

GUİNEA PİGLERDE CİSPLATİN VE CİSPLATİN-GENTAMİSİN KOMBİNASYONUNUN OTOTOKSİK ETKİLERİNİN HİSTOPATOLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI

Dr. Aziz ÖZTÜRK*
Dr. Enver ALTAŞ*
Dr. Bülent AKTAN*
Dr. Soner ÖZER*
Dr. R Murat KARAŞEN*
Dr. Akif ÇİFTÇİOĞLU**

Son elli yılda çok sayıda ilacın ototoksik yan etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Bunlardan en önemlileri; aminoglikozitler, loopdiüretikler, lokal anestezipler, antineoplastik ilaçlar ve non-steroidal antiinflamatuar ilaçlardır. Çalışmamızda antineoplastik ilaçlardan cisplatinin tek başına ve aminoglikozidlerden gentamisin ile birlikte kullanımının guinea pig kokleasında olası ototoksik etkileri ışık mikroskopik olarak değerlendirildi. Bu çalışma sonucunda, kokleanın bazal kıvrımında tüylü hücre dejenerasyonu ve nükleer kayıp, spiral ganglion hücreleri ve sinir liflerinde dejeneratif değişiklikler ve nükleer kayıp tespit edildi.

Kokleada gelişen bu dejeneratif değişiklikler cisplatin-gentamisin kombinasyonu verilen çalışma grubunda yalnız başına cisplatin verilen çalışma grubuna göre daha şiddetli olduğu görüldü. Aralarındaki fark istatistiksel olarak Wilcoxon Signed-Rank testi ile anlamlı bulundu ($p < 0.001$). Böylece, cisplatin-gentamisin kombinasyonunun tek başına cisplatin kullanımına göre daha fazla ototoksik olduğu kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Cisplatin, gentamisin, ototoksosite, guinea pig.

THE HISTOPATHOLOGIC INVESTIGATION OF THE OTOTOXIC EFFECTS OF CISPLATINUM AND CISPLATIN-GENTAMYCIN ON GUİNEA PİGS.

A wide ranged different drugs have been proved to be ototoxic in the last 50 years. These are aminoglycosides, loop diuretics, local anesthetics, antineoplastic drugs and non-steroidal anti-inflammatory agents. In this study, probable ototoxic side effects of cisplatin, antineoplastic agent, with or without gentamycin on the guinea pig's cochlea was evaluated light microscopically. Finally, it was found that nuclear loss and degeneration of hair cells in the basal turn of cochlea as well the changes in spiral ganglion and nerve fibers.

These degenerative changes were more severe in the group IV which on cisplatin and gentamycin combination as compared with group III which on cisplatin only. Thus, it was found that cisplatin and gentamycin combination may be more ototoxic that the use of only cisplatin. For statistically analysis, Wilcoxon Signed-Rank test was used. Cisplatin group (group III) was compared cisplatin-gentamycin group (group IV) and was statistically significant ($p < 0.001$).

Key words: Cisplatin, gentamycin, ototoxicity, guinea pig.

* Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, Erzurum
** Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Erzurum

Yazışma Adresi
Y.Doç. Dr. Enver ALTAŞ
Atatürk Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Yakutiye Araştırma Hastanesi
Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı
Tlf. 442 2331122/1687
Fax. 442.2186782
ERZURUM

Cisplatin (Cis-diaminedichloroplatinum II); Pt atomu, amonyum ve klor iyonlarından oluşmuş bir kompleks olup mesane, testis, over, uterus gibi genital ve üriner kanserlerde, özefagus ve baş-boyun kanserlerinde etkili bir antineoplastik ajandır. Cisplatin nefrotoksisite, myelosupresyon, gastrointestinal disfonksiyon, ototoksisite gibi yan etkilere sahiptir^{1,2}. Cisplatin ototoksisitesi kendini tinnitus ve işitme kaybı ile belli eder. Tinnitus tedavi bitiminden sonraki birkaç saat ile bir hafta arasında görülür ve sıklıkla geçicidir³. İşitme kaybı yüksek frekanslarda ve sensorinöral tiptedir ve genellikle bilateraldir⁴. Cisplatinin ototoksisite insidansı literatürde %9-91 arasında değişmektedir. Bu durum ototoksisite tanı kriterleri konusunda araştırmacıların değerlendirmeleri arasındaki standardizasyon eksikliği, tedavi süresi, ilacın dozu gibi nedenlere bağlı olabilir. Diğer antineoplastik ilaçların kullanımında olduğu gibi cisplatin kullanımı sırasında da kemik iliği supresyonuna bağlı ciddi enfeksiyonlarla karşılaşmakta ve bu enfeksiyonların tedavisinde de aminoglikozit grubu antibiyotikler sıklıkla kullanılmaktadır. Aminoglikozitler de cisplatin gibi ototoksik etkilere sahiptirler⁶.

Bu çalışmanın amacı; cisplatinin tek başına ve gentamisin ile birlikte kullanımının guinea pig kokleasındaki etkilerini ışık mikroskopik olarak incelemektir.

MATERYAL VE METOD

Çalışmamızda 44 adet albino guinea pig (350-550 gr) kullanılmıştır. Her grupta 11'er hayvan olmak üzere çalışmamız 4 grupta yapılmıştır. I. Gruba (Kontrol Grubu) 2cc serum fizyolojik, II. Gruba 100 mg/kg/gün gentamisin, III. Gruba 4 mg/kg/gün cisplatin, IV. Gruba 4 mg/kg/gün cisplatin + 100 mg/kg/gün gentamisin 5 gün süreyle her gün intraperitoneal (İ.P.) olarak enjekte edildi. Son dozdan 5 gün sonra bütün gruplardaki hayvanlar 100 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketalar^R Padeko) ve 3 mg/kg diazepam (Diazem^R Deva) İ.P. enjeksiyonu ile anestezi sağlandıktan sonra intrakardiyak %3 glüteraldehit enjeksiyonu ile öldürülüp dekapite edildiler. Tüm hayvanların 5 dakika içerisinde temporal kemikleri çıkarılıp bulla açılarak yuvarlak pencereden %2.5 glüteraldehit, 3 mM CaCl₂'ün pH: 7.3 0.1 M kakodilat buffer [Na (CH₃)₂ HSO₃ 3H₂O] tamponlu solusyonlar

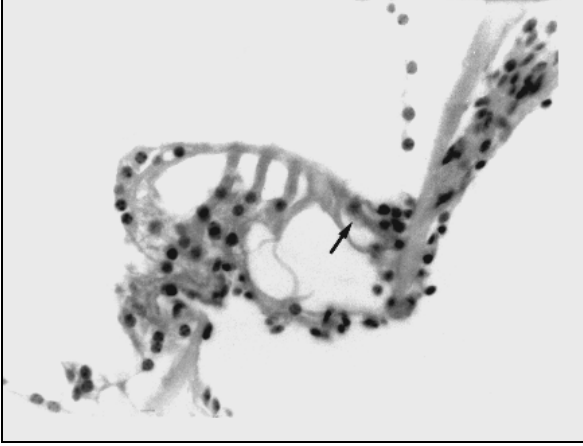
perilenfatik olarak enjekte edilerek fizyasyon yapıldı. Temporal kemikler aynı solusyonda + 4°C'de 1 gece bekletildi. Fizyasyon sonrası temporal kemikler dekalsifikasyon için %10 Etilen diamine tetra asetik asit sodyum tuzu solusyonunda (EDTA^R Atabay) + 4°C'de 10 gün bekletildi. Dekalsifiye temporal kemiklerden koklealar izole edilip midmodiolar kesitler yapıldı. Böylece her guinea pigden 4'er adet olmak üzere 176 adet yarım koklea elde edildi. Koklea spesmenleri grade etanolla dehidrate edildikten sonra parafin bloklara gömüldüler. Parafin bloklar 5 mm'lik kesitler halinde hazırlanıp hematoksilin-eozin ile boyandı. Preparatlar ışık mikroskopunda (IM) değişik büyütmelerde incelendi. Tüm yarım kokleaların tüylü hücreleri, spiral ganglion hücreleri ve sinir lifleri hidropik dejenerasyon ve nükleer kayıp yönünden incelendi. Değişikliklerin derecesi; değişiklik yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olmak üzere ayrıldı. Koklealardaki değişiklikler kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Bulgular istatistiksel olarak bilgisayarda SPSS programında non-parametrik testlerden olan Wilcoxon Signed-Rank testi ile karşılaştırıldılar.

BULGULAR

İntraperitoneal serum fizyolojik enjekte edilen kontrol grubu (Grup I) ve 100 mg/kg/gün gentamisin grubunda (Grup II) tüylü hücreler, spiral ganglion ve sinir liflerinde herhangi bir morfolojik değişiklik gözlenmedi.

4 mg/kg/gün cisplatin grubunda (Grup III) 44 yarım kokleanın 18'inde dış ve iç tüylü hücrede hidropik dejenerasyon gözlendi. Bunların 2'sinde şiddetli, 10'unda orta ve 6'sında hafif derecede hasar vardı (Resim 1). 4 mg/kg/gün cisplatin+100 mg/kg/gün gentamisin grubunda (Grup IV) 44 yarım kokleanın 40'ında iç ve dış tüylü hücrelerde ve spiral ganglion hücrelerinde hidropik dejenerasyon ve nükleer kayıp gözlendi. Bunların 24'ünde şiddetli, 12'sinde orta ve 4'ünde hafif derecede hasar vardı (Resim 2, Resim 3). Tüm gruplarda stria vaskülariste ışık mikroskopik düzeyde herhangi bir değişiklik gözlenmedi.

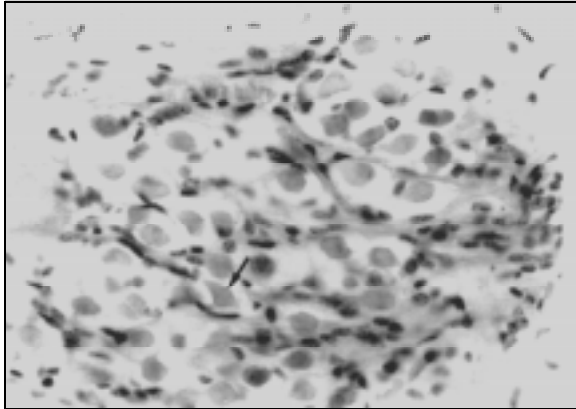
Ototoksisite şiddetinin derecesi ne olursa olsun gruplar arasında tüylü hücrelerde, spiral ganglion ve sinir liflerinde hidropik dejenerasyon



Resim 1. 4 mg/kg/gün cisplatin ototoksitesine bağlı iç tüylü hücrede hidropik dejenerasyon (H&E X400).



Resim 2. 4 mg/kg/gün cisplatin + 100 mg/kg/gün gentamisin ototoksitesine bağlı dış tüylü hücrenin birinde ve iç tüylü hücrede nükleer kayıp ve hidropik dejenerasyon (H&E X400).



Resim 3. 4 mg/kg/gün cisplatin + 100 mg/kg/gün gentamisin ototoksitesine bağlı ganglion hücrelerinde nükleer kayıp ve hidropik dejenerasyon (H&E X400).

ve nükleer kayıp gibi değişiklikler gözönüne alınarak yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda; Grup I ile Grup III ve Grup IV arasındaki fark anlamlı bulundu ($z = -3.7236$, $p < 0,001$ ve $z = -5.5109$, $p < 0,001$), Grup II ile Grup III ve Grup IV arasındaki fark anlamlı bulundu ($z = -3.7236$, $p < 0,001$ ve $z = -5.5109$, $p < 0,001$). Grup III ile Grup IV arasındaki fark anlamlı bulundu ($z = -4.1069$, $p < 0,001$). Grup I ile Grup II arasındaki fark anlamsız bulundu ($z = 0,0$, $p > 0,05$). Ancak; bulgular incelendiği zaman tek başına cisplatin verilen gruptaki dejeneratif değişiklikler ve nükleer kaybın cisplatin-gentamisin kombinasyonlu gruptakinden daha az olduğu görülmektedir. Yani, cisplatin-gentamisin kombinasyonunun tek başına cisplatine oranla daha fazla ototoksik etkiye yol açtığı görülmüştür.

TARTIŞMA

Cisplatinle yapılan hayvan çalışmaları kokleanın bazal turnundaki dış tüylü hücrelerin ilk olarak etkilendiğini, tedaviye devam edilirse hasarın epitel hücrelerine doğru ilerlediği gösterilmiştir^{7,8}. Cisplatinle yapılan çalışmalarda bazı araştırmacılar cisplatinin stria vaskularis üzerine dejeneratif değişiklikler yapmadığını⁹ veya minör değişiklikler yaptığını⁷ bildirmişlerdir. Tange ve Vuzevski, cisplatinin stria vaskulariste yaygın ototoksik değişikliklere yol açtığını söylemekte ve bunu marjinal hücre plazma membran yüzeyinin protrüzyonu, kistik dejenerasyonu ve hücrelerde kayıp olarak tarif etmektedirler¹⁰.

Çalışmamızda tüm gruplarda ışık mikroskopik düzeyde stria vaskulariste morfolojik değişiklikler görülmemiştir. Buna karşılık, cisplatin ve cisplatin-gentamisin kombinasyonu verilen hayvanlarda kokleanın bazal kıvrımında hafif, orta veya şiddetli derecede dış ve iç tüylü hücre hasarı tespit edildi.

Cisplatinin kokleanın nöral yapılarına (spiral ganglion ve sinir lifleri) olan toksik etkilerini gösteren az sayıda çalışma vardır. Straus ve ark.ları, frontal lob astrositoması nedeniyle cisplatin alan 9 yaşındaki bir kızın temporal kemiğini postmortem incelemişler ve kokleanın bazal turnundaki dış tüylü hücreler, spiral ganglionlar ve sinir liflerinde dejeneratif değişiklikler tespit etmişlerdir⁹. Sütbeyaz ve

ark.ları cisplatin ototoksitesisi üzerine yaptıkları çalışmalarında kokleanın bazal kıvrımındaki spiral ganglion hücrelerinin stoplazmalarında masif kondansasyon ve nükleuslarında küçülme, sinir liflerinde kondansasyon ve daralma, aksonlarda kayıp tespit etmişlerdir¹¹.

Çalışmamızda, yalnızca cisplatin verilen Grup III'de orta derecede, cisplatin-gentamisin verilen grup IV'de şiddetli derecede olmak üzere koklea bazal turnundaki spiral ganglion ve sinir liflerinde dejeneratif değişiklikler gözlemlendi.

Aminoglikozidler üzerinde yapılan bütün hayvan ve insan temporal kemik çalışmaları ilk olarak dış tüylü hücrelerin etkilendiği, dış tüylü hücreler tamamen dejenerasyon olduktan sonra iç tüylü hücrelerin etkilendiğini göstermişlerdir¹². İstisna olarak Hinojosa ve ark.ları, 2 vakada tüylü hücreler intakt olduğu halde ganglion hücre kaybı tespit etmişlerdir¹³. Tüylü hücreler destrükte olunca destek hücrelerinde dejenerasyon başlar, korti organı kollabe olur ve görülmez¹². Çalışmamızda yalnız gentamisin verilen Grup II'deki kokleaların hiçbirinde dejeneratif değişiklik gözlenmedi.

Kohn ve ark.ları cisplatinin tek başına ve gentamisin ile kullanımının guinea pig stria vaskülarisine olan etkilerini araştırmışlar ve cisplatin-gentamisin kombinasyonu verilen grupta strial dejenerasyonun daha fazla olduğunu göstermişlerdir⁶. Schweitzer ve ark.ları ile Riggs ve ark.ları, cisplatin ile kombine aminoglikozid kullanıldığında oluşan ototoksitesinin tek başına cisplatin ototoksitesine göre daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir^{14,15}. Biz de çalışmamızda, tek başına cisplatin kullanılan gruplara göre cisplatin gentamisin kullanılan gruplarda tüylü hücre, spiral ganglion ve sinir liflerindeki dejeneratif değişikliklerin daha fazla olduğunu tespit ettik.

Literatürdeki bazı raporlar, cisplatin ototoksitesinde bazı risk faktörlerine işaret etmektedirler. Bunlar arasında en önemlileri: Aquilar-Markulis ve ark.ları, daha önce işitme kaybı olanlarda, ileri yaşlarda olanlarda¹⁶ ve Brackley ve ark.larının serum albümin, hemoglobin, eritrosit ve hemotokriti düşük

olanlarda¹⁷ cisplatin ototoksitesinin arttığına dair çalışmalarıdır. Ayrıca, Barr-Hamilton cisplatin tedavisinde kahverengi gözlülerde mavi gözlülerden daha fazla ototoksitesite görüldüğü¹⁸ ve Marco-Algarra ve ark.ları, koklear lezyonun yeri ve derecesi ile alınan ilacın dozu arasında direkt ilişki olduğunu, cisplatin dozunun artımı ile lezyonun şiddetinin arttığını rapor etmişlerdir⁸. Çalışmamızda ortaya çıkan ototoksitesite şiddetinin değişik derecelerde olması bahsedilen bu durumlardan kaynaklanabilir.

Bu çalışma ile cisplatinin yalnızca korti organına değil koklear nöral yapılara da toksik olduğu ve cisplatin-gentamisin kombinasyonunun tek başına cisplatin kullanımına göre daha fazla ototoksik olduğu kanısına varılmıştır. Ayrıca; cisplatin ve cisplatin-gentamisin ototoksitesisi ile ilgili daha geniş çalışma serilerine ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Matz GJ. Clinical perspectives on ototoxic drugs. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990; 99: 39-43.
2. Moroso MJ, Blair RL. A review of cisplatin ototoxicity. *J Otolaryngol* 1983; 12: 365-369.
3. Schweitzer VG. Ototoxicity of chemotherapeutic agents. *Otol Clin of North Am* 1993; 26(5): 759-789.
4. Pasic RT, Dobie AR. Cis-Platinum ototoxicity in children. *Laryngoscope* 1991; 101: 985-991.
5. Fausti AS. Early detection of cisplatin ototoxicity. *Cancer* 1984; 53: 224-231.
6. Kohn S, Fradis M, Podoshin L, et al. Toxic effects of cisplatin alone and in combination with gentamycin in stria vascularis of guinea pigs. *Laryngoscope* 1991; 101: 709-716.
7. Nokai Y, Konishi K. Ototoxicity of anticancer drug cisplatin. *Acta Otolaryngol* 1982; 93: 227-232.
8. Marco-Algarra J, Basterra J, Marco J. Cis-Diaminedichloro Platinum ototoxicity. An experimental study. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1985; 99: 343-347.
9. Straus M, Towfighi J. Cis-platinum ototoxicity: Clinical experience and temporal bone histopathology. *Laryngoscope* 1983; 93: 1554-1559.
10. Tange RA, Vuzevski VD. Changes in the stria vascularis of the guinea pig due to cisplatin. *Arch Otorhinolaryngol* 1986; 239: 41-47.
11. Sütbeyaz Y, Yakan B, Döner F, Selimoğlu E, Karasen M. Cisplatin ototoxicity: Light microscopic study. *Tr J of Medical Sciences* 1995; 23: 37-41.
12. Huizing EH, Groot de JM. Human cochlear pathology in amino-glycoside ototoxicity. A review. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 1987; 436: 117-125.
13. Hinojosa R. Amino-glycoside ototoxicity. In: Lerner Sa, Motz GJ, Hawkins JE Jr, ed(s). Boston: Little, Brown-Company. 1981; 435-439.
14. Schmetzer VG, Hawkins JE, Lilly DJ et al. Ototoxic and nephrotoxic effects of combined treatment with cis-diaminedichloroplatinum and kanamycin in the guinea pig. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1984; 92(1): 41-49.
15. Riggs LC, Brummett RE, Guitjens SK, Matz GJ. Ototoxicity resulting from combined administration of cisplatin and gentamycin. *Laryngoscope* 1986; 106(4): 401-466.
16. Aguilar-Markulis MV, Beckley S, Priore R, Mettlin C. Auditory toxicity effects of long-term cisplatin therapy in genitourinary cancer patients. *J Surg Oncol* 1981; 16: 111-123.
17. Brian W Blakley, Grupta KA, Myers FS, Schwan S. Risk factors for ototoxicity due to cisplatin. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 120: 541-546.
18. Barr-Hamilton RW, Matheson LM, Keay DG. Ototoxicity of cisplatin and its relationship to eye colour. *The J of Laryngol and Otol* 1991; 105: 7-11.