

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

Leyla KUNTSAL¹ Yurdağül 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 yoğunlaştığı izlendi. Bu gruplar ışık mikroskopik olarak incelendiğinde hepatositlerin oluşturduğu hücre kordonlarının düzensizleştiği, sinüzoidlerin genişlediği, yer yer kanama odaklarının olduğu görüldü. Hepatositler çoğunlukla normal poligonal şekillerini kaybetmişlerdi. Ultrastrüktürel olarak incelendiğinde sinusoid lümenlerinde hepatositlere ait sitoplazmik kalıntılara rastlandı. Hepatositlerin perisinüzoidal yüzlerindeki mikrovilli yapılarında azalma ve şekil bozuklukları görülürken, bazılarında ise invagine ve piknotik nükleuslar, sitoplazmalarında düzensiz ve dilate endoplazmik retikulum, şişmiş mitokondrionlar, çok sayıda vakuol ve lizozomlar dikkati çekti. 18. ve 28. günlerde ise bu etkilenmelerin azaldığı 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 oluşmaktadır (6). Cisplatinin kullanımında ortaya çıkan ana sorunlardan biri akut tübüler nekrozla gelişen nefropati (7), diğeri 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 araştırmacılar tarafından incelenmektedir. Bizde cisplatinin tek doz verilip farklı sürelerde bekletildikten sonra sıçan karaciğer dokusuna yaptığı etkilerin neler olduğunu ışık ve elektron mikroskopik düzeyde incelemeyi planladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırmada İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden sağlanan 250-300 gr ağırlığında 16 adet Sprague Dawley türü genç erişkin erkek sıçanlar kullanıldı. Kontrol için ayrılan 4 adet erişkin sıçana 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 kurban edildi.

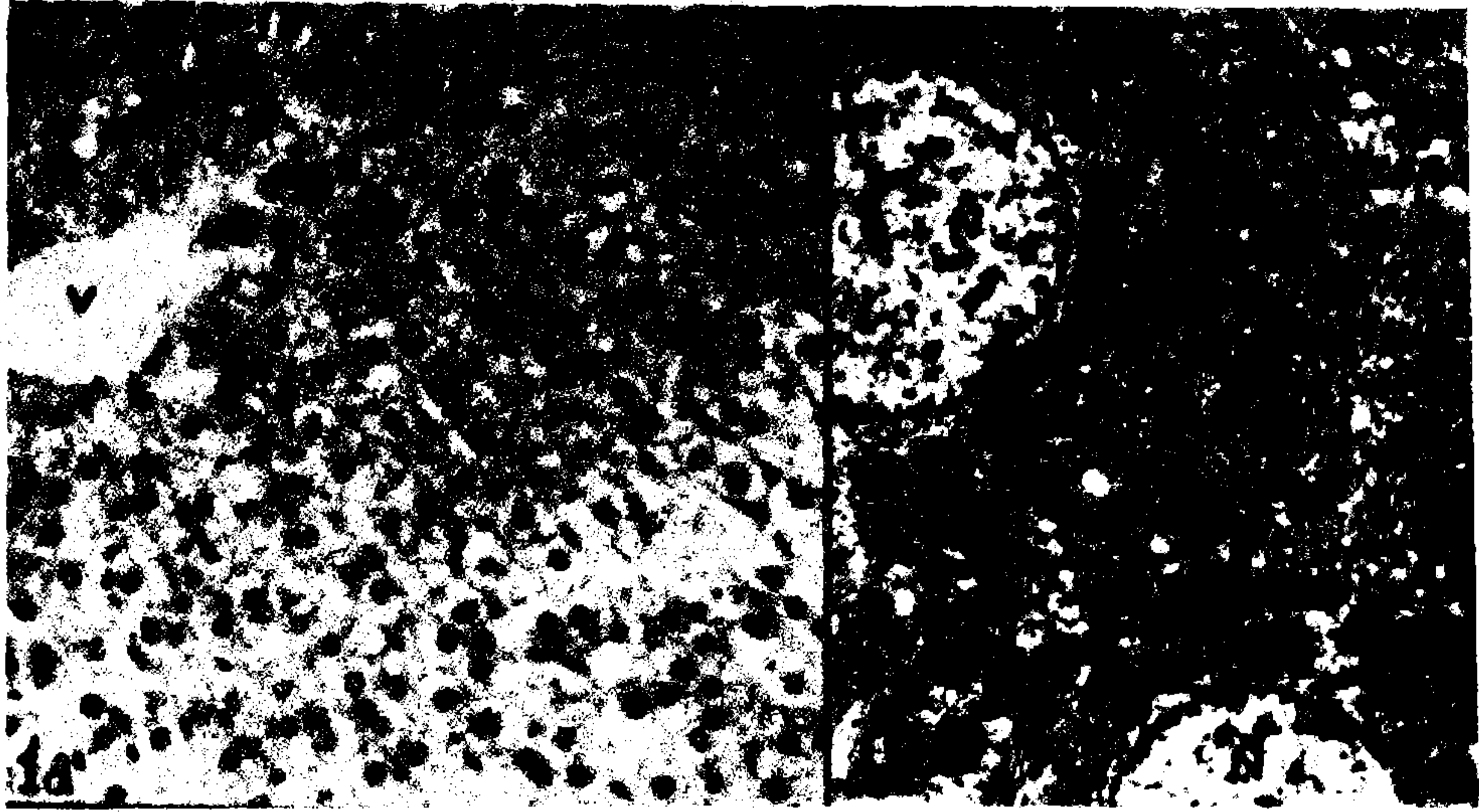
Kontrol ve deney gruplarındaki sıçanlardan alınan karaciğer doku parçalarının ışık ve elektron mikroskopik incelemeler için uygun takipleri yapıldı. Işık mikroskopi için, doku parçaları fosfat tamponlu % 10'luk formaldehit ve Bouin solüsyonlarında tespit edilerek, rutin işlemlerden sonra, alınan kesitlere 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'lik fosfat tamponlu osmium tetroksitte fikse 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.

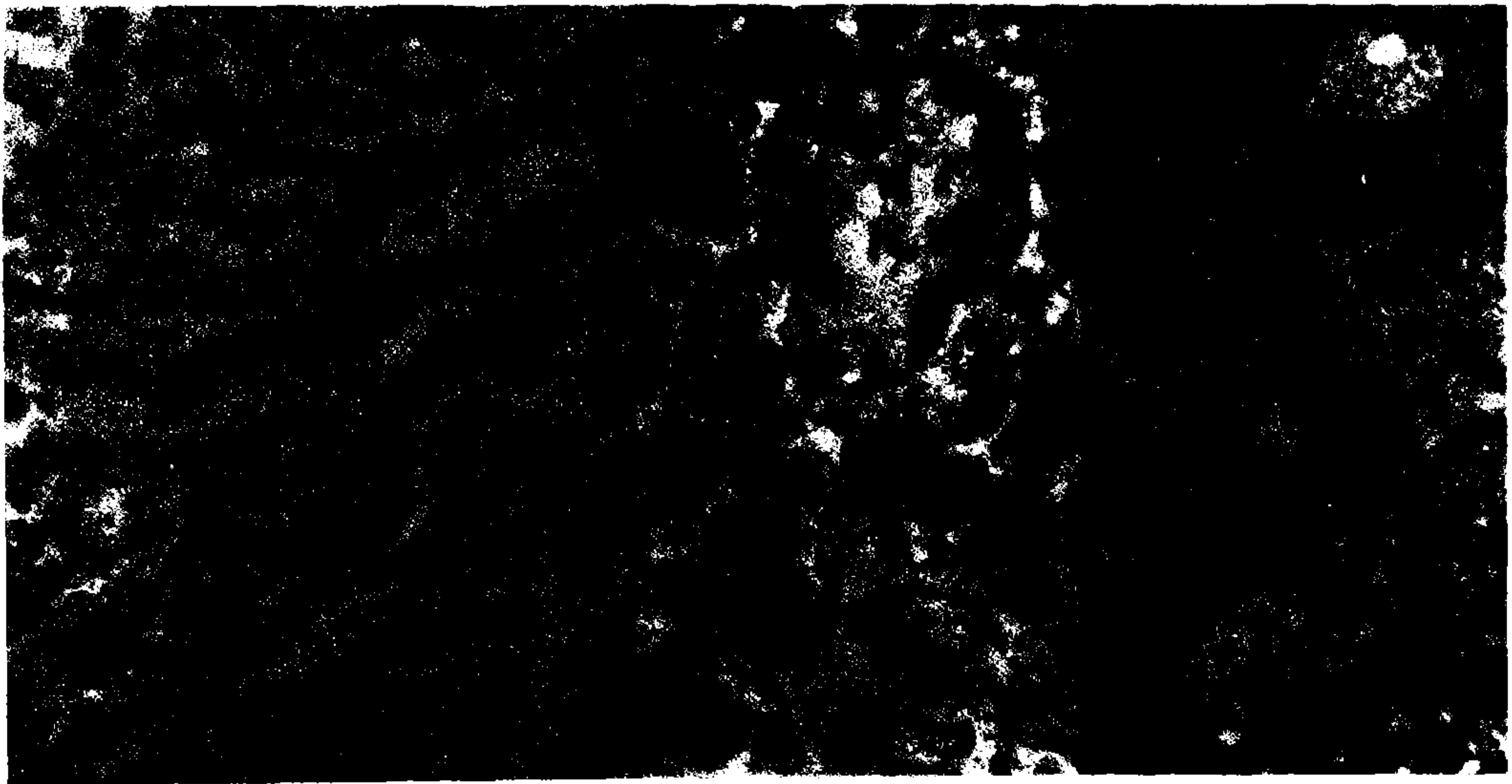
BULGULAR

Işık mikroskopik incelemede, kontrol grubuna ait sıçanlarda, karaciğer parankim hücrelerinin lobuluslar içinde düzenli kordonlar oluşturduğu görüldü. Bu hücre kordonları ve bunların aralarında seyreden sinüzoidler Vena centralis etrafında ışımsal olarak dizilmişti. Hepatositlerin nükleusları merkezi konumlu, yuvarlak veya oval şekilli idi. Bazı hepatositler çift nükleus içeriyordu. Sitoplazma granüler yapıda ve eozinofilikti (Resim 1). Kontrol grubuna ait hayvanlardan alınan karaciğer dokularının ultrastrüktürel incelenmesinde ışık mikroskopunda izlendiği gibi, poligonal şekilli hepatositler tek ya da çift nükleusluydu. Yuvarlak şekilli nükleuslarda kromatin materyali daha ziyade nükleolemma üzerinde kümelenmiş olarak gözlemlendi. Sitoplazmada, iyi gelişmiş granüllü endoplazma retikulumu (GER) membranları, daha çok nükleus periferisinde veya mitokondrionların arasında yer almakta idi. Granülsüz endoplazma retikulumu membranları (SER) ise nükleusun uzağında, hücre membranına yakın alanlardaydı. Bu bölgelerde bol miktarda glikojen partikülleri de göze çarpıyordu. Mitokondrionlar krista tipli ve homojen matriksli idi (Resim 1b). 5 mg/kg cisplatin uygulamasından 3 gün sonra kesilen sıçanlarda (I. deney grubu), karaciğerin ışık mikroskopik incelenmesinde, 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 dikkati çekti. Hepatositlerin bazılarının normal poligonal şekillerini kaybederek polimorfizm gösterdikleri izlendi (Resim 2a).

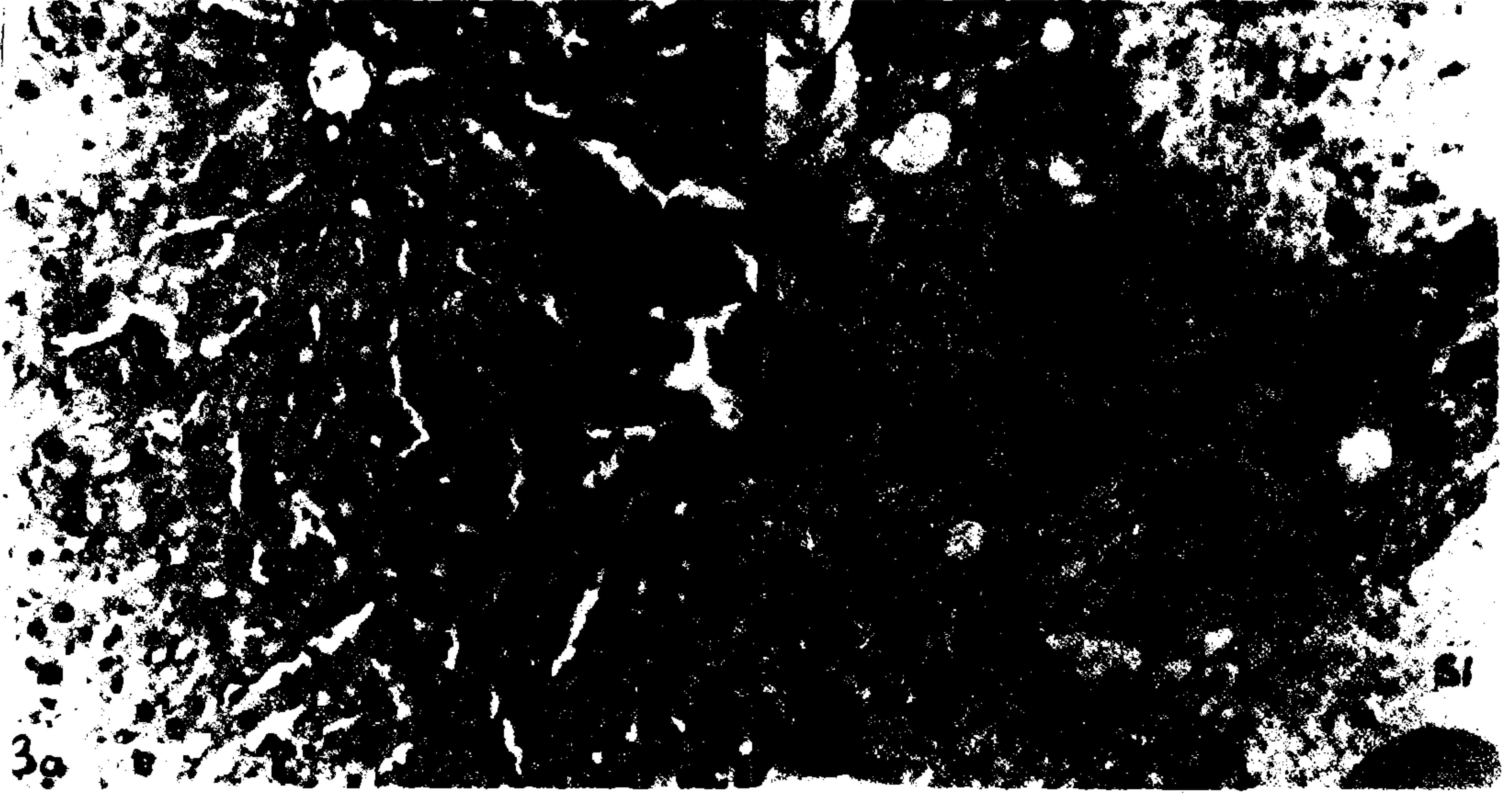
Ultrastrüktürel incelemede, I. deney grubuna ait bir kısım hepatositte nükleus invajinasyon nedeniyle düzensiz şekilli ve piknotikti. Bazı alanlarda hepatositlerin sitoplazmalarında granüler görünümün kaybolduğu izlendi (Resim 2b). Hepatositlerin bazılarında membran yırtılmaları sonucunda hücre bütünlüğünün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



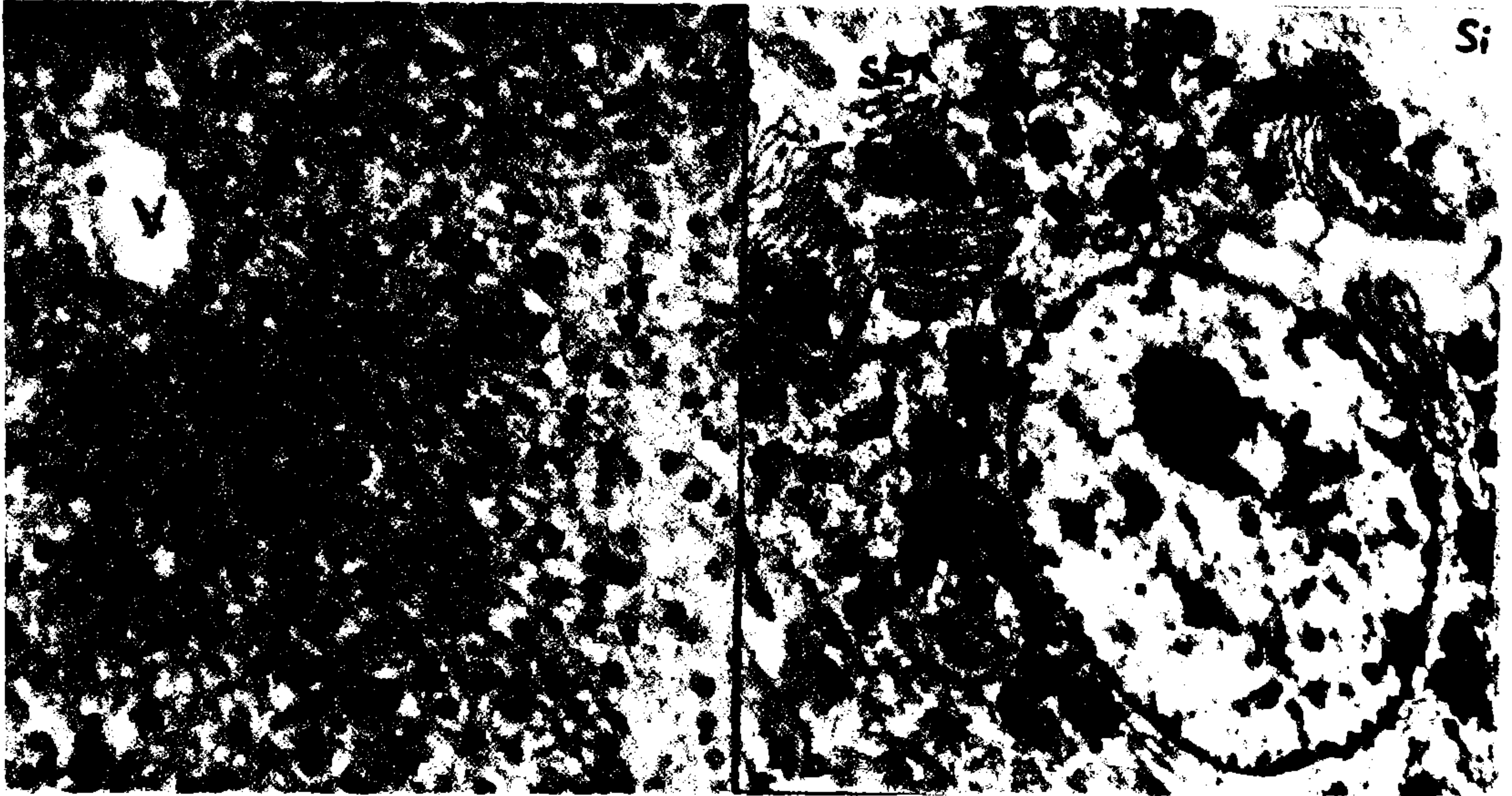
Resim 1 : Kontrol grubuna ait siçan karaciğeri: a) Klasik lobulusa ait v.centralis (v) ve ışımsal dizili hücre kordonları görülen ışık mikrofotografı. H&E: X 100 b) Bir hepatositte ait elektronmikrograf. N: Nükleus; Mi: Mitokondri; GER: Granuler endoplazma retikulumu; SER: Granülsüz endoplazma retikulumu;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



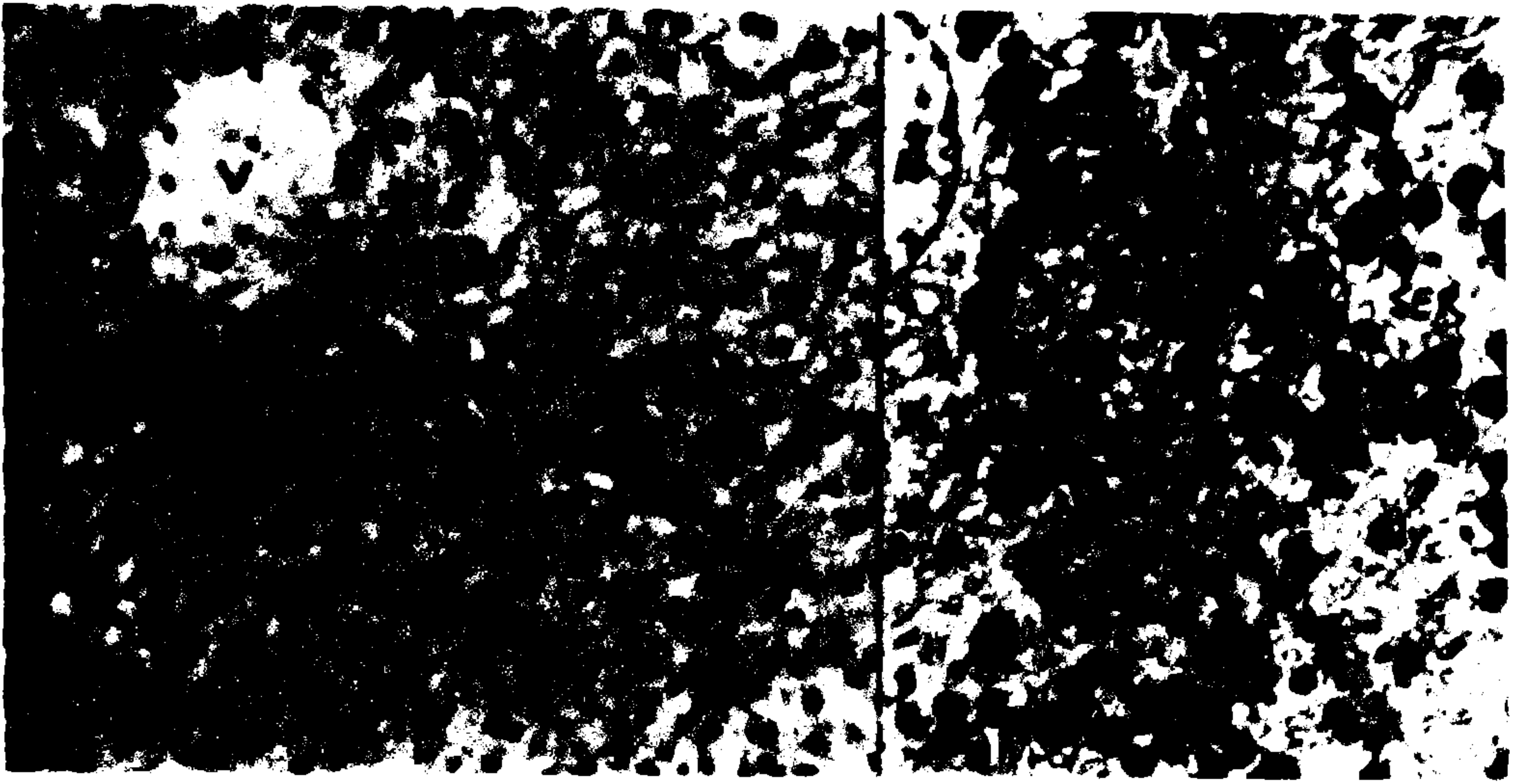
Resim 2 : I. deney grubu: a) Düzensiz hepatosit kordonları, intersellüler aralıkta ve sinusoidlerde (s) genişlemeler ve yer yer kanama odakları (oklar) izlenmekte. H&E: X 160 b) Bir hepatositte piknotik ve invaginasyonlu (oklar) nükleus (N), dejeneratif yapı bozuklukları gösteren mitokondrionlar (Mi) arasında karışık düzende yer almış GER membranları izlenmekte. E. M. X 12000 c) Bir hepatositin perisinüzoidal yüzünde membran yırtılmaları ve dejenerasyon, sinüzoid(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 ışınal 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: Nükleus; 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 dejenere yapıları ile mitokondrionların (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 bazılarında lipid damlacıkları ve lizozomlarda artış mevcuttu.

5 mg/kg'lık cisplatin uygulamasından 11 gün sonra (II. deney grubu), sıçanların karaciğerleri ışık mikroskopunda incelendiğinde, I. deney grubundaki bulguların bir çoğunun 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 rastlanmakta idi.

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

İlaç uygulamasını takip eden 18 gün sonra (III. deney grubu), karaciğer parenkimasında ışık mikroskopik olarak incelendiğinde belirgin bir düzelme gözlemlendi. 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 nükleus içerdiği ve GER ve SER membranlarının düzenli olarak dağıldığı izlendi. Hepatositlerde iri, büyük, çok sayıda lipid damlacıkları ve dejenere 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 ışınal bir dizilim gösteriyordu. Hücre nükleusları 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 düzelme tespit edildi. Hepatositlerde kontrol grubuna benzer görünüm hakimdi. Nükleus 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 deneysel çalışmada hepatositlerde ilacın nükleusta diffüz olarak yayıldığı, ancak düz yüzeyle endoplazma retikulumu (SER) sistemaları ve mikroadilerin matrikslerinde tanecikler halinde lokalize olduğu bildirilmiştir (11). Aynı çalışmada, sitoplazmada büyük boş sahalar, küçük vakuoller, dilate SER sistemaları ve şişmiş mitokondrionlar gösterilmiştir. Bizim bulgularımızla bu bilgiler genellikle paralel olmakla beraber, ayrıca bizim çalışmamızda, özellikle 3. ve 11. gün kesilen sıçanlarda, hepatositlerin bazılarının aşırı etkilenme sonucu parçalanıp sinüzoidlere döküldükleri görülmüştür (Resim 2c). Bunda cisplatin dozunu bir tek defada uygulamamızın rolü olduğunu düşünmekteyiz. Yukarıda bahsi geçen çalışmada ise cisplatinin 5 hafta süreyle her gün ve küçük dozlarda verilmesi söz konusudur.

Kurbağalarda yapılan ultrastrüktürel bir araştırmada, karaciğer hücrelerinde nükleusta kromatin dağılması, 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. gruplarda bile mitokondrionlarda 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 ilacın 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, ilacın klinik kullanımındaki en büyük sorun olan gastrointestinal etkilenme mekanizmasının açıklamasında katkısı olabileceği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Reedijk J., Lohman PHM, Cisplatin: Synthesis, antitumour activity and mechanism of action. *Pharm Weekbl Sci* 7 (5): 173-180, 1985.
2. Garnick MB, Advanced testicular cancer: Treatment choices in the "land of plenty" *J Clin Oncol* 3 (3): 294-296, 1985.
3. Ozols RF. The case for combination chemotherapy in the treatment of advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 3 (11): 1445-1447, 1985.
4. Pearson BS, Raghavan D, First-line intravenous cisplatin for deeply invasive bladder: Uptake on 70 cases *Br. J. Urol.* 57:690-693, 1985
5. 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.
6. Von Hoff DD, Richard S, Reichert CM et al, Toxic effects of cisdiamminedichloroplatinum (II) in man. *Cancer Treat Rep* 63: 1527-1531, 1979.
7. Choie DD, Longnecer DS, Del Campo AA, Acute and chronic cisplatin nephropathy in rats. *Lab Invest* 44 (5): 337-341, 1981.
8. Vermorken JB, Pinedo HM, Gastrointestinal toxicity of cisdiamminedichloroplatinum (II) *Neth J Med* 25: 275-279, 1982.
9. Vermorken JB, Pinedo HM, Gastrointestinal toxicity of cisdiamminedichloroplatinum (II) *Neth J Med* 25: 271-274, 1982.
10. 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.
11. Makita T, Itagaki S, Ohokawa T: X-Ray microanalysis and ultrastructural localization of cisplatin in liver and kidney of the rat. *Jpn J Cancer Res* 76: 895-901, 1985.
12. 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.
13. Blisard KS, Harrington DA, Toxicity of cis-diamminedichloroplatinum(II) in the frog, *Rana pipiens*. *J Comp Path* 103: 387-398, 1991.