

NİTROGEN MUSTARD (HN₂)'İN SIÇANDA LETHAL DOZ (LD₅₀-LD₁₀₀) SEVİYELERİNDE FETOMATERNAL TOKSİSİTE DEĞERLENDİRMESİ-I

Dr. Osman ÖZCAN *, Dr. Selçuk DUMAN **, Dr. Kemal IRMAK *,
Dr. Hüseyin UYSAL ***, Dr. Hasan KOÇ ****

* GATA Histoloji-Embriyoloji BD ** S.Ü.T.F. Histoloji-Embriyoloji BD,
*** S.Ü.T.F. Fizyoloji ABD, **** S.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD

ÖZET

Nitrojen mustardın LD₅₀ ve LD₁₀₀ seviyelerinde nonmalignant dokulara olan etkilerini incelemek amacıyla yapılan çalışmada 30 sıçan kullanıldı. I.P. olarak gebe sıçanlara verilen etkenin etkileri ışık mikroskopik seviyede değerlendirildi.

Karaciğerde doz-cevap ilişkisiyle doğru orantılı olarak gelişen dejeneratif bozukluklar, dalakta beyaz pulpa organizasyonunun bozukluğu, böbrekte fokal kanamalar ve periferik kan yaymasında lökopeni tesbit edildi. Embriyoların uygulama sonrası rezorbe olduğu preparasyonlarda gözlemlendi.

Gebelerde nitrojen mustardın uygulama zorunluğunda toksik etkilerinin gözönüne alınması gerektiği vurgulandı.

Anahtar Kelimeler: Nitrogen mustard, sıçan, toksisite, fetomaternal doku

SUMMARY

The Fetomaternal Toxicity Evaluation of Nitrogen Mustard (HN₂) at the Level of Lethal Dose (LD₅₀-LD₁₀₀) in Rats

In this study whose object was to invest the effects of nitrogen mustard in the level of LD₅₀ and LD₁₀₀ on nonmalignant tissues 30 rats were used. The effects of nitrogen mustard which was given intraperitoneally to pregnant rats were investigated with light microscope.

In the liver degenerative defects which increased with increasing dose, in the spleen white pulp organization defects, in the kidney focal bleedings and in the peripheric blood smear leucopenie were detected. After procces it was observed that embryos were resorbed. It was emphasised that in the obligation of the use of nitrogen mustard in pregnant the toxic effects should be taken care.

Key Words: Nitrogen mustard, rat, toxicity, fetomaternal tissue

GİRİŞ

Nitrogen mustard (C₃H₁₁Cl₁₂NHCL) (HN₂), erime noktası yaklaşık 108°C olan suda eriyebilen, beyaz renkli higroskopik vezikant kimyasal bir ajandır. Hodgkin lenfosarkoma, kronik lösemi, bronş karsinomları gibi neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanılan alkilleyici ilaç grubunda yer alan HN₂'nin immunosupressif, mutajenik, teratojenik ve karsinogenik etkileri de vardır (1-4). Sitotoksik alkilleyici ajanların en önemli biyofarmakolojik aktiviteleri; mitoz, hücre diferansiyasyonu, büyümesi ve fonksiyonları üzerinde yoğunlaşmaktadır. Sitotoksik özellik göstererek etki mekanizmasını oluşturan HN₂ organizmada pozitif yüklü bir metabolite dönüşerek DNA'ya olan affinitesini artırır. Guanin seviyesindeki 7 nolu azot atomuna irreversibl seviyede kovalent bağlarla bağlanır ve bu pürin bazının sitozin yerine timin ile baz çifti oluşturmaya neden olur. Sonuçta

genetik kodun yanlış okunmasıyla DNA replikasyon ve transkripsiyon bozukluğu ortaya çıkar. mRNA molekülleri bu seviyelerde bozular. Etken özellikle mitotik bölünmelerde G₁ ve S fazına daha sensitiftir. Bu duyarlılık invitro koşullarda, fibroblast kültürlerinde G₂ fazı düzeyindedir. Birçok alkilleyici ilaç grubunda yer alan antineoplastik ilaçlar elektrofilitik ve genomik DNA'ya kovalent ve/veya nonkovalent olarak bağlanabilmektedir (5-9).

HN₂'nin antitümöral etkisi, hücre membranında ATPaz enziminin inhibisyonu, sellüler NAD⁺ tüketiminin aktive edilmesi sonucu ATP havuzunun bitmesiyle şekillenen hücre ölümü, glikolitik enzimler ve cAMP düzeyi ile etkili olabilmektedir (10). HN₂ fetomaternal malignant ve nonmalignant dokular için potansiyel toksisiteye sahiptir (11). Doz-cevap etkileşimleriyle yakından ilişkili olan potansiyel toksisitede, embriyonun yaşı, plasentadan

geçme kapasitesi, embriyonik dokulara penetrasyonu, maternal karaciğer tarafından detoksifiye edilmesi veya teratojenik bir metabolite dönüşmesi gibi kriterler sözkonusudur (12-14). Nonmalignant dokularda etkenin sitotoksik etkilerinin görülebilmesi için, kimyasal yarılanma ömrü, dokulardaki dağılımı, atılımı ve target bölge affinitesi ile yakından ilişkilidir (3,15). HN₂'ye sensitif hücrelerde kromatin kondensasyonunun değişmesi, serbest radikalleri ortadan kaldıracak enzimlerin yokluğu veya inhibe edilmesi, DNAdaki major harabiyeti Go fazında tamir edecek olan 06-alkil guanin DNA alkil transferaz (06-AGT) enziminin yetersizliği, etkenin sitotoksitesini arttırmaktadır (16-19). Rezistant hücrelerde bu aktivasyonlar sağlıklı kombinasyonlar halinde yürütülmektedir (20). Ancak neoplastik hastalıkların tedavisinde ilaç uygulamaları sürekli olduğu için normal hücre içi rutin mekanizmalarda sapmalar olabilmektedir. Bu sapmaları tesbit etmek amacıyla invitro koşullarda değişik hücre hatları kullanılmaktadır. Bunlar Chinese hamster V₇₉ akciğer fibroblastları, neurospora spheroblastlar, insan akciğer adenokarsinom hücreleri (HTB.54), HeLa S₃ hücre tipleri en çok kullanılanlarıdır (21-25). Rezistant hücre tiplemesi için rodent maternal ve fetal dokusu alınan bu çalışmada, insanlarda gebelikteki insidansı %0.07 ile %0.1 oranlarında meydana gelen neoplastik oluşumların tedavisinde kullanılabilecek olan HN₂'nin lethal doz toksisitesi araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOD

1. ve 2. deney grupları ve kontrol grubu için 10'ar adet olmak üzere toplam 30 adet Swiss albino sıçanlar kullanıldı. Kristalize nitrogen mustardın 10 mg'lık injeksiyon preparasyonu 20 ml steril distile su ile uygulamaya hazır hale getirildikten sonra 1. deney grubuna LD₁₀₀ için 1 mg/kg, 2. deney grubuna LD₅₀ için 0.7 mg/kg oranında hazırlanan dozlar çiftleşmenin ertesini günü gebeliğin 1. günü kabul edilen gebe sıçanlara 12. günde İ.P. olarak verildi. Kontrol grubuna aynı yoldan 0.5 ml steril distile su verildi.

Gebeliğin 21. gününde dekapite edilen sıçanların maternal karaciğer, dalak ve böbrekleri ile fetusları alındı. Uygulamadan 24 saat sonra kontrol ve deney gruplarından periferik kan yaymaları alındı.

Işık mikroskopik inceleme için parafin blokaj tekniği kullanılarak HxE ile boyanan preparasyonların Olympus PM 10 AD fotoataşmanlı mikroskop ile mikrofotoları çekildi.

BULGULAR

LD₅₀ düzeyinde, karaciğer hücrelerinde radier dizilimi normaldi. Kupffer hücrelerinin aktivasyonu ile sinüzoidlerde kanın şekilli elemanları bol miktarda tesbit edildi. LD₁₀₀ düzeyinde ise hepatosit radier diziliminin ve hücre biçimlerinin bozulmuş, fagositik aktivitenin artmış olduğu gözlemlendi. Kanın şekilli elemanları bu seviyede de sinüzoidlerde gözlemlendi ve primer karaciğer dejenerasyonu tesbit edildi (Resim 1-2). LD₅₀ ve LD₁₀₀ düzeyinde dalak strüktürü aynı idi. Kırmızı ve beyaz pulpa organizasyonu tamamen bozuktu ve parankim içerisinde hemosiderin artışı gözlemlendi (Resim 3-4).

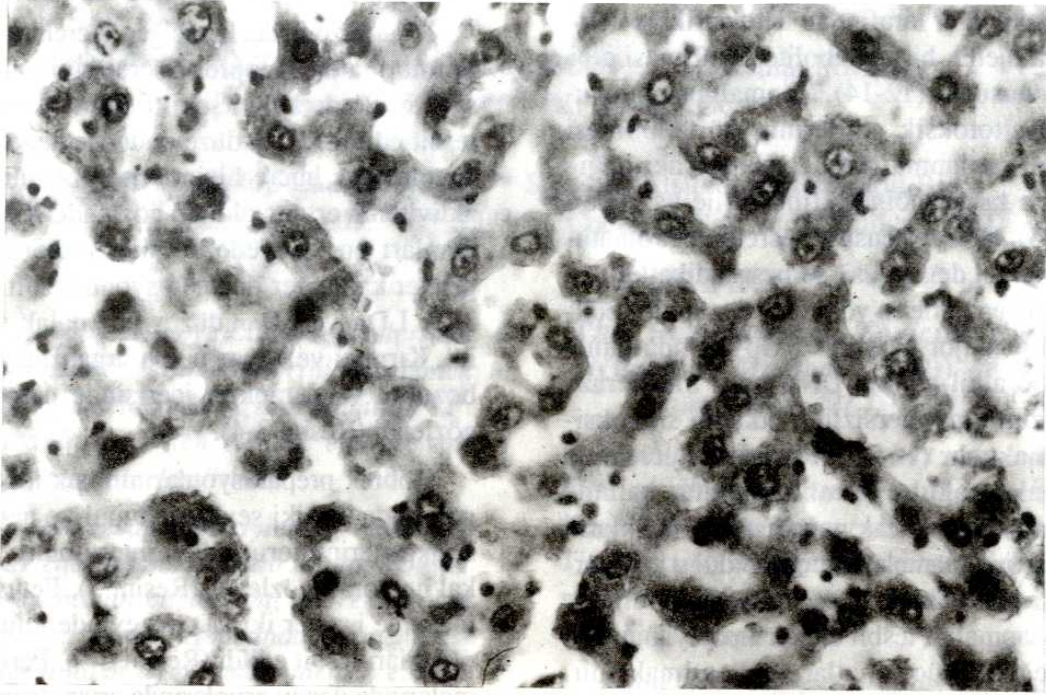
Böbrek preparasyonlarının ışık mikroskopik bulgularında her iki seviyede tubul ve nefronlar normal strüktürlerini korurlarken intertübüler bölgelerde focal hemoraji gözlemlendi (Resim 5). Fetüslerin incelenmesinde ise her iki LD düzeyinde fetüslerin rezorbe oldukları tesbit edildi (Resim 6-7). Periferik kan yaymalarında deney gruplarında artan doza bağlı lenfositopeni ağırlıklı lökopeni gözlemlendi.

Kontrol grubunda maternal yapılar normal histolojik görünümünde ve doğan yavrular normaldi.

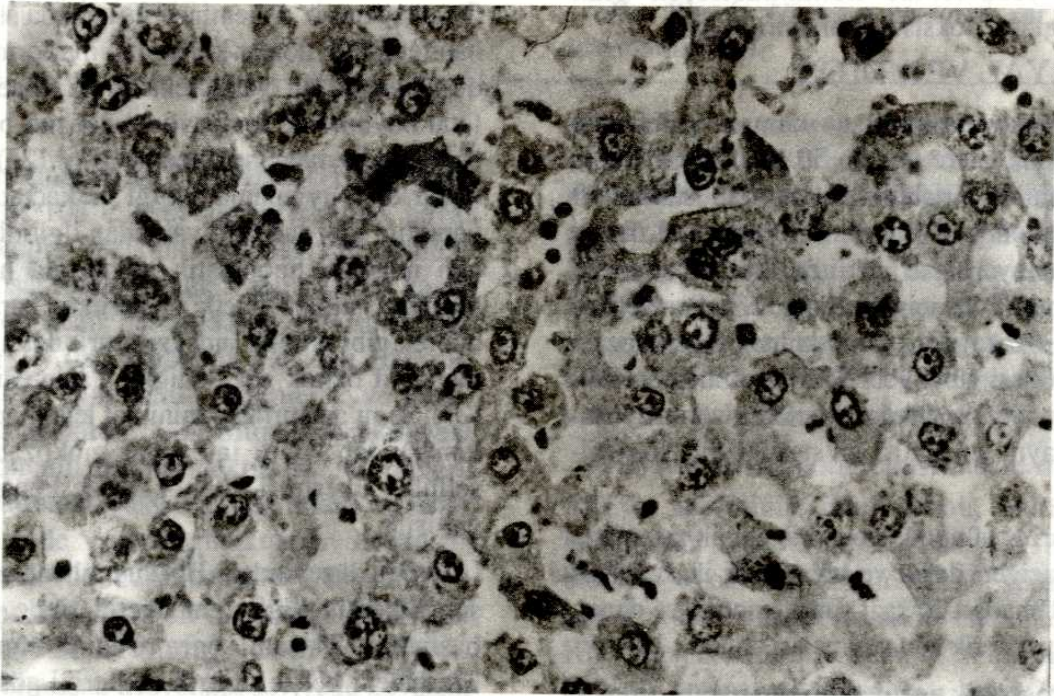
TARTIŞMA

Sitotoksik antineoplastik ajanlar gebeliğin her trimesterinde farklı yapılanmalara neden olmaktadır. Organogenesiz döneminde insanlarda sürekli uygulanan terapötik dozlar konjenital malformasyonlara ve düşüklere neden olabilmektedir. 1. trimesterden sonra fetal büyüme ve fonksiyonel gelişim bozuklukları - özellikle beyinde- şekillenmektedir (25). Bu yapılanmalar doz, uygulama sıklığı ve kaçınıcı trimesterde yapıldığı gibi şartlarla yakından ilgilidir (26). Nitrogen mustard neoplastik dokularda hızla çoğalan hücrelere sitotoksik etki gösterirken karaciğer, dalak, böbrek gibi mitotik indeksi sınırlı dokularda bu etkinin zayıf olarak gözlemlendiğini Calabresi bildirmiştir (27). Aynı araştırmacı minimal lethal doz HN₂ uygulamasından sonra intestinal mukozada harabiyet-sellüler hipertrofi, piknoz ve deskuamasyon tesbit etmiştir.

LD₅₀ düzeyindeki HN₂ uygulamasından 6-8 saat sonra kemik iliği stem hücrelerinde inhibisyonun başladığı, 24 saat sonra x-ışınlarının kemik iliği üzerindeki benzer toksik etkilerini göstererek lökopeni, 6-8 gün içinde de granülositopeni ve lenfoid dokularda düzensizliğin şekillendiği bildirilmiştir (27,28). Fareler üzerinde yapılan bir araştırmada alkilleyici ajanların doz-cevap ilişkisi araştırılmış ve bunun da embriyonik hücrelerin alkilasyonu ile direkt bağlantılı olduğu tesbit edilmiştir (29-31).



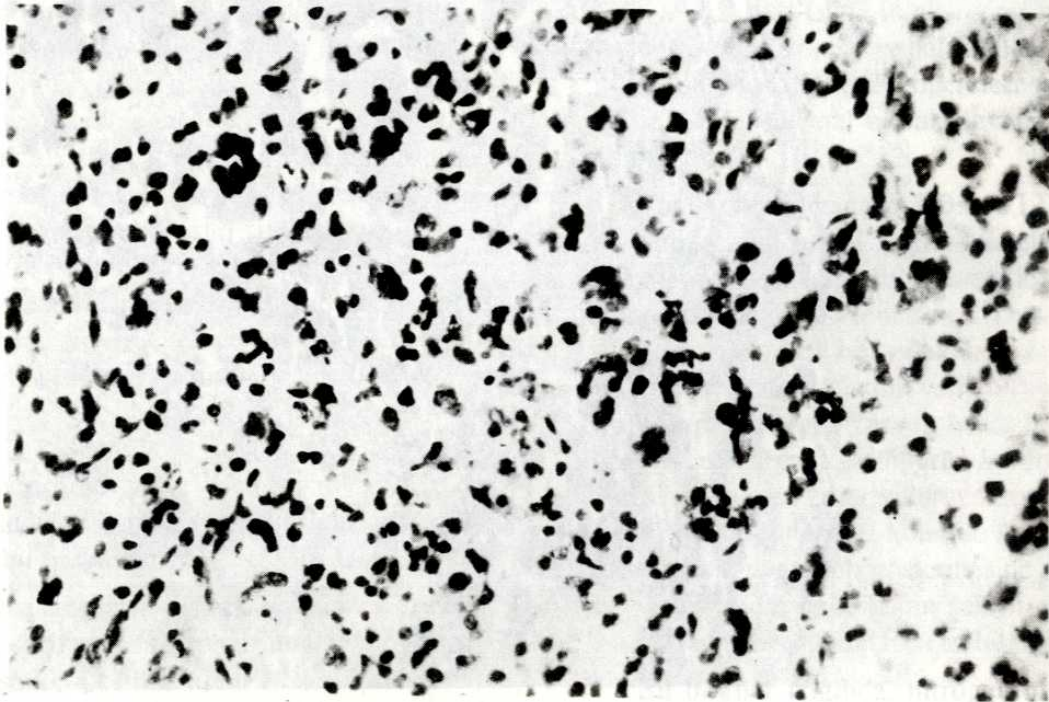
Resim 1. LD₅₀ dozu uygulanan karaciğerde aktive Kupffer hücreleri ve sinüzoidlerde kanın şekilli elemanları görülmekte, H&E; FMB x66



Resim 2. LD₁₀₀ dozu verilen karaciğerde aktive Kupffer hücreleri, sitoplazmik parçalanmalar ve sinüzoidlerde kanın şekilli elemanları gözlenmekte, H&E; FMBx66



Resim 3. Beyaz pulpa organizasyonunun bozulduğu dalaktan panoramik görünüm,
HxE; FMBx13



Resim 4. Dalak parankimi içerisinde hemosiderin görülme, HxE; FMBx120



Resim 7. LD₁₀₀ dozu verilen deney grubunda rezorbe fetusun hücresel kitlesi,
Hx E; FBMx12

Antineoplastik alkilleyici ilaç grubundan trimethyl phosphite'nin gebe sıçanlara 16,49 ve 164 mg/kg uygulamasında ilk iki dozun teratolojik, son dozun aşırı embriyotoksik etki göstererek fetusların rezorbe olduğu tesbit edilmiştir (28). Hipertermi oluşturularak alkilleyici ajanların sitotoksik etkilerinin artırılarak nonmalignant dokulara olan istenmeyen etkilerinin sınırlandırılabilceği, benzer şekilde kafein ve teofilinin etken ile kombinasyonlarının sinerjik karakterde olduğu, hipoksik ortamlarda etkenin biyoaktivasyonunun artırılabilceği, bizmut tuzlarıyla birlikte yapılan uygulamalarda kalp ve kemik iliği toksisitesinin azaldığı bildirilmiştir (32-36). İnvitro karaciğer hücre kültürlerinde yapılan toksite deneylerinde hücre membranında yırtıklar, geniş intrasellüler boşluk ve hücre konturunun bozukluğu tesbit edilmiştir (37).

Alkilleyici ajanların böbrek tubulleri ve nefronlarına olan etkilerini incelemek amacıyla Lash ve ark. (38) distal, proksimal tubul ve nefron ünitelerini taze olarak izole ederek ajanla inkübasyona bırakmışlar ve sonuçta distal tubülün proksimal tubülden daha sensitif, mitokondrial fonksiyonun inhibe olduğunu, hücre içi ATP ve oksijen tüketiminin

azaldığını bildirmişlerdir. Nitrogen mustardın farelerdeki tek dozluk LD₅₀ injeksiyonu-insan terapötik dozu- sonucu lökopeni ve dalak hücre sayısında azalma ile natural killer (NK) hücreleri ve makrofajların aktivitelerini normal olarak devam ettirdiği tesbit edilmiştir.

Yaptığımız çalışmada, LD₅₀ ve LD₁₀₀ seviyesinde maternal karaciğerde Kuppfer hücrelerinin hiperaktivasyonu ve doza bağımlı hepatositlerin radier diziliminde bozukluk gözlenirken, LD₁₀₀ dozunda karaciğerde dejeneratif bozukluklar tesbit ettik. Dalakta uygulanan dozlara karşılık verilen cevap ise beyaz ve kırmızı pulpa organizasyon bozukluğu idi. Böbrek genelinde histolojik strüktürün korunduğu gözlemlendi. Her iki dozda da embriyoların rezorbe olduğu tesbit edildi. Bu bulgularımız konu ile ilgili araştırmaların sonuçlarına uygunluk göstermesine ek olarak karaciğer sinüzoidlerinde kanın şekilli elemanlarını ve böbrekte kanama odaklarını tesbit ettik.

Bu bilgiler ışığında, nitrogen mustardın gebelerde kullanım zorunluluğu durumunda nonmalignant yapılara olan toksik etkileri gözönüne alınmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Smith GJ, Grisham JW. Cytotoxicity of monofunctional alkylating agents. Methyl methanesulfonate and methyl-N-nitro-nitrosoguanidine have different mechanisms of toxicity for 10T1/2 cells. *Mutat Res* 1983; 111(3): 405-17.
2. Sorsa M, Hemminki K, Vainio H. Occupational exposure to anticancer drug-potential and real hazards. *Mutat Res* 1985;154(2):135-49.
3. Sanderson BJ, Jhonson KJ, Henner WD. Dose-dependent cytotoxic and mutagenic effects of antineoplastic alkylating agents on human lymphoblastoid cells. *Environ Mol Mutagen* 1991; 17(4): 238-43.
4. Sykora I, Gandalovicova I. Trichiomethine hydrochloride and correlation of its mutagenic and toxic effects on male germ cells in mice. *Mutat Res* 1992; 266(2):291-7.
5. Peterson AR. DNA synthesis, mutagenesis, DNA damage and cytotoxicity in cultured mammalian cells treated with alkylating agents. *Cancer Res* 1980;40(3): 682-8.
6. Newbold RF, Warren W, Medcalf AS, Amos J. Mutagenicity of carcinogenic methylating agents is associated with a specific DNA modification. *Nature* 1980; 283(5747):596-9.
7. Kayaalp SO. *Tibbi farmakoloji*. Ankara: Ulucan Matbaası, 1984: 914.
8. Boorstein RJ, Pardee AB. Factors modifying 3-aminobenzamide cytotoxicity in normal and repair deficient human fibroblasts. *J Cell Physiol* 1984;120(3): 335-44.
9. Basu A, Lazo JS. A hypothesis regarding the protective role of metallothioneins against the toxicity of DNA interactive anticancer drugs. *Toxicol Lett* 1990;50(2-3):123-35.
10. Wells RL, Shibuya ML, Ben HE, Elkind MM. Cellular NAD⁺ and ATP levels in alkylation-induced cytotoxicity enhanced by an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthesis. *Cancer Biochem Biophys* 1990;11(2):97-105.
11. Pavilonis SV, Zhukene IaV, Didzhiapetrene IaK, Grazhialene Glu. Effect of lōfenal on rat embryogenesis. *Eksp Onkol* 1984; 6(3):66-9.
12. Tobey RA, Enger MD, Griffith JK, Hildebrand CE. Zinc-induced resistance to alkylating agent toxicity. *Cancer Res* 1982;42(8):2980-4.
13. Platzek T, Bochert G, Rahm U. Embryotoxicity induced by alkylating agents. Teratogenicity of asetoxy-methyl-methylnitrosamine:dose response relationship, application route dependency and phase specificity. *Arch Toxicol* 1983;52(1):45-69.
14. Black DJ, Livingston RB. Antineoplastic drugs in 1990. A review (Part I). *Drugs* 1990;39(4):489-501.
15. Sieber SM, Adamson RH. Toxicity of antineoplastic agents in man: Chromosomal aberrations, antifertility effects, congenital malformations and carcinogenic potential. *Adv Cancer Res* 1975; 22:57-155.
16. Rockwell S, Kennedy KA, Sertorelli AC, Mitomycin-C as a prototype bioreductive alkylating agent: in vitro studies of metabolism and cytotoxicity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982;8(3-4): 753-5.
17. Dusre L, Covey JM, Collins C, Sinha BK. DNA damage, cytotoxicity and free radical formation by mitomycin C in human cells. *Chem Biol Interact* 1989; 71(1): 63-78.
18. Moriwaki S, Nishigori C, Takebe H, Imamura S. 06-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in human malignant melanoma. *J Dermatol Sci* 1992; 4(1): 6-10.
19. Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11(2): 121-39.
20. Dusre L, Rajagopalan S, Eliot HM, Covey JM, Sinha BK. DNA interstrand cross-link and free radical formation in a human multidrug-resistant cell line from mitomycin C and its analogues. *Cancer Res* 1990; 50(3): 648-52.
21. Friedman J, Huberman E. Postreplication repair and the susceptibility of Chinese hamster cells to cytotoxic and mutagenic effects of alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci* 1980; 77(10): 6072-6.
22. Suter J, Brennand J, McMillan S, Fox M. Relative mutagenicity of antineoplastic drugs and other alkylating agents in V79 Chinese hamster cells, independence of cytotoxic and mutagenic responses. *Mutat Res* 1980;73(1):171-81.
23. Vu VT, Moy BC, Schein PS, Tew KD. Enhanced nitrosourea cytotoxicity in cell culture by sodium butyrate. *Oncology* 1985; 42(5): 317-21.
24. Bhattacharyya N, Bhattacharjee SB. Interaction of UV and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine: cytotoxicity and mutagenicity in V79 cells. *Mutat Res* 1985; 152(1):77-83.
25. Doll DC, Ringenberg Q, Yarbrow JW. Management of cancer during pregnancy. *Arc Intern Med* 1988; 148:2058-62.
26. Hirst DG, Brown JM. The therapeutic potential of miso-nidazole enhancement of alkylating agent cytotoxicity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982; 8(3-4): 639-42.
27. Calabresi P, Parks RE. Antiproliferative agents and drugs used for immunosuppression. In: Gilman AG, ed. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. U.S.A.: Pergament Press, 1990; 1203-60.
28. Reynolds CW, Foon KA. T gamma-lymphoproliferative disease and related disorders in humans and experimental animals: a review of the clinical, cellular, and functional characteristics. *Blood* 1984; 64(6): 1146-58.
29. Fujii T, Nakatsuka T. Potentiating effects of caffeine on teratogenicity of alkylating agents in mice. *Teratology* 1983; 28(1): 29-33.
30. Chaube S, Murphy ML. The teratogenic effects of the recent drugs active in cancer chemotherapy. *Adv Teratology* 1988; 3:181-287.

31. Platzek T, Bochert G, Rahm U, Neubert D. Embryotoxicity induced by alkylating agents. Some methodological aspects of DNA alkylation studies in murine embryos using ethylmethanesulfonate. *Z Naturforsch C* 1987; 42(5): 613-26.
32. Teicher BA, Sartorelli AC. Nitrobenzyl halides and carbamates as prototype bioreductive alkylating agents. *J Med Chem* 1980; 23(8): 955-60.
33. Kennedy KA, Rockwell S, Sartorelli AC. Preferential activation of mitomycin C to cytotoxic metabolites by hypoxic tumor cells. *Cancer Res* 1980; 40(7): 2356-60.
34. Byfield JE, Murnane J, Ward JF, Calabro-Jones P, Lynch M, Kulhanian F. Mice, men, mustard and methylated xanthenes: the potential role of caffeine and related drugs in the sensitization of human tumors to alkylating agents. *Br J Cancer* 1981; 43(5): 669-83.
35. Bull JM. An update on the anticancer effects of combination of chemotherapy and hyperthermia. *Cancer Res* 1984; 44(10 Suppl): 4853-4856.
36. Basu A, Lazo JS. A hypothesis regarding the protective role of metallothioneins against the toxicity of DNA interactive anticancer drugs. *Toxicol Lett* 1990; 50(2-3): 123-35.
37. Davies SM, Davies SL, Harris AL, Hickson ID. Isolation of two Chinese hamster ovary cell mutants hypersensitive to topoisomerase II inhibitors and cross-resistant to peroxides. *Cancer Res* 1989; 49(16): 4526-30.
38. Lash LH, Woods EB. Cytotoxicity of alkylating agents in isolated rat kidney proximal tubular and distal tubular cells. *Arch Biochem Biophys* 1991; 286(1): 46-56.
39. Riganti F, Sironi M, Kankova M, D'Incalci M, Spreafico F, Mantovani A, Vecchi A. The unique interaction with immunity of FCE 24517, an antitumor drug with a novel mode of action. *Int J Immunopharmacol* 1992; 14(2): 239-51.