36. Gallego MJ, Villalon G, Lopez Farre A, Garcia J, Giarron MP, et al Mechanisms of endothelial toxicity of cyclosporin A: role of nitric oxide, cGMP, and Ca. *Circ. research.* 74, 477-484, 1994.

37. Richards NT, Poston L, Hilton PJ Cyclosporine inhibits but does not induce vasoconstriction in human subcutaneous resistance vessels. *J Hypertension*, 7, 1-3, 1989.
38. Carrier M, Pelletier C Effect of direct injection of cyclosporin on the arterial vessels of the isolated hind limb in the dog. *Can. J. Cardiology*. 7, 2, 1991.
39. Whithworth et al. Hemodynamic effects of Cyclosporine A in Sheep. *Clin. and exp. pharm and phys.* 14, 573-580, 1987.
40. Lyson T, McMullan M, Ermel LD, Morgan BJ, Victor RG, Mechanism of cyclosporine-induced sympathetic activation and acute hypertension in rats. *Hypertension* 23, 667-675, 1994.
41. Tronc F, Carrier M, Pelletier C. Mechanism of hind limb vasoconstriction due to cyclosporine A in the dog. *Circulation Research* 71, 1159-64, 1992.
42. Raiteri M, Levi G. A reinterpretation of tryramine sympathomimetic effect and tachyphylaxis. *J. Neuroscience Res.*, 16, 439-441, 1986.
43. Fillenz M. *Noradrenergic neurons* . Cambridge University Press. New York, 1-229, 1990.
44. Goldstein DS. Plasma catecholamines and essential hypertension. *Analytical Review. Hypertension*. 5, 86-99, 1983.

45. Nicchitta CV, Kamoun AL, Williamson JR. Cyclosporine augments receptors mediated cellular calcium fluxes in isolated hepatocytes. *J. Bioc. Chem.* 260, 1361-1363, 1985.
46. Meyer Lehnert H, Schrier RW. Potential mechanism of cyclosporine A induced vascular smooth muscle contraction. *Hypertension.* 13, 352-60, 1989.
47. Jao S, Waltzer W, Albeit LA Acute cyclosporine induced decrease in GFR is mediated by changes in renal blood flow and renal vascular resistance. *Kidney Int.* 29, 431, 1986.(abstract)
48. Churchill PC, Rossi NF, Bidani AK and Mc Donald FD. Acute CSA induced renal vasoconstriction lack of effect of theophylline. *Am. J. Physiology*, 258, F41-45, 1990.
49. Murray BM, Paller MS, Ferris TF. Effects of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. *Kidney Int.* 28, 767, 1985.
50. Weir M, Klassen DK, Shen SY, Sullivan D, Buddemeyer EU and Hanwerger BS. Acute effects of IV Cyclosporine A on blood pressure, renal hemodynamics and urine prostaglandin production of healthy human. *Transplantation.* 49, 41-47, 1990.

51. Weir M, Klassen DK, Shen SY, Sullivan D, Buddemeyer EU and Hanwerger BS. Acute effects of IV cyclosporine on renal function in healthy humans. *Transplant Proc.* 21, 915-917, 1989.
52. Murray BM, Paller MS. Beneficial effects of renal denervation and prazosin on GFR and renal blood flow after cyclosporine in rats. *Clin. Nephrol.* 25, S37-39, 1986.
53. English JA, Evans DC, Houghton and Bennett WM. Cyclosporine induced acute renal dysfunction in rat; evidence of arteriolar vasoconstriction with preservation of tubular function. *Transplantation* 44, 135-141, 1987.
54. Gerkens JF Cyclosporine treatment of normal rats produces a rise in blood pressure and a decrease in renal vascular response to nerve stimulation, vasoconstrictors, and endothelium dependant dilators. *J.Pharmacol. Exp. Ther.* 250, 1105-1112, 1989.
55. Barthelmebs M, Billing A, Stephan D, Krieger JP, Grima M, Imbs JL, Modification de la réactivité vasculaire rénale endothélium-dépendante par la cyclosporine A *Arch Mal Coeur* 86, 1233-35, 1993.
56. Gallego MJ, Lopez Farre A, Riesco A, et al. Blockade of endothelium-dependent responses in conscious rats by cyclosporin A: effect of L-arginine. *Am J physiol.* 264 H708-H714, 1993.

57. Luscher TF, Yang Z, Diederich D, Buhler FR. Endothelium-dependent vascular responses, effects of hypertension and CSA. *Zeitschrift für Kardiologie* 78: suppl, 132-136, 1989.
58. Kaskel FJ, Devarajan P, Arbeit LA, Partin JS, Moore LC. Cyclosporine nephrotoxicity: Na excretion, autoregulation and angiotensin II. *Am. J. Physiol.* 252, F733-F742, 1987.
59. Carrier M, Tronc F, Stewart D, Pelletier LC. Dose dependent effect of cyclosporin on renal arterial resistance in dog. *Physiology*. 261, H1791-H1796, 1991.
60. Coleman TG, Norman RA, Young DB. Mechanisms of essential hypertension. In Guyton AC *Arterial Pressure and Hypertension* WB Saunders 457-470, 1980.
61. Coffman TM, Carr DR, Yarger WE, Klotman PE. Evidence that renal prostaglandin and thromboxane production is stimulated in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation*. 43, 282-285, 1987.
62. Perico N, Benigni A, Zoja C, Delaini F, Renuzzi G. Functional significance of exaggerated renal TxA₂ synthesis induced by cyclosporine A. *Am. J. Physiol.* 251, F581-587, 1986.
63. Carrier M, Tronc F, Pelletier MD, Latour JG. Rôle of Thromboxane and angiotensin in cyclosporine-induced renal vasoconstriction in the dog. *J. Heart Transplant* 12, 851-855, 1993.

64. Lerman et al Mayo. Endothelin a new cardiovascular regulatory peptide. Clin.Proc. 65, 1441-1455, 1990.
65. Carrier M, Tronc F, Stewart D, Nattel S, Pelletier CL. Blockade of cyclosporine-induced vasoconstriction by the calcium channel blocker diltiazem in dogs. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 106, 487-490, 1993.
66. Bunchman TE, Brookshire CA. Cyclosporine induced synthesis of endothelin by cultured human endothelial cells. J.Clin.Invest. 88, 310-314, 1991.
67. Nakahama H. Stimulatory effect of cyclosporine A on endothelin secretion by a cultured renal epithelial cell line LLC-PK1 cells. Eur. J. Pharmacol. 180, 191-192, 1990.
- 68 Shepherd JT, Vanhoutte PM Veins and their control WB Saunders Co. London-Philadelphie. 1-269, 1975.
- 69 Strichartz GR, Robotham JL The Control of vascular Tone. introductory comments Anesthesiology 79, 1367, 1993.
- 70 Roger AJ Endothelium, Anesthetics, and vascular control Anesthesiology 79, 1381-1391, 1993.

71. Vanhoutte PM The role of the systemic veins: an update, *Plebology*, 3, 1, 13-25, 1988.

72. Vanhoutte PM Return circulation and Norepinephrine: an update. John Libary. Eurotext Paris 1-14, 1991.

73. Sjöberg T, Anderson KE, Norgren L et al. Comparative effects of some calcium channel blockers on human peripheral arteries and veins. *Acta Physiol. Scand.* 130, 419-427, 1987.

74. Vanhoutte P, Leusen I The reactivity of isolated venous preparations to electrical stimulation. *Arch Gesamte Physiol.* 306, 341-353, 1969.

75. Browse NL, Shepherd JT, Response of veins of canine limb to aortic and carotid chemoreceptor stimulation *Am.J.Physio.* 210,1435-1441,1966.

76. Browse NL, Shepherd JT, Donald DE Differences in responses in veins and resistance vessels to some stimulus. *Am J. Physiology*, 211, 1241-1247, 1966.

77. Webb-Peploe MM, Shepherd JT, response of large hindlimb veins of the dog to sympathetic nerve stimulation, *Am.J.Physiology*, 215, 2, 299-307, 1968.

78. Webb-Peploe MM, Sheperd JT Responses of the superficial limb veins of the dog to changes in temperature. *Circulation res.* 22, 737-746, 1968

79. Webb-Peploe MM, Sheperd JT Response of dog's cutaneous veins to local and central temperature changes. *Circulation res.* 23, 693-699, 1968.
80. Webb-Peploe MM Cutaneous venoconstrictor response to local cooling in the dog: unexplained inhibition of neuronal re-uptake of NE *Circ.research* 24, 607-615, 1969.
81. Vanhoutte PM. Comparaison of the different responses of the dog's veins to electric stimulation and to NE. *circ.resarch* 34,317, 1974.
82. Vasodilatation: Vascular smooth muscle and autonomic nerves and endothelium. Raven Press New York, 1-551, 1988.
83. Vanhoutte PM, Shepherd JT Effects of cooling on B-receptors Mechanisms in isolated cutaneous veins of the dog. *Microvasc. Research* 2, 454-461, 1970.
84. Vanhoutte P, Shepherd JT Effect of Temperature on the reactivity of isolated cutaneous veins of the dog. *Amer. J. Physiol.* 218, 187-190. 1970.
85. Webb-Peploe MM Cutaneous venoconstrictor response to local cooling in the dog: unexplained inhibition of neuronal re-uptake of NE *Circ.research* 24, 607-615, 1969.

86. Vanhoutte P, Shepherd JT Activity and thermosensitivity of canine saphenous vein after inhibition of monoamine oxidase and catechol-o-methyl transferase. *Circ. Research*, 25, 607-616, 1969.
87. Vanhoutte PM, Flavahan NA Effects of temperature on alpha-adrenoreceptors in limb vein: role of receptors. *Reserve Federation Proc.* 45, 2347-2354, 1986.
88. Glover WE, Greenfield ADM, Kidd BSL, Whelan RF Reaction of the capacity blood vessels of the human forearm to vasoactive substances infused intra-arterially. *J. Physiol.* 140, 113-121, 1958.
89. Bosnjak ZJ Ion channels in vascular smooth muscle: physiology and pharmacology. *Anesthesiology* 79, 1392-1401, 1993
90. Shoukas AA Overall systems analysis of the carotid sinus baroreceptor reflex control of the circulation *Anesthesiology* 79, 1402-1412, 1993.
91. Mancia G, Donald DE, Shepherd JT Inhibition of adrenergic outflow to peripheral blood vessels by vagal afferents from the cardiopulmonary regions in the dog. *Circ. Res.* 33: 713, 1973.
- 92 Pelletier CL, Edis AJ, Shepherd JT Circulatory reflex from vagal afferents in responses to haemorrhage in the dog. *Circ.Res.* 29, 626-634, 1971.

93. Pelletier C, Shepherd JT, Venous responses to stimulation of the carotid chemoreceptors by hypoxia and hypercapnia, *Am.J.Physiol.* 223(1):97-103, 1972.
94. Pelletier CL Circulatory responses to graded stimulation of the carotid chemoreceptors in the dog. *Circ.Research* Vol XXXI, 431-443, 1972.
95. Browse NL, Shepherd JT, Response of veins of canine limb to aortic and carotid chemoreceptor stimulation *Am.J.Physio.* 210,1435-1441,1966.
96. Iizura T, Mark AL, Wendling MF, Schmid PG, Eckstein JW Differences in responses to saphenous and mesenteric veins to reflex stimuli. *Am.J. Physiology* 4, 219-, 1970.
97. Brunner D, Webb-Peploe MM Influence of carotid baroreceptors on different components of the vascular system. *J. Physiol. (London)*, 205, 257, 1969.
98. Daniel W Wayne. *Biostatistics: A foundation for analysis in the health sciences.* 5th Edition: 307-316, 1991.
99. Hintze Jerry L. *Solo user's guide Version 2.0 PMDP Statistical Software*, 191-196, 1988.
100. Kon V, Sugiura M, Imagami T, Harvie PR, Ichikawa I, Hoover RL, Role of endothelin in cyclosporine induced glomerular dysfunction. *Kidney Int* 37, 1487-1491,1990.

101. Miller VM, Vanhoutte PM, Endothelium-dependant contraction to arachidonic acid are mediated by products of cyclo-oxygenase in canine veins. *Am.J.Physiol.* 248, 432-437, 1985.
102. Edwards P, Lloyd MA, Anderson LM, The synergistic effects of cyclosporine and endothelin- demonstration of an important action. *Transplantation* 55, 1, 8-11, 1993.
103. Vanhoutte PM Cholinergische Mechanismen in vasculair glad Spierweefsel. Thesis, Universitaire Instelling, Antwerpen, 1973.
104. Tronc F, Carrier M, Pelletier C Effet de la cyclosporine injectée à dose thérapeutique dans l'artère rénale et fémorale du chien. *Ann Chir.* 45,9, 827-832, 1991.
105. Webb-Peploe MM, Shepherd JT Peripheral mechanisms involved in response of dog's cutaneous veins to local temperature Change. *Circ. Research.* 23, 701-708, 1968c.
106. Vanhoutte PM, Flavahan NA Effects of temperature on alpha-adrenoreceptors in limb vein: role of receptors. *Reserve Federation Proc.* 45, 2347-2354, 1986.

107. Tronc F, Carrier M, Pelletier C, Mechanism of hind limb vasoconstriction due to cyclosporine A in the dog. *Circulation Research* 71, 1159-64, 1992.
108. Besarab A, Jarrell BE, Hirsch S, Carabasi RA, Cressman MD, Green P Use of the isolated kidney model to assess the acute pharmacologic effects of cyclosporine and its vehicle, chremophore el. *Transplantation* 44, 2, 195-201, 1987.
109. Pankaj M, Spatenka J, Slavik Z, O'Neil G, Chester A, Yacoub M, Acute effects of cyclosporine and chremophore el on the endothelial function and vascular smooth muscle in the isolated rat heart. *Cardiovascular drugs and therapy* 6, 77-83, 1992.
110. Thiel G, Hermle M, Brunner FP, Acutely impaired renal function during intravenous administration of cyclosporine A: a chremophore side-effect. *Clinical Nephrology*, 25S1, S40-S42, 1986.
111. Vanrenterghem Y, Lerut T, Roels L, Gruwez J, Michielsens P. Thromboembolic complications and haemostatic changes in cyclosporin-treated cadaveric kidney allograft recipients. *Lancet* may 4 1985.
112. Choudhoury N, Neild GH, Brown Z, Cameron JS Thromboembolic complications in cyclosporin-treated kidney allograft recipients. *Lancet* sept 1985.
113. Allen RD, Michie CA, Morris PJ, Chapman JR Venous thrombosis and cyclosporin. *Lancet* nov, 1985.

114. Bergentz SE, Bergqvist D, Bornmyr S, Brunkwall J, Husberg B Venous thrombosis and cyclosporin. *Lancet* July 1985.
115. Kroskhus TJ, Kshetry VR, Hertz MI, Bolman RM, Deep venous thrombosis and pulmonary embolism after lung transplantation. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 110, 2, 540-544, 1995.
116. Luke DR, Kasiske BL, Matzke GR, Awni WM, Keane NF Effects of cyclosporine on the isolated perfused rat kidney transplantation. 43, 795-804, 1987.
117. Mason J. Cyclosporins past, present, and future. *Transplantation Proceedings* 24, suppl 2, 61-63, 1992a.
118. Mason J. Renal side-effects of cyclosporin A. *British journal of dermatology* 122, suppl 36, 71-77, 1990a.
119. Mason J. The effect of cyclosporine on renal function. *J. of autoimmunity* 5, suppl A, 349-354, 1992b.
120. Mason J. The pathophysiology of sandimmune cyclosporine in man and animals. *Pediatric Nephrology* 4, 554-574, 1990b.
121. Meyer Lehnert H, Schrier RW. Potential mechanism of cyclosporine A induced vascular smooth muscle contraction. *Hypertension*. 13, 352-60, 1989.

122. Lorenz W, Reimann HJ, Schmal A et al. Histamine release in dogs by Chremophor EL and its derivatives: oxethylated oleic acid is the most effective constituent. *J Pharm Med* 7, 63-67, 1977.
123. Lodge J, Nicholas. Direct vasoconstrictor effects of Sandimmune (cyclosporine A) are mediated by its vehicle Chremophor EL: Inhibition by the thromboxane A₂/ prostaglandin endoperoxidase receptor antagonist ifetroban. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. no 2, vol 271, 730-34, 1994.
124. Faulds D, Gao K, Benfield P. Cyclosporine, a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs* 45, 6, 953-1040, 1993.
125. Prud'homme GJ, Vanier LE Short analytical review: cyclosporine, tolerance and autoimmunity. *Clinical immunology and immunopathology*, 66,3, 185-192, 1993.
126. Mason J. The pathophysiology of cyclosporine in man and animals. *Pediatric Nephrology* 4, 686-704, 1990c.
127. Albrechtsen D, Helgerud P, Jakobsen A, Rugstad HE. Blood and intestinal lymph cyclosporine levels in the rat after oral and intravenous medication. *Transplant Proc*. 18,42, 1986.

128. Lemaire M, Tillement JP Role of lipoprotéins and erythrocytes in the vitro binding and distribution of cyclosporin A in the blood. *J.of Pharmacy and Pharmacology* 34, 715-718, 1982.
129. Spragg J, Weinblatt ME, Coblyn J, Fraser P, Austen KF. Effect of cyclosporin on urinary kallikrien excretion in patients with rheumatoid arthritis *J. of lab. and Clinical Medecine* 112: 324-332, 1988.
130. Berg KJ, Forre F, Bterkhoel E, Amundsen O, Djoseland HE, Rugstad B, Westle Side effects of CSA treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Kidney Int.* 29, 1180-87, 1986.
131. Delmonico FL, Conti D, Auchincloss H, Russell PS, Tolckoff-Rubin N, Fang LT, Cosimi AB. Long-term, low-dose Cyclosporine treatment of renal allograft recipients *Transplantation* 49, 899-904, 1990.
132. Bunke M, Wilder L, Martin A. Protection of glomerular filtration rate by the thromboxane receptor antagonist L655,240 during low dose cyclosporine administration. *Prostaglandins* 43, 351-360, 1992.
133. Balligand JL, Godfraind T. Endothelium-derived relaxing factor and muscle-derived relaxing factor in rat aorta: action of cyclosporine A. *J. Cardiovascular Pharmacology* 1991; 17 (suppl3): S213-S221.

134. Textor SC, Canzanello VJ, Taler SJ, Wilson DJ, et al. Cyclosporine-induced hypertension after transplantation. *Mayo Clin Proc* 69, 1182-1193, 1994.
135. Roullet JB, Xue D, McCarron DA et al. Vascular mechanisms of cyclosporin-induced hypertension in the rat. *J Clin Invest* 93, 2244-2250, 1994.
136. Tresham JJ, Withworth JA, Scoggins BA, Bennett WM . Cyclosporine induced hypertension in sheep: role of thromboxane . *Transplantation*. 49, 144-148, 1990.
137. Harper SJ, Moorhouse J, Veitch PS, improved immediate graft function with nifedipine in cyclosporine-treated renal allograft recipients- a randomized prospective study. *transplantation* 54,4, 1992.
138. Yamado Y et al. Cyclosporine age related changes in muscle sympathetic nerve activity in essential hypertension. 13, 870-7, 1989.
139. Steigerwalt S, Mc Curdy R, Smith S, Lockette W Sympathetic Nervous System in cyclosporin hypertension *Transplant Proceeding* 20, suppl III, III341-III345, 1988.
140. DawidsonI, Rooth P, Fry WR, Sandor Z, Willms C, Coopender S, Alway C, Reisch J Prevention of acute cyclosporine induced renal blood flow; inhibition and improved immunosuppression with verapamil. *Transplantation*, 48, 575-80, 1989.

141. Luke RG Mechanism of cyclosporine induced hypertension. *J Am Hypertension*, 4, 468-471, 1991.
142. Allyn M Cyclosporine, sympathetic activity and hypertension. *N.Engl.J.Med.* Vol 323, 11, 748-750, 1990.
143. Kroshus TJ, Kshetry VR, Hertz MI, Bolmann II RM. Deep venous thrombosis and pulmonary embolism after lung transplantation. *Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 110, 540-4, 1995.
144. Bombeli T, Muller M, Straub PW et al. Cyclosporine-induced detachment of vascular endothelial cells initiates the intrinsic coagulation system in plasma and whole blood. *J Lab Clin Med*. 127, 6, 621-34, 621-634.
145. Navarro JF, Mora C, Marcen R, Teruel JL, Gamez C et al. Acute cardiovascular effects of intravenous cyclosporine. *Int Urol Nephrol* 28, 4, 575-81, 1996.
146. Stein CM, He H, Pincus T, Wood AJ. Cyclosporine impairs vasodilatation without increased sympathetic activity in humans. *Hypertension*. 26, 4, 705-710, 1995.
147. Chua Yeow L, Pearson PJ, Evora PRB, Schaff HV. Detection of intraluminal release of endothelium-derived relaxing factor from human saphenous veins. *Circulation*. 88,128-132, 1993.

148. Chaikhouni A, Crawford FA, Pamela K et al. Human internal mammary artery produces more prostacyclin than saphenous vein. *Journal of cardiovascular surgery*. 92, 88-91, 1986.

149. Miller V, Komori K, Burnett JC, Vanhoutte PM. Differential sensitivity to endothelin in canine arteries and veins. *Am J Physiol* 257, H-1127-H1131, 1989.

150. Miller V, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase. *Am J Physiol* 248, H432-H437, 1985.

151. De Mey JG, Vanhoutte PM Heterogenous Behavior of the canine arterial and venous wall *Circ Research* 51, 439-447, 1982.

152. Morgan BJ, Lyson T, Scherrer U, Victor RG. Cyclosporine causes sympathetically mediated elevations in arterial pressure in rats. *Hypertension*. 18, 458-466, 1991.

153. Zengil H, Hodoglugil U, Guney Z. Effects of polysorbates and cremophor El on vascular responses in rat aorta. *Experientia* 51, 11, 1055-9, 1995.

154. Luscher TF, Diederich D et al. Difference between endothelium-dependent relaxation in arterial and in venous coronary bypass grafts *N. Engl J Med*. 319, 462-467, 1988.

155. Dhein S, Reiss N, Gerwin R et al. Endothelial function and contractility of human vena saphena magna for aortocoronary bypass grafting *J Thorac Cardiovasc Surg* 39, 66-69, 1991.

156. Shultze G, Stahl P, Nigam S. Effects of CSA on the generation of prostanoids by cultured peripheral lymphocytes. *Transplant Proc.* 16, 1214-1217, 1984.

157. Grace AA, Barradas MA, Milkhalidis DP, Jeremy JY, Moorhead JF et al. Cyclosporin A enhances platelet aggregation. *Kidney International* 32,889-895, 1987.

158. Henderson VJ, Mitchell RS, Kosek et al. Biochemical adaptation of "arterialized" vein grafts. *Ann Surg* 203, 339-345, 1986.

159. Hoover EL, Ross M, Fani K et al. Biochemical and histopathologic comparison between blood and saline storage of canine veins. *J Vasc Surg*, 7, 543-8, 1988.

160. O'Neil GS, Chester AH, Kushwaha S et al. Cyclosporin treatment does not impair the release of nitric oxide in human coronary arteries. *Br. Heart J* 66, 212-6, 1991.

161. Yang Z, Von Segesser L, Bauer E, Stulz P, Turina M, Luscher TF. Different activation of the endothelial l-arginine and cyclooxygenase pathway in the human mammary artery and the saphenous vein. *Circulation research*, 68, 52-60, 1991.