

Sisplatin uygulanan sıçanlarda nefrotoksisite ve kardiyotoksisitenin belirlenmesinde biyokimyasal belirteçler

Biochemical biomarkers for detection of nephrotoxicity and cardiotoxicity in cisplatin administered rats

Ayfer ÇOLAK¹, Burak TOPRAK¹, Hülya YALÇIN¹, Zekiye ALTUN², Gülden DİNİZ³, Aybüke OLGUN⁴, Osman YILMAZ⁵, Safiye AKTAŞ²

¹Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya Kliniği, İzmir

²Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Kliniği, İzmir

³Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, İzmir

⁴Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir

⁵Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Laboratuvar Hayvanları Bilimi, İzmir

ÖZET

Amaç: Sisplatin yaygın olarak kullanılan antikanserojen bir ilaçtır. Bu çalışmanın amacı, sisplatinin nefro ve kardiyotoksisitesini saptamada kullanılacak biyokimyasal belirteçlerin araştırılmasıdır.

Yöntemler: Çalışma, ağırlıkları 200-300 g arasında değişen erişkin dişi Wistar-Albino sıçanlar üzerinde gerçekleştirildi. Sıçanlar sisplatin uygulanan grup I (n=5) ve kontrol grubu (n=6) olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Birinci gruba intraperitoneal sisplatin (kümülatif doz 16 mg/kg), 2. gruba serum fizyolojik uygulandı. Tüm hayvanlar çalışmanın 14. günü sakrifiye edildi. Alman kan örneklerinde BNP, Troponin I, CK-MB, üre ve kreatinin ölçümü yapıldı. Tüm örnekler analize kadar -80°C'de saklandı.

Bulgular: Sisplatin uygulanan sıçanlarda serum troponin I, üre ve kreatinin seviyesi kontrol grubuna göre belirgin derecede yüksek bulundu ve aralarında anlamlı fark saptandı.

Sonuç: Sisplatin tedavisine bağlı gelişen nefrotoksisitenin belirlenmesinde üre ve kreatinin düzeyleri, kardiyotoksisitenin belirlenmesinde troponin I düzeyleri iyi bir belirteç olabilir.

Anahtar kelimeler: Sisplatin, BNP, troponin I, kardiyotoksite, sıçan

ABSTRACT

Objective: Cisplatin is a widely used anticancer drug. The aim of this study is to investigate biochemical biomarkers that can be used for identification of cisplatin cardiotoxicity and nephrotoxicity.

Methods: This study was conducted on female Wistar Albino rats weighing 200-300 g. Rats were separated into two groups as cisplatin administered group (n=5) and the control group (n=6). Intraperitoneal cisplatin (cumulative dose 16 mg/kg) was administered to the first group and the second group received physiological serum. All rats were sacrificed on day 14 of the study. BNP, troponin I, CK MB, urea, creatinine levels were measured in rat blood samples. All blood samples were stored at -80°C until measurement.

Results: Troponin I, urea and creatinine concentrations of cisplatin administered rats were significantly higher from those of the control rats.

Conclusion: Urea and creatinine values may be used for identification of cisplatin nephrotoxicity and troponin I may be a good biomarker for detection of cisplatin cardiotoxicity.

Key words: Cisplatin, BNP, troponin I, cardiotoxicity, rat

Alındığı tarih: 09.07.2013

Kabul tarihi: 11.07.2013

Yazışma adresi: Doç. Dr. Gülden Diniz, Kıbrıs Şehitleri Cad. 51/11, Alsancak 35220-İzmir
e-mail: agdiniz@windowslive.com

GİRİŞ

Sisplatin (CP) çocukluk çağı solid tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan, ağır metal olan platin (Pt) içeren antikanserojen bir ilaçtır. Sisplatin (cisdiamminedichloroplatinum, Cisplatin) DNA'nın ağır metal alkilleyicisidir. CP'in terapötik etkisi doz artışıyla belirgin şekilde artmaktadır ⁽¹⁾. Sisplatinin klinik kullanımı, oksidatif stres artımı ve apoptozis sonucu oluşan nefrotoksisite, kardiyotoksisite gibi yan etkiler nedeniyle sınırlanmıştır ^(1,2). CP nefrotoksisitesinin hücresel mekanizması tam anlaşılmadığı için CP etkisi çeşitli hayvan modelleri üzerinde çalışılmıştır ⁽³⁾. CP, DNA ile etkileşerek, zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar oluşturur ve oluşan DNA hasarı apoptozisi başlatır. Ayrıca birçok araştırmada nefrotoksisite patofizyolojisinde oksidatif stresin önemli olduğu gösterilmiştir ^(1,3).

Sisplatine bağlı kardiyotoksisite gelişmesinde hafif bulguların yanı sıra konjestif kalp yetmezliği, perikardit, kardiyomyopati gibi ağır bulgular olabilir ⁽⁴⁻⁶⁾. Çalışmalarda CP'in insanlarda akut ve kronik kardiyotoksiteye neden olduğu bildirilmiştir ⁽⁷⁾. Kardiyotoksisitenin patogenezinin, esas olarak serbest radikallerde ve lipid peroksidasyon ürünlerinde artış, antioksidan enzimlerde azalma sorumlu tutulmaktadır ⁽⁸⁾. Özellikle çocukluk çağındaki kanser hastalarında uzun yaşam beklentisi nedeniyle, kanser ilaçlarının yapmış oldukları yan etkilerin erken saptanması önemli hale gelmiştir. Kardiyak hasarın saptanmasında kardiyak enzimlerin serum düzeylerinin ölçülmesi son yıllarda önem kazanmıştır. Kardiyak Troponin I (cTnI) ve T (cTnT) yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip miyokard hasarı belirleyicileridir ^(9,10). cTnI miyokarda yüksek konsantrasyonda bulunan bir kontraktıl protein olup, miyokardiyal zedelenmeden sonra, zedelenmenin yaygınlığı ile orantılı olarak kana salınır ve kanda uzun süre yüksek seviyede kalır. cTnT'ye oranla cTnI özgüllüğü daha yüksektir ⁽¹¹⁾.

Ayrıca son yıllarda kardiyak hasarı belirlemede beyin natriüretik peptid (BNP) üzerine çalışmalar

artış göstermektedir. BNP (Brain Natriüretik Peptid), ventrikul fonksiyonundaki değişikliklere hassas ve bu değişikliklerin spesifik belirleyicisi olan 32 aminoasit içeren ventikuler bir hormondur. Konjestif kalp yetmezliğinin tanısında önemli bir gösterge olarak kabul edilmektedir ⁽¹²⁾. Sol ventrikül duvarındaki gerilme ve hacim yükü ile BNP sekresyonu uyarılır. Dolaşımdaki BNP'nin temel kaynağı kalp kası hücreleridir. Son zamanlarda kalpteki fibroblastların da BNP üretebildikleri gösterilmiştir ⁽⁴⁾. CP uygulanmış hastalarda, serum B tipi natriüretik peptid (BNP) düzeylerinin kardiyak disfonksiyon için bir belirteç olabileceği ve patolojiyi erken dönemde gösterebileceği bildirilmektedir ⁽¹³⁾. Bu çalışmada CP uygulanmış ratlarda erken dönemde nefrotoksisite ve kardiyotoksisite etkilerinin belirlenmesinde biyokimyasal parametrelerin yeri araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Her biri 6-8 haftalık, ortalama ağırlıkları 200-300 g olan, iç besleme yetiştirilen, 11 adet Wistar türü Albino suşu dişi sıçan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'ndan elde edildi. Çalışma için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 02.04.2010 tarihinde Etik Kurul onayı alındı. Sıçanlar rastgele seçilerek 2 grup oluşturuldu. Grup I (n=5) sisplatin uygulanan sıçan grubu, Grup II (n=6) serum fizyolojik uygulanan sıçan grubu olarak belirlendi. Çalışmada kontrol grubuna 1.-7. gün gavaj ile 8.-13. gün her gün olmak üzere Serum fizyolojik (SF) intraperitoneal yolla verildi ve 14. gün sakrifikasyon gerçekleşti. Sisplatin grubuna SF 1-7 gün gavaj ile, 8.-10. gün arası intraperitoneal yolla verildi. Onbirinci gün Sisplatin (10 mg/5 m, IV solusyon, Farmar ilaç), kardiyotoksik etki oluşturacak dozda (2 mg/ml konsantrasyonunda 16 mg/kg) intraperitoneal uygulandı ve 12.-13. gün SF intraperitoneal yolla verildi. Sisplatin ve eşdeğer hacimde serum fizyolojik uygulamalarından sonra, izlemin on dördüncü gününde sıçanlar feda edildi.

Kantitatif BNP, Troponin I (TnI-Ultra) ve CKMB serum düzeyleri ADVIA Centaur otoanalizöründe (BayerHealthCare LLC, Almanya) sandviç immün yöntemiyle ölçüldü. Serum üre, kreatinin düzeyleri Beckman Coulter AU 5800 analizöründe enzimatik yöntem ile değerlendirildi. Kit prospektüsünde duyarlılık ve ölçüm aralığı serum BNP düzeyi için 2.0-5.000 pg/mL, Tn I-Ultra için 0.006-50 ng/mL, CKMB için 0.18-300 ng/dL olarak belirtilmiştir.

İstatistiksel değerlendirmeler için Windows SPSS 15 programı kullanıldı. Grupların karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi uygulandı. Sonuçlar median (minimum-maksimum) olarak verildi. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Sisplatin uygulanan grupta serum değerleri, Troponin I 8.06 ng/ml (0.035-35.71), üre 316.0 mg/dl (141-345.4) ve kreatinin 2,25 mg/dl (0.85-2.51) bulundu. Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak Troponin I, üre ve kreatininde anlamlı yükseklik saptandı (sırasıyla $p=0.045$, $p=0.006$, $p=0.005$). Sisplatin uygulanan grupta CK MB 5.38 ng/dL (3.32-8.58) ve BNP 4.76 pg/mL (2.27-7.14) olarak ölçüldü ve kontrol grubuna göre yüksek bulundu. Fakat BNP ve CKMB değerleri ölçümü için kullanılan kitler human BNP ve CKMB ölçüm kiti olduğu ve ölçülen sonuçlar cihaz ölçüm aralığının altında saptandığı için değerlendirme dışı tutuldu.

Tablo 1. Kontrol ve sisplatin uygulanan ratların biyokimyasal belirteçleri.

	Kontrol (n=6)	Sisplatin(+) (n=5)	p
Troponin I (ng/ml)	0.023 (0.016-4.94)	0.15 (0.035-35.7)	0.045
Üre (mg/dl)	30.16 (27.0-34.5)	316.0 (141-345.4)	0.006
Kreatinin (mg/dl)	0.30 (0.13-0.40)	2.25 (0.85-2.51)	0.005
BNP (pg/ml)	2.24 (1.76-3.42)	5.7 (2.27-7.14)	değerlendirme dışı*
CK-MB (ng/ml)	2.35 (1.35-3.39)	3.88 (3.32-8.58)	değerlendirme dışı*

* Cihaz ölçüm aralığının altında sonuçlar.

TARTIŞMA

Çocuklar, antikanserojen ilaçlara bağlı gelişen kardiyomiyopatiye, erişkinlere kıyasla daha duyarlıdır. Bunda yaşam beklentilerinin uzunluğu ve somatik büyümeye paralel olarak miyokard büyüme potansiyelinin gerçekleşmemesi rol oynamaktadır⁽¹⁴⁾. Sisplatinin erken ve geç dönemde kardiyotoksisite etkisi olup, kardiyotoksisite tedavi kesiminden aylar veya yıllar sonra başlayabilmektedir. Bu nedenle, kardiyak etkilenmenin henüz klinik bulgular ortaya çıkmadan, hücresel düzeydeki miyokard hasarı varlığında saptanabilmesi önemlidir. Bunun için invaziv olmayan sensitivite ve spesifitesi yüksek kardiyak troponinler, endotelin, natriüretik peptidler gibi biyokimyasal parametreler incelenmiş ve CP'nin uygulandığı tedavi protokollerinde serum düzeylerinin arttığı gösterilmiştir⁽¹³⁾. Çalışmamızda, ratlara kardiyotoksisite oluşturacak şekilde tek doz olarak verilen sisplatin uygulamasından üç gün sonra alınan kan örneklerinde Troponin I, CK-MB, BNP ve üre kreatinin düzeylerini yüksek saptadık.

Uygulanan sisplatin dozunda, sisplatin grubundaki 5 rat için de üre kreatinin yüksekliği ile kanıtlanan nefrotoksik etki görülmüştür. Çalışmamıza benzer şekilde sisplatin uygulanan ratlarda nefrotoksik ve kardiyotoksik etkinin incelendiği bir çalışmada troponin I, üre ve kreatinin yüksekliği gösterilmiştir⁽¹⁵⁾.

Sisplatin toksik etkilerini farklı mekanizmalarla gösterebilmektedir. Sisplatin nefrotoksisitesinin en erken belirtisi protein sentezi inhibisyonudur. Ayrıca sisplatin redükte glutatyonun sülfhidril gruplarına bağlanıp, serbest oksijen radikalleri temizlenmesini azaltabilir. Sisplatin-Sülfhidril kompleksi hücre membran ve enzim fonksiyonlarına zarar verip, lipid peroksidasyonu ve mitokondriyel hasara neden olabilir^(16,17). Sisplatinin nefrotoksik etkisi proksimal tübül hücrelerinden seçici alımına bağlı olduğu düşünülmektedir. Sisplatin böbreğin diğer bölgelerinde de daha düşük oranda birikim gösterebilir. Proksimal tübül epitel hücrelerinin içindeki sisplatin konsantrasyonu ekstrasellüler konsantrasyonun 5 katı daha

yüksek bulunmuştur^(1,18).

Sisplatinin nefrotoksitesisi üzerine çok sayıda çalışma mevcutken, kardiyotoksik etkisi üzerine yapılan çalışmalar yetersizdir. Çalışmamızda sisplatin grubundaki 5 ratın troponin I değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı artış görülmüştür. Aynı şekilde artış BNP ve CK-MB düzeylerinde görülmesine rağmen, değerlendirmeye alınamamıştır. Ölçülen BNP ve CK-MB düzeyleri saptanabilen en düşük değerlere yakın bulunmuş ve kullandığımız BNP ve CK-MB reaktiflerinin ratların örneklerini değerlendiremediği kanısına varılmıştır.

Çalışmamızın kısıtlılıkları, ratlarda kardiyotoksik ve nefrotoksik belirteçleri incelerken doku ile ilişkisinin ortaya konmaması, kardiyotoksitesite incelenmesinde elektrokardiyografi bulguları ile biyokimyasal belirteçlerin ilişkisinin değerlendirilememesi sayılabilir. Çalışmamızda sisplatin uygulanan ratlarda nefrotoksitesite ve kardiyotoksitesite etkilerini erken dönemde saptayabilmek için yalnızca biyokimyasal belirteçlerin incelenmiş olmasını eksikliğimiz olduğunu düşünüyoruz.

Kardiyak yan etkilerin geriye dönüşümsüz olması erken tespiti önemli kılmakta ve önleyici, destekleyici tedavi stratejileri için gerekmektedir. Kardiyotoksitesitenin belirlenmesi için henüz kolay uygulanabilir, duyarlı, girişimsel olmayan ve sık yinelenen bir metot olmaması bu konudaki çalışmaların önemini korumaktadır. Çalışmamızda olduğu gibi kardiyak troponinin rutin kullanımını düşündüren güçlü kanıtlar gösterilmiştir⁽¹⁹⁾. Sisplatin kardiyotoksitesitesini değerlendirmek için troponin I iyi bir belirteç olabilir. Antikanser tedavinin etkin olabilmesi için, kardiyotoksitesite, nefrotoksitesite ve diğer risk faktörlerinin erken tanınması önemini korumakta ve bu yan etkilerin erken saptanabilmesine yönelik ileriye dönük daha kapsamlı çalışmalar gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Sabuncuoğlu S, Özgüneş H. Sisplatin toksitesisi: Oksidatif stresin önemi ve antioksidanların etkisi. *Tip Fakültesi Dergisi* 2010;73:3.
2. Demkow U, Stelmaszczyk-Emmel A. Cardiotoxicity of

3. cisplatin-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer patients. *Respir Physiol Neurobiol* 2013;187(1):64-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2013.03.013> PMID:23548823
3. Kanter M, Tarladaçalışır YT, Uygun M. Cisplatin nefrotoksitesisinde E vitamininin koruyucu etkileri: Işık ve elektron mikroskopik çalışma. *Tip Araştırmaları Dergisi* 2007;5(3):83-90.
4. Yağmurca M, Baş O, Şahin Ö, Nacar A et al. Ratlarda sisplatin ile indüklenmiş böbrek hasarına karşı melatonin ve ginkgo bilobanın koruyucu etkisi. *Kocatepe Tip Dergisi* 2007;8:29-34.
5. Aktürk E, Kurtoğlu E, Harputluoğlu H. Kanser ilaçlarının kardiyovasküler yan etkileri: Bu yan etkiler nasıl belirlenmeli, tedavi ve takip nasıl yapılmalı? *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2011;18(2):137-42.
6. El-Awady el-SE, Moustafa YM, Abo-Elmatty DM, Radwan. Cisplatin-induced cardiotoxicity: Mechanisms and cardioprotective strategies. *Eur J Pharmacol* 2011;650(1):335-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.085> PMID:21034734
7. De Leonardi V, Neri B, Bacalli S, Cinelli P. Reduction of cardiac toxicity of anthracycline Lines by L-carnitine. *Int J Clin Pharmacol Res* 1985;5:137-42. PMID:3860480
8. Demir F, Narin F, Akgün H, Üzümlü K, Saraymen R, Baykan A, Köklü E. Dokсорubisin ile oluşturulmuş deneysel kardiyotoksitesite üzerine melatoninin etkisi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2004;47:260-268.
9. Bertinchant JP, Polge A, Juan JM, et al. Evaluation of cardiac Troponin I and T levels as markers of myocardial damage in doxorubicine-induced cardiomyopathy rats, and their relationship with echocardiographic and histological findings. *Clinica Chim Acta* 2003;329:39-51. [http://dx.doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00013-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00013-5)
10. Kismet E, Varan A, Ayabakan C, et al. Serum Troponin T levels and Echocardiographic Evaluation in Children with Doxorubicine. *Pediatr Blood Cancer* 2004;42:220-224. <http://dx.doi.org/10.1002/pbc.10368> PMID:14752858
11. Cardinale D, Sandri MT, Martinoni A, et al. Myocardial injury revealed by plasma troponin I in breast cancer treated with high-dose chemotherapy. *Ann of Oncology* 2002;13:710-715. <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdf170> PMID:12075738
12. Munagala VK, Burnett JC Jr, Redfield MM. The natriuretic peptides in cardiovascular medicine. *Curr Probl Cardiol* 2004;29:707-69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2004.07.002> PMID:15550914
13. Kismet E, Demirkaya E, Yurttutan N, Berberoğlu S et al. Dokсорubisinin tedavisi uygulanan solid tümörlü çocuklarda serum BNP düzeyi. *Gülhane Tıp Dergisi* 2004;46(1):38-42.
14. Lipschultz SE, Rifai N, Sallan SE, et al. Predictive Value of Cardiac Troponin T in Pediatric Patients at Risk for Myocardial Injury. *American Heart Association* 1997;96:2641-2648.
15. Hussein A, Ahmed AA, Shouman SA, Sharawy S. Ameliorating effect of DL- α -lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and cardiotoxicity in experimental animals. *Drug Discov Ther* 2012;6(3):147-56. PMID:22890205

16. Lau AH. Apoptosis induced by cisplatin nephrotoxic injury. *Kidney Int* 1999;56(4):1295-8.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00687.x>
PMid:10504479
17. Kuhlmann MK, Burkhardt G, Köhler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12(12):2478-80.
<http://dx.doi.org/10.1093/ndt/12.12.2478>
18. Safirstein R, Miller P, Guttenplan JB. Uptake and metabolism of cisplatin by rat kidney. *Kidney Int* 1984;25(5):753-8.
<http://dx.doi.org/10.1038/ki.1984.86>
19. Dolci A, Dominici R, Cardinale D, Sandri MT, Panteghini M. Biochemical markers for prediction of chemotherapy-induced cardiotoxicity: systematic review of the literature and recommendations for use. *Am J Clin Pathol* 2008;130(5):688-95.
<http://dx.doi.org/10.1309/AJCPB66LRIVMQDR>
PMid:18854260