

Kobaylarda Siklofosfaminin Yalnız ve Mesna ile Kullanılmasının Bazı Kan Parametreleri Üzerine Etkisi

Özdal ETLİK

GATA, Fizyoloji Anabilim Dalı, 06018, Etlük, Ankara - TÜRKİYE

İlksin PIŞKIN, Vedat SAĞMANLIĞIL

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, 06110, Dışkapı, Ankara - TÜRKİYE

Ahmet TOMUR

GATA, Fizyoloji Anabilim Dalı, 06018, Etlük, Ankara - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 14.04.1998

Özet : Bu çalışma, tek doz uygulanan siklofosfaminin kan hücreleri üzerine etkilerinin ortaya konması yanında mesnanın bir koruma sağlayıp sağlayamayacağını görmek amacıyla yapılmıştır.

Araştırmada deneme hayvanı olarak 250-300 gram ağırlığında, erkek 24 albino kobay kullanıldı ve hayvanlar 4 gruba bölündü. Birinci (kontrol) ve ikinci grup hayvanlara 0, 180, 360 ve 540. dakikalarda serum fizyolojik plasebo olarak uygulanırken, üçüncü ve dördüncü grup kobaylara aynı dakikalarda mesna (21.5 mg/kg) periton içi verildi. Ayrıca birinci ve üçüncü grup hayvanlara 20. dakikada serum fizyolojik verilirken, ikinci ve dördüncü grup kobaylara ise siklofosfamin(68.1 mg/kg) periton içi uygulandı.

Heparinli tüplere alınan kan örneklerinde, eritrosit, lökosit ve trombosit sayılarına, hemogloblin ve hematokrit değerlerine ayrıca nötrofil, lenfosit, eozinofil, monosit ve bazofil yüzde oranlarına bakıldı.

Siklofosfaminin yalnız kullanılmasının eritrosit ve lökosit sayıları ile lenfosit oranında ve hematokrit değerinde azalma oluşturduğu buna karşın nötrofil oranında bir artış yaptığı gözlemlendi. Siklofosfaminin mesnaya birlikte kullanılması durumunda ise siklofosfamin etkisiyle azalmış olan lökosit sayısının ve lenfosit oranının mesnaya bir ölçüde arttığı saptandı. Diğer taraftan tek başına kullanılan mesnanın hematolojik bulgularında herhangi bir değişiklik oluşturmadığı belirlendi.

Anahtar Sözcükler : Siklofosfamin, mesna, kan parametreleri, kobay

The Effects of Cyclophosphamide in the Absence and Presence of Mesna on Some Blood Parameters in Guinea Pigs

Abstract : This investigation was carried out to observe the effects of single dose of cyclophosphamide on blood cells and whether these could be prevented by mesna or not.

In this study, 24 albino male guinea pigs weighing 250-300 g were equally divided into 4 groups. The first (control) and second groups animals were applied physiologic saline as placebo while third and fourth group animals were given mesna (21.5 mg/kg) at 0, 180, 360 and 540th minutes intraperitoneally. In addition these, physiologic saline was injected to the first and third group animals while cyclophosphamide (68.1 mg/kg) was given to the second and fourth group animals at 20th minute intraperitoneally.

The blood samples were taken into heparinized tubes to estimate total leukocyte, erythrocyte and platelet counts, hemoglobin value, packed cell volume and differential count.

It was observed that cyclophosphamide made a decrease in total erythrocyte and leukocyte counts, percentage of lymphocyte and packed cell volume in contrast to an increase in percentage of neutrophile. However, using cyclophosphamide with mesna showed that cyclophosphamide-caused decreases in leukocyte count and percentage of lymphocyte were partly increased by mesna. On the other hand mesna did not have any effect on blood cells when it was used alone.

Key Words : Cyclophosphamide, mesna, blood parameters, guinea pigs

Giriş

Siklofosfamin, insan ve veteriner hekimliğinde neoplastik ve otoimmün hastalıkların tedavisinde (1,2), yine veteriner hekimlikte kimyasal kırkım için kullanılan (3) ve karaciğer sitokrom P-450 sistemi etkisiyle sitotoksik metabolitlere dönüşen, azotlu hardallar grubundan alkilleyici bir ajandır (4). Hematopoietik sistemin siklofosfamin gibi alkilleyici ajanların etkilerine karşı oldukça hassas olduğu bildirilmektedir (5). Deneysel olarak hayvanlara azotlu hardalların subletal dozlarının uygulanmasından 6-8 saat sonra kemik iliğinde ve lenfoid dokularda mitozun durduğu ve hücre organellerinin parçalandığı ortaya konmuştur (6). Genel olarak azotlu hardalların yıkıcı etkisine karşı lenfositlerin diğer kan hücrelerine göre daha hassas olduğu bildirilmektedir (7). Siklofosfamin ise klinikte kullanıldığında en önemli yan etkileri kemik iliği baskılanması ve lökopeni ile daha seyrek olarak da trombositopenidir (8,9). Jalil ve Pandey (10), siklofosfamin uyguladıkları köpeklerde lökosit ve eritrosit sayıları ile hematokrit oranı ve hemoglobin miktarının azaldığını bildirmişler ve azalmanın nedenini kemik iliğinde hücre yapımının baskılanması ile açıklamışlardır. Moldovanu ve ark. (11) ise siklofosfamin verdikleri köpeklerde özellikle lökopeni oluştuğunu bildirmişlerdir.

Mesna (sodium-2-mercaptoethanesulfonate) bir thiol bileşiğidir. Mesnanın serbest sülfidril grupları siklofosfaminin toksik metabolitleri olan akrolein ve 4-hidroksiokzafosforinle çift bağ aracılığıyla birleşerek kararlı ve toksik olmayan bileşikler oluşturur (12). Bu toksik olmayan bileşiklerin idrarla atılması çabuk olduğundan siklofosfaminin metabolitleri boşaltım sistemindeki toksik etkilerini hızla kaybeder. Ancak boşaltım sistemi dışındaki toksik etkilerinin mesna ile ne ölçüde giderilebileceği tam olarak ortaya konamamıştır (13).

Bu çalışmada tek doz uygulanan siklofosfaminin kan hücreleri üzerine etkilerinin ortaya konması yanında mesnanın bir koruma sağlayıp sağlayamayacağını görülmesi amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada deneme hayvanı olarak 250-300 gram ağırlığında, erkek 24 albino kobay kullanıldı. Hayvanlar deneme süresince *ad libitum* su ve yemle beslendi ve 4 gruba bölündü.

Birinci (kontrol) ve ikinci grup kobaylara plasebo olarak serum fizyolojik 0, 180, 360 ve 540. dakikalarda periton içi uygulandı. Ayrıca ikinci grup kobaylara 20. dakikada 68.1 mg/kg siklofosfamin (14), birinci gruptakilere ise aynı dakikada serum fizyolojik periton içi verildi. Öte yandan, üçüncü ve dördüncü grup hayvanlara 0, 180, 360 ve 540. dakikalarda 21.5 mg/kg mesna (15,16) periton içi uygulandı. Son olarak dördüncü grup kobaylara 20. dakikada 68.1 mg/kg siklofosfamin verilirken, üçüncü gruptakilere de aynı dakikada serum fizyolojik enjekte edildi.

İlaç uygulamalarının tamamlanmasından 12 saat sonra kontrol ve deney gruplarındaki hayvanların kalplerinden alınan kan örnekleri, heparinli tüplere konuldu.

Alınan kan örneklerinde alyuvar akyuvar ve kan pulcuğu sayılarına, hemoglobin ve hematokrit değerlerine ayrıca nötrofil, lenfosit, eozinofil, monosit ve bazofil oranlarına otomatik kan hücreleri sayım cihazında (SKTS Coulter) bakıldı.

Gruplar arasındaki farklılığı ortaya koymak amacıyla varyans analizi ve farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu bulmak içinde Duncan testi (MS Windows için 5.0 paket program) uygulandı. Önemlilik düzeyi olarak $p < 0.05$ kabul edildi.

Bulgular

Bu çalışmada kontrol grubuna ve deney gruplarına ait hematolojik bulgular ve aralarındaki farklılıkların önemi tabloda verildi.

Siklofosfaminin uygulandığı 2. gruptan elde edilen bulgularla kontrol grubu karşılaştırıldığında, eritrosit ve lökosit sayılarında, hematokrit değerinde ve lenfosit oranında bir azalış olduğu buna karşın nötrofil oranında bir artış olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte hemoglobin değeri ile eozinofil, monosit ve bazofil oranlarının değişmediği gözlemlenmiştir. Kan pulcuğu sayısında bir düşüş izlenmiş olmasına rağmen istatistiksel yönden önemli olmadığı belirlenmiştir.

Mesnanın tek başına kullanıldığı gruptan (3. grup) alınan sonuçların kontrol grubu değerlerinden farklı olmadığı saptanmıştır.

Siklofosfaminin, mesna ile birlikte kullanıldığı 4.gruba ait verilerle tek başına kullanıldığı 2. gruba ait olanlar karşılaştırıldığında, lökosit sayısında ve lenfosit oranında istatistiksel olarak önemli bir artış gözlemlenirken eritrosit ve trombosit sayıları, nötrofil, eozinofil, monosit ve bazofil oranları ile hematokrit ve hemoglobin değerlerinde bir fark saptanamamıştır.

Siklofosfamid ile mesnanın birlikte kullanıldığı gruptaki (4. grup) alyuvar ve akyuvar sayıları, hematokrit değeri ve lenfosit oranının kontrol grubu değerlerine göre istatistiki açıdan düşük ve nötrofil oranının ise yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Buna karşın hemoglobinin değeri, eozinofil, monosit ve bazofil oranları ile kan pulcuğu sayısındaki değişimlerin istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur.

Tartışma

Bu çalışmada siklofosfamidin uygulanmasıyla eritrosit ve lökosit sayılarında, hematokrit değerde ve lenfosit oranında azalma olması, kemik iliği ve lenfoid dokuların siklofosfamid tarafından baskılanmasının bir sonucu olarak değerlendirilmektedir. Nötrofil oranında görülen artışın nedeni ise lenfosit oranındaki azalmaya bağlanmaktadır. Bilindiği gibi lökosit formülünde havvan türüne göre belli bir dengede bulunan bu hücrelerin birinin sayısındaki değişim diğerini oransal olarak etkilemektedir. Bu amaçla ratlar (17) ve köpekler (18) üzerinde yapılan benzer çalışmalarda da akyuvar formülündeki lenfosit oranı düşerken nötrofil oranının yükseldiği bildirilmektedir. Jalil ve Pandey (10), 21 hafta içinde toplam 130 mg/kg siklofosfamid uyguladıkları köpeklerde ilk haftalardan itibaren lökosit ve eritrosit sayıları ile hematokrit ve hemoglobin değerlerinin düştüğünü bildirmişler ve nedenini kemik iliğinde hücre yapımının baskılanması ile açıklamışlardır. Brick ve ark. (19) köpekler ve kedilerde yürüttükleri araştırmalarında, siklofosfamidin kemik iliğini baskıladığının kanıtı olarak

lökosit sayısının ve lenfosit oranının düşmesini göstermişlerdir. Wheeler ve ark. (17) ise 75 ile 100 mg/kg siklofosfamid uyguladıkları köpeklerde lökosit sayısının doza bağlı olarak sırasıyla mm^3 kanda 3800 ve 3150'ye düştüğünü bildirirken, ratlara 80 mg/kg siklofosfamid vererek mm^3 kanda lökosit sayısının 3900'e indiğini ayrıca lenfosit oranının %38'e düştüğünü, nötrofil oranının %55'e çıktığını ve monosit ile eozinofil oranlarının değişmeden kaldığını vurgulamışlardır. Köpeklerde yapılan diğer bir çalışmada da siklofosfamidin toksik etkisine bağlı olarak hematokrit değerinin %30'lara ve lökositlerin mm^3 kanda 4000'lere düştüğü bildirilmiştir (20).

Siklofosfamidin uygulanması sonucu kan pulcuğu sayısında istatistiksel olarak önem ifade etmeyen bir azalmanın gözlemlenmesi siklofosfamid toksisitesinin diğer azotlu hardalardan farklı olduğu ve seyrek olarak trombositopeni yaptığı şeklindeki bildirimlere uymaktadır (6,8). Siklofosfamidin asıl sitotoksik etkisi nükleer DNA, sitoplazmik RNA ve sitoplazma ile membran proteinleri üzerinde görülmekte ve bunun sonucu olarak mitoz engellenmektedir (21). Dolayısıyla çoğalma aşamasında olan lökosit, eritrosit ve trombositlerin sayısı azaltılmaktadır. Bununla birlikte kemik iliğinin baskılanma derecesinin ilacın etki mekanizmasına, hücre siklusunun aşamasına, ilacın dozuna ve uygulanan insan veya hayvanın yaşı ile beslenme durumuna bağlı olduğu da bildirilmektedir (9).

Bu araştırmada mesnanın uygulanmasıyla normal hematolojik değerlerin değişmediği belirlenmiştir. Klein

Tablo. Siklofosfamid ve mesna uygulamalarının bazı kan değerleri üzerine etkisi. Değerler ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiş olup, her grupta altı hayvan kullanılmıştır (n=6).

	1. GRUP Kontrol	2. GRUP Siklofosfamid	3. GRUP Mesna	4. GRUP Siklofosfamid Mesna
Eritrosit ($10^6/\text{mm}^3$)	5.16 \pm 0.09 ^{a,b}	4.75 \pm 0.15 ^{a,c}	5.32 \pm 0.11 ^{c,d}	4.81 \pm 0.11 ^{b,d}
Hematokrit (%)	41.22 \pm 1.08 ^{a,b}	37.56 \pm 1.40 ^{a,c}	41.77 \pm 1.08 ^{c,d}	37.38 \pm 1.11 ^{b,d}
Hemoglobin (g/100 ml)	13.58 \pm 0.29	13.09 \pm 0.46 ^{a,b}	14.27 \pm 0.21 ^a	12.90 \pm 0.46 ^b
Lökosit ($10^3/\text{mm}^3$)	5.70 \pm 0.22 ^{a,b}	3.13 \pm 0.42 ^{a,c,d}	6.60 \pm 0.16 ^{c,e}	4.40 \pm 0.19 ^{b,d,e}
Nötrofil (%)	35.19 \pm 1.10 ^{a,b}	77.14 \pm 3.40 ^{a,c}	38.50 \pm 2.72 ^{c,d}	66.25 \pm 5.13 ^{b,d}
Lenfosit (%)	60.94 \pm 1.22 ^{a,b}	18.57 \pm 3.14 ^{a,c,d}	58.12 \pm 3.54 ^{c,e}	30.79 \pm 5.01 ^{b,d,e}
Eozinofil (%)	2.17 \pm 0.20	2.43 \pm 0.88	1.72 \pm 0.65	1.27 \pm 0.26
Monosit (%)	1.30 \pm 0.34	1.51 \pm 0.76	1.43 \pm 0.85	1.12 \pm 0.30
Bazofil (%)	0.40 \pm 0.16	0.35 \pm 0.15	0.23 \pm 0.14	0.57 \pm 0.16
Kan pulcuğu ($10^5/\text{mm}^3$)	5.21 \pm 0.38	4.72 \pm 0.19	4.99.33 \pm 0.35	4.84 \pm 0.30

Aynı satırda aynı harfleri taşıyan ortalama değerler arası farklar önemlidir (p<0.05).

ve ark.ın (22) farelerde yaptığı çalışmada da mesnanın hematolojik parametreleri etkilemediği bildirilmiştir. Ayrıca yapılan literatür taramalarında mesnanın hematopoietik sistem üzerine herhangi bir olumsuz etkisinin bulunduğu dair kanıta rastlanılamamıştır.

Siklofosfamin ile birlikte kullanılan mesnanın kemik iliği baskılanmasını azaltacağı bildirilmiştir (7). Ancak bu araştırmada birlikte kullanılmalarının sadece lenfosit oranında dolayısıyla da lökosit sayısında normal değerlere

ulaşamayan bir artışa neden olması, mesnanın hematopoietik sistemde siklofosfamin metabolitlerinin toksisitesine karşı olan koruyucu etkisinin, idrar kesesi (23) ve kalp kasındaki (24) kadar başarılı olmadığını göstermektedir.

Sonuç olarak siklofosfaminin eritrosit ve lökosit sayıları ile lenfosit oranında azalma yaptığı, mesnanın ise bu ilacın toksisitesine karşı hemapoietik sistemi tam anlamıyla koruyamadığı gözönünde tutulmalıdır.

Kaynaklar

1. Laing, E. J., Miller, C. W. and Cochrane, S. M. : Treatment of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in five dogs. JAVMA. 1988; 193(2): 233-236.
2. Fairchild, W. V., Spence, C. R., Solomon, H. D. and Gangai, M. P. : The incidence of bladder cancer after cyclophosphamide therapy. 1979; 122: 163-164.
3. Schlink, A. C. and Macfarlane, W. V. : Chemical shearing: effects in field trials of repeated doses of cyclophosphamide on pregnancy, wool growth and CPA tolerance. Proceedings of the Australian Society of Animal Production. 1978; 12: 272.
4. Yazıcı, Z. : Antikanser ilaçlar. In: Farmakoloji. ed. Dökmeçi, I. pp 895-896. 2. cilt. 1. baskı. Bassaray Basımevi, İzmir, 1996.
5. Marin, M. P., Samson, R. J. L. and Jackson, E. R. : Hemorrhagic cystitis in a dog. Canadian Veterinary Journal. 1996; 37(4): 240.
6. Calabresi, P. and Parks, R.E. : Antiproliferative agents and drugs used for immunosuppression. In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, eds. Gilman, A. G., Goodman, L. S. and Gilman, A. , pp 1256-1266. Sixth ed. Macmillan Publishing Co., Inc., New York, 1980.
7. Dechant, K. L., Brogden, R. N., Pilkington, T. and Faulds, D. : Ifosfamide/Mesna: A review. 1991; 42(3): 428-467.
8. Coppoc, G. L. : Chemotherapy of neoplastic Diseases. In: Veterinary Pharmacology and Therapeutics, eds. Booth, N. H. and McDonald, L. E., pp 783-802. Fifth ed. The Iowa State University Press, Ames, 1982.
9. O'Keefe, D. A. and Harris, C. L. : Toxicology of oncologic drugs. Veterinary Clinics of North America : Small Animal Practice. 1990; 20(2): 483-504.
10. Jalil, M. A. and Pandey, S. K. : Haematological response to cyclophosphamide administration in dogs. 1987; 64: 751-755.
11. Moldovanu, G., Friedman, M. and Miller, D. G. : Treatment of canine malignant lymphoma with surgery and chemotherapy. JAVMA. 1966; 148(2): 153-156.
12. Shepherd, J. D., Pringle, L. E., Barnett, M. J., Klingemann, H. G., Reece, D. E. and Phillips, G. L. : Mesna versus hyperhydration for the prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation. J. Clin. Oncol. 1991; 9(11): 2016-2020.
13. Brock, N., Pohl, J. and Stekar, J. : Comparative study on the uroprotective efficacy of thiols and other sulfur compounds. Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 1981; 17(11): 1155-1163.
14. Phillips, F. S., Sternberg, S. S., Cronin, A. P. and Vidal, P. M. : Cyclophosphamide and urinary bladder toxicity. Cancer Res. 1991; 21: 1557-1561.
15. Freedman, A., Ehrlich, R. M. and Ljung, B. M. : Prevention of cyclophosphamide cystitis with 2-mercaptoethane sodium sulfonate: A histologic study. J. Urol. 1984; 132: 580-587.
16. Devries, C. R. and Freiha, F. S. : Hemorrhagic cystitis: A review. J. Urol. 1990; 143: 1-9.
17. Wheeler, A. G., Dansby, D., Hawkins, H. C., Payne, H. G. and Weikel, J. H. : A toxicologic and hematologic evaluation of cyclophosphamide in experimental animals. Toxicology and Applied Pharmacology. 1962; 4: 324-343.
18. Medleau, L., Dawe, D. L. and Calvert, C. A. : Immunosuppressive effects of cyclophosphamide, vincristine and L-asparaginase in dogs. Am. J. Vet. Res. 1983; 44(2): 176-179.
19. Brick, J. O., Roenigh, W. J. and Wilson, G. P. : Chemotherapy of malignant lymphoma in dogs and cats. JAVMA. 1968; 153(1): 47-52.
20. MacEwen, E. G., Brown, N. O., Patnaik, A. K., Hayes, A. A. and Passe, S. : Cyclic combination chemotherapy of canine lymphosarcoma. JAVMA. 1981; 178(11): 1178-1181.
21. Stanton, M. E. and Legendre, A. M. : Effects of cyclophosphamide in dogs and cats. JAVMA. 1986; 188(11): 1319-1322.
22. Klein, H. O., Wickramanayake, P. D., Christian, E. and Coerper, C.: Therapeutic effects of single-push or fractionated injections or continuous infusion of oxazaphosphorines (cyclophosphamide, ifosfamide, asta z 7557). Cancer. 1984; 54: 1193-1203.
23. Etlık, Ö., Tomur, A., Deveci, S., Pişkin, I. and Pekcan, M. : Comparison of the uroprotective efficacy of mesna and HBO treatments in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. J. Urol. 1997; 158: 2296-2299.
24. Dorr, R. T. and Lagel, K. : Effects of sulfhydryl compounds and glutathione depletion on rat heart myocyte toxicity induced by 4-hydroperoxycyclophosphamide and acrolein in vitro. Chem. Biol. Interact. 1994; 93(2): 117-128.