

DOKSORUBİSİN İLE OLUŞTURULMUŞ DENEYSEL KARDİYOTOKSİSİTE VE KARDİYOTOKSİSİTE ÜZERİNE L-TRİPTOFAN ETKİSİ

Doxorubicin-induced experimental cardiotoxicity and effect of L-tryptophan on cardiotoxicity

Figen NARİN¹, Ferunda DEMİR², Hülya AKGÜN³, Ali BAYKAN²,
Derya KOÇER⁴, Kazım ÜZÜM⁵

Özet

Amaç: Etkin bir antitümör ajan olan doksorubisinin kardiyotoksik yan etkisi, ilacın terapötik kullanımını kısıtlamakta, kardiyotoksitenin belirlenmesi ve önlenmesi önem kazanmaktadır. Kardiyotoksitenin patogenezinden ağırlıklı olarak serbest radikallerde ve lipid peroksidasyon ürünlerinde artış, antioksidan enzimlerde azalma sorumlu tutulmaktadır. Çalışmada doksorubisine bağlı kardiyotoksitenin patogenezini araştırılması ve bunun üzerine triptofanın etkisinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: 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) birinci gruba verildiği gibi doksorubisin ve doksorubisinden 24 saat önce başlanarak ve doksorubisin son dozundan 7 gün sonrasına kadar devam etmek üzere L-triptofan (200 mg/kg/gün oral) verilerek oluşturuldu. Üçüncü grup ise kontrol grubu (n:7) olarak planlandı. Kardiyotoksitenin patogenezindeki etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla miyokard ve plazma glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD), malondialdehit (MDA) ve miyokardiyal nitrik oksit (NO) düzeyleri ile kardiyotoksite tanısındaki etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla serum troponin I (Tn I) ve kreatin kinaz MB (CKMB) düzeyleri çalışıldı. Histopatolojik olarak miyokardiyal hücre hasarının gelişip gelişmediği araştırıldı.

Bulgular: Doksorubisin verilen genç tavşanlarda histopatolojik olarak ağır kardiyomiopati geliştiği; miyokardiyal GSH-Px'in azaldığı, MDA ve NO düzeylerinin yükseldiği saptandı. Doksorubisinle birlikte L-triptofan verilen grupta miyokardiyal GSH-Px ve SOD'un yükseldiği, histopatolojik olarak L-triptofanın ağır kardiyomiopatiyi önlediği saptandı. Gruplar arasında plazma GSH-Px, SOD ve MDA düzeyleri açısından fark bulunmadı. Serum troponin I (Tn I) ve kreatin kinaz MB (CKMB) düzeylerinin, sadece ağır kardiyotoksite gelişen grupta arttığı, antioksidan verilen gruplarda değişmediği tesbit edildi.

Sonuç: Sonuç olarak doksorubisine bağlı kardiyotoksitenin patogenezinde miyokardiyal antioksidan enzimlerde azalma, serbest radikallerde ve lipid peroksidasyon ürünlerinde artmanın rol oynayabileceği tesbit edilmiş ve L-triptofanın doksorubisine bağlı ağır kardiyotoksiteyi önleyebileceği gösterilmiştir. Ayrıca sonuçlar serum troponin I ve kreatin kinaz MB düzeylerinin, ağır kardiyotoksitesinin tanısında kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Deneysel; Doksorubisin; Kardiyotoksite; L-triptofan

Abstract

Aim: Doxorubicin, a widely used antineoplastic agent in clinical practice, has a serious side effect, cardiotoxicity. Due to the risk of life-threatening cardiotoxicity which limits the therapeutic potential, diagnosis and prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity becomes critical. Free radicals, lipid peroxidation and antioxidant enzymes are suggested to be involved mainly in doxorubicin-induced cardiotoxicity pathogenesis. The aim of this study was to evaluate the pathogenesis of doxorubicin induced cardiotoxicity and the effect of L-tryptophan on it.

Material and Methods: The study was designed on three groups: the first group received (n=10 young rabbit) 6 daily doses of intraperitoneal doxorubicin (cumulative dose 15mg/kg) for 15 days. The second group received (n=10 young rabbit) received triptofan (200 mg/kg/day oral) 24 hours before intraperitoneal doxorubicin and this was continued 7 days after the last dose of doxorubicin. The third group was the control group (n=7). Myocardial and plasma glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) activity and myocardial nitric oxide (NO) activity was measured in our rabbit model. Serum troponin I (Tn I) and creatine kinase MB (CKMB) values were tested for diagnostic value of cardiotoxicity.

Results: Our results suggested that doxorubicin formed severe cardiotoxicity in young rabbits with 15 mg/kg cumulative doses with markedly decreased myocardial GSH-Px and increased MDA and NO values. L-tryptophan reduced doxorubicin-induced cardiotoxicity by increasing myocardial GSH-Px and SOD activity. Although serum Tn I and CKMB levels had diagnostic values, any change in plasma GSH-Px, SOD and MDA activity was determined in assessing doxorubicin-induced cardiotoxicity.

Conclusion: In conclusion, decreased antioxidant enzyme levels, increased free radicals and lipid peroxidation play a major role in the pathogenesis of doxorubicin-induced cardiotoxicity and tryptophan is an effective antioxidant in reducing doxorubicin-induced cardiotoxicity.

Key Words: Cardiotoxicity, Doxorubicin, Experimental, Tryptophan

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi 38039 KAYSERİ
Biyokimya. Y.Doç.Dr.¹, Araş.Gör.Dr.⁴,
Pediatri. Uzm.Dr.², Prof.Dr.³, Patoloji. Öğr.Gör.Dr.⁵

Geliş tarihi: 2 Mart 2004

Kanser tedavisinde kullanılan doksozubisin, yan etkisi fazla olan etkili bir kemoterapik ajandır. Kardiyotoksisite en önemli yan etkisi olup ilk kez doksozubisin tedavisi alan çocuklarda kalp yetmezliği geliştiğinin fark edilmesiyle dikkat çekmiştir. Doksozubisine bağlı kardiyotoksisite geliştiğinde kan basıncı, elektrokardiyografi değişiklikleri gibi hafif semptomların yanı sıra konjestif kalp yetmezliği, disritmi, miyokardit, perikardit ve kardiyomiyopati gibi ağır bulgular görülebilir.

Doksozubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezi tam olarak açıklanamamış, histopatolojik bulguların değişken olması bir çok faktörün etkili olduğunu düşündürmüştür (1). Çalışmalarda elde edilen bulgular, doksozubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinde; serbest radikal oluşumunun, antioksidan enzimlerde azalmanın ve lipid peroksidasyonunda artmanın rol oynuyor olabileceğini desteklemektedir (1,2). Patogeneзде 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). Doksozubisinin 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).

Doksozubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinde serbest radikal ve antioksidan enzimlerin rol oynadığına ait bulguların belirlenmesi, antioksidan tedavi denemelerini gündeme getirmiştir (2).

Doksozubisine bağlı kardiyotoksisitenin önlenmesine yönelik ilk çalışmada Van Vleet ve ark. (4) tavşanlara doksozubisinle birlikte antioksidan olarak selenyum ve E vitamini vermişler, 10 haftalık çalışma periodunda selenyum ve E vitamininin doksozubisine bağlı kardiyotoksisiteyi azalttığını belirlemişlerdir. Bu çalışmayı kalsiyum kanal blokörü, koenzim Q, deksrazoksan (ICRF-

187) ve melatonin gibi ajanların denendiği çalışmalar takip etmiştir (5).

L-Triptofan proteinlerin yapısında yer alan 20 aminoasitten biri olup, serotonin nörotransmitterlerinin en önemli ön maddesidir. Serotonin, hipotalamus ve beyin sapında bulunan nöronlarda, pineal bezde ve sindirim sisteminin kromafin hücrelerinde L-triptofandan sentez edilmekte olup; ağrının algılanması, davranışların normal ve anormal olarak düzenlenmesi, uykunun, vücut sıcaklığının ve kan basıncının düzenlenmesi gibi fizyolojik görevleri vardır (6).

Çalışmalarda triptofan derivesi olan N-asetilserotonin de serbest radikal temizleyici aktivitesi olduğu gösterildi (6). Membran lipoproteinlerinde özellikle lipid yoğunluğunun fazla olduğu bölgelerde triptofanın yüksek miktarlarda biriktiği, bu birikiminin lipid tabakayı peroksidasyona karşı koruduğu ve triptofanın sitoprotektif antioksidan olarak kullanılabileceği saptandı (7).

L-triptofan, melatonin prekürsörü amino asit olup serbest oksijen radikallerini temizleyici etkisi olduğu bilinmekle birlikte (7,8) miyokardiyal hasardaki etkisini gösteren herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Çalışmada triptofanın bu özelliklerinden yararlanarak doksozubisine bağlı kardiyotoksisite gelişmesinin önlenmesi amaçlandı. Bu amaçla tavşanlarda deneysel olarak doksozubisine bağlı kardiyotoksisite oluşturulması ve triptofan verilerek doksozubisinin olumsuz etkilerinin önlenmesi planlandı.

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+Triptofan Grubu; doksorubisin ile birlikte triptofan uygulanan grup, (n=10). 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 (9) 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+Triptofan Uygulaması

Doksorubisin Doks Grubuna verildiği şekilde, toz halinde olan L-Triptofan (Sigma Chemical Company, Sigma, St.Louis.MO) doksorubisine başlanmadan 1 gün önce başlanarak son doksorubisin dozundan sonra 7 gün daha devam edilecek şekilde, 20 gün süreyle 200mg/kg /gün (farmakolojik doz:25-200mg/kg Brzozowski ve ark.'nın önerdiği şekilde) (8), su ile sulandırılarak ağızdan 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, 21. gün kan örnekleri Doks grubunda doksorubisin tedavisinin son dozundan 8 gün sonra, Doks+Triptofan gruplarında doksorubisin tedavisinin son dozundan 8 gün, triptofanın 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.

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 sakrifiye edildive 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 cc serumda, serum troponin I düzeyleri ise İnnotrac Aio İmmunoanalizör cihazında İnnotrac Aio TM Troponin I Analyte Pen kiti ile 0.5 cc serumda çalışıldı.

Plazma ve miyokardiyal GSH-Px aktivitesi; GSH-Px tarafından katalizlenen bir reaksiyonda H₂O₂ ile glutatyonun (GSH) oksidasyon hızının ölçülmesi esasına dayanan Paglia ve Valentine'nin birleşik enzimatik yöntemi (10) 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. (11) 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 (12) tarafından geliştirilen ve Jain (13) 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. (14) tarafından geliştirilen metoda göre yapıldı.

Doku NO Tayini: Dondurularak saklanan miyokardiyal homojenatından elde edilen süpernatantların 0.05 ml'si, Somogyi reaktifi (%10 ZnSO₄ ve 0,5 N NaOH) ile ¼ (v/v) oranında seyreltilerek ve deproteinize edilerek, + 4°C'de 1500 rpm de 10 dk santrifüj edildi (15). Elde edilen deproteinize süpernatantlardan NO (NO₂ + NO₃) tayini yapıldı.

Griess reaksiyonu, nitrat (NO₃) iyonlarına spesifik olmadığından süpernatantda bulunan nitrat (NO₃) önce nitrite (NO₂) redüklendi ve sonra nitrit üzerinden hazırlanan nitrat standart grafiğinden miktar tayini yapıldı (16).

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. (9).

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 + Trip Grubu 10, Kontrol Grubu 7 tavşan ile başlandı. Çalışma Doks Grubu 10, Doks + Trip 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 değişiklik olmadığı belirlendi (Tablo I).

Doks+Trip grubunda değerlerde anlamlı değişiklik olmadığı belirlendi (p>0.05)(Tablo II).

Her iki grubun değerleri birbiriyle kıyaslandığında 21. günde Doks grubunda troponin ve CKMB değerlerindeki yüksekliğin Doks+Trip grubuna göre anlamlı olduğu saptandı (p<0.05).

Doku MDA, NO, SOD ve GSM-Px değerleri Doks, Doks+Trip ve kontrol gruplarında incelendi ve bu parametrelerin gruplar içindeki değerleri birbirleriyle kıyaslandı. MDA' nın Doks ve Doks+Trip değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu saptandı (p<0.05). NO' nun Doks+Trip ve Doks grubu değerlerinin kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu belirlendi (p<0.05). SOD değerleri incelendiğinde Doks ve Doks+Trip grubu değerlerinin kontrol grubuna göre, Doks+Trip grubu değerinin ise Doks grubuna göre anlamlı yüksek olduğu ve GSH-Px'in değerleri incelendiğinde ise Kontrol ve Doku+Trip gruplarının değerlerinin Doks grubuna göre anlamlı artmış olduğu saptandı (p<0.05)(Tablo III).

Histopatolojik Değerlendirme

Doks Grubunun kardiyomiyopati skoru 3 (ağır kardiyomiyopati), Doks+Trip 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 denekte kardiyomiyopati bulguları ile birlikte

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

Doks. Grubu n=10	0. gün Ortanca (Min-Max)	21.gün Ortanca (Min-Max)	P değeri
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 (μ mol/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

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

Doks. + Trip n=10	0. gün Ortanca (Min-Max)	21.gün Ortanca (Min-Max)	P değeri
Troponin I (ng/mL)	0.22 (0.16-0.23)	0.22 (0.18-0.29)	>0.05
CKMB (U/l)	2729 (1979-3751)	2703 (1447-4003)	>0.05
MDA (μ mol/L)	0.38 (0.17-1.44)	0.34 (0.11-1.15)	>0.05
SOD (U/L)	1.27 (1.11-1.37)	1.26 (1.08-1.36)	>0.05
GSH-PX (U/mL)	0.24 (0.06-0.40)	0.32 (0.14-0.43)	>0.05

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

Grup	n	MDA (nmol/ μ g protein) Ortanca (Min-Max)	NO (μ mol $\times 10^3$ / μ g protein) Ortanca (Min-Max)	SOD (U/ μ g protein) Ortanca (Min-Max)	GSH-Px (mU/ μ g protein) Ortanca (Min-Max)
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 + Trip	10	0.052 (0,013-0,083) ^a	0.10 (0.04-0.20) ^a	7.33 (3.53-13.25) ^{a,b}	5.7 (3.2-10.0) ^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

^ap<0.05, Kontrol Grubu ile kıyaslandığında, ^bp<0.05 Doks grubu ile kıyaslandığında

Tablo IV. Grupların histopatolojik kardiyomiyopati skorlaması

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

^ap<0.05, Kontrol Grubu ile kıyaslandığında, ^bp<0.05, Doks Grubu ile kıyaslandığında.

bakteri kumeleri goruldu. Grupların histopatolojik kardiyomiyopati skorlaması tablo III'de verilmiştir.

TARTIşMA

Etkin bir antitumör ajan olan doksozubisinin kardiyotoksik yan etkisi, antitumör etkisinden maksimum düzeyde faydalanılmasını engellemekte, kardiyotoksik etki nedeniyle antitumör etkinin kısıtlanması, kardiyotoksisitenin önlenmesi çalışmalarını gündeme getirmektedir.

Doksozubisine bağlı kardiyotoksisitenin önlenmesine yönelik çalışmalar daha çok deneysel çalışmalar olup; fare, sıçan, tavşan, domuz ve köpeklerde yapılan çalışmalarda, doksozubisinle oluşturulan kardiyotoksisitenin klinik ve morfolojik

özelliklerinin insanlardakine benzer olduğu belirlenmiştir (5). Çalışmada tavşan modeli tercih edilmiş ve çocukluk çağında kullanılan doksozubisinin kardiyotoksik etkisini yansıtmaları açısından genç tavşanlar seçilmiştir. Doksozubisin dozu hayvan modellerinde (tavşan ve sıçan) belirlenen total kümülatif doza (15mg/kg) uygun verilmiştir (5,17).

Çalışmada sadece doksozubisin verilen grupta histopatolojik olarak miyokardiyal fibrillerde şişme ve interstisyel ödem, disorganizasyon ve nekrozdan oluşan bulguların olması ile ağır kardiyomiyopati geliştiği saptanmıştır. Miyokardiyal fibrillerde şişme ve interstisyel ödem, miyokardiyal fibrillerin disorganizasyonu, ve nekrozdan oluşan histopatolojik bulgular literatürdeki bulgularla benzerlik göstermektedir (9). Doks+Trip grubunda yapılan histopatolojik değerlendirmede normal miyokard dokusu yanında sadece miyokardiyal fibrillerde şişme, interstisyel ödem ve disorganizasyondan oluşan hafif kardiyomiyopati bulgusu saptandı. Bu durum triptofanın doksozubisine bağlı kardiyotoksisiteyi tam olarak önlemese de oldukça geriletteğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda doksozubisine bağlı miyokardiyal hasarın belirlenmesinde, klinikte kullanılan, invaziv olmayan serum CK-MB ve Tn I düzeylerinin tanısıl değeri de değerlendirilmiştir. Çalışmamızda Doks Grubunda çalışma sonu CKMB düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanması literatürdeki çalışmalarda uyumlu bulunmuştur (9). Hafif kardiyomiyopati saptanan Doks+Trip

grubunda çalışma sonu serum CKMB düzeylerinde artış tesbit edilmemesi, minör miyokardiyal hasarın tesbitinde serum CKMB düzeylerinin yeterli olmadığını düşündürmüştür.

Dokso rubisine bağlı kardiyotoksisitenin belirlenmesinde, CKMB ile ilgili yeterli çalışma olmasına rağmen; Tn I düzeylerinin tanısal değeri ile ilgili çok az sayıda çalışma vardır. Mathew ve ark. (18) malign hastalarda 375mg/m² lik kümülatif dozların üzerinde asemptomatik miyokardiyal hasarın tespitinde serum Tn I düzeylerinin belirleyici olduğunu bildirmişlerdir. Herman ve ark. (19) ratlarda 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 kardiyomiyopatının biyokimyasal göstergesi olabileceği görüşünü desteklemiştir. Ancak hafif kardiyomiyopati saptanan Doks+Trip grubunda 21. gün Tn I düzeylerinde yükselme tesbit edilmemiştir. Bu nedenle Tn I'nin minör miyokardiyal hasarı göstermede yetersiz kaldığı düşünülmüştür.

Dokso rubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezi tam olarak açıklanamamış; bulgular, kardiyotoksisite gelişmesinde serbest radikallerin açığa çıkmasının ve antioksidan enzimlerin azalmasının major rol oynadığını ortaya koymuştur (1,2). Çalışmamızda, aralıklı doz dokso rubisin uygulamasının (2.5mg/kg/günaşırı), serbest radikal, lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistem üzerine etkileri de değerlendirilmiştir. Dokso rubisine bağlı kardiyotoksisite oluşturaların çalışmalarda son dokso rubisin enjeksiyonundan 3 hafta sonra antioksidan sistem ve lipid peroksidasyonu değerlendirilmiş ve dokso rubisinin kronik süreçte kalp doku GSH-Px'ını azalttığı ve lipid peroksidasyon ürünlerini artırdığı belirlenmiştir (20,21).

Kardiyomiyositleri serbest oksijen radikallerine karşı koruyan major antioksidan enzim GSH-Px'dır (22). Çalışmamızda sadece dokso rubisin verilen grupta kalp doku GSH-Px düzeylerinin azalmış olduğu bulunmuş, bu bulgu dokso rubisin kardiyotoksisitenin patogeneziinde GSH-Px'ın azalmasının primer rolü olduğu görüşünü teyit etmiştir. Li ve ark. (23) 15 mg/kg kümülatif dozda dokso rubisin verdikleri ratlarda dokso rubisinin son dozundan sonra 2. saatten itibaren GSH-Px enzim aktivitesinde azalma saptadıklarını, Yin ve ark. (24) ise dokso rubisini 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 dokso rubisinle birlikte triptofan kullandığımız grupta kalp doku GSH-Px aktivitesi korunmuştur. Histopatolojik olarak da kardiyotoksisitenin geriletmiş görülmesi, kalpteki artmış GSH-Px aktivitesi ile izah edilmiştir.

Daloz ve ark. (25) sıçanlarda dokso rubisin +radyasyon'un kardiyak fonksiyonlar ve antioksidan defans sistemleri üzerine olan etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında, sadece dokso rubisin verilen grupta, son dokso rubisin dozundan 24 saat ve 30 gün sonraki plazma ve doku SOD düzeylerinde azalma veya artış olmadığını, kontrol grubu ile benzer bulduklarını rapor etmişlerdir. İliskovic ve ark. (26) dokso rubisin son dozundan 3 hafta sonra kalp doku, SOD düzeylerinde değişiklik olmadığını, dokso rubisinle birlikte antioksidan olarak probukol verilen grupta doku SOD düzeyinin anlamlı oranda arttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda antioksidan etkinliklerini değerlendirmek istediğimiz triptofan 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 çekiciydi. Çalışmalardaki bulgular ve bizim bulgularımız SOD'ın dokso rubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogeneziinde rolünün az olsa

da, önlenmesinde etkin olduğunu düşündürmektedir.

Doksorubisinin serbest radikal aracılığıyla oluşturduğu kardiyak hasarın bir diğer mekanizmasının da lipid peroksidasyonu olduğu düşünülmektedir (1). Literatürde doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patofizyolojisinden kalp doku MDA düzeylerinde yükselmenin sorumlu tutulduğu çok sayıda çalışma bildirilmiştir (20,21,27). Bazı araştırmacılar CKMB ve LDH gibi kardiyak enzimlerdeki yükselmeyi kardiyak membranların doksorubisine bağlı lipid peroksidasyonuna uğramaları sonucu enzim salınımının olmasına bağlamışlardır (9). 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. Çalışmamızda ise kullandığımız triptofanla kalp doku MDA düzeylerinde azalma tesbit etmedik. Bu sonuç triptofanın antioksidan etkinliğini lipid peroksidasyonunu engelleyerek yapmadığını düşündürmektedir.

Doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinde sorumlu tutulan NO ve peroksinitrit ile ilgili ilk çalışma Weinstein ve ark. (28) tarafından yayınlanmıştır. Weinstein ve ark. 20mg/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 (29), Aldieri ve ark. (30)'nın yaptığı çalışmalarda da bu sonucu destekler bulgular elde edilmiştir. Çalışmamızda kalp doku NO düzeyi ile ilgili bulgularımız literatürle uyumlu olup, Doks Grubu'nda NO düzeyleri; kontrol, Doks+Trip gruplarına göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur. Bu bulgu, doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinde NO'nin rolünün olduğu görüşünü desteklemiş, triptofanın 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 tanısal 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 kardiyotoksisitesini belirlemede kullanılamayacağını düşündürmüştür.

Melatoninin antioksidan aktivitesiyle ilgili cesaret veren sonuçların alınması, melatoninin sentezlendiği bir aminoasit olan L-triptofan'ın da benzer özelliklere sahip olup olmadığı düşüncesini uyandırmıştır. L-triptofanın antioksidan aktivitesinin değerlendirildiği çalışma sayısı oldukça az olup; süperoksit anyon ve hidrojen peroksitin ortaya çıkışını önlediği (31), antioksidan olarak farmakolojik kullanımlarının söz konusu olabileceği (7) ileri sürülmektedir.

Brzozowski ve ark. (8) L-triptofanın sıçanlarda plazma melatonin düzeylerinde 2-3 kat artma, gastrik kan akımında ve NO gibi kan serbest radikal düzeylerinde azalma sağlayarak, stres ve iskemi / reperfüzyonla oluşan gastrik lezyonları önlediğini saptadıklarını rapor etmişlerdir.

Watanaba ve ark. (32) insan plasentasından elde edilen L-triptofanın, diğer plaseenta antioksidanları olan L-fenilalanin, L-trozin ve urasilden daha etkili bir antioksidan olduğunu ve L-triptofanın fenton reaksiyonu ve sitokrom P-450 bağımlı lipid peroksidasyonu üzerine inhibitör aktivitesinin daha fazla olduğunu saptadıklarını rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda Doks+Trip Grubu'nda kalp doku

GSH-Px ve SOD düzeylerinin anlamlı oranda yükselmiş olması, L-triptofanın koruyucu etkisini kalp doku GSH-Px ve SOD düzeylerini artırarak sağladığını düşündürmüştür. Çalışmamız L-Triptofanın, endojen antioksidan enzim aktivitelerini artırdığına dair bulguların olduğu ilk çalışma özelliğini taşımaktadır. Ancak Doks+Trip Grubu'nda doku MDA ve NO düzeyleri Doks Grubuna benzer bulunmuştur. Bu bulgu L-triptofanın kalp doku NO düzeylerini azaltmada yetersiz kaldığı ve Watanaba ve ark.'nın (32) bulgularının aksine lipid peroksidasyonunu önleyemediğini ortaya koymuştur. Literatürde benzer bir çalışmaya rastlayamadık.

Sonuçta; doksorubisin verilen grupta ağır kardiyomiyopati geliştiği, doksorubisin ile birlikte triptofan verilen grupta ise hafif kardiyomiyopati bulguları oluştuğu ve triptofanın doksorubisine bağlı kardiyotoksitesiteyi önlemesinde hafiflettiği kanatine 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 kardiyotoksitesitesinin patogenezinde GSH-Px'in 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 kardiyotoksitesitesini belirlemede kullanılamayacağı kanaatine varıldı. Ayrıca; triptofanın miyokardiyal GSH-Px düzeylerini ve SOD enzim aktivitesinde yükselttiği saptandı, NO düzeyi ve MDA aktivitesinde değişiklik yapmadığı saptandı. Doksorubisine bağlı kardiyotoksitesiteyi önlemede yeterli olabileceği, triptofanın kardiyotoksitesiteyi 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;11:931-936.*
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;6:411-420.
3. Singal PK, Deally CM, Weinberg LE. Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. *J Mol Cell Cardiol* 1987;19:817-828.
4. Van Vleet JF, Ferrans VJ. Clinical and pathologic features of chronic adriamycin toxicosis in rabbits. *Am J Vet Res* 1980;41:1462-1469.
5. Herman EH, Ferrans VJ. Preclinical animal models of cardiac protection from anthracycline-induced cardiotoxicity. *Semin Oncol* 1998;25:15-21.
6. Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J, D'Arpa D. Melatonin and tryptophan derivatives as free radical scavengers and antioxidants. *Adv Exp Med Biol* 1999;467:379-387.
7. Moosmann B, Behl C. Cytoprotective antioxidant function of tyrosine and tryptophan residues in transmembrane proteins. *Eur J Biochem* 2000;267:5687-5692.
8. 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.
9. 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;43:211-218.
10. Paglia DE, Valentina WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-169.
11. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497-500.
12. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1978

- 15;90:37-43.
13. Jain SK. Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes. *Biochem Biophys Acta*. 1988;937:205-210.
 14. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid relations. *Analytical Biochemistry* 1979; 95:351-358.
 15. 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.
 16. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995;41:892-896.
 17. Morishima I, Matsui H, Mukawa H, et al. Melatonin, a pineal hormone with antioxidant property, protects against adriamycin cardiomyopathy in rats. *Life Sci* 1998;63:511-521.
 18. 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;19:352-359.
 19. 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: 1-85.
 20. Siveski-Iliskovic N, Kaul N, Singal PK. Probucol promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Circulation* 1994;89:2829-2835.
 21. Sadzuka Y, Sugiyama T, Shimoi K, Kinae N, Hirota S. Protective effect of flavonoids on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Lett* 1997;92:1-7.
 22. Myers C. The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Semin Oncol* 1998 ;25:10-14.
 23. Li T, Singal PK. Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol. *Circulation* 2000;24:102:2105-2110.
 24. Yin X, Wu H, Chen Y, Kang YJ. Induction of antioxidants by adriamycin in mouse heart. *Biochem Pharmacol* 1998;56:87-93.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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;43:513-520.
 28. 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.
 29. Fadillioglu E, Yilmaz 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;191:153-158.
 30. Aldieri E, Bergandi L, Riganti C, Costamagna C, Bosia 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.
 31. Toyosaki T. Antioxidant effect of beta-carotene on lipid peroxidation and synergism with tocopherol in an emulsified linoleic acid model system. *Int J Food Sci Nutr*. 2002;53:419-423.
 32. Watanabe S, Togashi S, Takahashi N, Fukui T. L tryptophan as an antioxidant in human placenta extract. *J Nutr Sci Vitaminol* 2002;48:36-39.