

Doksorubisin ile Oluşturulmuş Deneysel Kardiyotoksisite ve Kardiyotoksisite Üzerine Pentoksifilin Etkisi

Y. Doç. Dr. Figen NARİN*, Uz. Dr. Ferunda DEMİR**, Hülya AKGÜN***, Uz. Dr. Ali BAYKAN**, Prof. Dr. Kazım ÜZÜM**, Sibel KUZUGÜDEN*, Uz. Dr. Esat KÖKLÜ**

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya*, Pediatri** ve Patoloji*** Anabilim Dalları, Kayseri

Özet

Etkin bir antitümör ajan olan doksorubisinin kardiyotoksik yan etkisi, ilacın terapötik kullanımını kısıtlamakta, kardiyotoksisitenin belirlenmesi ve önlenmesi önem kazanmaktadır. Kardiyotoksisitenin patogenezinin ağırlıklı olarak serbest radikallerde ve lipid peroksidasyon ürünlerinde artış, antioksidan enzimlerde azalma sorumlu tutulmaktadır. Çalışmada doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinin ve bunun üzerine pentoksifilin etkisinin araştırılması amaçlandı.

Çalışma üç grupta planlandı. Birinci grup (n:10) genç tavşanlara, 15 günlük süre içerisinde, 6 eşit dozda (kümülatif doz 15mg/kg) intraperitoneal doksorubisin, ikinci grup (n:10) doksorubisinden 24 saat önce başlanarak ve doksorubisin son dozundan 7 gün sonrasına kadar devam etmek üzere ve pentoksifilin (40 mg/kg/gün intraperitoneal) verilerek oluşturuldu. Üçüncü grup ise kontrol grubu (n:7) olarak planlandı.

Kardiyotoksisitenin patogenezindeki etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla miyokard ve plazma glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD), malondialdehit (MDA) ve miyokardiyal nitrik oksit (NO) düzeyleri ile kardiyotoksisite tanısındaki etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla serum troponin I (Tn I) ve kreatin kinaz MB (CKMB) düzeyleri çalışıldı. Histopatolojik olarak miyokardiyal hücre hasarının gelişip gelişmediği araştırıldı.

Doksorubisin verilen genç tavşanlarda histopatolojik olarak ağır kardiyomiyopati geliştiği; miyokardiyal GSH-Px'in (2.4 mU/µg) azaldığı, MDA (0.056nmol/µg) ve NO (0.13 µmol⁻³/µg) düzeylerinin yükseldiği saptandı. Doksorubisinle birlikte pentoksifilin verilen grupta ise miyokardiyal GSH-Px (5.6 mU/µg), SOD'ın (5.56 U/µg) yükselip, NO (0.08 µmol⁻³/µg) düzeylerini azaldığı histopatolojik olarak pentoksifilin ağırlı kardiyomiyopatiji önlediği saptandı. Gruplar arasında plazma GSH-Px, SOD ve MDA düzeyleri açısından fark bulunmadı. Serum troponin I (Tn I) (2.4 ng/mL) ve kreatin kinaz MB (CKMB) (4123 U/mL) düzeylerinin, sadece ağır kardiyotoksisite gelişen grupta arttığı, antioksidan verilen grupta değişmediği tesbit edildi.

Sonuç olarak doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinde miyokardiyal antioksidan enzimlerde azalma, serbest radikallerde ve lipid peroksidasyon ürünlerinde artmanın rol oynayabileceği tesbit edilmiş ve pentoksifilin doksorubisine bağlı ağır kardiyotoksisiteyi önleyebileceği gösterilmiştir. Ayrıca sonuçlar serum troponin I ve kreatin kinaz MB düzeylerinin, ağır kardiyotoksisitenin tanısında kullanılabileceğini göstermektedir. (Türk Kardiyol Dern Arş 2004; 32: 279-287)

Anahtar kelimeler: Doksorubisin, kardiyotoksisite, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, nitrik oksit, malondialdehit, pentoksifilin

Summary

Doxorubicin-Induced Experimental Cardiotoxicity and Effect of Pentoxphylline on Cardiotoxicity

Doxorubicin, a widely used antineoplastic agent in clinical practice, has a serious side effect, as cardiotoxicity. Due to the risk of life-threatening cardiotoxicity which limits doxorubicin's therapeutic potential, diagnosis and prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity becomes essential. Free radicals, lipid peroxidation and antioxidant enzymes are suggested to be involved mainly in doxorubicin-induced cardiotoxicity pathogenesis. Aim

of this study was the investigation of pathogenesis of doxorubicine induced cardiotoxicity and the effect of the pentoxphylline on this subject.

The study was designed on three groups: the first group (n=10 young rabbit) who took 6 daily doses of intraperitoneal doxorubicine (cumulative dose 15mg/kg) for 15 days. The second group (n=10 young rabbit) who received pentoxifylline (40 mg/kg/day intraperitoneal) 24 hours before intraperitoneal doxorubicine and continued 7 days after the last dose of doxorubicine. The third group was a control group (n=7).

We measured myocardial and plasma glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) activities and myocardial nitric oxide (NO) activity in our rabbit model. Serum troponin I (Tn I) and creatine kinase MB (CKMB) values were tested for the assessment of cardiotoxicity.

Our results suggested that doxorubicin formed severe cardiotoxicity in young rabbits with 15 mg/kg cumulative doses with markedly decreased myocardial GSH-Px (2.4 mU/ μ g) and increased MDA (0.056nmol/ μ g) and NO (0.13 μ mol⁻³/ μ g) values. Pentoxphylline reduced doxorubicin-induced cardiotoxicity by increasing myocardial GSH-Px (5.6 mU/ μ g), SOD (5.56 U/ μ g) activities and decreasing myocardial NO (0.08 μ mol⁻³/ μ g) activities. Although serum Tn I (2.4 ngr/mL in the first group) and CKMB (4123 U/mL in the first group) levels had diagnostic values, any change in plasma GSH-Px, SOD and MDA activities was determined in assessing doxorubicin-induced cardiotoxicity.

In conclusion, decreased antioxidant enzyme levels, increased free radicals and lipid peroxidation play major role in the pathogenesis of doxorubicin-induced cardiotoxicity and pentoxphylline is an effective antioxidant in reducing doxorubicin-induced cardiotoxicity. (Türk Kardiyol Dern Arş 2004; 32: 279-287)

Key words: Doxorubicin, cardiotoxicity, nitric oxide, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, malondialdehyde, pentoxphylline

Kanser tedavisinde kullanılan doksorubisin, yan etkisi fazla olan etkili bir kemoterapik ajandır. Kardiyotoksisite en önemli yan etkisi olup ilk kez doksorubisin tedavisi alan çocuklarda kalp yetersizliği geliştiğinin fark edilmesiyle dikkati çekmiştir. Doksorubisine bağlı kardiyotoksisite geliştiğinde kan basıncı, elektrokardiyografi değişiklikleri gibi hafif bulguların yanı sıra myokardit, kardiyomiyopati gibi ağır klinik tablolar görülebilir.

Doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogeneğinde; serbest radikal oluşumunun, antioksidan enzimlerde azalmanın ve lipid peroksidasyonunda artmanın rol oynayabileceğini desteklemektedir (1,2). Patogenezde sorumlu tutulan serbest radikaller süperoksit, hidroksil radikalleri ve nitrik oksittir (NO). Serbest radikallerin indüklediği malondialdehit (MDA) gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin de olaya katkısı olduğu gösterilmiştir (1,3). Doksorubisinin serbest radikal oluşumuna neden olması yanında; glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz gibi antioksidan enzimleri

azaltarak kardiyotoksisiteye neden olduğu da gösterilmiştir (1).

Doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogeneğinde serbest radikal ve antioksidan enzimlerin rol oynadığına ait bulguların belirlenmesi, antioksidan tedavi denemelerini gündeme getirmiştir (2). E vitamini, çalışmayı kalsiyum kanal blokörü, koenzim Q, deksrazoksan (ICRF-187) ve melatonin gibi ajanlar değişik çalışmalarda kullanılmıştır (4,5). Son yıllarda pentoksifilinin antioksidan etkisi olduğu da gündeme gelmiş, nötrofillerden süperoksit anyon salınımını azalttığı, en toksik oksijen radikali olarak düşünülen hidroksil radikali ile geçici ve yarı ömrü çok kısa bir radikal oluşturarak koruyucu etki yaptığı bildirilmiştir (6,7).

Pentoksifilin antioksidan olarak E vitaminine benzer şekilde önleyici ve küratif etkiye de sahiptir (8). Pasquer ve ark. (7) pentoksifilinin toksik oksijen bileşenlerini temizleyici olarak gücünü ksantine eşit olarak bulmuşlardır. Bekercioğlu ve ark. (9) doksorubisinin damar dışına

ekstravazasyonu sonucu oluşan serbest radikallere bağlı deri nekrozunun, pentoksifilin kullanımıyla anlamlı derecede azaldığını saptamışlar, bu etkinin pentoksifilin malondialdehiti azaltmasıyla ilgili olduğunu düşündüklerini bildirmişlerdir. Şener ve ark. (10) intestinal iskemi / reperfüzyon hasarı oluşturdukları ratlarda pentoksifilin doku GSH-Px düzeylerinde yükselme, doku MDA düzeylerinde azalma sağlayarak oksidatif hasarı önlediğini rapor etmişlerdir. Pentoksifilin birçok alanda bu özelliklerinden yararlanıldığı halde doksorubisine bağlı kardiyotoksitenin engellenmesine yönelik çalışmaya literatürde rastlanmadı.

Çalışmada tavşanlarda deneysel olarak doksorubisine bağlı kardiyotoksosite oluşturulması ve pentoksifilin doksorubisin kardiyotoksitesite üzerine olan etkisinin araştırılması amaçlandı.

MATERYAL ve METOD

Çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya, Patoloji ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim dallarının işbirliği ile Hakan Çetinsaya Deneysel Araştırma Merkezi Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi.

Çalışmada yaşları 60-90 gün arasında New Zeland White cinsi toplam 27 erkek tavşan kullanıldı. Hayvanlar bir haftalık adaptasyon döneminden sonra 3 gruba ayrıldı. Doks Grubu; sadece doksorubisin uygulanan grup, (n=10). Doks+Pen Grubu; doksorubisin ile birlikte pentoksifilin uygulanan grup, (n=9). Kontrol Grubu; distile su uygulanan grup, (n=7).

Doksorubisin Uygulaması

Doksorubisin (Adriablastina, Pharmacia) 10 mg/lık flakonda, 5 ml distile su ile sulandırılarak, hayvan modellerinde belirlenen total kümülatif doza göre (11) her gün aynı saatte olmak üzere 2.5mg/kg/gün, gün aşırı, 6 eşit dozda, total kümülatif doz 15mg/kg olacak şekilde, intraperitoneal olarak verildi.

Doksorubisin+Pentoksifilin Uygulaması: Doksorubisin Doks Grubuna verildiği şekilde, pentoksifilin (Trental, Aventis Pharma) 40mg/kg/gün olacak şekilde (farmakolojik doz:30-50mg/kg) (6) doksorubisine başlanmadan 1 gün önce başlanarak son doksorubi-

bisin dozundan sonra 7 gün daha devam edilecek şekilde 20 gün süreyle, intraperitoneal olarak verildi.

Kontrol Grubu: Sadece distile su doksorubisinin sulandırıldığı eş değer miktarda gün aşırı, 6 dozda uygulandı.

Örneklerin alınması ve hazırlanması

a.Kan Örnekleri:

0. gün kan örnekleri adaptasyon döneminin sonunda, ilaç uygulamalarına başlanmadan 24 saat önce alındı.

21. gün kan örnekleri Doks grubunda doksorubisin tedavisinin son dozundan 8 gün sonra, Doks+Pen gruplarında doksorubisin tedavisinin son dozundan 8 gün, pentoksifilin son dozundan 24 saat sonra alındı.

Kan örnekleri tavşanların kulak venlerinden, antikoagulan içermeyen bir tüpe 2 ml ve heparinli bir tüpe 4 ml olacak şekilde alındı.

Antikoagulan içermeyen tüpe alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve serum örnekleri -70°C'de saklandı. Serum örneklerinde CK-MB ve troponin I düzeyleri çalışıldı.

Heparinli tüpe alınan kan örnekleri 0°C'de 15 dk santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı ve plazma örnekleri çalışılmak üzere -70°C'de saklandı. Plazma örneklerinde GSH-Px, SOD ve MDA düzeyleri çalışıldı.

b. Doku Örnekleri:

21. gün kan örnekleri alındıktan hemen sonra kulak veninden 2 ml potasyum klorür verilerek tavşanlar öldürüldü. Kalpleri hızla çıkarılarak soğuk suyla yıkandı ve sol ventrikülden iki parça doku örneği alındı. Örneklerden biri hızla kuru bir spanca sarılarak doku GSH-Px, SOD, MDA ve NO düzeyleri çalışılmak üzere -70°C'de saklandı. İkinci örnek %10'luk formol içerisine konularak histopatolojik değerlendirme için saklandı.

Biyokimyasal Çalışma Metodu

Serum CKMB düzeyi, Konelab 60İ otoanalizör ile Medkim firmasının CKMB düzeyleri ölçümü için ürettiği reagent kitler kullanılarak 0.5 ml serumda, serum troponin I düzeyleri ise İnotrac Aio İmmünoanalizör cihazında İnotrac Aio TM Troponin I Analyte Pen kiti ile 0.5 ml serumda çalışıldı.

Plazma ve miyokardiyal GSH-Px aktivitesi; GSH-Px tarafından katalizlenen bir reaksiyonda H_2O_2 ile glutatyonun (GSH) oksidasyon hızının ölçülmesi esasına dayanan Paglia ve Valentine'nin birleşik enzimatik yöntemi (12) ile ölçüldü. Doku GSH-Px aktivitesi tayini: Miyokardiyal homojenatının (1/4 w/v) 13200 rpm'de 30 dk santrifüjlenmesiyle elde edilen süpernatantın fosfat tamponu (0.05 M, pH = 7.4) ile 1/10 oranında dilüe edilip, 0.05 ml'si kullanılarak yapıldı.

Plazma ve miyokardiyal SOD aktivitesi tayininde Sun ve ark.(13) tarafından geliştirilen "Süperoksit üreticisi olarak ksantin oksidaz sisteminin kullanılması ve nitroblue tetrazoliumun (NBT) redüksiyonunun inhibe edilmesi" esasına dayanan metod kullanıldı. Doku SOD aktivitesi tayini: miyokardiyal homojenatından elde edilen süpernatantın 0.05 ml'sinin, 0.01 M fosfat tamponu (pH:7.4) ile 1/10 oranında dilüe edilerek yapıldı.

Plazma MDA aktivitesi tayini: Stocks ve Dormandy (14) tarafından geliştirilen ve Jain (15) tarafından modifiye edilen temel prensibi "Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan MDA'in tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek 532 nm dalga boyunda maksimum absorbans veren renkli bir kompleks oluşturması" esasına dayanan metodu kullanılarak yapıldı. Doku MDA tayini: Ohkawa ve ark. (16) tarafından geliştirilen metoda göre yapıldı.

Doku NO Tayini: Dondurularak saklanan miyokardiyal homojenatından elde edilen süpernatantların 0.05 ml'si, Somogyi reaktifi (%10 $ZnSO_4$ ve 0,5 N NaOH) ile 1/4 (v/v) oranında seyreltilerek ve deproteinize edilerek, + 4°C'de 1500 rpm de 10 dk santrifüj edildi (17). Elde edilen deproteinize süpernatantlardan NO ($NO_2 + NO_3$) tayini yapıldı.

Griess reaksiyonu, nitrat (NO_3) iyonlarına spesifik olmadığından süpernatantda bulunan nitrat (NO_3) önce nitrite (NO_2) redüklendi ve sonra nitrit üzerinden hazırlanan nitrat standart grafiğinden miktar tayini yapıldı (18).

Histopatolojik Çalışma Metodu

Formol ile fikse edilen miyokard dokuları Patoloji Laboratuvarı'nda değerlendirildi. Rutin takip işlemlerinden geçirilen dokulardan, parafin bloklar elde edildi. Her numuneden mikrotom ile 5-6 mikrometre kalınlığında doku kesitleri alındı. Doku kesitleri Hemotoksilen-Eozin (HE) histokimyasal boyama yöntemi ile boyandı.

Hemotoksilen-Eozin ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelendi. Histopatolojik değişikliklerin ağırlığına göre skorlama yapıldı. Aşağıda belirtilen her histopatolojik değişiklik için 1 puan verildi (11).

- Miyokard liflerinde şişme ve intertisiyel ödem (+1),
- Miyokard liflerinde disorganizasyon (+1),
- Miyokard liflerinde nekroz (+1),
- Miyokard liflerinde vakuolizasyon (+1),
- Miyokard liflerinde hiçbir değişiklik olmaması (+0).

Kardiyomiyopati derecesinin ağırlığı, toplam puana (0 ile 3) göre yapıldı:

- 0 puan: kardiyomiyopati yok,
- 1 puan: hafif derecede kardiyomiyopati,
- 2 puan: orta derecede kardiyomiyopati,

Tüm istatistiksel analizler SPSS 10.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Tüm parametreler istatistiksel analizlerde nonparametrik testler kullanıldığı için ortanca (minimum-maksimum) olarak ifade edildi. Gruplar arası karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi ve Mann-Whitney U testi, grup içi karşılaştırmada ise Wilcoxon signed ranks testi kullanıldı. Tüm istatistiksel analizlerde $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya Doks Grubu 10, Doks + Pen Grubu 10, Kontrol Grubu 7 tavşan ile başlandı. Çalışma Doks Grubu 10, Doks + Pen Grubu 10, Kontrol Grubu 7 tavşan ile bitirildi. Doks grubunda 0. gün ve 21. gün serum CKMB ve troponin I, plazma MDA, SOD, GSH-Px düzeyleri tablo 1 de gösterildi. Tedavi öncesi, ve sonrası değerleri kıyasladığımızda Troponin, CKMB düzeylerinin 21. gün sonunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükselmiş olduğu saptandı ($p < 0.05$). Diğer parametrelerde değişikliklilik olmadığı belirlendi (Tablo 1).

Tablo 1. Doksorubisin alan grupta 0. gün ve 21. gün serum CKMB ve troponin I, plazma MDA, SOD, GSH-Px düzeyleri

Doks. n=10	0. gün	21. gün	p değeri
	Ortanca (Min-Maks)	Ortanca (Min-Maks)	
Troponin I (ng/mL)	0.22 (0.17-0.26)	0.27 (0.24-0.56)	<0.05
CKMB (U/l)	2080 (1043-4059)	4123 (2542-5981)	<0.05
MDA (µmol/L)	0.52 (0.11-0.78)	0.69 (0.27-1.41)	>0.05
SOD (U/L)	1.31 (1.15-1.42)	1.24 (0.97-1.44)	>0.05
GSH-PX (U/mL)	0.18 (0.11-0.38)	0.26 (0.08-0.43)	>0.05

CKMB; kreatin kinaz MB, MDA; malondealdehid, SOD; superoksit dismutaz, GSH-Px; glutatyon peroksidaz

Doks+Pen grubunda değerlerde anlamlı değişiklik olmadığı belirlendi (p>0.05)(Tablo 2).

Tablo 2. Doks+Pen alan grupta 0. gün ve 21. gün serum CKMB ve troponin I, plazma MDA, SOD, GSH-Px düzeyleri

Doks.+Pen n=9	0. gün	21. gün	p değeri
	Ortanca (Min-Maks)	Ortanca (Min-Maks)	
Troponin I (ng/mL)	0.22 (0.16-0.23)	0.23 (0.19-0.27)	>0.05
CKMB (U/l)	2108 (917-3890)	2703 (1447-4003)	>0.05
MDA (µmol/L)	0.44 (0.14-1.14)	0.38 (0.14-2.06)	>0.05
SOD (U/L)	1.28 (1.14-1.35)	1.24 (1.12-1.36)	>0.05
GSH-PX (U/mL)	0.30 (0.11-0.44)	0.21 (0.08-0.49)	>0.05

CKMB; kreatin kinaz MB, MDA; malondealdehid, SOD; superoksit dismutaz, GSH-Px; glutatyon peroksidaz

Her iki grubun değerleri birbiriyle kıyaslandığında Doks grubunda Troponin ve CKMB değerlerindeki yüksekliğin Doks+Pen grubuna göre anlamlı olduğu saptandı (p<0.05).

Doku MDA, NO, SOD ve GSM-Px değerleri Doks, Doks+Pen ve kontrol gruplarında incelendi ve bu parametrelerin gruplar içindeki değerleri birbirleriyle kıyaslandı. MDA'nın Doks ve Doks+Pen değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu saptandı (p<0.05). NO'nun Doks+Pen grubu değerinin kontrol grubundan, Doks grubunun değerinin ise diğer iki gruptan istatistiksel olarak anlamlı yüksek oldu-

ğu belirlendi (p<0.05). SOD değerleri incelendiğinde Doks ve Doks+Pen grubu değerlerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu ve GSM-Px'in değerleri incelendiğinde ise Kontrol ve Doku+Pen gruplarının değerlerinin Doks grubuna göre anlamlı artmış olduğu saptandı (p<0.05) (Tablo 3).

Histopatolojik Değerlendirme

Doks Grubunun kardiyomiyopati skoru 3 (ağır kardiyomiyopati), Doks+Pen Gruplarının kardiyomiyopati skoru 1 (hafif kardiyomiyopati), Kontrol Grubunun kardiyomiyopati skoru 0 olarak bulundu. Grupların histopatolojik bulguları karşılaştırıldığında Doks Grubu kardiyomiyopati skorunun diğer grupların kardiyomiyopati skoruna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğu (p<0.05) belirlendi. Doks Grubunda bir miyokartta kardiyomiyopati bulguları ile birlikte bakteri kümeleri görüldü. Grupların histopatolojik kardiyomiyopati skorlaması tablo 4'de verilmiştir.

TARTIŞMA

Doksorubisine bağlı kardiyotoksitenin önlenmesine yönelik çalışmalar daha çok deneysel çalışmalar olup; fare, tavşan, domuz ve köpeklerde yapılan çalışmalarda, doksorubisinle oluşturulan kardiyotoksitenin klinik ve morfolojik özelliklerinin insanlardakine benzer olduğu belirlenmiştir (5). Çalışmada tavşan modeli tercih edilmiş ve çocukluk çağında kullanılan doksorubisinin kardiyotoksik etkisini yanıtması açısından genç tavşanlar seçilmiştir. Doksorubisin dozu hayvan modellerinde (tavşan ve fare) belirlenen total kümülatif doza (15mg/kg) uygun verilmiştir (5,19).

Çalışmada sadece doksorubisin verilen grupta histopatolojik olarak ağır kardiyomiyopati ge-

Tablo 3. Kontrol, Doks ve Doks+Pen gruplarında MDA, SOD, NO ve GSH-Px değerleri

Grup	n	MDA (nmol/µg protein) Ortanca (Min-Maks)	NO (µmolx10-3/µg protein) Ortanca (Min-Maks)	SOD (U/µg protein) Ortanca (Min-Maks)	GSH-Px (mU/µg protein) Ortanca (Min-Maks)
Doks.	10	0.056 (0,031-0,087) ^a	0.13 (0.06-0.26) ^a	5.42 (2.58-7.63) ^a	2.4 (1.3-7.6)
Doks + Pen	9	0.051 (0,019-0,094) ^a	0.08 (0.04-0.10) ^{a,b}	5.56 (3.08-11.41) ^a	5.6 (4.0-9.7) ^b
Kontrol	7	0,027 (0,017-0,042)	0.03 (0.02-0.05)	4.97 (3.04-7,26)	4.6 (2.2-5.0) ^b

^a $p<0.05$, Kontrol Grubu ile kıyaslandığında, ^b $p<0.05$ Dos grubu ile kıyaslandığında
NO: nitrik oksit, MDA: malondealdehid, SOD; superoksit dismutaz, GSH-Px: glutatyon peroksidaz

liştiği saptanmıştır. Miyokardiyal fibrillerde şişme ve interstisiyel ödem, miyokardiyal fibrillerin disorganizasyonu, ve nekrozundan oluşan histopatolojik bulgular literatürdeki bulgularla benzerlik göstermektedir (^{11,20}). Doks+Pen grubunda yapılan histopatolojik değerlendirmede normal miyokard dokusu yanında hafif kardiyomiyopati bulgusu saptandı. Bu durum pentoksifilin doksorubisine bağlı kardiyotoksisteyi tam olarak önlemese de oldukça gerilettiğini düşündürmektedir.

Çalışmada Doks Grubunda çalışma sonu CKMB düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanması literatürdeki çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (¹¹). Hafif kardiyomiyopati saptanan Doks+Pen grubunda çalışma sonu serum CKMB düzeylerinde artış tesbit edilmemesi, minör miyokardiyal hasarın tesbitinde serum CKMB düzeylerinin yeterli olmadığını düşündürmüştür.

Dokсорubisine bağlı kardiyotoksistenin belirlenmesinde, CKMB ile ilgili yeterli çalışma olmasına rağmen; Tn I düzeylerinin tanısal değeri ile ilgili çok az sayıda çalışma vardır. Mathew

Tablo 4. Grupların histopatolojik kardiyomiyopati skorlaması

Grup	n	Kardiyomiyopati Skoru Ortanca (Min-Maks)
Doks	9	3.0 (2.0 - 3.0) ^a
Doks + Pen	9	1.0 (0.0 - 1.0) ^{a,b}
Kontrol	7	0.0 (0.0 - 0.0) ^b

^a $p<0.05$, Kontrol Grubu ile kıyaslandığında, ^b $p<0.05$, Doks Grubu ile kıyaslandığında.

P ve ark. (²¹) malignitesi olan hastalarda 375 mg/m²lik kümülatif dozların üzerinde asemptomatik miyokardiyal hasarın tespitinde serum Tn I düzeylerinin belirleyici olduğunu bildirmişlerdir. Herman ve ark. (²²) farelerde 7 mg/kg kümülatif dozda serum Tn T düzeylerinde artış saptadıklarını belirtmekle birlikte, serum Tn I düzeylerinin değerlendirildiği veya kümülatif doz karşılaştırılması yapılmış deneysel çalışmaya rastlayamadık. Çalışmamızda Doks Grubunda, Tn I düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmış ve histopatolojik olarak kardiyomiyopati skorunun 3 bulunması ile yükselmiş serum troponin I düzeyleri arasında paralellik olduğu tesbit edilmiştir. Bu bulgu serum troponin I düzeylerinin kardiyomiyopatinin biyokimyasal göstergesi olabileceği görüşünü desteklemiştir. Ancak hafif kardiyomiyopati saptanan Doks+Pen grubunda 21. gün Tn I düzeylerinde yükselme tesbit edilmemiştir. Bu nedenle Tn I'nın minör miyokardiyal hasarı göstermede yetersiz kaldığı düşünülmüştür.

Dokсорubisine bağlı kardiyotoksistenin patogenezi tam olarak açıklanamamış; bulgular, kardiyotoksiste gelişmesinde serbest radikallerin açığa çıkmasının ve antioksidan enzimlerin azalmasının major rol oynadığını ortaya koymuştur (^{23,24}).

Kardiyomiyositleri serbest oksijen radikallerine karşı koruyan major antioksidan enzim GSH-Px'dir (²⁵). Çalışmamızda sadece dokсорubisin verilen grupta kalp doku GSH-Px düzeylerinin azalmış olduğu bulunmuş, bu bulgu dokсорubisin kardiyotoksistesinin patogenezinde GSH-

Px'in azalmasının primer rolü olduğu görüşünü teyit etmiştir. Li ve ark. (26) 15 mg/kg kümülatif dozda doksorubisin verdikleri farelerde doksorubisinin son dozundan sonra 2. saatten itibaren GSH-Px enzim aktivitesinde azalma saptadıklarını, Yin ve ark. (27) ise doksorubisini 15 mg/kg tek doz olarak verdiklerinde GSH-Px aktivitesinin değişmediğini rapor etmişlerdir. Bulgularımız Li'nin bulguları ile uyumlu, Yin ve ark. bulguları ile uyumlu değildir. Bu farklılığın Yin ve ark.'nın kümülatif dozu tek doz olarak vermesinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda doksorubisinle birlikte Pentoksifilin kullandığımız grupta kalp doku GSH-Px aktivitesi korunmuştur. Histopatolojik olarak da kardiyotoksisitenin geriletilmiş görülmesi, kalpdeki artmış GSH-Px aktivitesi ile izah edilmiştir.

Dalloz ve ark. (28) ratlarda doksorubisin+radyasyon'un kardiyak fonksiyonlar ve antioksidan defans sistemleri üzerine olan etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında, sadece doksorubisin verilen grupta, son doksorubisin dozundan 24 saat ve 30 gün sonraki plazma ve doku SOD düzeylerinde azalma veya artış olmadığını, kontrol grubu ile benzer bulduklarını rapor etmişlerdir. İlskovic ve ark. (29) doksorubisin son dozundan 3 hafta sonra kalp doku SOD düzeylerinde değişiklik olmadığını, doksorubisinle birlikte antioksidan olarak probukol verilen grupta doku SOD düzeyinin anlamlı oranda arttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda antioksidan etkinliklerini değerlendirmek istediğimiz pentoksifilin grubunda kontrol grubuna göre kalp doku SOD düzeylerinde artış olduğunu belirledik. Bu artış kompensatuar mekanizmaya bağlansa da, Doks grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olması dikkat çekici idi. Çalışmalardaki bulgular ve bizim bulgularımız SOD'ın doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinde rolünün az olsa da, önlenmesinde etkin olduğunu düşündürmektedir.

Doksorubisinin serbest radikal aracılığıyla oluşturduğu kardiyak hasarın bir diğer mekanizma-

sının da lipid peroksidasyonu olduğu düşünülmektedir (1). Literatürde doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patofizyolojisinden kalp doku MDA düzeylerinde yükselmenin sorumlu tutulduğu çok sayıda çalışma bildirilmiştir (23,24,30). Bazı araştırmacılar CKMB ve LDH gibi kardiyak enzimlerdeki yükselmeyi kardiyak membranların doksorubisine bağlı lipid peroksidasyonuna uğramaları sonucu enzim salınımının olmasına bağlamışlardır (11). Çalışmamızda da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doksorubisin grubunda MDA düzeylerinde anlamlı artış belirlenmiş, bu bulgu doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinde lipid peroksidasyon ürünlerindeki artışında etkili olduğu görüşünü desteklemiştir. Çalışmada kullandığımız pentoksifilinle kalp doku MDA düzeylerinde azalma tesbit etmedik. Bu sonuç pentoksifilin antioksidan etkinliğini lipid peroksidasyonunu engelleyerek yapmadığını düşündürmektedir.

Doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinde sorumlu tutulan NO ve peroksinitrit ile ilgili ilk çalışma Weinstein ve ark. (31) tarafından yayınlanmıştır. Weinstein ve ark. 20 mg/kg intraperitoneal tek doz doksorubisin verdikleri farelerde, kalp dokusunda NO sentetaz II enziminde artış olduğunu ve son doksorubisin dozundan 5 gün sonra da, doksorubisine bağlı oksidatif olayın devam ettiğini, kardiyak dokuda proteine bağlı peroksinitrit radikallerinde artış saptadıklarını bildirmişlerdir. Fadilloğlu, Alderi ve ark.'nın yaptığı çalışmalarda da bu sonucu destekler bulgular elde edilmiştir (32,33). Çalışmamızda kalp doku NO düzeyi ile ilgili bulgularımız literatürle uyumlu olup, Doks Grubu'nda NO düzeyleri; kontrol, doks+pen gruplarına göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur. Bu bulgu, doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinde NO'nin rolünün olduğu görüşünü desteklemiş, pentoksifilin NO sentezini azaltarak antioksidan aktivite sağlıyor olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda kalp doku GSH-Px, SOD ve

MDA düzeyleri ile birlikte çalışma başında ve çalışma sonunda plazma GSH-Px, SOD ve MDA düzeyleri de belirlenmiştir. Ömürleri kısa olan ve oluştukları dokuda etkin olan antioksidan enzimlerin ve serbest radikallerin doku düzeylerinin tanısasal değeri plazma değerlerinden kıymetlidir. Ancak klinikte plazma değerlerinin belirlenmesi doku değerlerinin belirlenmesinden daha pratik olacaktır. Çalışmamızda plazma GSH-Px, SOD ve MDA düzeyleri açısından grupların başlangıç değerleri ve çalışma sonu değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Bu bulgu plazma GSH-Px, SOD ve MDA düzeylerinin doksorubisin kardiyotoksitesini belirlemede kullanılamayacağını düşündürmüştür.

Bir metilksantin türevi olan pentoksifilinin dolaşım düzenleyici etkisinden yıllarca yararlanmış, son yıllarda nötrofillerde kuvvetli inhibitör etki sağladığı, özellikle hasarlı dokularda süperoksit radikali başta olmak üzere nötrofillerden serbest oksijen radikallerinin ve lizozomal enzimlerin salınımını inhibe ettiği ⁽¹⁰⁾ hasarlı dokuda hidroksil radikallerini temizlediği belirlenmiştir ^(7,8). Antioksidan olarak kullanıldığı çalışmalarda ise farklı sonuçlar elde edilmiştir. Sulkawska ve ark. ⁽³⁴⁾ siklofosfamide bağlı serbest radikallerle oluşan akciğer hasarını önlediğini, karaciğerin oksidatif hasarını önlemede ise yetersiz kaldığını saptadıklarını bildirmişlerdir.

Viladkar ve ark. ⁽³⁵⁾ pentoksifilinin insan KML hücrelerinde doksorubisin akümülyasyonunu artırarak, doksorubisinin antitümör etkisini arttırdığını rapor etmişlerdir. Literatürde pentoksifilinin doksorubisine bağlı kardiyotoksitesinin önlenmesindeki etkinliği ile ilgili herhangi bir klinik veya deneysel çalışmaya rastlayamadık. Çalışmamızda, pentoksifilinin, doku GSH-Px ve SOD düzeylerini arttırarak ve doku NO düzeylerini azaltarak doksorubisin kardiyotoksitesini engellediğini saptadık. Benzer çalışma olmadığı için bu bulgumuzu literatürle kıyaslayamadık.

Sonuçta; doksorubisin verilen grupta ağır kardiyomiyopati geliştiği, doksorubisin ile birlikte pentoksifilin verilen grupta ise hafif kardiyomiyopati bulguları olduğu ve pentoksifilinin doksorubisine bağlı kardiyotoksitesiyi önlemeye de hafiflettiği kanaatine varıldı. Serum Tn I ve CKMB düzeylerinin doksorubisine bağlı ağır kardiyomiyosit hasarının belirlenmesinde yararlı olabileceği, minör miyokardiyal hasarı göstermede ise yetersiz kalabilecekleri görüldü. Doksorubisin verilen grupta miyokardiyal GSH-Px düzeyleri azaldığı, MDA ve NO düzeylerinin yükseldiği saptandı, bu bulgu doksorubisinin kardiyotoksitesinin patogeneğinde GSH-Px'ın azalmasının, MDA ve NO düzeylerinin artmasının rolü olduğu görüşünü destekledi. Başlangıç plazma GSH-Px, SOD ve MDA düzeyleri ile çalışma sonu düzeyleri arasında fark saptanmayıp, plazma GSH-Px, SOD ve MDA düzeylerinin doksorubisin kardiyotoksitesini belirlemede kullanılamayacağı kanaatine varıldı. Ayrıca pentoksifilinin miyokardiyal GSH-Px düzeylerini yükselttiği, NO düzeylerini azalttığı, SOD enzim aktivitesinde ve MDA aktivitesinde değişiklik yapmadığı; doksorubisine bağlı kardiyotoksitesiyi önlemede yeterli olabileceği, pentoksifilinin kardiyotoksitesiyi önlemedeki etkinliğine yönelik yeni çalışmaların yapılması gerektiği kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

1. Singal PK, Iliskovic N, Li T, Kumar D: Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *FASEB J.* 1997;11:931-6
2. Wojtacki J, Lewicka-Nowak E, Lesniewski-Kmak K: Anthracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention review of the literature. *Med Sci Monit.* 2000; 6:411-20
3. Singal PK, Deally CM, Weinberg LE: Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. *J Mol Cell Cardiol.* 1987;19:817-28
4. Van Vleet JF, Ferrans VJ: Clinical and pathologic features of chronic adriamycin toxicosis in rabbits. *Am J Vet Res.* 1980;41:1462-9
5. Herman EH, Ferrans VJ: Preclinical animal models of cardiac protection from anthracycline-induced cardiotoxicity. *Semin Oncol.* 1998;25:15-21

6. Samlaska CP, Winfield EA: Pentoxifylline. *J Am Acad Dermatol.* 1994;30:603-21
7. Pasquier C, Franzini E, Abedinzaldelr Z, Hakim J: Protective effect of pentoxifylline against hydroxyl radical-induced damage to proteins in pentoxifylline and analogues: effects on leukocyte function. Hakim J, Mandel GL (eds). Basel: Karger, 1988; 91-6
8. Freitas JP, Filipe P, Guerra Rodrigo F: [Potential antioxidative effects of pentoxifylline]. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1995;189:401-5
9. Bekerecioglu M, Kutluhan A, Demirtas I, Karaayvaz M: Prevention of adriamycin-induced skin necrosis with various free radical scavengers. *J Surg Res.* 1998;75:61-5
10. Sener G, Akgun U, Satiroglu H, Topaloglu U, Keyer-Uysal M: The effect of pentoxifylline on intestinal ischemia/reperfusion injury. *Fundam Clin Pharmacol.* 2001;15:19-22
11. Saad SY, Najjar TA, Al-Rikabi AC: The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacol Res.* 2001;43:211-8
12. Paglia DE, Valentina WN: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967;70:158-69
13. Sun Y, Oberley LW, Li Y: A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988; 3413:497-500
14. Satoh K: Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta.* 1978 15;90:37-43
15. Jain SK: Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes. *Biochem Biophys Acta.* 1988;937:205-10
16. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid relations. *Analytical Biochemistry.* 1979; 95:351-8
17. Davidge ST, Stranko CP, Roberts JM: Urine but not plasma nitric oxide metabolites are decreased in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;174:1008-1013
18. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL: Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem.* 1995;41:892-6
19. Morishima I, Matsui H, Mukawa H, et al: Melatonin, a pineal hormone with antioxidant property, protects against adriamycin cardiomyopathy in rats. *Life Sci.* 1998;63:511-21
20. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, et al: The role of melatonin and L-tryptophan in prevention of acute gastric lesions induced by stress, ethanol, ischemia, and aspirin. *J Pineal Res.* 1997;23:79-89
21. Mathew P, Suarez W, Kip K, et al: Is there a potential role for serum cardiac troponin I as a marker for myocardial dysfunction in pediatric patients receiving anthracycline-based therapy? A pilot study. *Cancer Invest.* 2001;19:352-9
22. Herman EH, Lipshultz SE, Rifai N, et al: Cardiac troponin T: elevated serum levels and loss from cardiac myocytes in doxorubicin toxicity. *Circulation.* 1996; 94: I-85
23. Siveski-Iliskovic N, Kaul N, Singal PK: Probucol promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Circulation.* 1994;89:2829-35
24. Sadzuka Y, Sugiyama T, Shimoi K, Kinai N, Hirota S: Protective effect of flavonoids on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Lett.* 1997;92:1-7
25. Myers C: The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Semin Oncol.* 1998;25:10-14
26. Li T, Singal PK: Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol. *Circulation.* 2000;24:102:2105-110
27. Yin X, Wu H, Chen Y, Kang YJ: Induction of antioxidants by adriamycin in mouse heart. *Biochem Pharmacol* 1998;56:87-93
28. Dalloz F, Maingon P, Cottin Y, Briot F, Horiot JC, Rochette L: Effects of combined irradiation and doxorubicin treatment on cardiac function and antioxidant defenses in the rat. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:785-800
29. Iliskovic N, Hasinoff BB, Maliszka KL, Li T, Danelisen I, Singal PK: Mechanisms of beneficial effects of probucol in adriamycin cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem.* 1999;196:43-49
30. Sayed-Ahmed MM, Salman TM, Gaballah HE, Abou El-Naga SA, Nicolai R, Calvani M: Propionyl-L-carnitine as protector against adriamycin-induced cardiomyopathy. *Pharmacol Res.* 2001;43:513-20
31. Weinstein DM, Mihm MJ, Bauer JA: Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;294:396-401
32. Fadillioglu E, Yılmaz HR, Erdogan H, Sogut S: The activities of tissue xanthine oxidase and adenosine deaminase and the levels of hydroxyproline and nitric oxide in rat hearts subjected to doxorubicin: protective effect of erdosteine. *Toxicology.* 2003;191:153-8
33. Aldieri E, Bergandi L, Riganti C, Costamagna C, Bossia A, Ghigo D: Doxorubicin induces an increase of nitric oxide synthesis in rat cardiac cells that is inhibited by iron supplementation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002;185:85-90
34. Sulkowska M, Sulkowski S, Skrzydlewska E: The effect of pentoxifylline on ultrastructure and antioxidant potential during cyclophosphamide-induced liver injury. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1999;31:413-22
35. Viladkar A, Juvekar A, Chitnis M, Advani S: Amelioration of doxorubicin resistance by pentoxifylline in human chronic myeloid leukemia cells in vitro. *Sel Cancer Ther.* 1991;7:119-26