

Cisplatinin Sıçan Karaciğeri Üzerine Etkisinin İşık Ve Elektron Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi*

Leyla KUNTSAL¹ Yurdagül CANBERK²

ÖZET

Kanser kemoterapisinde kullanılan cisplatinin karaciğer dokusu üzerine etkisini morfolojik olarak incelemek amacıyla planlanan bu çalışmada, 4'ü kontrol, 12'si deney grubu olmak üzere toplam 16 adet beyaz sıçan kullanıldı. 5 mg/kg cisplatinin tek doz olarak intraperitoneal uygulanmasını takip eden 3., 11., 18., ve 28. günlerde kesim yapıldı. Cisplatinin, karaciğerde akut bir etkilenme meydana getirdiği ve bu etkilenmenin özellikle 3. ve 11. günlerde yoğunlaştiği izlendi. Bu gruplar ışık mikroskopik olarak incelendiğinde hepatositlerin oluşturduğu hücre kordonlarının düzensizliği, sinüsoidlerin genişlediği, yer yer kanama odaklarının olduğu görüldü. Hepatositler çoğunlukla normal poligonal şekillерini kaybetmişlerdi. Ultrastrüktürel olarak incelendiğinde sinusoid lümenlerinde hepatositlere ait sitoplazmik kalıntıları rastlandı. Hepatositlerin perisinüsoidal yüzlerindeki mikrovilli yapılarında azalma ve şekil bozuklukları görüldürken, bazlarında ise invagine ve piknotik nükleuslar, sitoplasmalarında düzensiz ve dilate endoplazmik retikulum, şişmiş mitokondriyonlar, çok sayıda vakuol ve lisozomlar dikkat çekti. 18. ve 28. günlerde ise bu etkilenmelerin azalığı ve bazı hücrelerdeki mitokondri bozuklukları haricinde, genel olarak rejenerasyonun sağlandığı görüldü.

Anahtar Kelimeler : Karaciğer, cisplatin, ışık mikroskopi, elektron mikroskopi, Sprague Dawley sıçan

SUMMARY

LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPICAL INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CISPLATIN ON THE HEPATOCYTES OF THE RAT.

This study was planned to examine the morphological effect of cisplatin, a cancer chemotherapeutic, on liver tissue. A total of 16 Sprague Dawley rats, four of which were control and twelve were experimental group, were used in the study. Animals were sacrificed on 3., 11., 18. and 28. days following a single dose of 5 mg/kg intraperitoneal cisplatin administration. It was observed that cisplatin caused an acute affection on liver and this affection became more especially on 3. and 11. days. In these groups it was light microscopically observed that cell cords formed by hepatocytes became irregular, sinusoids widened and hemorrhage occurred in some areas. Hepatocytes mostly lost their normal polygonal shapes. On ultrastructural examination, it was observed that cytoplasmic residues belonging to hepatocytes were met in sinusoidal lumen. There was a decrease and alteration in the structure of microvilli in perisinusoidal surface of hepatocytes. Picnotic and invaginated nuclei in hepatocytes, irregular and dilated endoplasmic reticulum, swelling mitochondria and an increase in vacuoles and lysosomes were in the cytoplasm were noted. It was also observed on 18. and 28. days that these affections lessened and a general regeneration was maintained except for the mitochondrial alterations in some cells.

Key Words : Liver, cisplatin, light microscopy, electron microscopy, Sprague Dawley rat

* Bu çalışma 12. Ulusal Elektron Mikroskopu Kongresi'nde (11-15 Eylül 1995, Antalya) tebliğ edilmiştir

¹ Uzm. Dr. İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

² Prof.Dr. İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

Cisplatin, yüksek antitümoral aktivite gösteren organik platin türevi bir ilaçtır (1). Başta testis ve over kanserleri (2, 3) olmak üzere mesane (4), prostat (5), beyin, baş, boyun ve bazı akciğer kanserlerinde kullanılan bu ilaç tümör hücrelerinde DNA üzerine etki yaparak hücre çoğalmasını durdurur.

Tüm antitümoral ilaçlarda olduğu gibi, cisplatin kullanımında da sağlıklı hücreler etkilenmekte ve birçok toksik yan etkiler oluşturmaktadır (6). Cisplatinin kullanımında ortaya çıkan ana sorunlardan biri akut tubüler nekrozla gelişen nefropati (7), digeri de çok şiddetli bulantı, kusma ve anoreksi ile kendini gösteren gastrointestinal sistem toksisitesidir (8, 9).

İlacın mide ve barsaklardaki toksik etkilerine ek olarak, karaciğer hücrelerinde de etkilenmeye yol açtığı, bazı araştırmalarda bildirilmektedir (10, 11, 12). Kanser kemoterapisinde kullanılmasına günümüzde devam edilen cisplatinin özellikle sindirim sistemine etkilerinin ne olduğu hala çeşitli yöntemlerle araştırmalar tarafından incelenmektedir. Bizde cisplatinin tek doz verilip farklı sürelerde bekletildikten sonra siçan karaciğer dokusuna yaptığı etkilerin neler olduğunu ışık ve elektron mikroskopik düzeyde incelemeyi planladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırmada İ.Ü. Deneyel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden sağlanan 250-300 gr ağırlığında 16 adet Sprague Dawley türü genç erişkin erkek siçanlar kullanıldı. Kontrol için ayrılan 4 adet erişkin siçana 2.5 ml serum fizyolojik uygulanırken, deney hayvanlarına 5 mg/kg cisplatin 2.5 ml serum fizyolojikle karıştırılarak intraperitoneal uygulandı. Hayvanlar tek doz ilaç uygulamasını takip eden 3. (I. deney grubu), 11. (II. deney grubu), 18. (III. deney grubu) ve 28. (IV. deney grubu) günlerinde sakrifiye edildi.

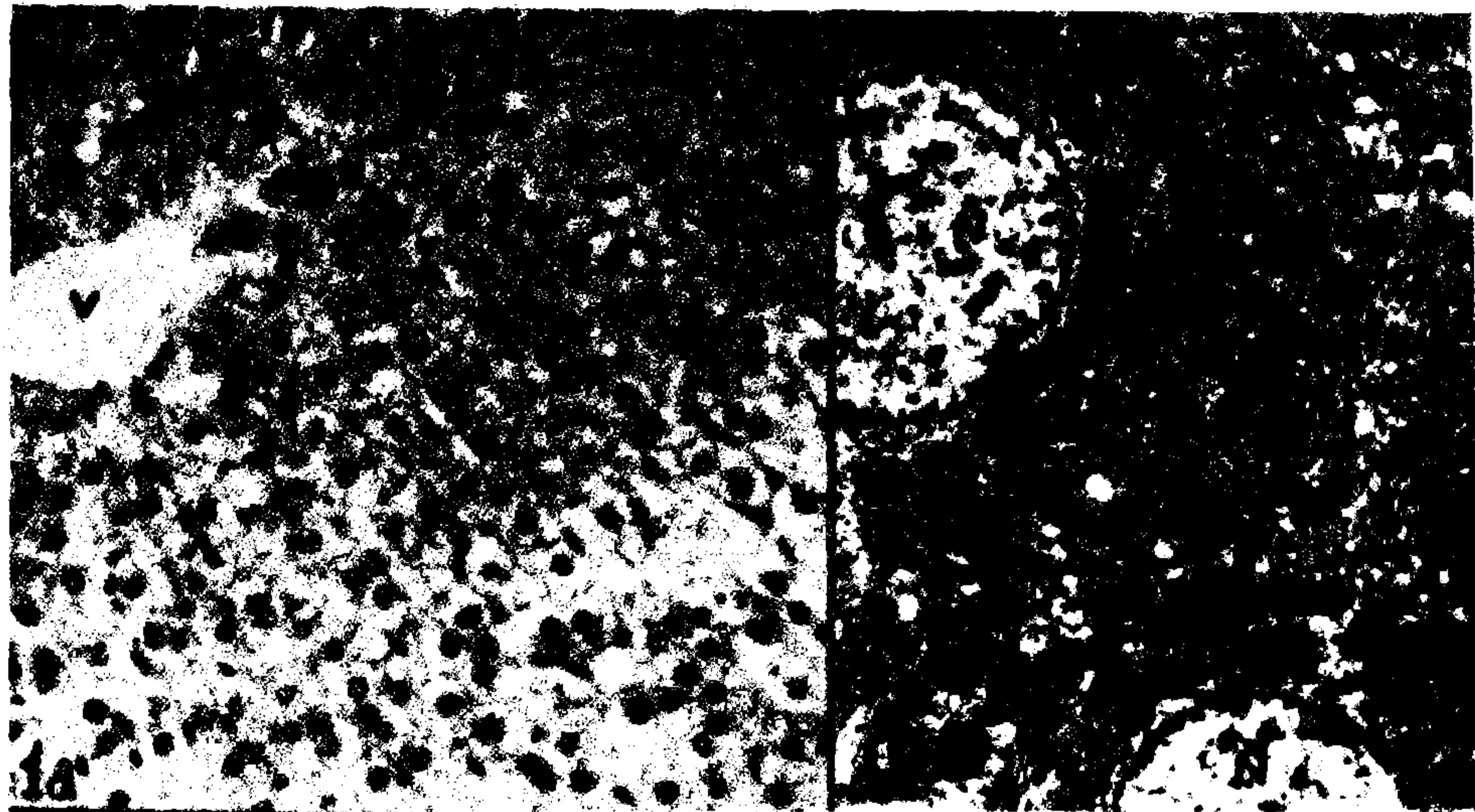
Kontrol ve deney gruplarındaki siçanlardan alınan karaciğer doku parçalarının ışık ve elektron mikroskopik incelemeler için uygun takipleri yapıldı. ışık mikroskopi için, doku parçaları fosfat tamponlu % 10'luk formaldehit ve Bouin solüsyonlarında tespit edilerek, rutin işlemlerden sonra, alınan kesitlere H&E boyası uygulandı. Elektron mikroskopik inceleme için, doku parçaları önce fosfat tamponlu % 2.5'lük glutaraldehidde (pH = 7.2), daha sonra 1 saat süreyle % 1'lük fosfat tamponlu osmium tetroksitte fiks edilerek Vestopal - W ile bloklandı. LKB ultramikrotomunda alınan 400 - 600 Å kalınlığında ince kesitler alınarak uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlandı. Jeol-

100 C ve Zeiss EM9 transmisyon elektronmikroskoplarında incelendi.

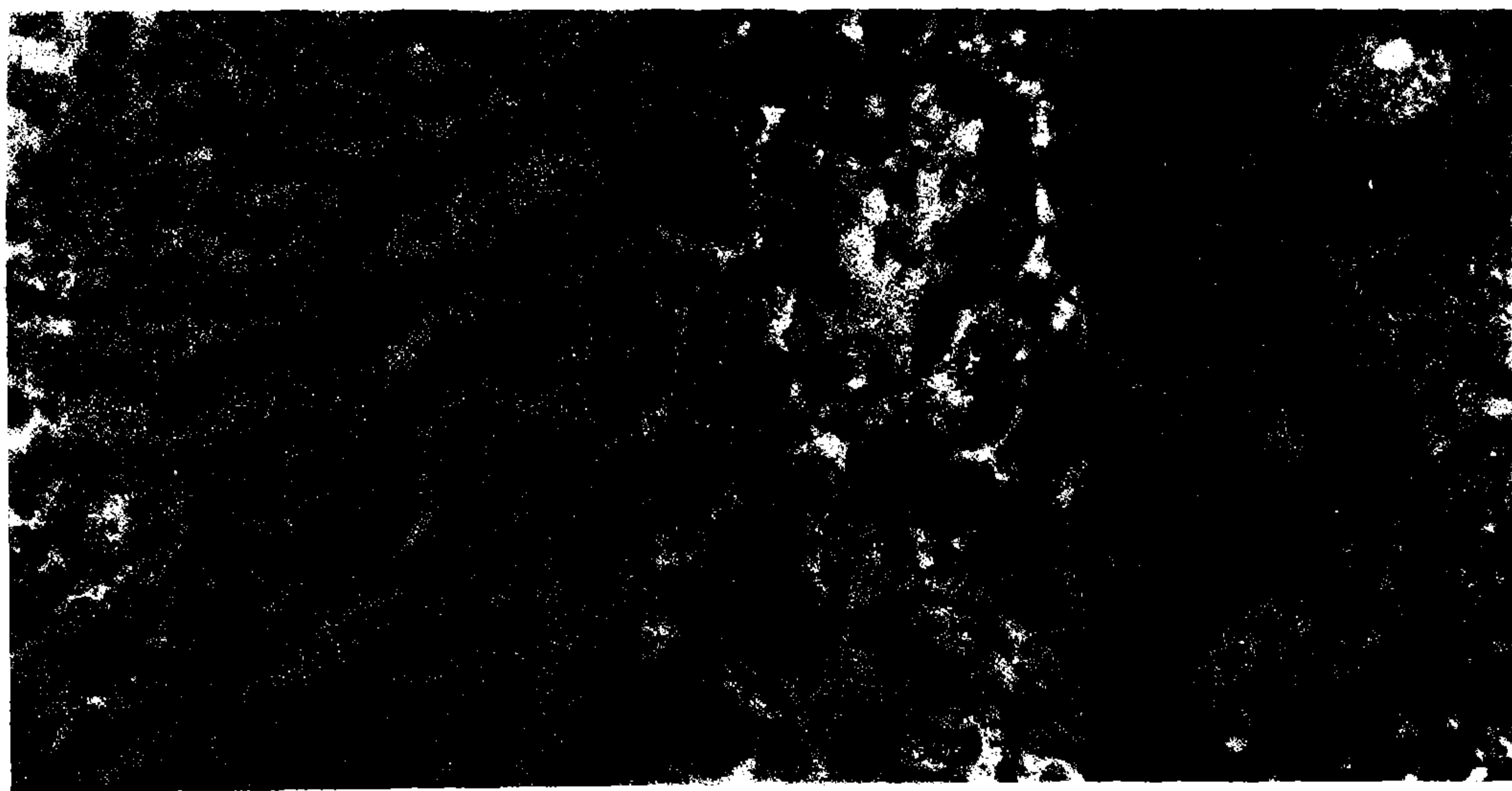
BULGULAR

İşık mikroskopik incelemede, kontrol grubuna ait siçanlarda, karaciğer parankim hücrelerinin lobuluslar içinde düzenli kordonlar oluşturduğu görüldü. Bu hücre kordonları ve bunların arasında seyreden sinüzoidler Vena centralis etrafında işinsal olarak dizilmişti. Hepatositlerin nükleusları merkezi konumlu, yuvarlak veya oval şekilli idi. Bazı hepatositler çift nukleus içeriyordu. Sitoplazma granüler yapıda ve eozinofiliktı (Resim 1). Kontrol grubuna ait hayvanlardan alınan karaciğer dokularının ultrastrüktürel incelenmesinde ışık mikroskobunda izlendiği gibi, poligonal şekilli hepatositler tek ya da çift nükleuslu ydu. Yuvarlak şekilli nükleuslarda kromatin materyali daha ziyade nükleolemma üzerinde kümelenmiş olarak gözlandı. Sitoplazmada, iyi gelişmiş granüllü endoplazma retikulumu (GER) membranları, daha çok nükleus periferisinde veya mitokondrionların arasında yer almaktı idi. Granülsüz endoplazma retikulumu membranları (SER) ise nükleusun uzağında, hücre membranına yakın alanlardaydı. Bu bölgelerde bol miktarda glikojen partikülleri de göze çarpıyordu. Mitokondrionlar krista tipi ve homojen matriksli idi (Resim 1b). 5 mg/kg cisplatin uygulamasından 3 gün sonra kesilen siçanlarda (I. deney grubu), karaciğerin ışık mikroskopik incelemesinde, genel yapıda önemli ölçüde bozulmalar izlendi. Hepatositlerin oluşturduğu hücre kordonlarının düzensiz seyrettiği ve intresellüler aralıkların yer yer genişlediği görüldü. Sinüzoidlerin de genişlediği ve bazı yerlerde kanama odaklarının oluştuğu dikkat çekti. Hepatositlerin bazlarının normal poligonal şekillerini kaybederek polimorfizm gösterdikleri izlendi (Resim 2a).

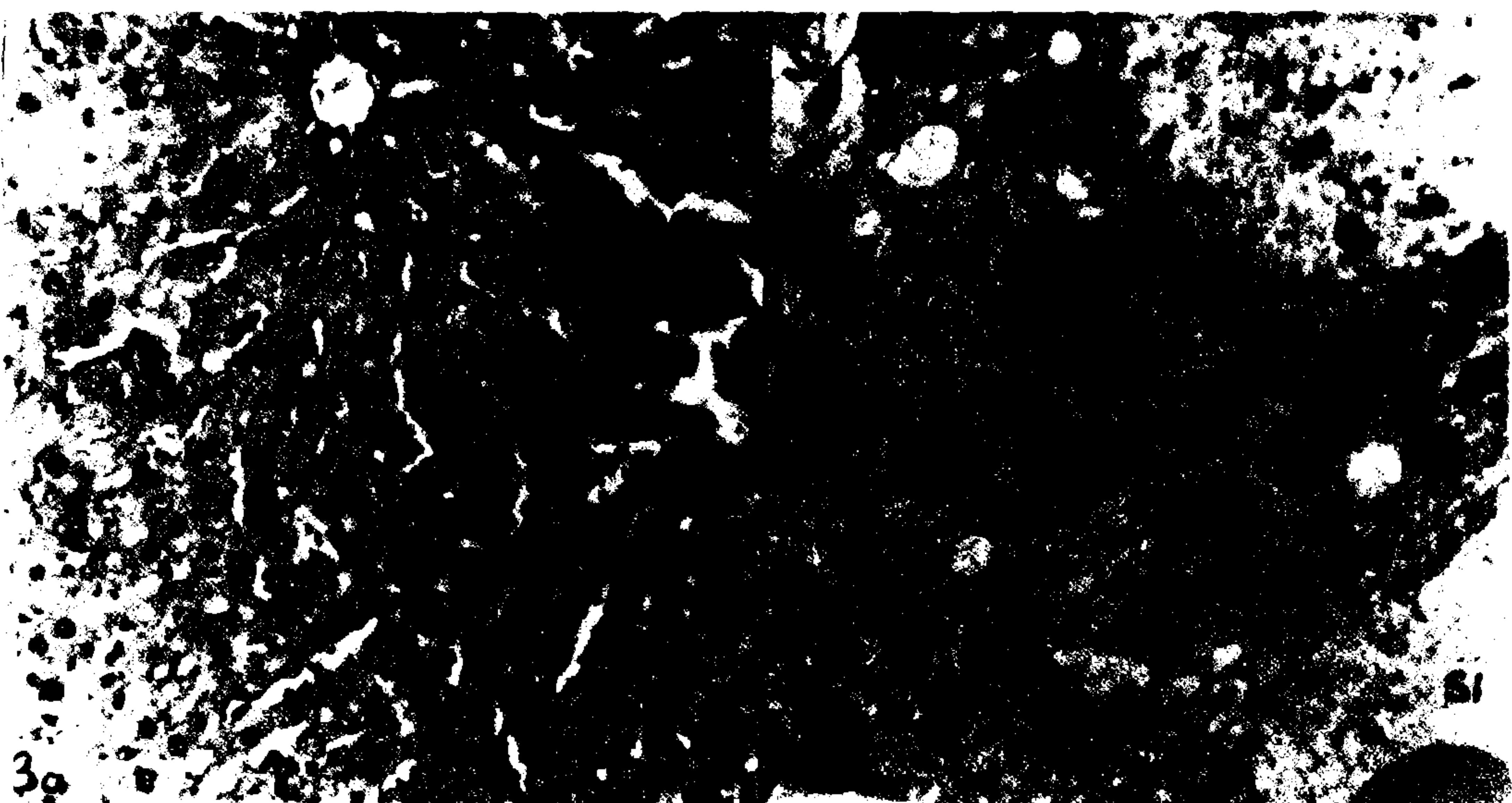
Ultrastrüktürel incelemede, I. deney grubuna ait bir kısım hepatositte nükleus invajinasyon nedeniyle düzensiz şekilli ve piknotiktı. Bazı alanlarda hepatositlerin sitoplazmalarında granüler görünümün kaybolduğu izlendi (Resim 2b). Hepatositlerin bazlarında membran yırtılmaları sonucunda hücre bütünlüğünün bozulduğu ve sitoplazmanın dağıldığı görüldü. Bu alanlarda sinüzoid lümeni içinde hücrelere ait sitoplazmik yapı artıkları izlendi (Resim 2c). Hücrelerin sinüzoide bakan yüzeylerinde mikrovilli yapılarında bozulma ve azalma vardı. Bu hepatositlerin çoğu normal poligonal şekillerini kaybetmişti. Hepatosit sitoplazmasında, GER membranlarının düzenli



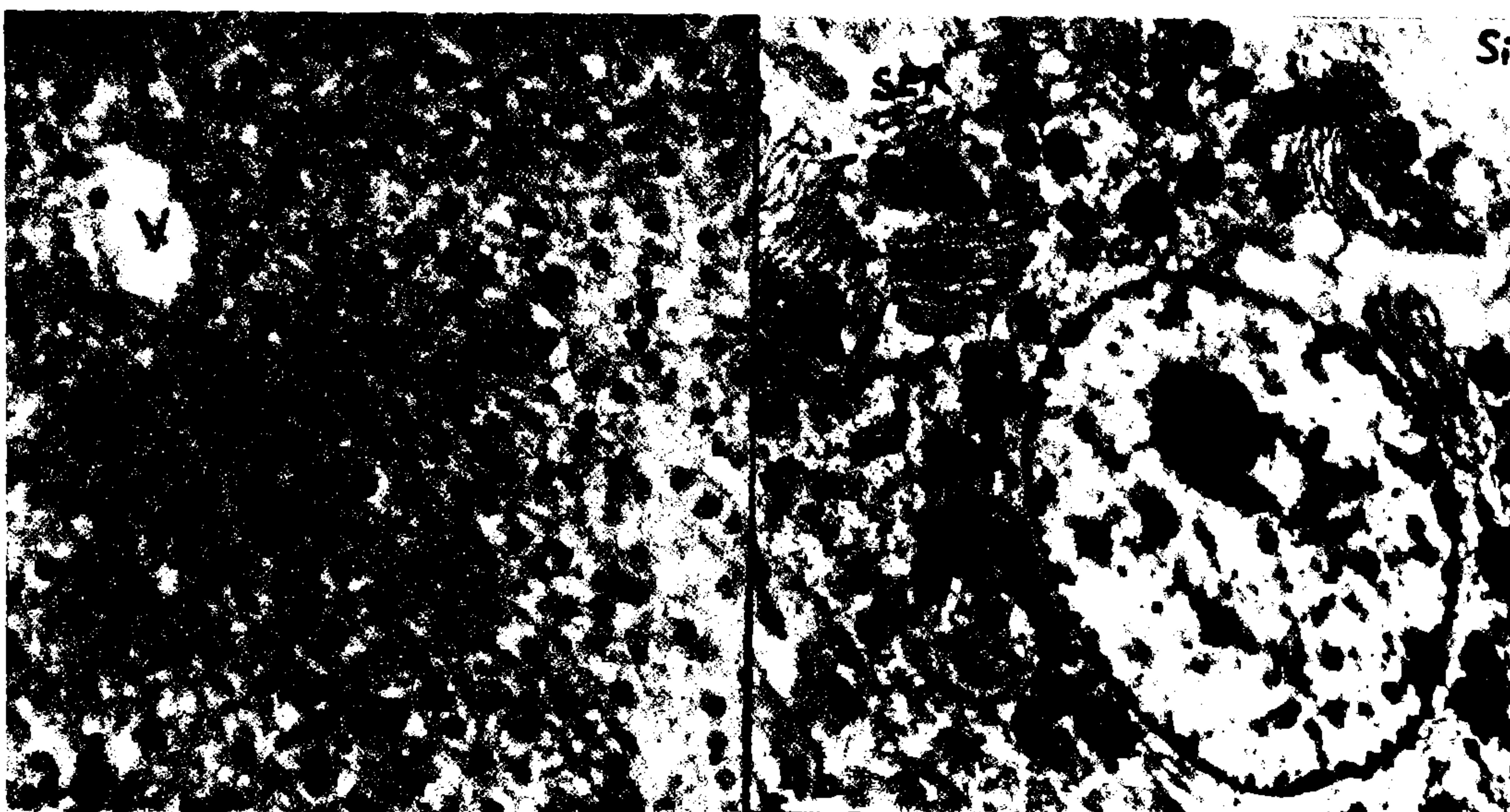
Resim 1 : Kontrol grubuna ait siçan karaciğeri: a) Klasik lobulusa ait v.centralis (v) ve işinsal dizili hücre kordonları görülen işık mikrosotografi. H&E: X 100 b) Bir hepatoside ait elektronmikrograf. N: Nukleus; Mi: Mitokondri; GER: Granuler endoplazma retikulumu; SER: Granülsüz endoplazma retikulumu; Gly: Glikojen partikülleri. X 7500



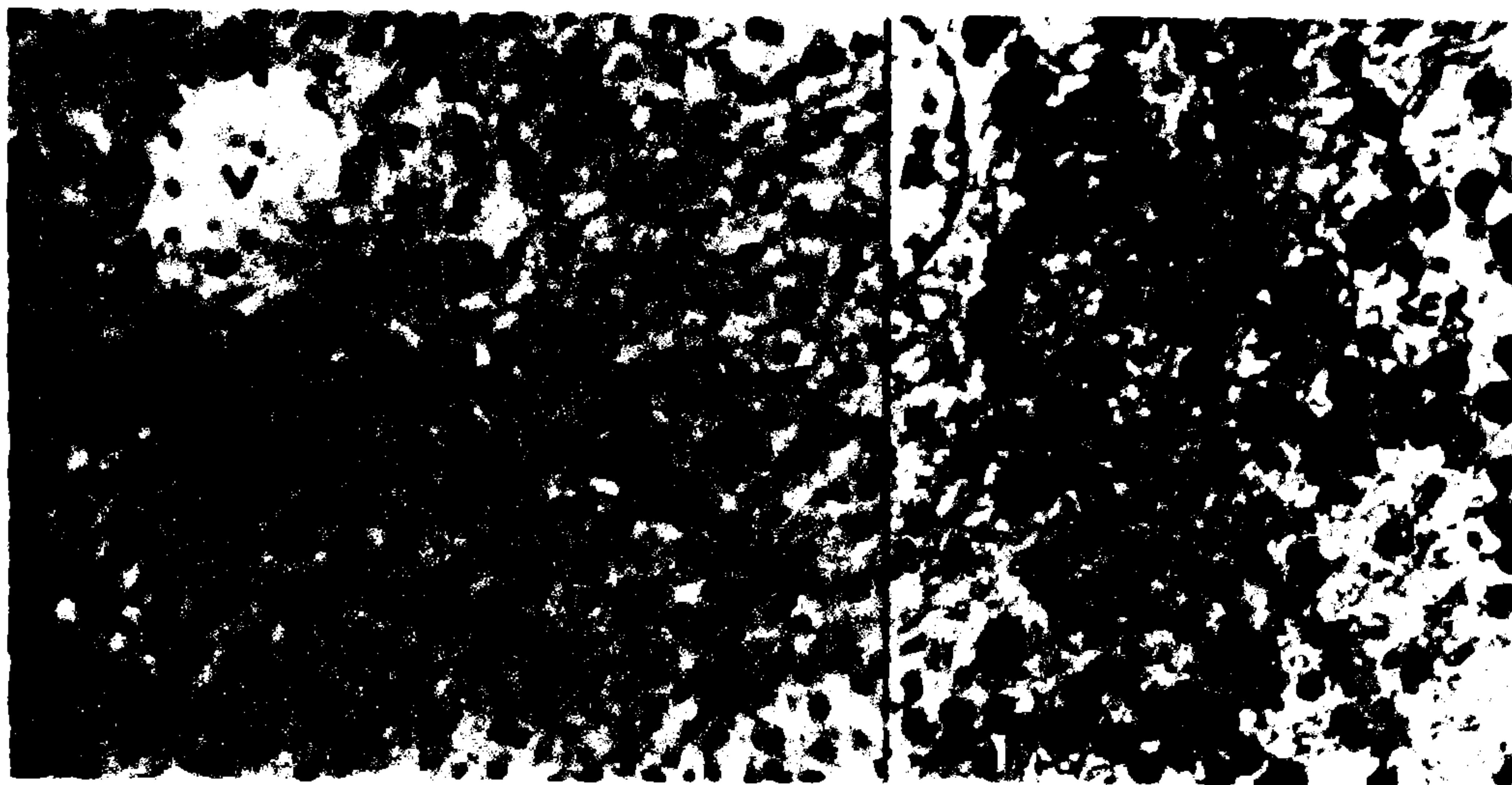
Resim 2 : I. deney grubu: a) Düzensiz hepatosit kordonları, intersellüler aralıkta ve sinusoidlerde (s) genişlemeler ve yer yer kanama odakları (oklar) izlenmekte. H&E: X 160 b) Bir hepatositte piknotik ve invaginasyonlu (oklar) nükleus (N), dejeneratif yapı bozuklukları gösteren mitokondrionlar (Mi) arasında karışık düzende yer almış GER membranları izlenmekte. E. M. X 12000 c) Bir hepatositin perisinüsoidal yüzünde membran yırtılmaları ve dejenerasyon, sinüsoid(s) lümeninde ise sitoplazmik yapı artıkları görülmekte. Gly: Glikojen partikülleri; Er: Eritrosit E.M. X 7500



Resim 3 : II. deney grubu: a) V. Centralisler(v) çevresinde işinsal dizili hücre kordonları ve sinuzoidlerde yer yer genişlemeler (oklar) dikkati çekmekte. H&E: X 100 b) Bir hepatositte yer yer genişlemiş perisinusoidal aralıklar (oklar) ve dejeneratif bozuklukların devam ettiği mitokondrionlar (Mi) izlenmekte. N: Nükleus; Gly: Glikojen; Si: Sinosoid. Er: Eritrosit. E.M. X 7500



Resim 4 : III. deney grubu: a) Bir klasik lobulusta hücre kordonlarının düzenli olarak V. Centralis(v) çevresinde dizilişi görülmekte. H&E: X 100 b) Bir hepatositte düzenli bir dağılım gösteren GER ve SER membranları ile bazı alanlarda lipid granülleri(Li) görülmekte. N: Nükleus; No: Nukleous; Mi: Mitokondri. Si: Sinusoid; Gly: Glikojen E.M. X 7500



Resim 5 : IV. deney grubu; a) Hepatositlerin V. Centralis(v) çevresinde düzenli kordonlar oluşturduğu izlenmekte. H&E: X 100 b) Bir hepatositde dejenerere yapıları ile mitokondriyonların (Mi) arasında normal yapıda GER ve SER membranları ve Golgi kompleksi(Go) görülmekte. E.M. X 7500

dizilimlerini kaybettiği görüldü (Resim 2b). SER'de dilatasyon, glikojen partiküllerinde nispeten azalma, mitokondriyonlarda şişme ve şekil bozuklukları vardı (Resim 2b,c). Hepatositlerin bazlarında lipid damlacıkları ve lizozomlarda artış mevcuttu.

5 mg/kg'lık cisplatin uygulamasından 11 gün sonra (II. deney grubu), siçanların karaciğerleri ışık mikroskopunda incelendiğinde, I. deney grubundaki bulguların birçoğunu aynen devam ettiği, hücre kordonlarındaki düzensizleşmenin nispeten azaldığı ancak sinüzoidlerdeki genişlemelerin devam ettiği görüldü (Resim 3a). Bazı hepatositlerde şişme ve polimorfizm vardı. Piknotik nükleuslara daha az rastlanmaktadır.

Elektron mikroskopik incelemede, II. gruba ait hepatositlerde nukleus şekli ve kromatin dağılımı kontrole benzerlik göstermektedir. Hücrelerin perisinüzoidal yüzeyinde dejeneratif yapı bozuklukları izlendi. Perisinüzoidal aralığın yer yer genişlediği, hücre sitoplazmasına doğru vakuoller oluşturacak şekilde boşluklar yaptığı dikkati çekti. GER membranlarının nukleus periferisinde yer aldığı, SER membranlarının da glikojen partiküllerinden oldukça zengin olarak sinüzoide yakın bölgelerde dağıldığı gözlandı (Resim 3b).

İlaç uygulamasını takip eden 18 gün sonra (III. deney grubu), karaciğer parenkimasında ışık mikroskopik olarak incelendiğinde belirgin bir düzelleme gözlandı. I. ve II. deney gruplarında rastlanan sinüzoid genişlemeleri ve kanama odakları bu grupta izlenmedi (Resim 4).

III. gruba ait ultrastrüktürel incelemede de kontrol grubuna benzer görünüm hakimdi. Hücrelerin kromatinden zengin, yuvarlak şekilli nukleus içerdigi ve GER ve SER membranlarının düzenli olarak dağıldığı izlendi. Hepatositlerde iri, büyük, çok sayıda lipid damlacıkları ve dejenerere yapılarıyla mitokondriyonların varlığını sürdürmesi dikkat çekiciydi (Resim 4b).

28. günde (IV. deney grubu) ise ışık mikroskopik incelemede, kontrol grubuna benzer şekilde hücre kordonları V. centralis etrafında işinsal bir dizilim gösteriyordu. Hücre nukleusları normal yapıda ve sitoplazmada granüler görünüm ve eozinofilik boyanma mevcuttu (Resim 5a).

Ultrastrüktürel incelemede, IV. deney grubundaki hepatositlerde, I. ve II. deney gruplarında izlenen dejenerasyonlarda gerileme ve düzelleme tespit edildi. Hepatositlerde kontrol grubuna benzer görünüm hakimdi. Nukleus membranı düzgün sınırlıydı. Hücrelerde GER ve SER membranları düzenli ve oldukça zengin olarak bulunmaktaydı. Ayrıca hücrelerde glikojen partikülleri bol idi. Aktif Golgi kompleksine sıklıkla rastlandı. Sitoplazmik organellerdeki yapı bozukluklarının oldukça azalmasına rağmen mitokondri dejenerasyonları az da olsa devam etmekteydi (Resim 5b).

TARTIŞMA

Kanser kemoterapisinde kullanılan ana ilaçlardan biri olan cisplatinin, güçlü antitümör aktivitesinin yanı sıra, özellikle böbrek ve

gastrointestinal sistem üzerine ciddi yan etkilerinin bulunduğu bilinmektedir (6, 8, 9). Bunlara ek olarak, karaciğerde meydana getirdiği morfolojik etkilenme ise, özellikle karaciğer rahatsızlığı bulunan hastalarda önemli olmaktadır. İlacın karaciğerde en çok hepatositlerde hasar oluşturduğu, buna karşılık Kupffer, Ito ve endotel hücrelerinin daha az etkilendiği çeşitli araştırmalarda bildirilmektedir (11, 13).

Sıçanlarda yapılan bir deneyel çalışmada hepatositlerde ilaçın nukleusta diffüz olarak yayıldığı, ancak düz yüzeyli endoplazma retikulumu (SER) sisternaları ve mikrobadilerin matrikslerinde tanecikler halinde lokalize olduğu bildirilmiştir (11). Aynı çalışmada, sitoplazmada büyük boş sahalar, küçük vakuoller, dilate SER sisternaları ve şişmiş mitokondrionlar gösterilmiştir. Bizim bulgularımızla bu bilgiler genellikle paralel olmakla beraber, ayrıca bizim çalışmamızda, özellikle 3. ve 11. gün kesilen sıçanlarda, hepatositlerin bazlarının aşırı etkilenme sonucu parçalanıp sinüzoidlere döküldükleri görülmüştür (Resim 2c). Bunda cisplatin dozunu bir tek defada uygulamamızın rolü olduğunu düşünmektedir. Yukarıda bahsi geçen çalışmada ise cisplatinin 5 hafta süreyle her gün ve küçük dozlarda verilmesi söz konusudur.

Kurbağalarda yapılan ultrastrüktürel bir araştırmada, karaciğer hücrelerinde nukleusta kromatin dağılımı, GER'de azalma ve düzensiz dağılım saptanmıştır (13). Bu bildirilenler de bizim bulgularımıza benzemekle beraber, bu araştırmada mitokondrial dejenerasyonun izlenmemesi dikkat çekicidir. Nitekim biz çalışmamızda, III. ve IV. grumlarda bile mitokondriolarında dejeneratif yapı bozukluklarının devam ettiğini izledik (Resim 4b,5b).

Tkacova ve arkadaşlarının (12) sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada, cisplatinin hepatositlerde mitokondrial protein sentezini % 50 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Bu araştırmada normal ve tümörlü karaciğer dokusu karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve ilaçın normal karaciğer hepatositlerindeki mitokondrial protein sentezini, tümörlü dokulardakinden daha fazla inhibe ettiği görülmüştür. Bu da bizim hepatositlerde morfolojik olarak tespit ettiğimiz mitokondrial şişme ve krista bozulmaları gibi bulgularımızı desteklemektedir (Resim 2b,c).

Sonuç olarak; cisplatin kullanımına bağlı olarak karaciğerde meydana gelen bu akut etkilenmenin, ilaçın klinik kullanımındaki en büyük sorun olan gastrointestinal etkilenme mekanizmasının açıklamasında katkısı olabileceği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

- Reedijk J., Lohman PHM, Cisplatin: Synthesis, antitumour activity and mechanism of action. Pharm Weekbl Sci 7 (5): 173-180, 1985.
- Garnick MB, Advanced testicular cancer: Treatment choices in the "land of plenty" J Clin Oncol 3 (3): 294-296, 1985.
- Ozols RF. The case for combination chemotherapy in the treatment of advanced ovarian cancer. J Clin Oncol 3 (11): 1445-1447, 1985.
- Pearson BS, Raghavan D, First-line intravenous cisplatin for deeply invasive bladder: Uptake on 70 cases Br. J. Urol. 57:690-693, 1985
- Yagoda A, Watson RC, Natale RB et al, A critical analysis of response criteria in patients with prostatic cancer treated with cis-diamminedichloroplatinum (II). Cancer 44: 1553-1562, 1979.
- Von Hoff DD, Richard S, Reichert CM et al, Toxic effects of cisdiamminedichloroplatinum (II) in man. Cancer Treat Rep 63: 1527-1531, 1979.
- Choie DD, Longnecker DS, Del Campo AA, Acute and chronic cisplatin nephropathy in rats. Lab Invest 44 (5): 337-341, 1981.
- Vermorken JB, Pinedo HM, Gastrointestinal toxicity of cisdiamminedichloroplatinum (II) Neth J Med 25: 275-279, 1982.
- Vermorken JB, Pinedo HM, Gastrointestinal toxicity of cisdiamminedichloroplatinum (II) Neth J Med 25: 271-274, 1982.
- Geneva R, Kokileva L, Endogenous degradation of DNA and chromatin in rat liver nuclei after in vivo treatment with cis-and transdiamminedichloroplatinum (II). Cytobies 62: 167-174, 1990.
- Makita T, Itagaki S, Ohokawa T: X-Ray microanaltsis and ultrastructural localization of cisplatin in liver and kidney of the rat. Jpn J Cancer Res 76: 895-901, 1985.
- Tkacova E, Drobnik J, Kuzela S, Unequal inhibitor of protein synthesis in mitochondria of Zajdela hepatoma and rat liver after in vivo treatment with cis-diamminedichloroplatinum(II). Neoplasma 31 (2): 129-137, 1984.
- Blisard KS, Harrington DA, Toxicity of cis-diamminedichloroplatinum(II) in the frog, *Rana pipiens*. J Comp Path 103: 387-398, 1991.