



THE EFFECTS OF VERAPAMIL, A CALCIUM CANAL BLOKER, ON CISPLATIN TOXICITY

M. DİKMEN* & A. BAŞARAN**

*Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji ABD 26470 Eskişehir, Türkiye

** Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD 26480 Eskişehir, Türkiye

Geliş tarihi: 16.08.2007 Kabul tarihi: 28.02.2008

CİSPLATİN TOKSİSİTESİ ÜZERİNE KALSİYUM KANAL BLOKÖRLERİNDEN VERAPAMIL'İN ETKİLERİ

ABSTRACT

The aim of this study was investigated to protective effects of calcium chanel blocker verapamil on cisplatin induced toxicity.

Fourty-two *Rattus norvegicus* (Wistar albino) rats were divided into six groups. The control group (I. group) was injected with 0.3 ml saline, II. group was injected with 0.2 mg/kg verapamil, III. group was injected with 2 mg/kg verapamil, IV. group was injected with 5 mg/kg cisplatin, V. group was injected with 0.2 mg/kg verapamil+5 mg/kg cisplatin and VI. group was injected with 2 mg/kg verapamil+5 mg/kg cisplatin. Before cisplatin injection, verapamil was given during the three days at the same hour. After this period, at the fourth day, cisplatin was injected with as a single dose. Following the last dose, within 24 hours urine samples were collected and than blood, kidney and liver tissues samples and bone marrow were collected from the rats under ether anesthesia.

At the end of the study, we found that serum creatinine in the IV. group was significantly increased according to control group ($p<0.001$). SGOT activity was significantly decreased in III., V. and VI. groups ($p<0.001$). As a result of chromosomal analyses, there were not significantly increased on the number of chromatid typed gaps in the IV., V ve VI. group according to control group. Histopathologic findings showed that a certain recovery was dedected into kidney tissue of the V. group according to kidney tissue of IV.group .

As a conclusion, it was determined that verapamil had a protective effect on cisplatin toxicity and this protective effect was high in the V. group which had been given low dose of verapamil.

Key words : Cisplatin, Rat, Toxicity, Verapamil.

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, antineoplastik bir ajan olan cisplatinin toksisitesi üzerine, kalsiyum kanal blokörü olan verapamilin etkilerini araştırmaktır.

Bu çalışmada, 42 adet *Rattus norvegicus* (Wistar albino) soyu, 180-270 g ağırlığında sıçan kullanıldı. Sıçanlar eşit sayıda 6 gruba ayrıldı. Kontrol grubu olan I. gruba 0,3 ml serum fizyolojik, II. gruba 0,2 mg/kg verapamil, III. gruba 2 mg/kg verapamil, IV. gruba 5 mg/kg cisplatin, V. gruba 0,2 mg/kg verapamil ile 5 mg/kg cisplatin ve VI. gruba da 2 mg/kg verapamil ile 5 mg/kg cisplatin verildi. Deneyde, verapamil, cisplatin enjeksiyonundan önce 3 gün boyunca her gün aynı saatte, cisplatin ise verapamil enjeksiyonunun bitiminden sonraki 4. günde tek doz halinde, intraperitoneal olarak uygulandı. Cisplatin enjeksiyonunu takiben 24 saatlik idrar örnekleri toplandı ve deney bitiminde eter anestezisi altında kan, doku ve kemik iliği örnekleri alındı.

Çalışma sonunda, kontrole göre sadece cisplatin verilen IV. grupta, serum kreatinin değerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede artış bulundu ($p<0.001$). III., V. ve VI. grupta ise, SGOT aktivitesi ($p<0.01$) önemli düzeyde azaldı.

Kromozomal incelemede de IV., V. ve VI. gruplarda kromatid tipi gap sayısında artış görülse de bu artış kontrole göre anlamlı değildi. Histopatolojik bulgular düşük doz verapamil verdiğimiz V. grupta IV. gruba göre, böbrek dokusunda belirgin bir iyileşme olduğunu gösterdi.

Sonuç olarak bu çalışmada, cisplatinin toksisitesi üzerine bazı bulgularda verapamilin koruyucu etki yaptığı, bu koruyucu etkinin düşük doz verapamil verilen V. grupta daha da etkili olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler : Cisplatin, Sıçan, Toksisite, Verapamil

1. GİRİŞ

Kanser kemoterapisinin etkinliğini kısıtlayan majör faktörlerden biri de toksik etkiler olup, bu yüzden toksik etkinin azaltılması için kemoterapiye yeni ilaçlar eklenmektedir 1,2,3. Alkilleyici bir ajan olarak etki eden cisplatin *cis*-diamminedichloroplatinum II de; testis kanserlerinde, baş-boyun, idrar kesesi ve over tümörlerinde başarıyla kullanılan bir ilaçtır. Cisplatin, DNA yapısında birbirine yakın guanin nükleotidleri arasında çapraz bağlantılar oluşturarak antitümör aktivite göstermektedir. Fakat bunun yanında cisplatinin bulantı, kusma ve hematolojik depresyon gibi spesifik yan etkileriyle nefrotoksisite, hepatotoksisite ve ototoksisite yaptığı da bilinmektedir 4-9.

Bir çok biyolojik olayda Ca^{+2} iyonu aktivatör ve regülatör olarak önemli bir rol oynamaktadır. Normal şartlarda hücreler arası sıvıdaki Ca^{+2} iyonu, hücre içine göre daha fazladır. Bu nedenle, bir hücre normal fonksiyonunu yapabilmek için, hücre içi Ca^{+2} düzeyini çok düşük düzeylerde tutmak zorundadır. Belirli bir süre iskemiye bırakılan hücrelerde, hücre içi Ca^{+2} artışı gözlenir ve bu artışa bağlı olarak hücrede ve bunun bulunduğu sistemlerde bir çok fizyopatolojik mekanizma devreye girerek, iskemik hasara neden olur 10-12.

İskemik hasar ya da toksisite durumunda, hücresel seviyede oluşan ilk değişiklikler böbrek, karaciğer ve myokardiyumda gözlenir. Kemoteropatik bir ajan olan cisplatinin, toksik etkilerinden en önemlisi de, Ca^{+2} un sitozolik dengesinin bozulması sonucu oluşan ve tübular hücre hasarı ile gelişen nefrotoksisitedir. Bu olayda, hücresel sitozolik Ca^{+2} dengesinin bozulması, mitokondriyel değişikliklere, hücresel şişmeye ve sonuçta hücre ölümüne neden olur 13. İskemiye bağlı olarak oluşan hücre hasarında, kalsiyum kanal blokörlerinin (KKB) hücre ölümüne neden olan metabolik olayları önleyebileceği açıklanmıştır 10-13.

Yapılan son araştırmalarda KKB'nin, kardivasküler seviyeden başka, migrenden renal transplantasyona kadar bir çok alanda yararlı etkileri olduğu öne sürülmektedir 14,15. Yapılan çalışmalar KKB'nin karaciğerde, miyokarda, beyinde ve böbrekte iskemik hasarı azalttığını rapor etmektedir 11,12,16. Yine bazı kanser hücre dizileri ile yapılan çalışmalarda, KKB'lerinin cisplatin ile birlikte uygulanmasının, kanser hücrelerinde apoptotik etkiyi artırdığını göstermiştir 17,18.

Biz de bu çalışmamızda, antineoplastik bir ajan olan cisplatin toksisitesi üzerine, KKB'den verapamilin farklı iki dozunun etkisini araştırmayı planladık.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada ağırlıkları 180 – 270 g ağırlığında 42 adet *Rattus norvegicus* (Wistar albino) soyu sıçan kullanıldı. Sıçanlar, standart pelet sıçan yemi ile beslendi ve taze çeşme suyu verildi. Her grupta 7 hayvan olacak şekilde 6 grup oluşturuldu. Bu gruplara ;

I. gruba	: 0.3 ml serum fizyolojik (Kontrol)
II. gruba	: 0.2 mg / kg verapamil (Düşük doz)
III. gruba	: 2 mg / kg verapamil (Yüksek doz)
IV. gruba	: 5 mg / kg cisplatin
V. gruba	: 0.2 mg / kg verapamil + 5 mg / kg cisplatin
VI. gruba	: 2 mg / kg verapamil + 5 mg / kg cisplatin

verildi. Verapamil (Knoll AG, Hoechst-İstanbul) ve Cisplatin (Eczacıbaşı, Roger Bellon-İstanbul) %0.09'luk serum fizyolojik içinde çözündürüldü. Kontrol grubu olan I. gruba serum fizyolojik; II., III., V. ve VI. gruba cisplatin enjeksiyonundan önce 3 gün boyunca hergün aynı saatte verapamil; IV., V. ve VI. gruba ise deney bitişisi olan 4. günde tek doz halinde cisplatin, intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edildi. Deney bitimi olan 4. günde cisplatin enjeksiyonunu takiben metabolik idrar toplama kafeslerine konulan sıçanların, 24 saatlik idrarları toplandı. Her bir hayvana ait idrar hacmi belirlendi. İdrar pH değerleri pH metre ile, idrar kreatinin düzeyleri ise spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlendi 19. Deney bitiminde hayvanlar eter anestezisi altında bayıltılarak, karın göğüs bölgesi açılan her bir sıçanın kalbinin sol ventrikülünden enjektörle alınan kan örneklerinden elde edilen serumlarda,

kreatinin düzeyleri SGOT, SGPT ve ALP aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçüldü 19. SGOT, SGPT ve ALP aktivitesi, Knickerbocker, Cromatest-İspanya (Reitman-Frankel) kitleri kullanılarak ölçüldü.

Kemik iliğinden standart harvest yöntemi uygulanarak kromozom preparatları elde edildi 20. Bunun için, sıçanlara cisplatin enjeksiyonu takip eden 22. saatte mitoz bölünme durumundaki hücrelerin metafaz evresinde durmasını sağlayan 4 mg/kg colcemid i.p olarak verildi. İki saat sonra eter anestezisi altında bayıltılmış sıçanların femur kemikleri açığa çıkarıldı. İçinde fetal bovine serum bulunan enjektöre kemik iliği çekildi. Kemik iliği+fetal bovine serum karışımı 10 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve 1200 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Kalan hücre peletine 5 ml 0.075 M KCl damla damla vortekste ilave edildi ve 20 dakika 37°C etüvde inkübe edildi. Süre sonunda tekrar 1200 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Taze Carnoy fiksatif (3 hacim metanol, 1 hacim asetik asit) 5 ml damla damla vorteks'de ilave edildi. Tüpler tekrar yukarıda belirtilen rpm'de santrifüj edilip, süpernatant atıldı. Tekrar Carnoy fiksatif ilave edildi. 30 dakika buzdolabında bekletildikten sonra santrifüj edildi ve üstte biriken süpernatant atıldı. Temiz lamlara her hayvandan 3 preparat olacak şekilde, hücre süspansiyonu 25-30 cm yükseklikten püskürtülerek yayıldı ve lamalar kurutulmaya bırakıldı. Kuruyan lamalar %5 Giemsa boyası ile boyanarak (pH=7), entellan ile kapatıldı 20. Mitotik indeks için her bir hayvana ait preparatlardan, ışık mikroskopunda 1000 hücre sayıldı ve bunlardan 100 hücreden mitoz giren hücre sayısı hesaplandı. Ayrıca kromozom ve kromatid anomalileri, kırık veya gap bakımından ışık mikroskopunda 200'er metafaz plağı sayılıp değerlendirildi Hazırladığımız preparatlarda, metafaz plağında her bir kromozom ikili kromatid halinde görünmektedir. Eğer kromatidlerin her ikisinde birden bir kırılma olmuş ve bu kırık açıklığı kromatidin enine olan genişliğinden büyük ise "kromozom tipi kırık", küçük ise "kromozom tipi gap" olarak adlandırılır. Eğer kırılma kromozomu oluşturan kromatidlerin sadece birinde meydana gelmiş ve oluşan açıklık kromatidin enine olan genişliğinden büyük ise "kromatid tipi kırık", küçük ise "kromatid tipi gap" olarak değerlendirildi.

Histolojik inceleme için karaciğer ve böbrek dokuları nötral formalinde tespit edildi. Parafin bloklardan alınan 4-5 µ'luk kesitler haematoksin-eosin boyama yöntemiyle boyanarak ışık mikroskobu altında değerlendirildi 21.

İstatistik Değerlendirme; İstatistiksel analizler, SPSS 12.0 (Statistical Package for Social Sciences) software paket programı (SPSS Inc., Chicago, III. USA) kullanılarak yapıldı. Çizelge 1 ve 2'deki değerler, ortalama ±standart hata olarak verilmiştir. Farklılıklar p<0.05 durumunda önemli olarak değerlendirilmiştir. Çizelge 1'deki veriler ile Çizelge 2'deki mitotik indeks değerleri Shapiro-Wilk testine göre normal dağılmış olup, verilere tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Çizelge 2'deki gap ve kırık sayıları ise Kuruskal Wallis Tek Yönlü Parametrik olmayan Varyans analizi ile değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

Çalışmamızda, kontrol ve deney gruplarına ait idrar hacmi, pH, idrar-serum kreatinini ve kreatinin klerensi değerleri ile istatistiksel değerlendirilmeleri **Çizelge 1**'de görülmektedir. Bu değerlerden sadece IV. grubun serum kreatinin düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P<0,001).

Kontrol ve deney gruplarının SGOT, SGPT, ALP enzim aktiviteleri ve istatistiksel değerlendirilmeleri **Çizelge 1**'de görülmektedir. Serum enzimlerinden SGOT aktivitesi III, V. ve VI. grupta, kontrole göre anlamlı düzeyde azalma gösterdi (p<0,01). III. gruptaki SGPT aktivitesindeki azalma, sadece IV. gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,05).

Çizelge 1. Kontrol Ve Deneysel Gruplarına Ait Bazı İdrar Ve Serum Parametre Değerleri

GRUPLAR	n	İDRAR			Kreatinin Klerensi (ml/dk)	SERUM			
		Hacim (ml)	pH	Kreatinin (mg/dl)		Kreatinin (mg/dl)	SGOT (U/L)	SGPT (U/L)	ALP (U/L)
I. Grup (Kontrol) (serum fizyolojik)	7	4.21±0.63	7.89±0.27	69.42±5.10	0.06±0.01	3.37±0.21	37.14±2.13	12.29±1.34	168.94±33.54
II. Grup (0,2mg/kg verapamil)	7	4.07±0.80	7.93±0.32	58.03±3.07	0.04±0.01	3.71±0.31	31.57±3.04	8.86±1.16	158.51±2.12
III. Grup (2mg/kg verapamil)	7	5.71±1.40	7.73±0.36	57.30±6.91	0.05±0.01	3.96±0.15	26.57±1.54	8.29±0.61	141.31±3.35
IV. Grup (5 mg/kg cisplatin)	7	5.79±1.51	7.91±0.36	48.94±9.85	0.04±0.01	4.84±0.18	31.43±2.93	12.00±1.29	136.04±9.31
V. Grup (0,2mg/kg ver. + 5 mg/kg cis)	7	4.15±0.71	7.43±0.26	67.98±6.26	0.06±0.01	3.51±0.06	24.71±2.62	9.14±1.26	143.41±6.95
VI. Grup (2mg/kg ver. + 5 mg/kg cis)	7	6.57±0.78	7.43±0.29	64.20±5.59	0.07±0.01	3.69±0.15	25.14±2.06	13.00±1.00	128.74±7.21
İstatistiksel Analiz		p>0.05 ^{ns}	p>0.05 ^{ns}	p>0.05 ^{ns}	p>0.05 ^{ns}	I-IV,II-IV, III-IV,IV-V, IV-VI gruplar arasında p<0,001 ^{***}	I-III, I-V, I-VI gruplar arasında p<0,01 ^{**}	III-VI gruplar arasında p<0,05 [*]	p>0.05 ^{ns}

n.s: p>0.05 farklılık yok, *: p<0.05 farklılık var, **: p<0.01 anlamlı farklılık var, ***: p<0.001 önemli düzeyde farklılık var. Değerler ortalaması± standart hata olarak verilmiştir.

Grupların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi kullanıldı.

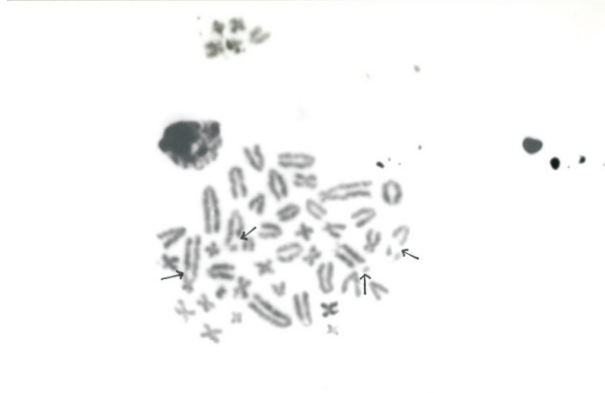
Kontrol ve deney grupları arasında, mitotik indeks, kırık, gap sayıları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Ancak cisplatin enjekte edilen IV. ve V. grupta kromatid tipi gap sayısında belirgin bir artış olduğu gözlemlendi (**Çizelge 2**) ve (**Resim 1** ve **2**).

Çizelge 2. Kontrol Ve Deney Gruplarının Mitotik İndeks, Kırık, Gap Sayıları.

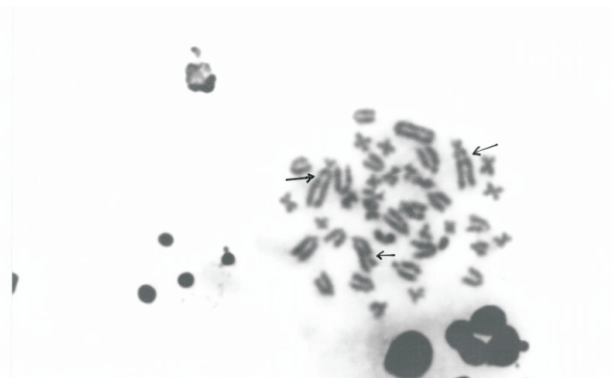
GRUPLAR	n	Mitotik indeks (%)	Gap		Kırık	
			Kromozom Tipi	Kromatid Tipi	Kromozom Tipi	Kromatid Tipi
I.Grup (Kontrol) (serum fizyolojik)	7	10.05	2	3	1	2
II.Grup (0,2mg/kg verapamil)	7	9.92	1	4	2	1
III.Grup (2mg/kg verapamil)	7	8.90	1	3	1	2
IV.Grup (5 mg/kg cisplatin)	7	7.70	2	6	2	2
V.Grup (0,2mg/kg ver. + 5 mg/kg cis)	7	9.41	1	6	1	1
VI.Grup (2mg/kg ver. + 5 mg/kg cis)	7	10.75	2	5	2	2

Mitotik indeks için tek yönlü varyans analizi uygulanmış olup, n.s: $p>0.05$ farklılık yok.

Kromozom - kromatid tipi gap ve kırık sayıları Kuruskal Wallis Tek Yönlü Parametrik olmayan Varyans analizi ile değerlendirilmiş olup, n.s: $p>0.05$ farklılık yok.

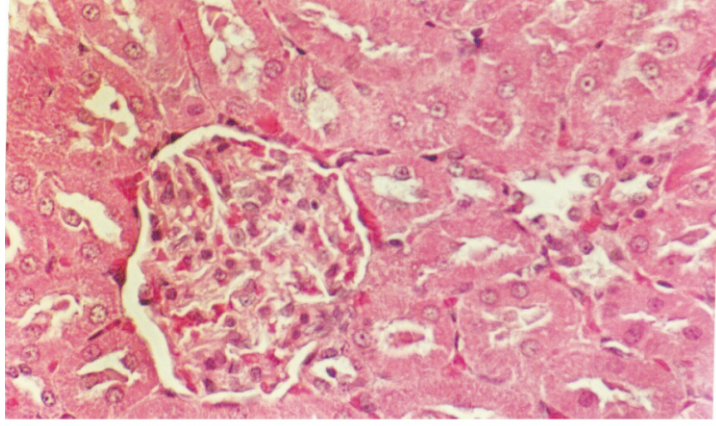


Resim 1. IV. Gruba Ait Metafaz Plağında Kromozom Tipi Ve Kromatid Tipi Kırık İle Kromatid Tipi Gap.

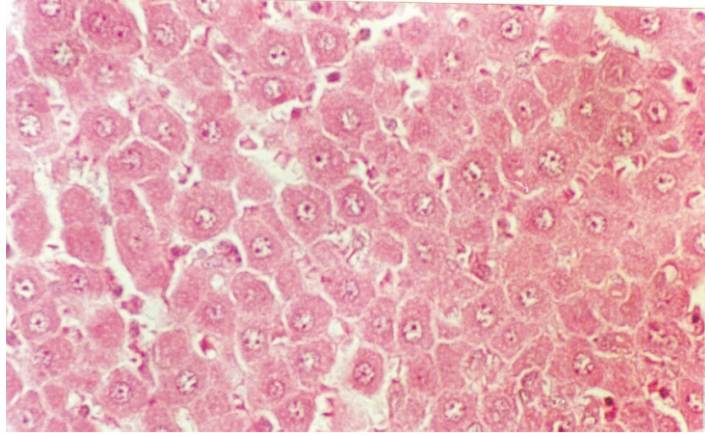


Resim 2. V. Gruba Ait Metafaz Plağında Kromozom Tipi Ve Kromatid Tipi Gap İle Kromatid Tipi Kırık.

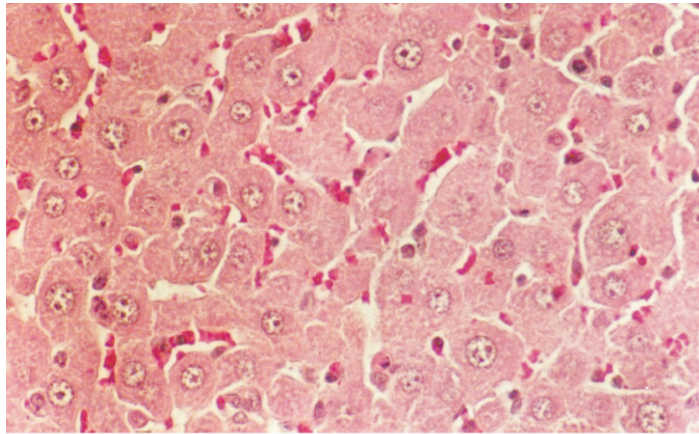
Histolojik bulgular değerlendirildiğinde ise, II. grubun böbrek ve karaciğer doku kesitlerinde kontrol grubuna (**Resim 3 ve 4**) yakın görünüm elde edildi. 2 mg/kg verapamil verilen III. gruba ait böbrek doku kesitlerinde de kontrol grubuna yakın görünüm elde edilirken, karaciğer doku örneklerinde kontrol grubundan farklı olarak hiperemi görüldü (**Resim 5**).



Resim 3. Kontrol Grubuna Ait Normal Görünümde Böbrek Dokusu. HxE, Orj.Büy. X132.

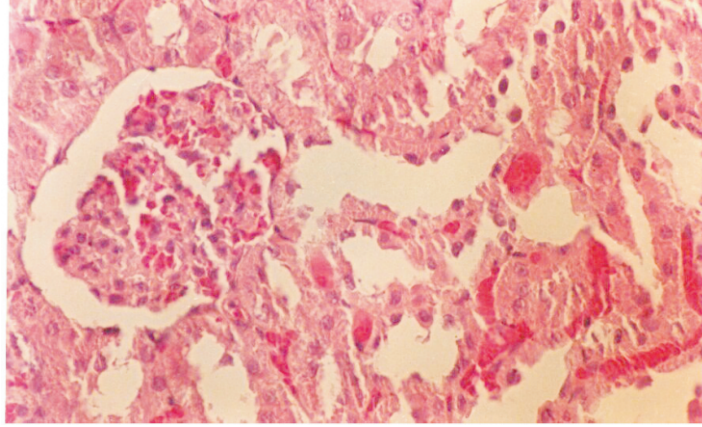


Resim 4. Kontrol Grubuna Ait Normal Görünümde Karaciğer Dokusu. HxE, Orj.Büy. X132.

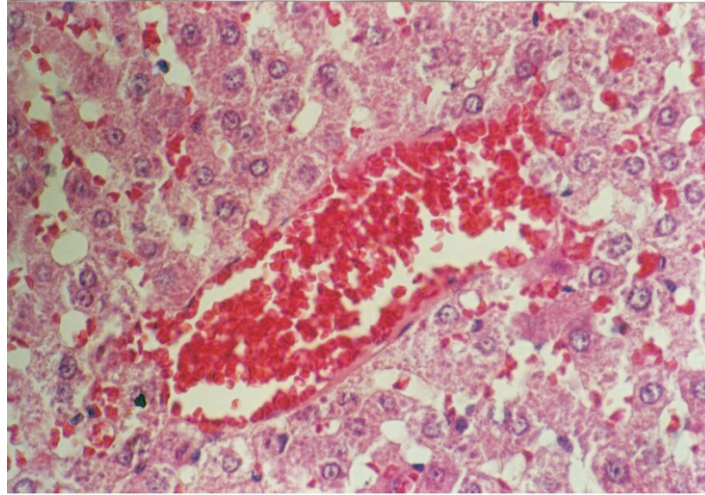


Resim 5. 2 mg/kg Verapamil Verilen III. Gruba Ait Karaciğer Dokusu Kesitinde Hafif Sinüzoidal Konjesyon. HxE, Orj.Büy. X132.

IV. gruba ait böbrek dokusu kesitlerinin incelenmesinde genellikle hiperemi gözlemlendi. Glomerüllerde ışık mikroskopik düzeyde belirgin bir bozukluğa rastlanmasa da, proksimal tübülüs hücrelerinde apikal yüzde fırçamsı kenar silinmesi, sitoplazma içinde vakuolizasyon görüldü. Distal tübülüslerde ise epitel iyice yassılaştı, tübülüs ve lümen yer yer belirgin derecede genişlemiş olarak görüldü. Nükleuslarda belirgin bir bozukluk görülmemesine karşılık, hücrelerin sitoplazmalarında belirgin bir erime ve sitoplazma kaybı yaygın olarak gözlemlendi (**Resim 6**). Bu gruba ait karaciğer kesitlerinin incelenmesinde de, çok yaygın olmaksızın portal alanda hücre infiltrasyonu, hiperemi, minimal derecede Kupffer hücre artışı gözlenirken, bazı hepatositlerin sitoplazmasında daha belirgin derecede vakuolizasyon görülmesi dikkat çekici idi (**Resim 7**).

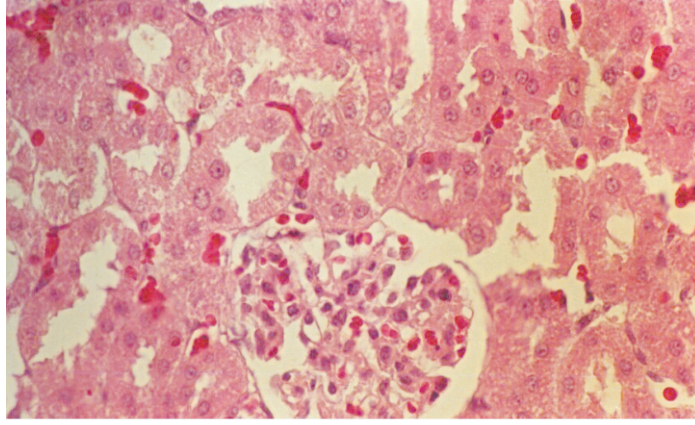


Resim 6. 5 mg/kg Cisplatin Verilen IV. Gruba Ait Böbrek Dokusu Kesitinde Proksimal Ve Distal Tübülüslerde Dejenerasyon. Hx&E, Orj.Büy. X132.

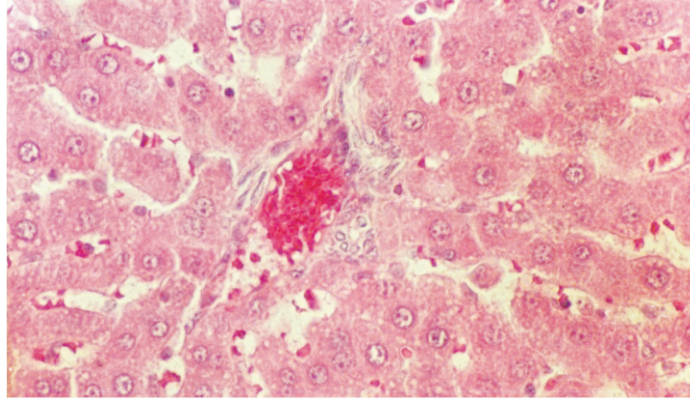


Resim 7. 5 mg/kg Cisplatin Verilen IV. Gruba Ait Karaciğer Dokusu Kesitinde, Hiperemi Ve Hepatositlerde Belirgin Vakuolizasyon. Hx&E, Orj.Büy. X132.

V. gruba ait böbrek doku örneklerinde IV. gruba ait bulgular görülmekle beraber tübüler dilatasyonda IV. ve VI. gruba göre azalma görüldü (**Resim 8**). Bu gruba ait karaciğer doku kesitlerinde çok yaygın olmaksızın portal alanda hücre infiltrasyonu, sinüzoidal konjesyon ve bazı hepatositlerin sitoplazmasında daha belirgin hidropik dejenerasyon gözlemlendi (**Resim 9**).

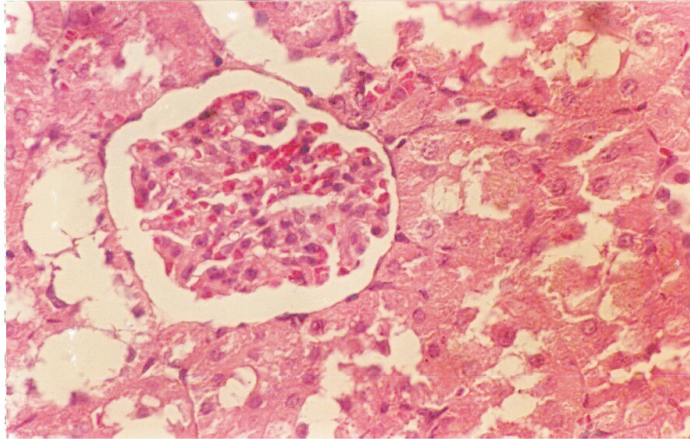


Resim 8. 0.2 mg/kg Verapamil + 5 mg/kg Cisplatin Verilen V. Gruba Ait Böbrek Dokusu Kesitinde, Tübülüs Hücrelerinde Vakuolizasyon Ve Hiperemi. HxE, Orj.Büy. x132.

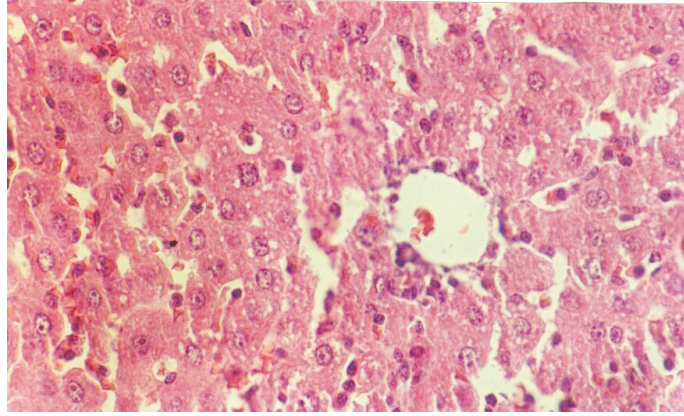


Resim 9. 0.2 mg/kg Verapamil + 5 mg/kg Cisplatin Verilen V. Gruba Ait Karaciğer Dokusu Kesitlerinde, Sinüzoidal Konjesyon Ve Belirgin Hidropik Dejenerasyon. HxE, Orj.Büy. x132.

VI. gruba ait böbrek dokusu örneklerinde genellikle medulla ve kortekste hiperemi gözlemlendi. Glomerüllerde ışık mikroskopik düzeyde belirgin bir bozukluğa rastlanmamasına karşılık, kortekste proksimal tübülüs hücrelerinde apikal yüzde fırçamsı kenar silinmesi, sitoplazma içinde vakuolizasyon görüldü. Distal tübülüslerde tübular dilatasyon ve epitelin iyice yassılaştığı görüldü. Nükleuslarda belirgin bir bozukluk görülmemesine karşılık hücrelerin sitoplazmalarında belirgin bir erime ve sitoplazma kaybı yaygın olarak gözlemlendi (**Resim 10**). Bu gruba ait karaciğer doku kesitlerinde, çok yaygın olmaksızın portal alanda hücre infiltrasyonu, minimal derecede kupffer hücre artışı görülürken, hücrelerde vakuolizasyon gözlemlendi (**Resim 11**).



Resim 10. 2 mg/kg Verapamil + 5 mg/kg Cisplatin Verilen VI. Gruba Ait Böbrek Dokusu Kesitinde, Proksimal Ve Distal Tübül Dejenerasyonu. HxE, Orj.Büy. x132.



Resim 11. 2 mg/kg Verapamil + 5 mg/kg Cisplatin Verilen VI. Gruba Ait Karaciğer Dokusu Kesitinde, Minimal Derecede Kupffer Hücre Artışı Ve Hücre İnfiltrasyonu, Hepatositlerde Vakuolizasyon. HxE, Orj.Büy. x132

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

İdrar hacmi bakımından gruplar arası yapılan karşılaştırmada kontrol ve diğer deney grup değerlerinin birbirine çok yakın olduğu belirlendi. Yapılan çalışmalarda da 13,22, verapamilin idrar hacmini anlamlı derecede arttırdığı açıklanmış olup, bu bulgu bizim III. ve IV. gruplarımızın sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. İdrar pH değeri ise tüm gruplarda alkali bir yapıda bulunmuştur. İdrar kreatinin seviyesi, kontrole göre IV. grupta serum kreatinin seviyesine paralel olarak düşmüştür. Bu sonuç cisplatinin, serum kreatinin seviyesini yükselttiğini gösteren literatürlerle uyumludur 7,23,24,25,26,27,28. Verapamil ile yapılan başka bir çalışmada 29 kontrol grubuna göre verapamilin, serum kreatinin düzeyini yükselttiği bildirilmiştir. Buna paralel olarak bizim çalışmamızda da verapamilin idrar kreatinin seviyesini düşürdüğü belirlendi. Serum kreatinin seviyesi IV. grupta, kontrol ve diğer deney gruplarına göre yüksek bulunmuştur. Bu sonuç, cisplatinin serum kreatinin seviyesini yükselttiğini gösteren çalışmalarla uyumluluk göstermektedir 23-28. Kreatinin klerensi seviyeleri arasında farklılık istatistiksel açıdan önemsiz olmakla birlikte II., III. ve IV. gruplarda kontrole göre görülen düşüş bazı literatür bilgileriyle uyumludur 5,23,26,29.

III., V. ve VI. gruplarda SGOT aktivitesindeki düşüş kontrol grubuna göre önemli bulunmuştur. Yapılan bazı çalışmalarda 30,31, verapamilin SGOT aktivitesi üzerine etkisi bizim bulgularımızla uyumluluk göstermektedir. SGPT aktivitesi, kontrol gruba göre II ve III. gruplar da istatistiksel açıdan anlamlı olmayan bir düşüş göstermiş, VI. grupta ise, yüksek doz verapamil verilen III. gruba göre, istatistiksel açıdan önemli bir artış görülmüştür. Çalışmamızda iki ayrı doz olarak değerlendirdiğimiz verapamil gruplarının (II. ve III. grup) enzim aktivitesi üzerine etkileri sonuçları ile uyumlu çalışmalar vardır 30,31.

Mitotik indeks oranlarında kontrol grubuna göre, IV. grupta düşüş, kromatid tipi gap sayısına IV., V. ve VI. gruplarda artış görülse de gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlılık bulunmadı. Ayrıca deney grupları ile kontrol grubu arasında kromozom tipi gap ve kırık ile kromatid tipi gap ve kırık sayılarında da önemli farklılık bulunamadı. Cisplatin kanser tedavisinde alkilleyici bir ajan olarak kullanılmaktadır. Çünkü, cisplatin bu özelliğinden dolayı interfaz ve mitoz bölünmenin tüm evrelerinde etkili olduğundan hücre bölünmesini durdurur. Bu etkisini, DNA zincirlerinde çapraz bağlantılar oluşturarak DNA sentezini inhibe ederek ve böylece RNA ve protein sentezini engellemek suretiyle yapar ve bu arada kromozom kırıkları oluşturur 1. Cisplatin gibi birçok sitotoksik ajanın, DNA polimeraz enziminin görevini etkileyerek replikasyonu durdurduğu, kromatin kırığı ve gap oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir 32-34. Cisplatin'in, DNA'daki pürin bazlarının 7 nolu N atomuna bağlanarak zincir içi ve dışı çapraz bağlantılar oluşturarak, DNA sentezini inhibe ettiği rapor edilmiştir 32.

Böbrek histolojisi ile ilgili bulgularımıza paralel olarak, çeşitli kaynaklarda da cisplatinin renal tübül nekroza ve renal yetmezliğe neden olduğu bildirilmektedir 4,5,23-28,35-39. Bir çalışmada 40, sıçanlarda gentamisin verilen grupta meydana gelen nefrotoksositeye 0.2mg/kg verapamilin koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir. Yine verapamilin böbrek hasarı üzerinde koruyucu etkisi olduğunu bildiren çalışmalar da vardır 13,22,41,42. Başka bir çalışmada da cisplatin ile tedavi edilen hastalarda renal fonksiyon üzerinde verapamilin yararlı etkileri olduğu rapor edilmiştir 38. Hepatik fibrozis oluşturulan sıçanlarda da, cisplatinin böbrek dokusunda, tübül nekroz, tübül dilatasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonuna neden olduğu ve akut toksisite yaptığı açıklanmıştır 7. Bizim çalışmamızda da IV. ve VI. gruplarda böbrek dokularında cisplatinin yaptığı böbrek hasarını, cisplatinle birlikte verilen düşük doz (0,2 mg/kg) verapamilin, tübül dilatasyonu azaltarak engellediği görülmüştür.

Kontrolle göre, IV. grubun karaciğerinde toksik hasar olduğu ancak bu hasarın V. ve VI. gruplarda da olduğu gözlemlendi. Hepatik fibrozisli sıçanlar ile yapılan bir çalışmada, cisplatinin, kontrole göre karaciğerde nekroz, hepatosit vakuolizasyonu, yalancı lob oluşumu ve safrada önemli derecede artış meydana getirdiği açıklanmıştır 7. Başka bir çalışmada da 43, düşük doz (%1'lik) verapamilin, karaciğer rejenerasyonunu hızlandırdığı ve bazı yayınlarda verapamilin hepatotoksik etki gösterebildiği bildirilmektedir. Buna karşılık verapamilin hepatotoksisiteyi azalttığı ve böbrekte koruyucu etkilerinin olduğunu rapor eden çalışmalar da mevcuttur 11,31.

Çalışmamızın sonucunda, yüksek doz verapamilin, serum enzim aktivitelerinde değişiklik yaptığı, karaciğer dokusunda bazı hasarlar oluşturduğu ve sonuçta tedavi dozunun üzerinde verapamilin yan etkisinin olduğu belirlendi. Cisplatinin toksik dozunun özellikle serum kreatinin değerini önemli derece arttırdığını, böbrek ve karaciğerde bazı değişiklikler yaptığı, ayrıca kromatid tipi gap sayısında istatistiksel açıdan önemli olmayan bir artışa neden olduğu görüldü. Yüksek doz verapamilin, cisplatinin yaptığı serum kreatinin değerindeki toksisiteyi düzelterek kontrol değerine yaklaştırdığı, fakat enzim aktivite düzeylerinde azalmaya neden olduğu, ayrıca karaciğer ve böbrek histolojisi üzerinde koruyucu etkisi olmadığı görüldü. Buna karşılık düşük doz verapamilin, cisplatin toksisitesinde özellikle serum kreatinin ve böbrek histolojisi üzerinde koruyucu etkisi olduğu belirlendi.

KAYNAKLAR

- [1] S.O. Kayaalp, *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. 9. Baskı, I. Cilt. Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti., Ankara (2000), 372–400.
- [2] T. Godfraind, R. Miller, M Wibo M, *Calcium Antagonism And Calcium Entry Blockade*. Pharmacol Rev, 38:(4), (1986) 321–416,.
- [3] A.L. Haris, D. Hochhause, *Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Treatmen*, Acta Oncologica, 31:(2), (1992), 205–213.
- [4] J.D.Bitran , R.K.Desser, A.A Billings, M.F. Kozloff, et a., *Acute Nephrotoxicity Following cis-dichlorodinammine-platinum*, Cancer, 49(1982), 1784–1788.
- [5] J.D. Blachiey, J.B. Mill, *Renal and Electrolyte Disturbances Associated with Cisplatin*, Annals of Internal Medicine, 95 (1981): 628–632.
- [6] K. Hanada, K. Odaka, A. Kuda , H. Ogata, *Effects of Disopyramide and Verapamil on Renal Disposition and Nephrotoxicity of Cisplatin in Rats*. Pharmaceutical Research, 16:(10), (1999) : 1589-1595.
- [7] Y. Miyamoto, K. Shimado, Y. Sakaguchi, M. Miyamoto, *Cisplatin (CDDP) İnduced Acute Toxicity in an Experimental Model of Hepatic Fibrosis*. The Journal of Toxicological Sciences, 32:(39), (2007), 311-319.
- [8] H.S. So, C. Park , H.J Kim., J.H. Lee et al, *Protective Effect of T-Type Calcium Channel Blocker Flunarizine on Cisplatin- Induced Death of Auditory Cells* Hearing Research, 204 (2005), 127-13,
- [9] E. Kurt., T. Evrensel, G. Gönüllü, Ö. Kanat ve ark, *Cisplatin Bağlı Böbrek Toksikitesi ve Sentetik Oral Prostaglandin E*. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 28 (2), (2002), 17-20.
- [10] AK Campell. *What does Ca⁺² do in cells?*, Cell Calsium, 7 (1986), 285–286,.
- [11] K. Umeshita, M. Manden., T. Ukei et al, *Different Cytoprotective Effects of Calcium Blockers in Hypothermic Liver Preservation*, Transplantation Proceedings, 21(1), (1989), 1290–1291.
- [12] NA.Yıldızoğlu, VM Altan, Y Öztürk, *Kalsiyum Kanalları ve Kalsiyum Antagonistleri*, Doğa, 13(3), (1989), 274–284.
- [13] K.A. Duggan, G.. Macdonald., J.A. Charlesworth., B.A. Pussell, *Verapamil Prevents Post-Transplant Oliguric Renal Failure*, Clinical Nephrology, 24(6), (1985), 289–291.
- [14] F. Murad, *Calcium Channel Blockers*, Goodman and Gilmon's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Edited by Gilman AG., Rall TW., Nies AS. and Taylor P., 8th ed., Progamen Press, New York (1990), 774–783 pp.
- [15] P.L Vaghy., J.S. Williams., A. Schwart, *Reseptor Pharmacology Of Caciium Entry Blocing Agents*, Am J Cardiol, 59 (1987), 9–17A.
- [16] R.W. Schrier., P.E. Arnold., W.J.V. Putten., T.J. Burke, *Celluler Calcium in Ischemic Acute Renal Failure:Role of Calcium Entry Bloklers*, Kidney International, 32 (1987), 313–312.
- [17] M. Liao., H. Chen., H Shui, *Apoptosis Induced by Cisplatin and Verapamil or SDZ PSC 833 in Human Ovarian Cell Lines*. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 35(2), (2000), 101- 104.
- [18] S. Kondo., T. Yin D.Morimura, J. Takeuchi, *Combination Therapy with Cisplatin and Nifedipine Inducing Apoptosis in Multidrug Resistant Human Glioblastoma Cells*. Br J Cancer, 71(2), (1995), 282- 289.
- [19] M. Yenson, *Tıpsal Ve Klinik Laboratuvar Çalışmaları*. Geliştirilmiş 6. baskı. Sermet Matbaası, Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş., İstanbul, (1986).
- [20] N. Başaran, *Sitogenetik Laboratuvar El Kitabı*. Eskişehir Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Eskişehir, (1987), 38-40.
- [21] J.D. Bancraft, A Stevens, *Theory and Practice of Histological techniques*, Churcill Livingstone, Edinburg, (1977), 240–245.
- [22] T.J. Burke., P.E. Arnold., J.A. Gordon., et al, *Protective Effect of İnrarenal Calcium Membrane Blockers Before of After Renal Ischemia*, J Clin Invest, 74, (1984), 1830-1840.

- [23] G. Deray, M. Dubals, H. Beufiles, et al, *Effects Of Nifedipine on Cisplatin-Induced Nephrotoxicity In Rats*, Clinical Nephrology, 30(3), (1988), 146–150.
- [24] J. Levi, C. Jacobs, S.M. Kalman, et al, *Mechanism of Cis-Platinum Nephrotoxicity, Effects Of Sulfhydryl Groups In Rat Kidneys*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 213(3), (1980) 545–551.
- [25] J.C. Gonzales-Vitale, D:M. Hayes, E, Cuitkovic, S.S Sternberg, *The Renal Pathology In Clinical Trials of Cis-Platinum (II) Diammine-Dichloride*, Cancer, 39, (1977), 1362–1371.
- [26] D:M. Hayes, E. Cvitkovic, R.B. Golbey, et al, *High Dose Cis-Platinum Diammine Dichloride: Amelioration of Renal Toxicity By Mannitol Diuresis*, Cancer, 39, (1977), 1372–1381.
- [27] R.F. Ozols, B.J. Corden, J. Jacob, *High-Dose Cisplatin In Hypertonic Saline*. Annals of Internal Medicine, 100(1), (1984), 19–24.
- [28] J.J. Stark, S.B. Howell, *Nephrotoxicity of Cis-Platinum (II) Dichlorodiammine*. Clin Pharmacol Ther, 23(4), (1978), 461–466.
- [29] A.J. Watson, L.F. Gimenez, D.K. Klassen, et al, *Calcium Channel Blockade In Experimental Aminoglycoside Nephrotoxicity*, J Clin Pharmacol, 27, (1987), 625–627.
- [30] N.P. Mora J.A. Cienfuegos, F. Pereira, et al, *Value of Prostacyclin Plus Verapamil for Obtaining 24-Hour Preserved Liver Allografts*, Transplantation Proceedings, 20(5), (1988), 980–982.
- [31] K.Y. Polat, K. Karakaş, M. Başoğlu, et al, *Protective Role of Verapamil and α -Tocopherol In Experimental Warm Liver Ischemia and Reperfusion Injury*, Tr J of. Med Sci, 24, (1994), 29–43.
- [32] Z.Z. Zdraveski, J.A. Melio, M.G. Marinus, J.M. Essigman, *Multiple Pathways of Recombination Define Cellular Responses to Cisplatin*. Chemistry and Biology, 7, (2000), 39-50.
- [33] A. Nowosielska, M.G. Marinus, *Cisplatin Induces DNA Double-strand break Formation in Escherichia coli dam Mutations*. DNA Repair 4, (2005), 773 -781.
- [34] A. Nowosielska, M.G. Marinus, *DNA Mismatch Repair-induced Double-strand Breaks*. DNA Repair (2007) (Article in press).
- [35] M.R. Brady, M.L. Zeidel, B.C. Kone, et al, *Differential Actions of Cisplatin On Renal Proximal Tubule and Inner Medullary Collecting Duct Cells*, The J Pharmacology and Experimental Therapeutics, 265(3), (1993), 1421–1428.
- [36] G. Deray, M. Dubois, F. Martinec, et al, *Protective Effects of Calcium Channel Blockers On Drug-Induced Nephrotoxicity*, Therapie, 44, (1989), 183–187.
- [37] B.R. Jones, R.B. Bhalla, J. Mladek, et al, *Comparison of Methods of Evaluating Nephrotoxicity of Cis-Platinum*, Clin Pharmacol Ther, 27(4), (1980), 557–562.
- [38] J.J.G. Offerman, S. Meijer, D.T.H. Sleijfer, et al, *The Influence Of Verapamil On Renal Function In Patients Treated With Cisplatin*, Clinical Nephrology, 24(5), (1985), 249–255.
- [39] R. Safirstein, P. Miller, J.B. Guttenplan, et al, *Uptake and Metabolism of Cisplatin By Rat Kidney*, Kidney International, 25, (1984), 753–758.
- [40] A. Başaran, Z. Eren, H.V. Güneş, et al, *Effects of Verapamil On Gentamicin-Induced Nephrotoxicity In Rats*, J Healt Sci, 5, (1993), 11–21.
- [41] C.D. Malis, J.Y. Cheung, A. Leaf, J.V. Bonventre, *Effects of Verpamil In Models Of Ischemic Acute Renal Failure In The Rat*, Clin Res, (1983), F735–F742,.
- [42] T. Shimizu, T. Kawabata, M. Nakamura, *Protective Effect Of A Novel Calcium Blocker, S- 312-D, On Ischemic Acute Renal Failure In Rat*, The Journal of Pharmacology and Experintal Therapeutics, 255(2), (1990), 484–490.
- [43] A. Başaran, K. Erol N. Başaran, *Verapamil'in Karaciğer Rejenerasyonu ve Bazı Enzim Düzeylerine Etkisi*, Tr J Of Med Sci, 15, (1991), 308–313.