

40619

**KALSIYUM KANAL BLOKÖRLERİ İLE VİNKRİSTİN
KOMBİNASYONUNUN ANTİTÜMORAL ETKİNLİĞİ**

Dr. Adem ELBAŞI

**Osmangazi Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Lisans üstü Öğretim yönetmeliği Uyarınca
Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalında**

**DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.**

Danışman: Doç. Dr. Kevser EROL

Nisan 1994 ESKİŞEHİR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Adem ELBAŞI'nın Doktora tezi olarak hazırladığı "Kalsiyum Kanal Blokörleri ile Vinkristin kombinasyonunun anti tümoral etkinliği" başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliđinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Doc.Dr. MiŐek CINGI

13/05/1994

Doc.Dr. Keuser EROL

Doc.Dr. R. Levent BÜYÜKUYAL

Osangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
gün ve sayılı kararıyla onaylanmıŐtır.

ASLI GIBIDIR

17 SUBAT 1995

Prof. Dr. Nurettin BAŐARAN
Enstitü Müdürü



ÖZET

Kalsiyum kanal blokörleri (7.5-15-30 mg/kg verapamil, 0.3-0.6-1 mg/kg nifedipin, 12.5-25-50 mg/kg diltiazem) ile 0.2 mg/kg vinkristinin birlikte kullanılmasıyla antitümöral etkinliğin ve normal dokular üzerindeki toksik etkinin nasıl değiştiğini araştırdık.

0.2 mg/kg vinkristin+15-30 mg/kg verapamil kombinasyonu ve 0.2 mg/kg vinkristin+ 1 mg/kg nifedipin uygulanan farelerde 0.2 mg/kg vinkristin uygulanan farelere göre yaşam süresi daha uzamıştır. Toksik etkilerin incelenmesinde, böbrek ve karaciğer, kemik iliği ve kan biyokimyasının değerlendirilmesinde, vinkristinin yalnız kullanılmasına göre vinkristin+KKB uygulanan farelerde bu etkilerin azaldığını gözledik.

Sonuç olarak kemoterapide kalsiyum kanal blokörleri kullanılmaya başlanmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ancak kalsiyum kanal blokörlerinin kemoteropötiklerin sitotoksik etkilerini artırıcı, toksitelerini azaltıcı ve direnç gelişimini önleyici katkılarının mekanizmasının anlaşılması için daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır.

SUMMARY

We researched how changed the toxic effect on normal tissues and anti-tumoral effect using vincristine (0.2 mg/kg) and CCBs (verapamil 7.5-15-30 mg/kg, nifedipin 0.3-0.6-1 mg/kg, diltiazem 12.5-25-50) together in the rats.

The rats who were treated with combinations of vincristine+verapamil (15-30 mg/kg) and vincristine+nifedipin (1mg/kg) had longer survival period than treated with vincristine alone.

Use of combination of vincristine and CCBs reduced toxic effects on the liver, kidney, bone marrow and biochemical values instead of use of vincristine alone

In conclusion; CCBs have begun to use on cancer chemotherapy and obtained good results. But more research necessary to understand the mechanisms of increase antitumoral effect and reduction of toxic effects and prevent of resistance vincristine, treating with combination of vincristine and CCBs.

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı başta hocam Doç. Dr. Kevser Erol'a, Doç. Dr.İpek Cingi'ye, Yard. Doç. Dr. Mahmut Özdemir'e, Uzm. Dr. Serdar Alpan'a, histolojik inceleme için Doç Dr.Cengiz Bayçu'ya ve DETAM'dan Doç. Dr. Tuncay Altuğ'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	1
SUMMARY	11
TEŞEKKÜR	111
İÇİNDEKİLER	1V
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2. 1. Vinkristin	6
2. 2. Kalsiyum Kanal Blokörleri	7
2. 2. 1. Verapamil	10
2. 2. 2. Nifedipin	10
2. 2. 3. Diltiazem	11
2. 3. KKB'leri ile Kemoterapötiklerin etkileşimi	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
3. 1. Gereç	14
3. 1. 1. Deney hayvanları	14
3. 1. 2. Kullanılan ilaç ve kimyasal maddeler	14
3. 1. 3. Kullanılan Aygıtlar	14
3. 2. Yöntem	15
3. 2. 1. Deney hayvanlarının bakımı	15
3. 2. 2. Deneyin uygulanması	15

4. BULGULAR	20
4. 1. Yaşam süresi bulguları	20
4. 2. Histolojik bulgular	29
4. 3. Biyokimyasal bulgular	47
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇLAR	60
7. KAYNAKLAR DİZİNİ	62



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil. 2. 1.Kalsiyum kanalları	8
Şekil. 4. 1. 1. Kontrol grubunda yaşam süresi	24
Şekil. 4. 1. 2. II. grup yaşam süresi	24
Şekil. 4. 1. 3. III. grup yaşam süresi	25
Şekil. 4. 1. 4. IV. grup yaşam süresi	25
Şekil. 4. 1. 5. V. grup yaşam süresi	26
Şekil. 4. 1. 6. VI. grup yaşam süresi	26
Şekil. 4. 1. 7. VII. grup yaşam süresi	27
Şekil. 4. 1. 8. VIII. grup yaşam süresi	27
Şekil. 4. 1. 9. IX. grup yaşam süresi	28
Şekil. 4. 1. 10. X. grup yaşam süresi	28
Şekil. 4. 1. 11. XI. grup yaşam süresi	29
Şekil. 4. 2. 1. II. grup böbrek kesiti	30
Şekil. 4. 2. 2. V. grup böbrek kesiti	31
Şekil. 4. 2. 3 VIII. grup böbrek kesiti	32
Şekil. 4. 2. 4. XI. grup böbrek kesiti	33
Şekil. 4. 2. 5. II. grup karaciğer kesiti	34
Şekil. 4. 2. 6. V. grup karaciğer kesiti	35
Şekil. 4. 2. 7. VIII. grup karaciğer kesiti	36
Şekil. 4. 2. 8. XI. grup karaciğer kesiti	37
Şekil. 4. 2. 9. II. grup kemik iliği	38
Şekil. 4. 2.10. V. grup kemik iliği	39
Şekil. 4. 2. 11. VIII. grup kemik iliği	40
Şekil. 4. 2.12. XI. grup kemik iliği	41
Şekil. 4. 2. 13. XII. grup kemik iliği	42
Şekil. 4. 2.14. XIII. grup kemik iliği	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3. 1. Tedavi grupları,dozu, uygulama ve zamanı	15
Çizelge 4. 1. Yaşam takibi, zaman ve ölen hayvan sayısı	20
Çizelge 4. 2. Grupların yaşam süresi	23
Çizelge 4. 3. Grupların plazma renin aktivitesi	46
Çizelge 4. 4. Grupların hematokrit değerleri	46
Çizelge 4. 5. Grupların lökosit sayısı	47
Çizelge 4. 6. Grupların ürik asit değerleri	47
Çizelge 4. 7. Grupların plazma kreatinin değeri	48
Çizelge 4. 8 Grupların kemik iliği hücre sayısı	48

1. GİRİŞ

Kanser kemoterapisinin etkinliğini kısıtlayan majör faktörler olarak ilaç rezistansı ve toksik etkiler gösterilmektedir (1). Bu nedenle ilaç rezistansının mekanizması ile ilgili çalışmalar yapılmakta ve toksik etkinin azaltılması için kemoterapiye yeni ilaçlar eklenmektedir. Sitoplazmik membranda bulunan Kalsiyum kanallarından kalsiyumun içe girişini bloke eden ve benzer mekanizmalara sahip bulunan kalsiyum kanal blokörleri genellikle kardiovasküler hastalıkların tedavisinde örneğin angina pectoris, aritmi, hipertansiyon gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (2). Ancak son yıllarda yapılan araştırmalarla kardiovasküler seviyeden başka migrenden renal transplantasyona kadar birçok alanda yararlı etkileri olduğu öne sürülmektedir. Kalsiyum kanal blokörlerinin beta blokörler ve glikozidler (1, 3, 4, 5, 6) gibi birçok ilaçla etkileşimi incelenmiştir ancak bu ilaçların kanser tedavisinde kullanılan ilaçlarla etkileşimini inceleyen çalışmalar oldukça yenidir. Kalsiyum kanal blokörlerinin antitümoral aktivitenin artırılmasında ve kemoterapötiklerin normal dokulara yaptıkları toksik etkinin azaltılmasındaki rolü 1981 yılında Tsuruo ve arkadaşlarınca yapılan ilk çalışmalarla belirginleşmişti.

Bu çalışmamızda biz de kalsiyum kanal blokörleri (verapamil, nifedipin, diltiazem) ile vinkristinin birlikte kullanılmasıyla antitümoral etkinliğin ve normal dokular üzerindeki toksik etkilerin nasıl değiştiğini araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

Sitoplazmik membranda bulunan kalsiyum kanallarından kalsiyumun hücre içine girişini bloke eden bulunan kalsiyum kanal blokörleri genellikle kardiovasküler hastalıkların (hipertansiyon, aritmi, angina pectoris v.b.) tedavisinde kullanılmaktadır (2). Kalsiyum kanal blokörlerinin beta blokörler ve kalp glikozidleri gibi bazı kardiyovasküler sistem ilaçları ile etkileşimleri incelenmiştir. Ayrıca son yıllarda hem ilaç etkileşimi hem de farmakolojik etki yönünden kardiovasküler sistem dışında da örneğin santral sinir sistemine olan etkileri üzerine çalışmalar yapılmıştır. Ancak kemoterapötik ilaçlarla kalsiyum kanal blokörleri arasındaki etkileşimi inceleyen çalışmalar oldukça yenidir (3, 4, 5, 6, 7). Biz bu araştırmamızda kalsiyum kanal blokörlerinin kanser tedavisinde sık kullanılan bir kemoterapötik ilaç olan vinkristin ile olan etkileşimini ve bu etkileşimin sonuçlarını inceledik.

Klasik kanser kemoterapisi incelendiğinde tedavinin etkinliğini sağlayan üç faktörün söz konusu olduğu görülmektedir.

1. Kemoterapötüğün terapötik indeksi,
2. Hastanın kişisel özellikleri,
3. Malignensi'nin tipi ve aşaması (8, 9).

Kanser tedavisinde temel hedef normal dokulara zarar vermeden total kanserli hücre ölümünün sağlanmasıdır. Bunun için bu faktörler arasındaki denge sağlandığında kemoterapide başarı yükselmektedir. Ancak bazı kanser türlerinde çok etkin olabilen bir ilaç başka tür kanserlerde aynı etkinliği gösteremezken bazen de ilaçtan çok hastanın kişisel özellikleri önemli olmaktadır. Yaş, cins, ırk, hastada bulunan diğer hastalıklar, hastanın immün durumu gibi bir çok faktör tedaviyi etkilemektedir. Bunların yanında tümörün çoğalma hızı, büyüklüğü ve aşaması da tedaviyi etkilemektedir. Bu dengenin sağlanması için kemoterapide çeşitli ilaç kombinasyonları kullanılmaktadır. Ancak kombinasyonun oluşturulmasında da bazı ilkeler sözkonusudur. Bunları sıralayacak olursak:

- 1.Kullanılan ilaçlar tümöre etkili olmalı.
- 2.Kombinasyondaki ilaçlar tümör hücrelerine farklı mekanizmalarla etki edebilmeli.
- 3.İlaçların yan etkileri olabildiğince birbirinden farklı olmalı.
- 4.Kullanılan her ilaç tek başına kullanılıyor gibi tam doz verilebilmeli.
- 5.Varısa kemoterapötik antidozu kombinasyona eklenmeli (8,9).

Kemoterapötik kombinasyonun etkinliğini kısıtlayan ilaca bağılı iki ana faktör söz konusudur.

- 1.İlaçların normal organ sistemleri üzerine olan toksik etkileri
- 2.İlaca karşı gelişen direnç.

Toksik etkiler: Bu ilaçların toksik etkileri organizmaya göre farklılık göstermektedir; ancak, genel olarak ortak yan etkileri sözkonusudur; bunlar:

1. Kemik iliğı depresyonu, anemi, lökopeni
2. Lenfotoksik etki ve immünosüpresyon; Antineoplastik ilaçların çoğı

lenfoid dokuların hızlı çoğalan jerminal hücrelerinin çoğalmasını inhibe ederler.

3. Hızlı çoğalan diğer normal hücrelerin inhibisyonu;

Örneğin, gastrointestinal kanal mukozasının hızlı çoğalan hücreleri v b

4. Hemen oluşan yan etkiler;bunlar emilim ve atılım sırasında oluşan irritan etkilerdir.

5. Teratojenik etki

6. Karsinojenik etki

7. Spermatojenezin ve oojenezin azalması v.b. şeklinde özetlenebilir.

Kemoterapötüğün öldürücü etkisine karşı oluşan direnç kanser tedavisinde ana problemlerden biridir. Direnç doğal ya da kazanılmış olabilmektedir. Doğal direnç gösteren tümörler kemoterapötiğe ya hiç cevap vermezler ya da çok az cevap verirler. Direnç söz konusu olmayan tümör türlerinin ise ilaçlara duyarlılığı büyük ölçüde değişkenlik gösterir. Belirli bir tümör türü belirli bir ilaca duyarlılık gösterir diğerlerine dirençlidir. Bu nedenle antineoplastik ilaçlarda etkinlik spektrumu söz konusudur. Tümör hücrelerinin direnci antineoplastik ilaçlarla tedavi sırasında gelişebilmektedir buna kazanılmış veya sekonder rezistans denir. Kazanılmış rezistans çoğunlukla önceden kanser tedavisi görenlerde ortaya çıkmakta, genetik ya da epigenetik kaynaklı olabilmektedir.

Direnç mekanizmasının açıklanmasında aşağıdaki mekanizmalar sorumlu tutulmaktadır.

1. Malign hücre tarafından ilacın uptake'inin azalması,
2. Hedef enzim yapımının artması veya ilaca olan afinitesinin azalması.
3. İlacın biyoaktivitesinde azalma,
4. İlacın inaktivasyonunda hızlanma, yaptığı tahribatın onarılmasında artış,
5. Tümör hücresinde DNA sentezi için farklı kopyalarının kullanılması,
(DNA onarımının hızlanması.)

6. Purin ve Pirimidin sentezinde yedek yolakların aktivasyonu,
7. İlaç moleküllerini tümör hücresinden dışarı pompalayan hücre membranındaki P glikoproteini'nin üretiminin artmasıdır. (Bu olay multipl ilaç rezistansından sorumludur.)(8, 9, 10).

Kemoterapötüğün öldürücü etkisine tümör hücrelerinin direnci tedavide ana problemlerden birini oluşturmaktadır. Sadece tümör hücrelerine duyarlı ilaçlar seçici olarak bazı hücreleri öldürürken kemoterapötiğe dirençli olan diğer tümör hücrelerinin aşırı artmasına yol açar.

İlaca karşı gelişen direnç mekanizması incelendiğinde ilacın tümör hücresi içindeki düzeyinin azalması, ilacın katabolizmasında hızlanma ve ilaç metabolizmasındaki diğer değişiklikler ile ilacın oluşturduğu tahribatın hücre tarafından onarılmasında artış gözlenmektedir. Tümör dokusunda sayısı artan hücreler sadece kullanılan ajanlara karşı direnç geliştirmekle kalmayıp aynı zamanda birçok farklı mekanizma ile etki eden diğer ilaçlara da direnç gösterme eğilimindedirler. Bu fenomen pleiotropic ilaç rezistansı ya da multipl ilaç rezistansı olarak adlandırılır.

Gen amplifikasyon'u yani hücredeki genlerin ekstra kopyalarının oluşumu da tümör hücrelerine karşı direnç geliştiren mekanizmalardan biridir (10). Bu iddia metotreksatla yapılan birçok in vivo ve in vitro çalışmada araştırılmıştır. Metotreksat, tetrahidrofolat redüktaz enzimini inhibe etmesine karşılık gen amplifikasyonu nedeniyle enzimin yapımı artar ve ilaca direnç gelişir. Gen amplifikasyonu multipl ilaç direncinde de geçerlidir. Multipl ilaç direnci tümör hücresi yüzeyinde bulunan membran glikoproteini olarak bilinen P glikoproteini'nin aşırı salgılanmasına da bağlı olduğu ileri sürülmektedir (10). P glikoprotein salıverilmesi multipl olarak kullanılan ilaçların hücre içindeki düzeylerinin azalması ile birlikte olmaktadır. P glikoproteini'ni kodlayan bir multipl ilaç geni izole edilmiş ve dizimi çözülmüştür. Bu gen transfer edildiğinde önceden ilaca duyarlı hücrelerde

ilaç direncinin ortaya çıktığı belirlenmiştir. MDR 1 (Multiple Drug Resistance) diye adlandırılan bu gen birçok dokuda ortaya konmuş olup tümör hücrelerinde artmış olduğu anlaşılmıştır. Ancak bazı tümör hücrelerinde de bu genin bulunmaması ilaç direncinde başka mekanizmaların da söz konusu olabileceğini göstermektedir. İlaça karşı hafif ya da orta düzeyde gelişen direnç yüksek dozda kemoterapötik kullanımı ile aşılabilmektedir. Bu bulgular kanserde erken teşhisin ve ilaç uygulanmasında programlama ve doz ayarlamasının önemini vurgulamaktadır. Gen amplifikasyonu nedeniyle ilaca karşı oluşan direnç yüksek doz uygulamasında daha az ortaya çıkmaktadır. Çünkü DNA' nın geçici inhibisyonu gen amplifikasyonu gelişmesine yol açabilmektedir (1, 3, 8, 9, 10).

2. 1. Vinkristin

Catharanthus roseus adlı bitkiden izole edilen bir alkaloiddir. Vinkristin hücre dönemine özgü bir ajandır. Hücrenin mitoz dönemine etkilidir (8). Bu etkinin oluşması için hücrede multipl yerleşim gösterir. Döneme etkili diğer antineoplastik ilaçlarla tedaviden önce, aynı kombine rejim içinde tümör hücrelerini aynı döneme getirmek için yani senkronize etmek için kullanılır. Akut lenfositik lösemi, myeloid lösemi, Hodgkin lenfoması, Hodgkin dışı lenfomalar, testiküler karsinoma, küçük hücreli anaplastik akciğer karsinoması, sarkom, nöroblastoma, embriyonal rabdosarkom, genel sarkomlar, wilms tümörü, meme kanseri, serviks kanseri, multipl myeloma gibi birçok kanser türünde etkilidir.

Etki mekanizması:

1. Mitozun metafazında mikrotübüllerden ibaret olan mitoz içciklerinin oluşmasını önler.
2. Mikrotübüllerin yapıtaşı olan tubulin moleküllerine bağlanarak onların

mikrotübülleri oluşturmak üzere bir araya gelmesini bozar (9).

3. DNA bağımlı RNA ya etki ederek RNA sentezini inhibe eder (8).

Farmakokinetiği:

Ağız yoluyla kullanıldığında absorpsiyonu düşüktür. Hızlı bifazik plazma klirensi vardır. Vinkristinin %80'i plazma proteinlerine bağlanır. Bir kısmı karaciğerde metabolize edilir. Safra ile atılır. Bir kısmı enterohepatik sirkülasyona geçer, % 70'i feçesle atılır, % 5-6'sı da idrarla atılır. Santral sinir sistemine geçiş çok azdır.

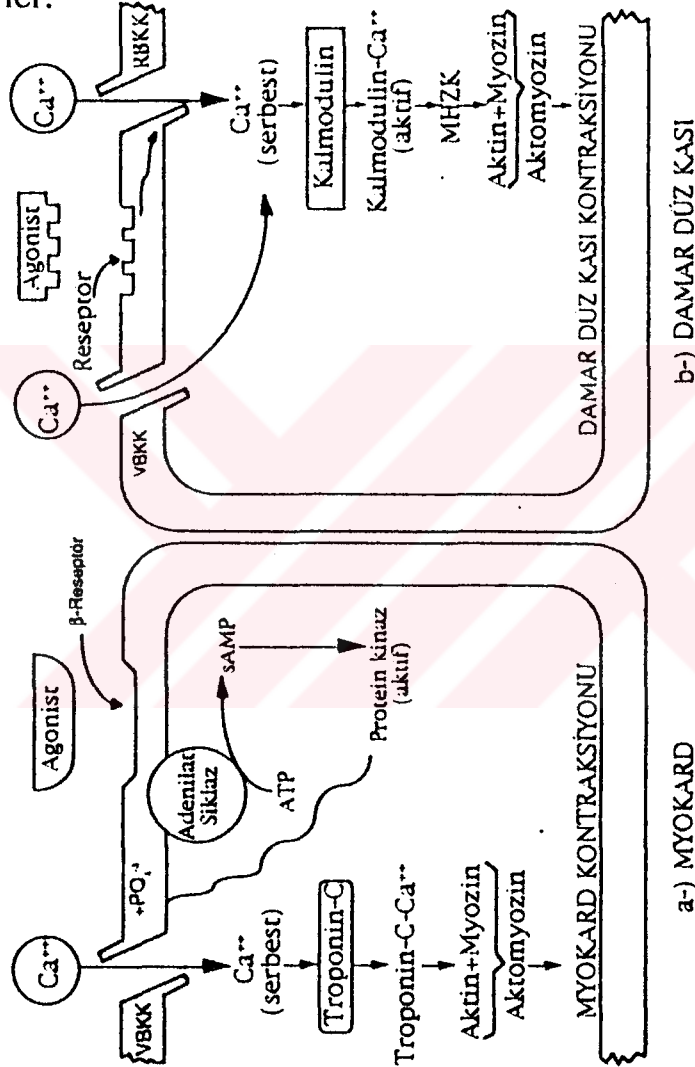
Yan etkileri:

1. Hematolojik yan etkiler: genellikle seyrek ve lökopeni şeklinde belirir. Bazen hafif anemi ve trombositopeni gözlenir.
 2. Nörolojik yan etkiler: reflekslerde azalma, parestezi, ataksi, foot drop (düşük ayak), kas güçsüzlüğü, abdominal ağrı, kabızlık, sinir boyunca ağrı, barsak tıkanmasıdır.
 3. Dermatolojik: Alopesi, % 20 lokal irritasyon,
 4. Ürik asitin birikmesine bağlı olarak gelişen nefropatidir.
- Vikrisintinin haftalık dozu 0,1 mg/kg dan başlayarak 0,2 mg/kg'a kadar çıkabilmektedir.

2. 2. Kalsiyum kanal blökorleri (KKB)

Normal bir hücrede hücre içi Ca^{++} konsantrasyonu çeşitli uyarılarla artar. Hücre zarında depolarizasyona neden olan elektriksel bir uyarı veya hücre dışında yüksek potasyum konsantrasyonu voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını etkileyerek hücre içine Ca^{++} girişine neden olur. Bazı hormonlar ve nörohormonlar hücre zarında bir reseptöre bağlanarak reseptör bağımlı kalsiyum kanalları olarak bilinen yapıları aktive ederek hücre içi Ca^{++}

düzeyini artırır. Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları hücre zarındaki elektiriksel değişimlere karşı gösterdikleri duyarlılığa ve açık kalma sürelerine göre L, N ve T tipi olmak üzere 3 gruba ayrılır (9, 11). Kalsiyum kanal blokörleri normal konsantrasyonlarda sadece L tipi Ca^{++} kanalını bloke eder. Yüksek konsantrasyonlarda ise reseptör bağımlı Ca^{++} kanalını bloke edebilirler.



Şekil 2. 1. Kalsiyum kanalları

a. Myokard hücresi sitoplazma membranındaki voltaj bağımlı kalsiyum kanalları ve beta reseptörler ile ilişkisi, b. Damir düz kası hücresi sitoplazma membranında voltaj bağımlı ve reseptöre bağımlı kalsiyum kanalları ile kontraksiyona yol açan olaylar zinciri.

Kalsiyum kanal blokörleri selektif ve non selektif olarak iki ana gruba ayrılırlar. Non selektif blokörler Ca^{++} kanallarından başka sodyum kanallarını da güçlü bir şekilde bloke ederler. Selektif blokörler birbirinden çok farklı kimyasal yapılara sahip 3 gruba ayrılır (9, 12, 13).

1. Fenilalkilaminler (Verapamil, Gallopamil)
2. Dihidropiridinler (Nikardipin, Nimodipin, Nifedipin, Nitrendipin)
3. Benzotiazepinler (Diltiazem)

Kalsiyum kanal blokörleri birçok (kalp, böbrek vb.) hücre tiplerinde hücre içine Ca^{++} girişini etkiler.

Günümüzde kalsiyum kanal blokörlerinin en önemli etkilerinden biri damar düz kas hücresi üzerine gösterdiği gevşetici etkidir. Hipertansif hastalara veya deney hayvanlarına kalsiyum kanal blokörleri verildiği zaman görülen en belirgin etki vazodilatasyon ve vasküler direncin azalmasıdır (11, 14, 15). Bu etki böbrek kan akımının ve glomerüler filtrasyon hızının artmasına yol açar. Diğer vazodilatörlerden farklı olarak kalsiyum kanal blokörleri su ve tuz tutulmasına sebep olmazlar. Ayrıca diürez ve natriürezini artırır. Hipertansiyonda ve böbrek yetmezliğinde bu ilaçların glomerüler filtrasyon hızındaki düşmeyi önledikleri bildirilmiştir (11, 14). Bundan başka renal iskemiye veya nefrotoksisiteye bağlı akut tübüler nekroz ve akut böbrek yetmezliği üzerine koruyucu etkileri hakkında umut verici sonuçlar bildirilmiştir (14, 15, 16).

Renin-angiotensin sistemi: Renin-angiotensin sistemi dolaşımda bulunan angiotensin II üzerinden sıvı-elektrolit dengesinde, kan basıncı ve hacminin ayarlanmasında önemli rol oynamaktadır. Angiotensin II nin primer etkileri adrenal korteksten aldosteron sentez ve salınımını stimüle ederek direkt arteriyel vazokonstriktör etkisi ile kan basıncını yükseltmektedir (18, 19).

2. 2. 1. Verapamil

Bir fenilalkilamin türevidir. Kalsiyum kanal blokörleri arasında üzerinde en fazla çalışılmış ve denenmiş olanıdır. İlk olarak koroner dilatatörü ve antihipertansif olarak çıkarılmış, daha sonra kalpte A-V düğüm üzerine depresyon yapıcı etkisi fark edilmiş ve antiaritmik olarak kullanılmaya başlanmıştır. Periferik vazodilatatör etkisi nifedipinden azdır. Kalp üzerine in vivo etkileri nikardipinden daha güçlüdür. Negatif inotrop etkisiyle kardiyomyopatiye kullanılır. Verapamil mide barsak kanalından çabuk ve tam olarak emilir. Ancak ağızdan verildiğinde biyoyararlanım oldukça azdır. Çünkü karaciğerden ilk geçiş sırasında önemli düzeyde inaktive edilir. İlaç verildikten sonra yarılanma ömrü 3-6 saattir. Bu süre kronik tedavide 9 saatin üzerine çıkar. Verapamil plazma proteinlerine % 90 oranında bağlanır. Ağızdan günde 3 veya 4 kez 80-120 mg dozunda verilir.

Yan etkiler:

2. ve 3. derece atrioventriküler blok, konstipasyon, ciltte vazodilatasyon, yüzde kızarma, baş ağrısı, baş dönmesi, ayaklarda ödem ve ortostatik hipotansiyon yapar. Mide bozukluğuna neden olur (11, 17).

2. 2. 2. Nifedipin

Dihidropiridin türevi bir kalsiyum kanal blokördür. Kalp üzerine olan etkileri verapamilden daha azdır; ancak damarlar üzerine gevşetici etkisi daha güçlüdür. Mide barsak kanalından kolay ve çabuk emilir. Karaciğerden ilk geçişte verapamilden daha az metabolize edilir. Sistemik biyoyararlanım %65 kadardır. Eliminasyon yarılanma ömrü 5 saattir. Günde 3 defa 10 mg dozunda kullanılır.

Yan etkileri; yüzde ve bacaklarda cilt damarlarının vazodilatasyonuna bağlı olarak yanma duyumsaması ve yüz kızarması, baş ağrısı, palpasyon, hafif

hiperkalemi, ayaklarda ödem, ağız kuruluğu, bacakta kramp, postürel hipotansiyon ve nadiren ürtiker yapabilir (11-17).

2. 2. 3. Diltiazem

Benzotiazepin türevi bir kalsiyum kanal blokörüdür. Kardiak etkisi zayıftır. Uzun kullanımda kardioprotektif etkisi vardır. Günde 3 kez 60 mg kadar kullanılabilir. Mide barsak kanalından çabuk ve tam olarak emilir. Ancak ağızdan verildiğinde biyoyararlanım oldukça azdır. Çünkü karaciğerden ilk geçiş sırasında önemli düzeyde inaktive edilir. İlaç verildikten sonra yarılanma ömrü 3-6 saattir. Bu süre kronik tedavide 9 saatin üzerine çıkar. Yan etkileri ; sinus bradikardisi, flushing, konstipasyon, 1. derece atrio-ventriküler blok, karaciğer transaminazlarının plazma düzeylerinde yükselme, baş ağrısı, baş dönmesi v.b.(11-17).

2.2.3.Kalsiyum kanal blokörleri ile kemoterapötiklerin etkileşimi

Kemoterapide direncin ve toksisitenin önlenmesi için çeşitli kombinasyonlar denenmektedir (20). Kalsiyum kanal blokörlerinin bu nedenle kemoterapötik kombinasyonuna dahil edilmesi Tsuruo ve arkadaşlarının ilaç rezistansı ile kalsiyum metabolizması arasındaki olası ilişkiyi düşünerek yaptıkları araştırmalarla ortaya çıkmıştır (21, 22). Tsuruo ve arkadaşları, vinkristine dirençli olan ve P388 olarak adlandırılan insan lösemi hücreleriyle, insan K562 myelojenik lösemi hücrelerinin in vitro çalışmalarında kalsiyum kanal blokörleri ile vinkristin arasındaki ilişkiyi incelemiş ve kalsiyum kanal blokörlerinin eklenmesiyle vinkristinin sitotoksitesinin artmış olduğunu tespit etmişlerdir (23). Bunun intrasellüler düzeydeki vinkristin artışı ile ilişkili olduğu görülmüştür. İlacın hücre içindeki düzeyinin azalmasının vinkristinin kemoterapötik etkinliğini kısıtladığı gösterilmiştir (24, 25). Sonraki çalışmalarda diğer kalsiyum kanal blokörleri P388 hücrelerinde

vinkristin ile birlikte kullanılınca vinkristinin sitotoksik etkisinin doza bağımlı olarak arttığı belirlenmiştir (23, 24, 26). Ayrıca kalsiyum kanal blokörleri ile in vitro nonlösemi tümör hücrelerinde de örneğin lewis akciğer karsinoması, B16 melonoma, kolon adenokarsinomu ve glioma tümör hücrelerinde de benzer sonuçlar göstermiştir (23, 24, 27, 28, 29). Yine bütün bu çalışmalarda yaşam süresi izlemleri de kalsiyum kanal blokörlerinin vinkristin ile birlikte uygulandığında farelerin yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir (29, 30).

Vinkristin ile kalsiyum kanal blokörlerinin birlikte kullanılmasıyla belli bir oranda artan antitümoral etkinin altında yatan mekanizmalar araştırıldığında; Vinkristin tek başına kullanıldığında ve kalsiyum kanal blokörleri ile birlikte kullanıldığında P388 lösemi hücresinde vinkristinin zaman bağımlı olarak farklı miktarlarda biriktiği gözlenmiştir (31). Tsuruo ve arkadaşları bu kombinasyonun vinkristine az duyarlı olan tümör hücrelerinde de etkili olup vinkristinin tümör hücresinde birikimini arttırdığını gözlemişlerdir (27, 28). Teorik olarak vinkristin miktarının hücre içinde artışında iki mekanizma söz konusudur.

1. Vinkristinin intrasellüler seviyedeki artışı bu ilacın tümör hücre membranından geçişindeki bir değişikliğe bağlı olabilir. Bu dışa çıkışı azalması ve içe girişin artması ile açıklanabilmektedir.
2. İntrasellüler elementlere vinkristin bağlanmasındaki artıştır. Bu bağlanma analiz edildiğinde vinkristinin mikrotübüllerdeki tubuline affinitesinde bir artış gözlenmemiştir (27, 28, 31).

Kalsiyum kanal blokörlerinin vinka alkaloidlerinin dışa çıkışını azaltmasındaki alt mekanizmalar iyi bilinmemektedir. Multipl ilaç direnci incelendiğinde bazı lösemi tiplerinde örneğin P388 ve K562 gibi tümör hücrelerinde kalsiyum içeriğinin artmış olduğu görüldü (27, 28, 29). Böylece

vinkrisintin hedefi olan mikrotübüllerinin fonksiyonunun kalsiyum ve kalmodulin ile ilgili olduğu belirlendi (29-32). Vinkrisintinin sitotoksik etkisinin artırılması sadece kalsiyum kanal blokörleri ile değil aynı zamanda kalmodulin antagonistleriyle de oluşmaktadır (29-32). Ancak kalsiyum ve kalsiyum iyonoforlarının etkilerini gösterecek destekleyici ya da desteklemeyen sağlam ve yeni sonuçlara ihtiyaç vardır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. Gereç

3. 1. 1. Deney Hayvanları

Deney için İstanbul Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden sağlanan yaklaşık sekiz haftalık her iki cinsten Balb/c fareler kullanıldı.

3. 1. 2. Kullanılan ilaçlar ve kimyasal maddeler

Verapamil amp. (İsoptin, Knoll İlaç San.)

Diltiazem amp. (Diltizem, Mustafa Nevzat İlaç San.)

Nifedipin kap. (Nidilat, Mustafa Nevzat İlaç San.)

Vinkristin amp. (Onkovin Mustafa Nevzat İlaç San.)

Vinblastin amp. (Velbe Lilly Comp.)

Serum fizyolojik

Glasiyal asetik asit

%'luk Formalin

EDTA

3. 1. 3. AYGITLAR

a) Mikroskop (Karl Zeis)

- b) Etüv (Nüve EN 400)
- c) Santrifüj (nüve)
- d) Santfirüj tüpü
- e) Lökosit sulandırma pipeti
- f) Thoma lamı
- g) Hayvan operasyon takımı (bistüri, makas, pens v. b)
- h) Hassas terazi
- i) Lam, lamal
- i) Radio immüno assay

3. 2. Yöntem

3. 2. 1. Deney hayvanlarının bakımı

Deney süresince fareler fare yetiştirme kafeslerine kondu , standart yem (İstanbul Yem sanayi/İST) ve su ile beslendi. İstanbul Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edilen Ehrilch Ascites Carsinoma (EAC) adlı tümörü deneyden onbeş gün önce bir erkek fareye intraperitoneal olarak implante edilerek pasaj yapıldı. Pasajdan yaklaşık 0.2 ml asit sıvısı içinde 5×10^6 hücre içeren ehrilch Ascites Carsinoma subkutan olarak farelerin karın sol lateral bölgesine enjekte edildi.

3. 2. 1. Deneyin uygulanması

Fareler işaretlenerek gruplandırıldı; I. grup kontrol, II. grup 0.2 mg/kg/hafta Vinkristin uygulananlar, III. grup 0.2 mg/kg/hafta vinkristin + 7.5 mg/kg/gün Verapamil uygulananlar, IV grup 0.2 mg/kg/hafta Vinkristin + 15 mg/kg/gün Verapamil uygulananlar, V. grup 0.2 mg/kg/hafta Vinkristin + 30 mg/kg/gün Verapamil uygulananlar, VI. grup 0.2 mg/kg/hafta Vinkristin + 0.3 mg/kg/gün Nifedipin uygulananlar, VII. grup 0.2 mg/kg/hafta Vinkristin + 0.6 mg/kg/gün Nifedipin uygulananlar, VIII. grup 0.2

mg/kg/hafta Vinkristin + 1 mg/kg/gün Nifedipin uygulanlar, IX. grup 0.2 mg/kg/hafta Vinkristin + 12.5 mg/kg/gün Diltiazem uygulananlar, X. grup 0.2 mg/kg/hafta Vinkristin + 25 mg/kg/gün Diltiazem uygulananlar, XI. grup 0.2 mg/kg/hafta Vinkristin + 50 mg/kg/gün Diltiazem tedavisi uygulananlardan oluşuyordu.

Çizelge 3. 1. Tedavi grupları, doz, veriliş yolu ve zaman.

Grup	Denek Sayısı	Uygulanan ilaç ve dozu	Veriliş Yolu	Veriliş süresi
I	25	Serum fizyolojik (0.2 ml/kg/gün)	i.P	15 gün
II	25	Vinkristin (0.2 mg/kg/hafta)	i.P.	15 gün
III	10	Vinkristin (0.2 mg/kg)+Verapamil (7.5 mg/kg)	i.P.	15 gün
IV	10	Vinkristin (0.2 mg/kg)+Verapamil (15 mg/kg)	i.P.	15 gün
V	25	Vinkristin (0.2 mg/kg)+Verapamil (30 mg/kg)	i.P.	15 gün
VI	10	Vinkristin (0.2 mg/kg)+Nifedipin (0.3 mg/kg)	i.P.	15 gün
VII	10	Vinkristin (0.2 mg/kg)+Nifedipin (0.6 mg/kg)	i.P.	15 gün
VIII	25	Vinkristin (0.2 mg/kg)+Nifedipin (1 mg/kg)	i.P.	15 gün
IX	25	Vinkristin (0.2 mg/kg)+Diltiazem (12.5 mg/kg)	i.P.	15 gün
X	10	Vinkristin (0.2 mg/kg)+Diltiazem (25 mg/kg)	i.P.	15 gün
XI	10	Vinkristin (0.2 mg/kg)+Diltiazem (50 mg/kg)	i.P.	15 gün
XII	10	Vinblastin (0.2mg/kg)	i.P.	15 gün
XIII	10	Vinblastin (0.2mg/kg) +Verapamil (30 mg/kg)	i P.	15 gün

Deney, yaşam süresinin izlenmesi ve I, II, V, VIII ve XI. grupların her birinden 10 fare üzerinde yapılan toksikolojik araştırmadan oluşuyordu. Toksikolojik incelemeye dahil edilen gruplar, verilen en yüksek dozlar nedeniyle tercih edildi. Toksikolojik araştırma hematokrit değerleri, lökosit sayıları, serum kreatinin, ürik asit değerleri, plazma renin aktivitesi, kemik iliği hücre sayısı ve histopatolojik olarak karaciğer, böbrek ve kemik iliği incelemelerini içeriyordu. Kemik iliğinin toksikolojik incelemesine XII. (

0.2 mg/kg Vinblastin) ve XIII. (0.2 mg/kg Vinblastin+30 mg/kg verapamil) gruplar eklendi. Deneyin ilk gününden başlayarak fareler ölene kadar her gün tartıldı ve ağırlıkları kaydedildi.

Deneyin 15. gününde Vinkristin üçüncü kez uygulandıktan bir gün sonra ilaç uygulaması kesildi. Aynı gün toksikolojik inceleme için belirlenen fareler ayrıldı. Kalan gruplar yaşam süresi izlenmesine alındı, her gün ölen fareler kaydedildi. Bütün fareler öldükten sonra deneye son verildi. Deney sonunda yaşam süresi izlenmesi istatistiksel olarak Student's t testi ile değerlendirildi.

Toksikolojik inceleme için fareler eterle anestezi edildi. Eterle anestezi edilen farelerin kalpten alınan kan örneklerinde grupların hematokrit değerleri, lökosit sayıları ürik asit ve serum kreatinin değerleri incelendi. Hematokrit değerinin saptanması için asetik asitli kılcal hematokrit tüplere alınan kan örnekleri tüplerin bir ucu ısıtılarak santrifüj edildi, lökositler %2.5'lük asetik asit çözeltisinde klasik yöntemlerle Thoma lamalarında sayıldı. Renin için içine 0.2 cc EDTA çekilmiş enjektörlere intrakardiyak yolla alınan kan 3000 devir /dak'da Nüve NF-G15 marka santrifüj aleti ile 10 dakika çevrilerek plazmaları ayrıldı. Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Hormon ve İlaç Analiz Laboratuvarı'nda radioimmünoassay (RIA) metodu ile plazma renin aktive (PRA) düzeyleri ölçüldü. Plazma renin aktivite (PRA) ölçümünde "Sorin Biomedica" marka RIA kiti kullanıldı. PRA ölçümü renin-angiotensin sisteminin değişik patolojik durumlarda değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. PRA ölçümü AgII'in RIA metodu ile ölçümüne dayanmaktadır. Bunun için 500 ml plazma örneği 10 ml serilmetil sidfosilflorid (PMSF) ve 50 ml "generation buffer" bir tüpe koyularak karıştırıldı. Tüpler sürekli olarak buz banyosunda tutuldu. Bu karışımdan 200 µl alınarak bir başka tüpe aktarıldı ve 37 °C de 90 dakika inkübe edilerek plazma renin düzeyine bağlı olarak değişen miktarda angiotensin I oluşumu sağlandı. Buz banyosunda tutulan ve

37 °C de 90 dakika süre ile inkübe edilen tüplerdeki angiotensin I miktarları RIA metodu ile ölçüldü. Bu amaçla 50 µl ölçümü yapılacak olan örnek ve 500 µl I¹²⁵ işaretli angiotensin I içeren "tracer" angiotensin I'e karşı oluşturulmuş spesifik antikör ile kaplı tüplere koyuldu. Oda ısısında 24 saat bekletildikten sonra sıvı faz aspire edilerek tüp duvarına bağlanan radyoaktivite "Sesa mikro assay 85" marka gamma counter ile 1 dakika süre ile sayıldı. İçine ne kadar angiotensin I olduğu bilinen standartlar ve "tracer" (50 µl standart + 500 µl tracer) antikör kaplı tüplerde aynı şartlarda 24 saat bekletilerek sonuçta tüp duvarına bağlanan radyoaktivite sayıldı. Aşağıdaki bağıntıdan yararlanılarak bulunan % B/Bo değerleri ile standart eğri çizildi .

$$\%B/B_0 = \frac{\text{standart veya numune sayımı}}{\text{sıfır standartı sayımı}} \times 10$$

Bu eğriden faydalanılarak örneklerin içerdikleri angiotensin I düzeyleri saptandı.

$$(\text{ng } 37^\circ\text{C} = \text{ng } 4^\circ\text{C})$$

$$\text{PRA} = \frac{\text{standart veya numune sayımı}}{\text{inkübasyon süresi (1.5 saat)}} \times 1.12$$

Yukarıdaki bağıntıdan faydalanarak her örnek için PRA değerleri hesaplandı.

Kan örneklerinin alınmasını takiben fareler yüksek doz eter anestezisi ile öldürüldü. Kemik iliği incelemesi için bir femuru kaslarından tamamen temizlenip her iki uçtan kesilerek çıkarılmış ve enjektördeki 0.2 ml serum fizyolojik femurun bir ucundan basınçla fışkırtılarak kemik iliği çıkartılmış ve iliğin tamamen tüp içine çıkması sağlandı. 5 ml serum fizyolojik ve kemik iliği içeren tüpteki hücrelerin homojen dağılımı için aynı enjektörle

sıvı birkaç kez çekilip boşaltıldı. Tüplerde köpürme meydana gelmeden alınan örnekler glacial asetik asitle sulandırılarak Thoma lamında sayıldı. Otopsileri yapılan farelerden histopatolojik inceleme amacıyla kemik iliği için diğer femur, karaciğer ve böbrek çıkarılıp %10'luk formalinde 24 saat tespit edildi. Kullanılan nötral formalin ترکیبی:

Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat	4 g
Disodyum hidrojen fosfat	8.5 g
Formaldehid (% 40)	100 cc

Distile su

Rutin histolojik doku takibinden sonra parafin blokları hazırlanan dokulardan "Reichert-Jung" marka mikrotom ile 6 mikronluk kemik iliği, karaciğer ve böbrek kesitleri lam üzerine yerleştirilerek Hemotoksilin-eozin boyası ile boyanmış ve ışık mikroskopunda histopatolojik incelendikten sonra fotoğrafları çekilmiştir.

Elde edilen veriler Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik bölümünde Student's t testi ve tek yönlü varyans analizi uygulanarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4. 1. Yaşam süresi bulguları

Yaşam süresi takibi çizelge 4. 1. de gösterilmiştir.

Çizelge 4. 1.Zaman, gruplar ve ölen hayvan sayısı:

grup	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	
gün												
18	2											
19												
20	3											
21								1		2		
22				1								
23	1										1	
24	2											
25							1					
26			1		1						3	
27	3											
28			2			1		1	1			
29		1			1				1			
30												
31						1				2	1	
32		3	1	2			1			1		
33												
34		2						1				
35	2							3	2			
36									1		2	
37						2						
38					2							
39												
40		3		1	2		1		1		2	
41	2					1			1	2		
42												
43				1		1	2					
44			1									
45		1						2				

grup gün	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
46											
47		2						2			
48			2	1		1	1		1		
49											
50			1							1	
51											
52					2					1	2
53			1	2		2					
54		1					1	2	1		
55											
56											
57					3						1
58							2				
59			1			1					
60		2									
61				1	1						
62									1		
63											
64								3		1	2
65											
66											
67											
68					3						
69											
70											1
71				1							

I. Grup: (Kontrol) ortalama yaşam süresi yaklaşık 26.66 gündü. Bu grupta en uzun yaşam süresi 41 gün en kısa ise 18 gün olarak belirlendi.

II. Grup: 0.2 mg/kg/hafta Vinkristin ile tedavi edilen farelerde ortalama yaşam süresi yaklaşık 41.73 gündü, en uzun yaşam süresi 60 gün, en kısa

yaşam süresi 29 gün olarak belirlendi.

III. Grup: 0.2 mg/kg Vinkristin+7.5 mg/kg verapamil ile tedavi edilen farelerde ortalama yaşam süresi 41.60 gündü. En uzun yaşam süresi 59 gün, en kısa yaşam süresi 26 gün olarak belirlendi.

IV. Grup: 0.2 mg/kg Vinkristin+15 mg/kg verapamil ile tedavi edilen farelerde ortalama yaşam süresi 45.50 ($p<0,01$) gündü. En uzun yaşam süresi 71 gün, en kısa yaşam süresi 22 gün olarak belirlendi.

V. Grup: 0.2 mg/kg Vinkristin+30 mg/kg verapamil ile tedavi edilen farelerde ortalama yaşam süresi 50.07 ($p<0,01$)gündü. En uzun yaşam süresi 68 gün, en kısa yaşam süresi 26 gün olarak belirlendi.

VI. Grup: 0.2 mg/kg Vinkristin+0.3 mg/kg Nifedipin ile tedavi edilen farelerde ortalama yaşam süresi 43.00 gündü. En uzun yaşam süresi 59 gün, en kısa yaşam süresi 28 gün olarak belirlendi.

VII. Grup: 0.2 mg/kg Vinkristin+0.6 mg/kg Nifedipin ile tedavi edilen farelerde ortalama yaşam süresi 42,30 gündü. En uzun yaşam süresi 58 gün, en kısa yaşam süresi 25 gün olarak belirlendi.

VIII. Grup: 0.2 mg/kg Vinkristin+1 mg/kg Nifedipin ile tedavi edilen farelerde ortalama yaşam süresi 44.60 ($p<0,01$)gündü. En uzun yaşam süresi 62 gün, en kısa yaşam süresi 21 gün olarak belirlendi.

IX. Grup: 0.2 mg/kg Vinkristin+12.5 mg/kg Diltiazem ile tedavi edilen farelerde ortalama yaşam süresi 40.32 gündü. En uzun yaşam süresi 62 gün, en kısa 28 gün olarak belirlendi.

X. Grup: 0.2 mg/kg Vinkristin+25 mg/kg Diltiazem ile tedavi edilen farelerde ortalama yaşam süresi 38.40 gündü. En uzun yaşam süresi 64 gün, en kısa 21 gün olarak belirlendi.

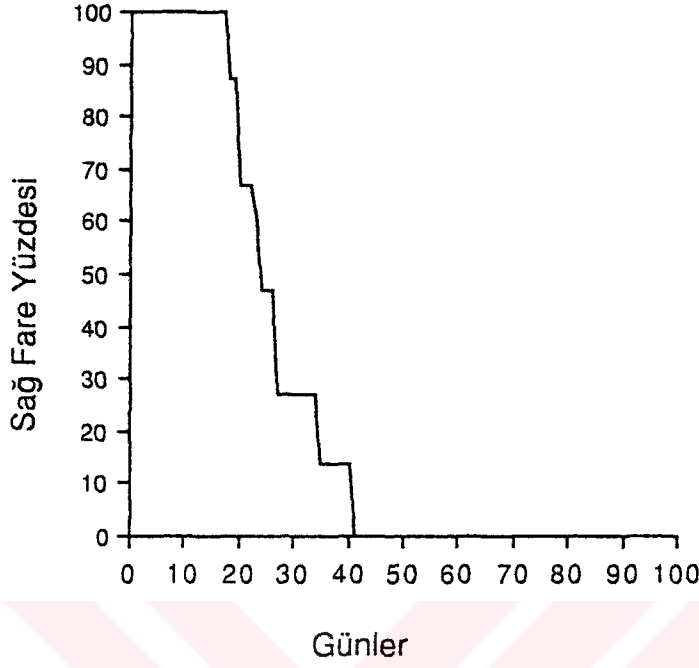
XI. Grup: 0.2 mg/kg Vinkristin+50 mg/kg Diltiazem ile tedavi edilen farelerde ortalama yaşam süresi 42.33 gündü. En uzun yaşam süresi 70 gün, en kısa 23 gün olarak belirlendi. Gruplar student's t testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. IV., V. ve VIII gruplarda diğer gruplara göre anlamlı farklılık vardı: $p<0.01$ bu gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında aralarında

anlamli bir fark bulunamadi.

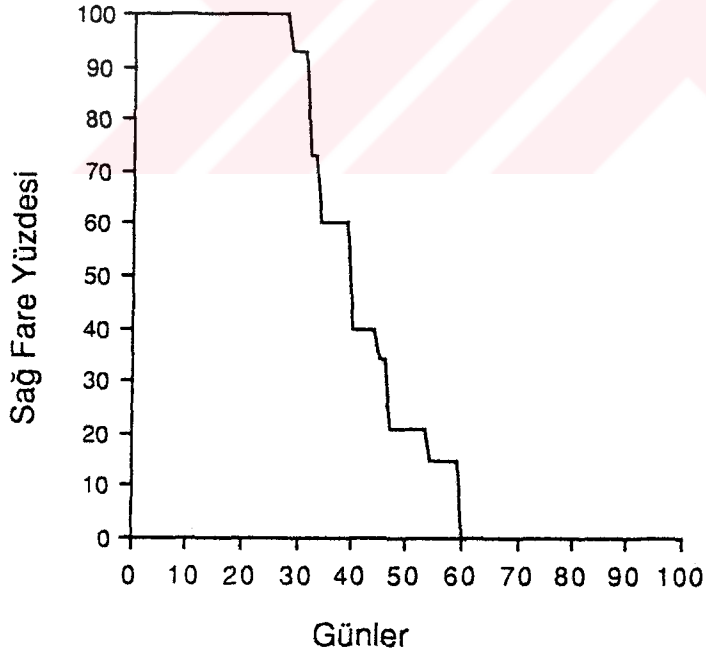
Çizelge 4. 2: Gruplar, ortalama yaşam süresi ve standart hata.

Gruplar	Denek sayısı	Ortalama (gün)	St. Hata	Karşılaştırma
I	25	26.66	2.33	A
II	25	41.73	2.73	A
III	10	41.60	3.30	A
IV*	10	45.50	3.94	B
V*	25	50.07	3.60	B
VI	10	43.00	3.21	A
VII	10	42.30	3.61	A
VIII*	25	44.60	3.40	B
IX	10	40.30	3.45	A
X	10	38.40	4.40	A
XI	25	42.33	4.03	A

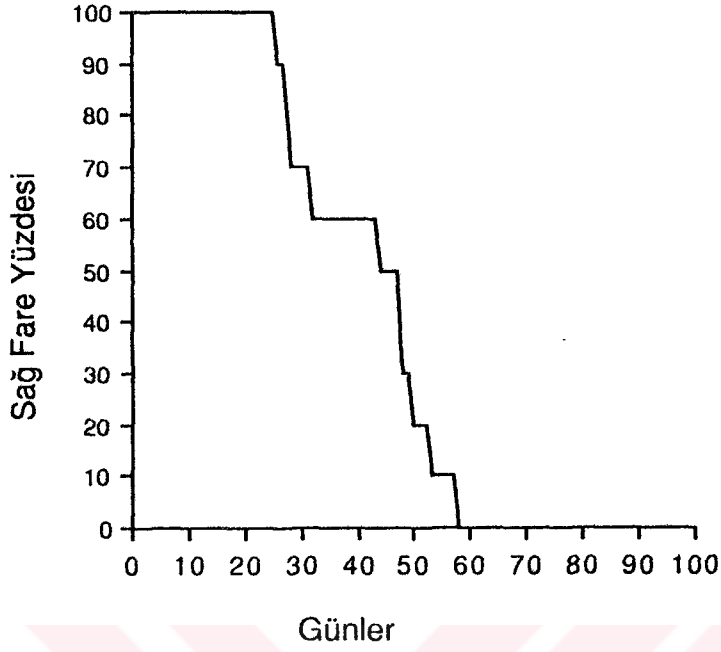
* $p < 0.01$ önemli farklılık vardır.(tüm gruplar karşılaştırıldığında)



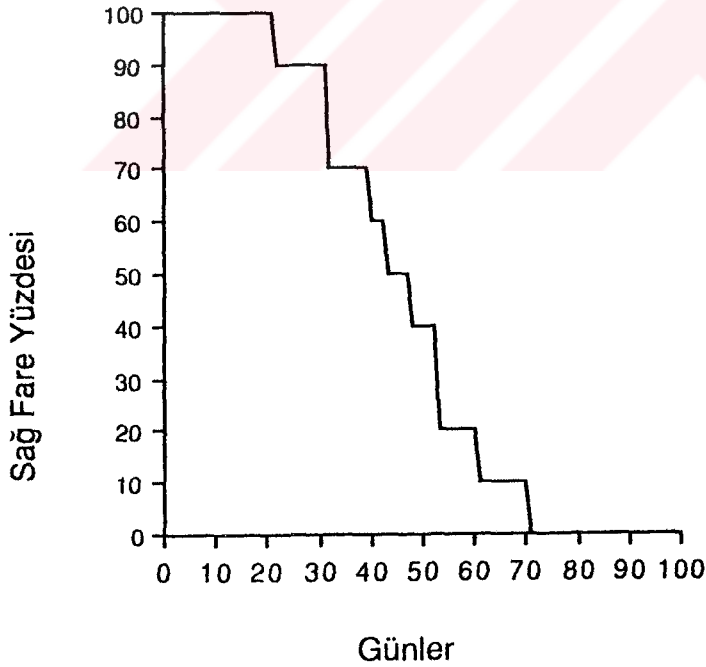
Şekil 4.1.1. Kontrol grubunda ortalama yaşam süresi yaklaşık 26.66 gün. Bu grupta en uzun yaşam süresi 41 gün, en kısa ise 18 gündür.



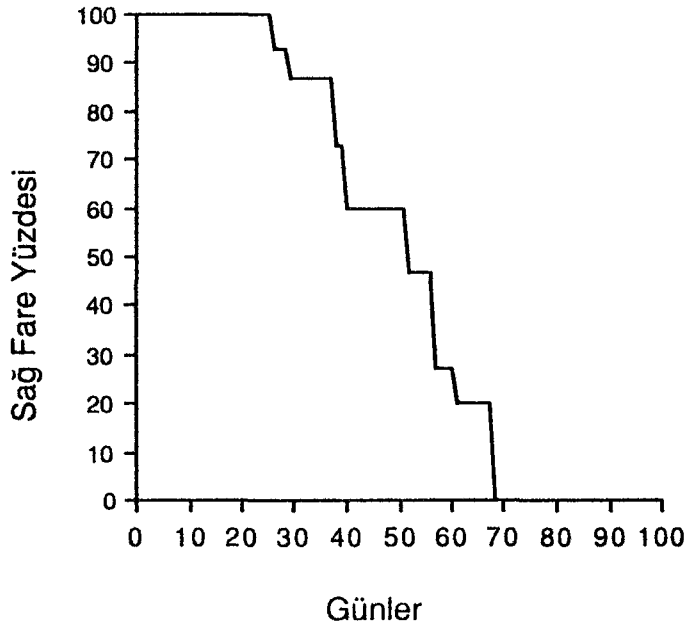
Şekil 4.1. 2. 0.2 mg/kg Vinkristin ile tedavi edilen grupta ortalama yaşam süresi yaklaşık 41.73 gün, en uzun yaşam süresi 60 gün, en kısa yaşam süresi 29 gündür.



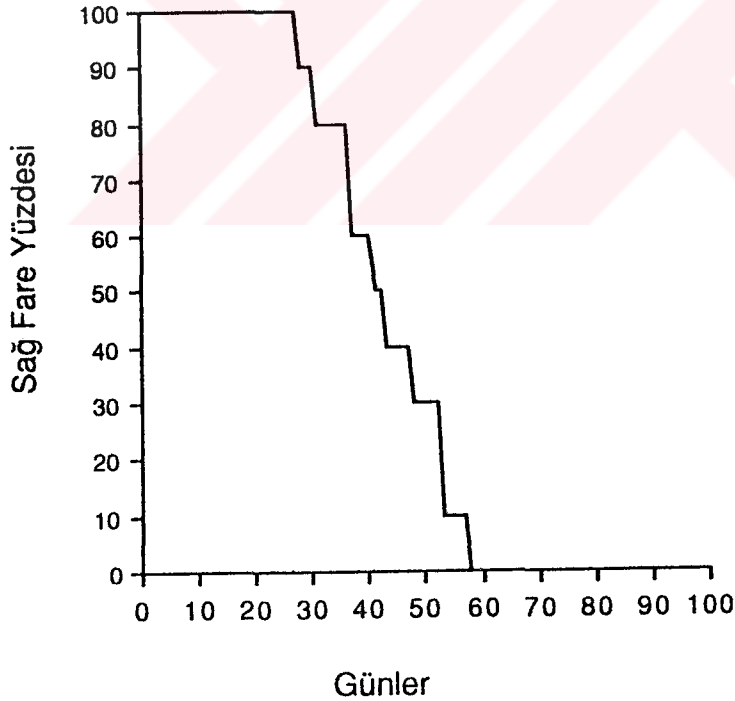
Şekil 4.1. 3. 0.2 mg/kg Vinkristin + 7.5 mg/kg verapamil ile tedavi edilen grupta ortalama yaşam süresi 41.60 gün. En uzun yaşam süresi 59 gün, en kısa yaşam süresi 26 gündür.



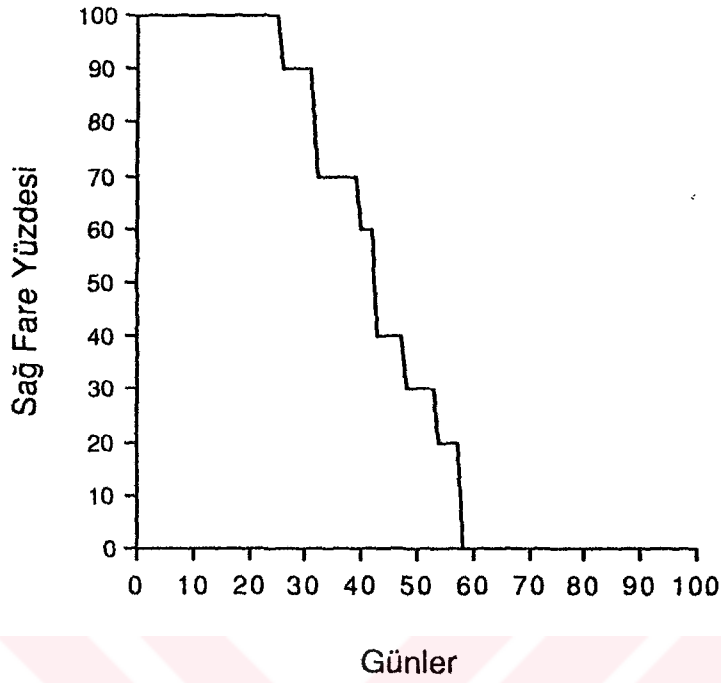
Grafik 4.1.4. 0.2 mg/kg Vinkristin+15 mg/kg verapamil ile tedavi edilen grupta ortalama yaşam süresi 45.50 gün. En uzun yaşam süresi 71 gün, en kısa yaşam süresi 22 gündür. ($p < 0.01$)



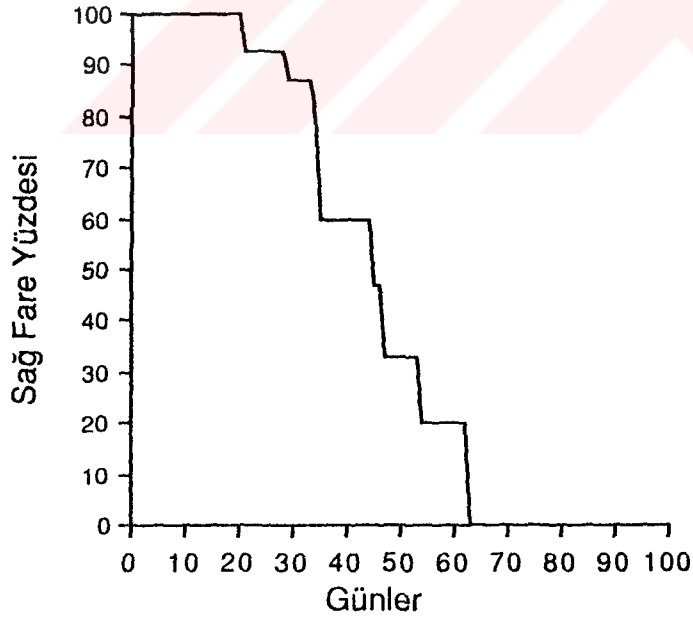
Şekil 4.1. 5. 0.2 mg/kg Vinkristin + 30 mg/kg verapamil ile tedavi edilen grupta ortalama yaşam süresi 50.07 gün. En uzun yaşam süresi 58 gün, en kısa yaşam süresi 26 gündür.($p < 0.01$)



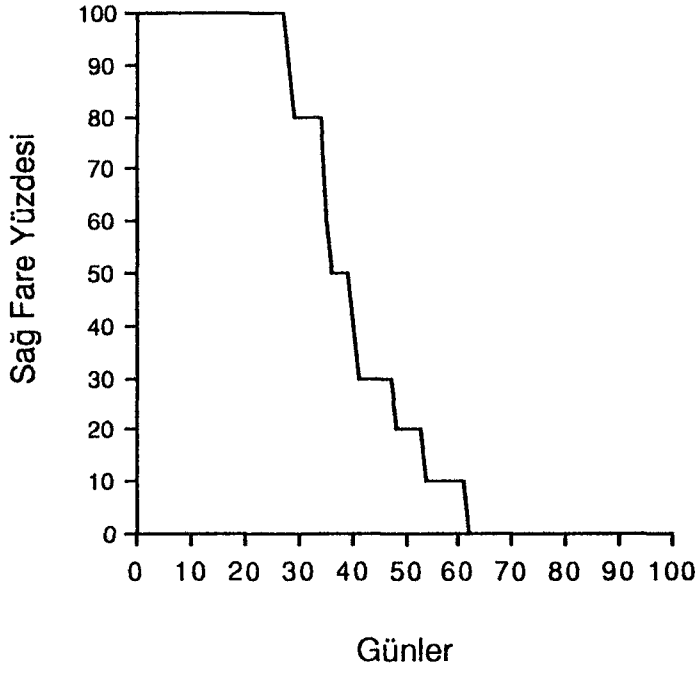
Şekil 4.1. 6. 0.2 mg/kg Vinkristin + 0.3 mg/kg Nifedipin ile tedavi edilen grupta ortalama yaşam süresi 43'tir. En uzun yaşam süresi 59 gün, en kısa yaşam süresi 28 gün.



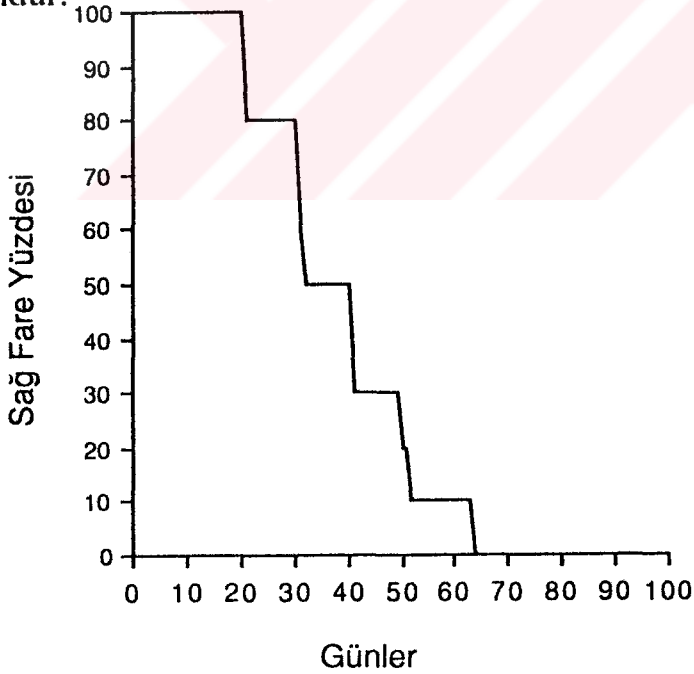
Şekil 4. 1. 7. 0.2 mg/kg Vinkristin + 0.6 mg/kg Nifedipin ile tedavi edilen grupta ortalama yaşam süresi 42.30 . En uzun yaşam süresi 58 gün, en kısa yaşam süresi 25 gün.



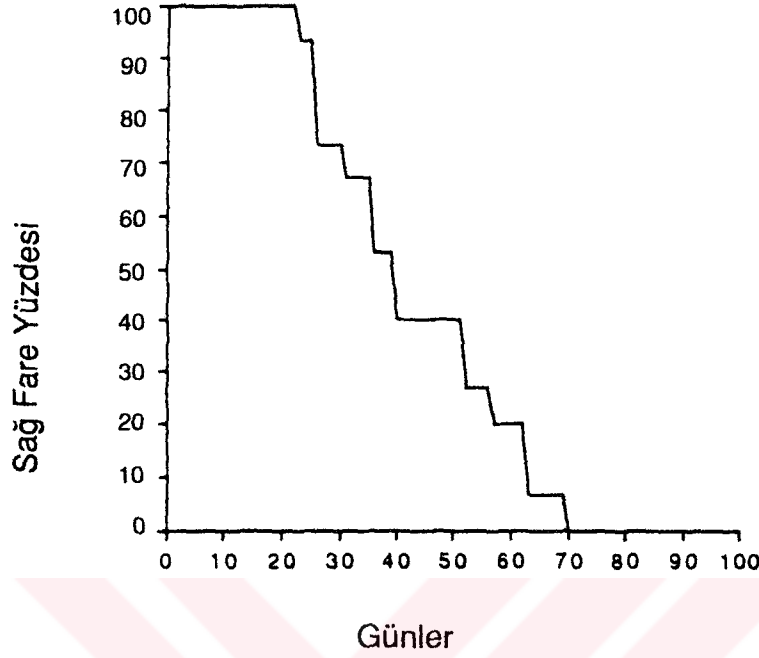
Şekil 4. 1. 8. 0.2 mg/kg Vinkristin + 1 mg/kg Nifedipin ile tedavi edilen grupta ortalama yaşam süresi 44.60'tır. En uzun yaşam süresi 63 gün, en kısa yaşam süresi 21 gün.



Şekil 4.1. 9. 0.2 mg/kg Vinkristin + 12.5 mg/kg Diltiazem ile tedavi edilen grupta ortalama yaşam süresi 40.33 gündür. En uzun yaşam süresi 62 gün, en kısa 28 gündür.



Şekil 4.1.10. 0.2 mg/kg Vinkristin + 25 mg/kg Diltiazem ile tedavi edilen grupta ortalama yaşam süresi 38.40 gündür. En uzun yaşam süresi 64 gün, en kısa 21 gündür.



Şekil 4.1.11. 0.2 mg/kg Vinkristin + 50 mg/kg Diltiazem ile tedavi edilen grupta ortalama yaşam süresi 42.33 gündür. En uzun yaşam süresi 70 gün, en kısa 23 gündür.

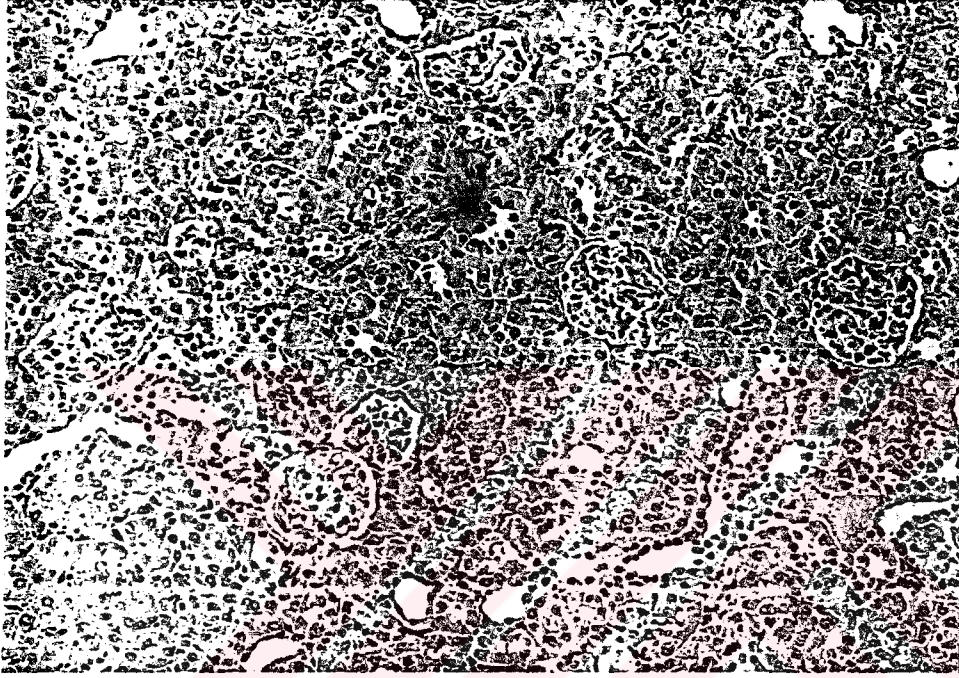
4. 2. Histolojik bulgular

İlaç uygulamasının üçüncü haftasında, Vinkristin uygulamasından bir gün sonra fareler eterle anestezi edilerek böbrek, karaciğer ve kemik iliği çıkarılarak formalin solüsyonuna alındı ve klasik yöntemlerle hazırlanan preparatların histopatolojik incelemesinde:

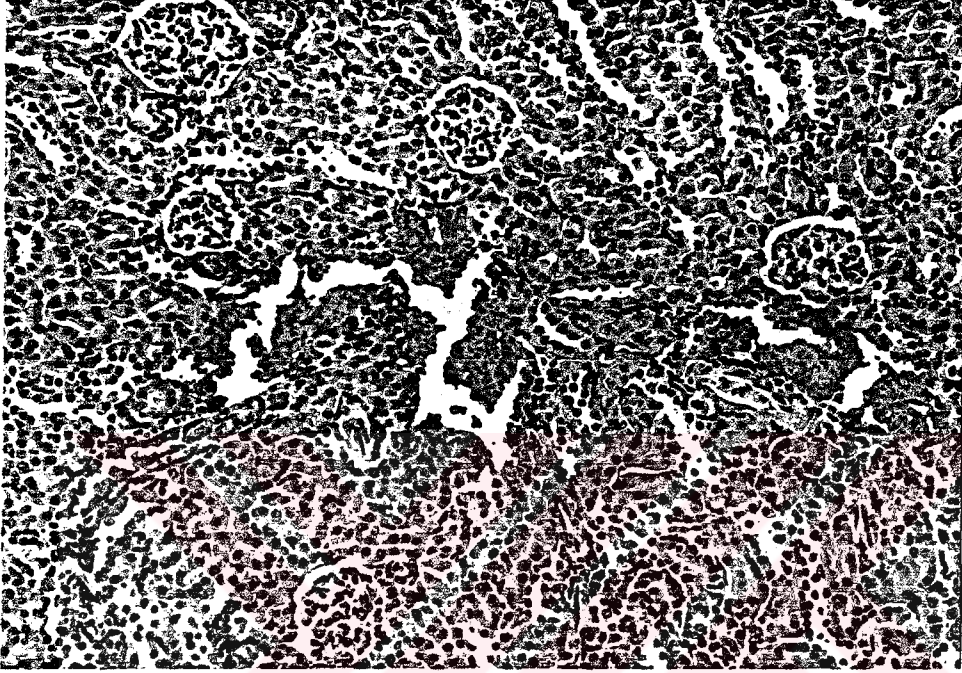
Böbrek kesitlerinin histopatolojik incelenmesi. Kontrol grubunda normal histolojik bulgular izlenmiştir.



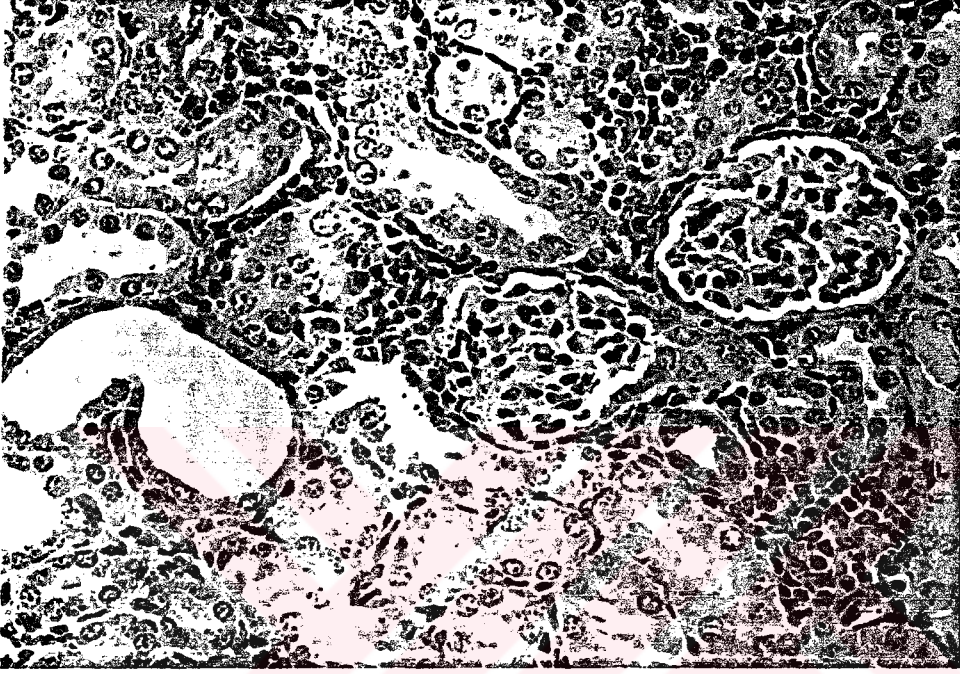
Şekil 4. 2. 1. 0.2 mg/kg Vinkristin uygulanan II. grupta medulla dahil tüm dokuda hiperemik kapiller ve bunun yanısıra kortexte aşırı derecede dilatasyona uğramış damarlar gözükmetedir. Yer yer atrofik glomerüller görüldü. Tubüller ise normale yakın tespit edilmiştir.(H. E. X 64)



Şekil 4. 2. 2. 0.2 mg/kg Vinkristin +30 mg/kg/gün Verapamil uygulanan V.grupta ise Vinkristine göre dokularda hipereminin azalmış olduğu gözlemlendi. Ayrıca tubüller ve glomerüler yapıların normal olduğu tespit edildi. (H. E. X 64)

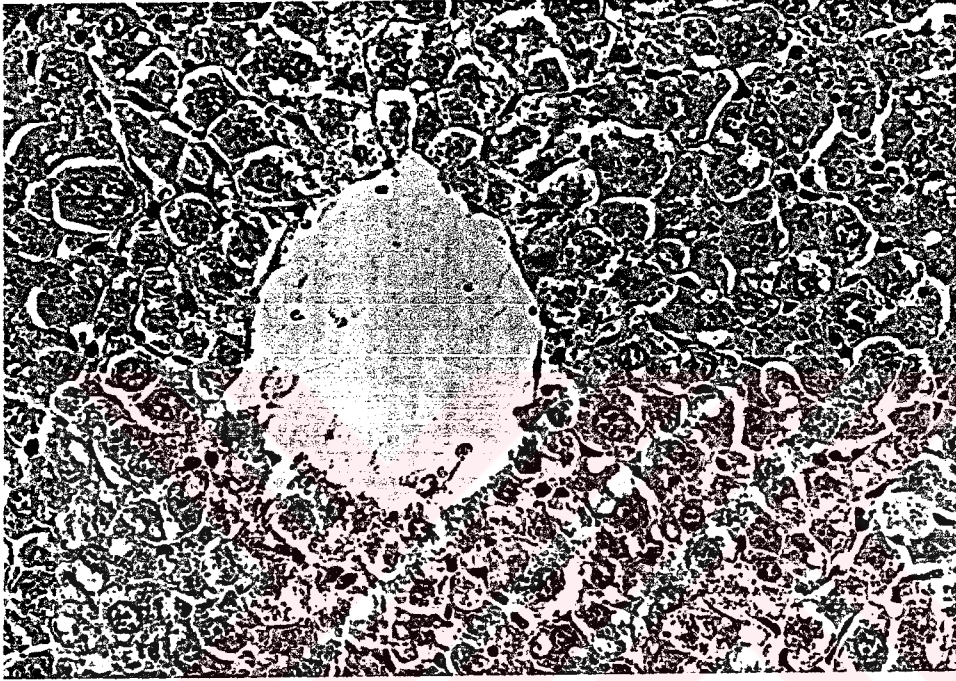


Şekil 4. 2. 3. 0.2 mg/kg Vinkristin+1 mg/kg Nifedipin uygulanan VIII. grupta ise kapiller hiperemik diğer yapılarda normal görüntü tespit edilmiştir.(H. E. X 64)

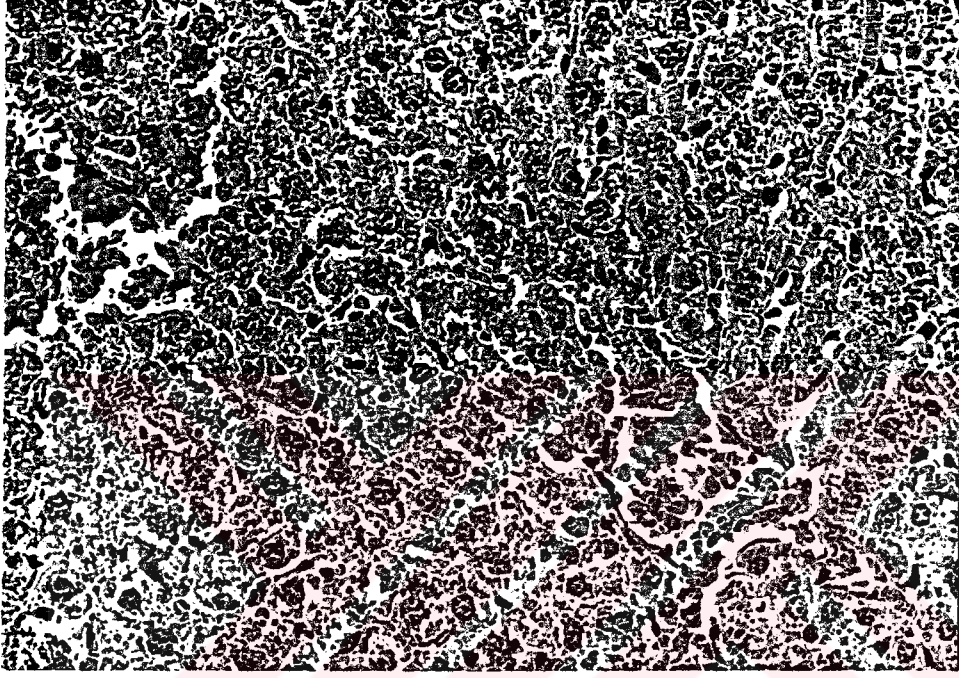


Şekil 4. 2. 4: 0.2 mg/kg Vinkristin + 50 mg/kg/gün Diltiazem uygulanan grupta ise hafif proksimal infiltrasyon ile tubüler yapının normal olduğu tespit edilmiştir. (H. E. X 132)

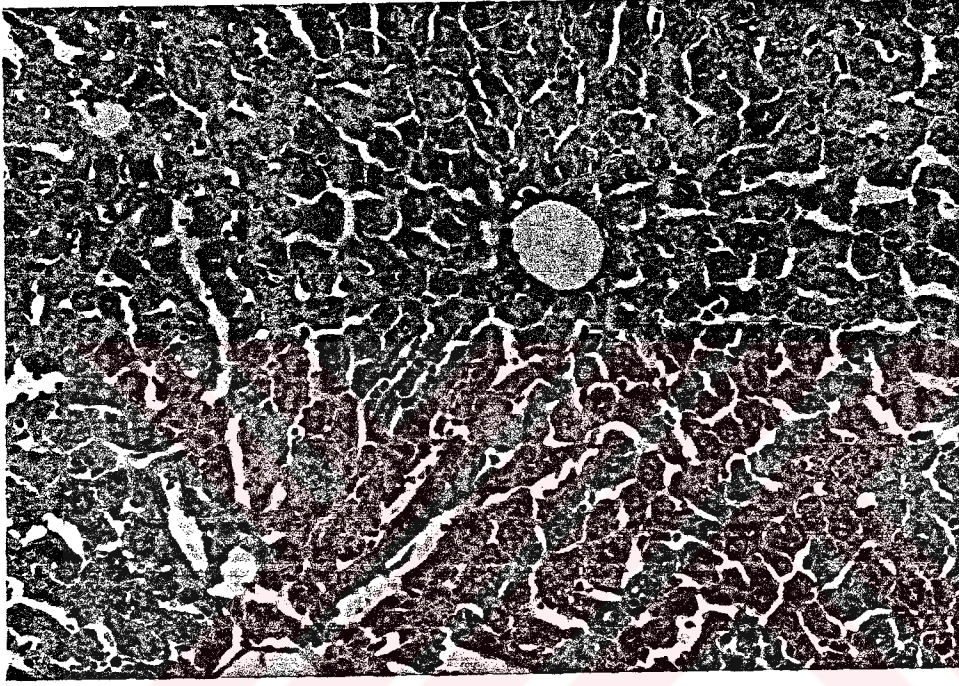
Karaciğer histopatolojik incelemesinde: Kontrol grubunda normal histopatolojik görüntü elde edilmiştir.



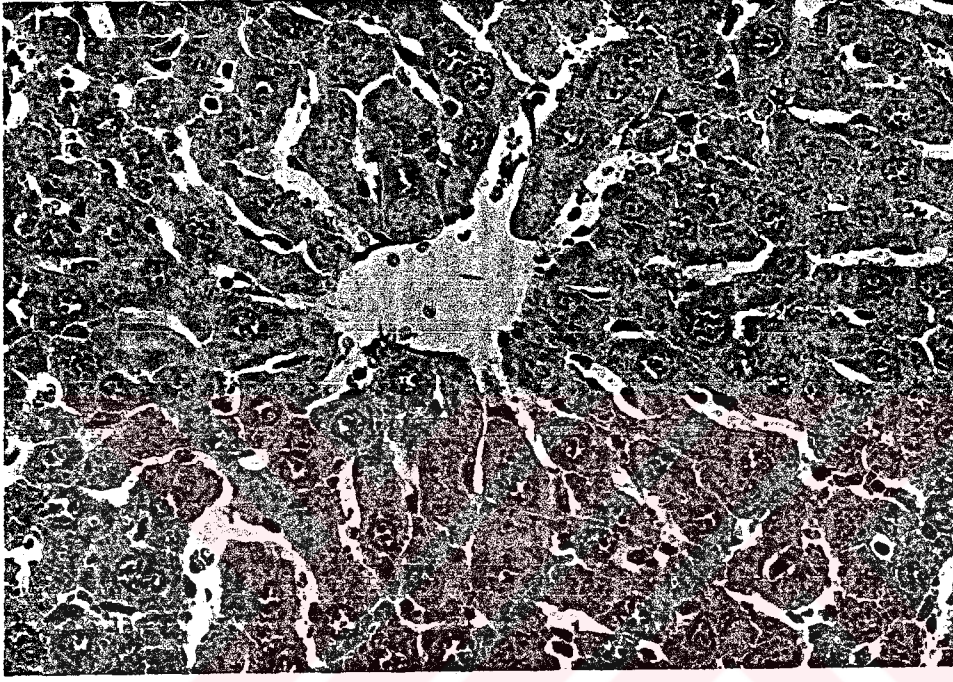
Şekil 4. 2. 5: 0.2 mg/kg Vinkristin uygulanan II. grupta dilate olmuş vena centralis mevcuttur. Yer yer vakuolizasyon gösteren hepatositler ve bunun özellikle sentrolobüler hücrelerde olduğu yine sentrolobüler hücrelerde hidropik dejenerasyon olduğu gözlenmiştir. (H. E. X 132)



Şekil 4. 2. 6: 0.2 mg/kg Vinkristin + 30 mg/kg/gün Verapamil uygulanan V. grupta hiperemik vena centralisler ile parankima sinuzoidlerinde hiperemi tespit edilmiştir. Hepatositler nispeten iyi korunmuş olup normale yakındır.(H. E. X 132)



Şekil 4. 2. 7. 0.2 mg/kg Vinkristin + 1 mg/kg/gün Nifedipin uygulanan VIII.grupta: Normale yakın karaciğer dokusu bunun yanısıra sentral venler gözükmüş olup hepatositler normaldir. (H. E. X132)

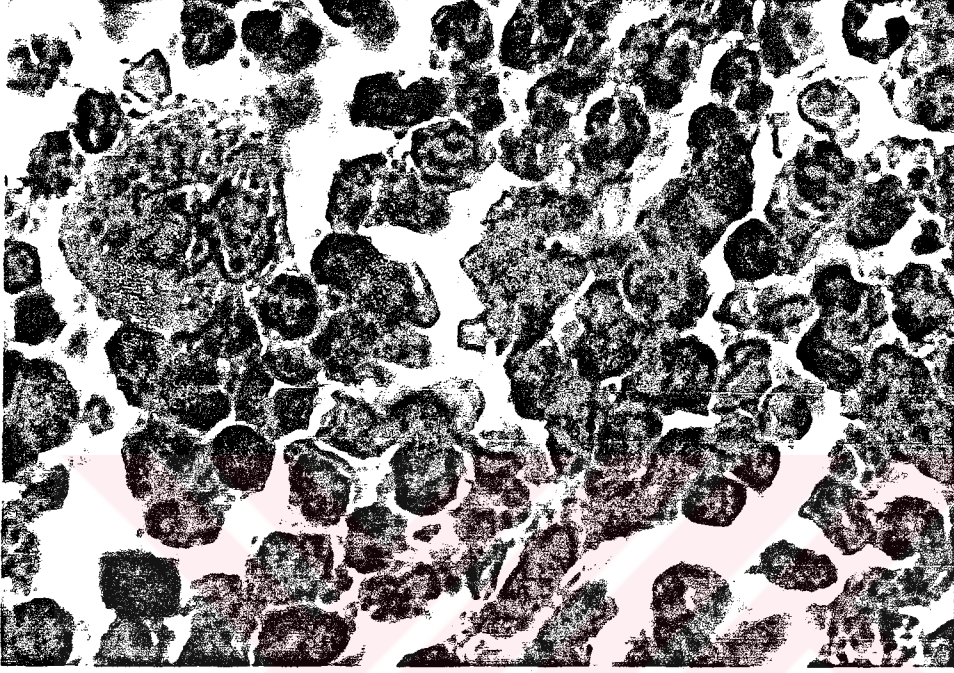


Şekil 4. 2. 8. 0.2 mg/kg Vinkristin + 50 mg/kg/gün Diltiazem uygulanan grupta patolojik görüntü belirlenmemiş olup normale yakın yapı mevcuttur. (H. E. X132)

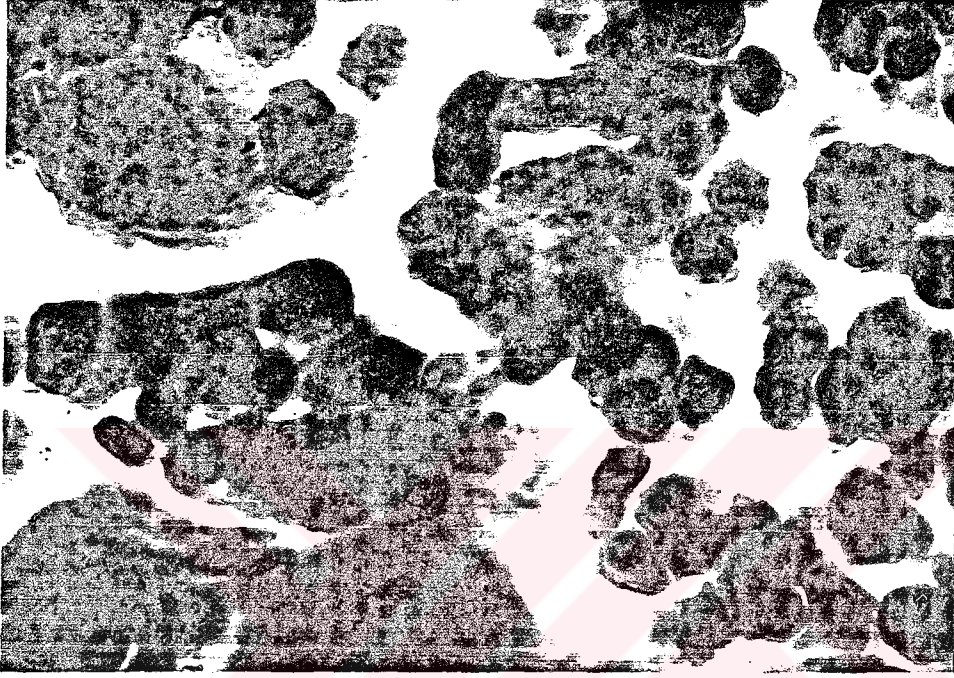
Kemik iliğinin incelenmesinde;



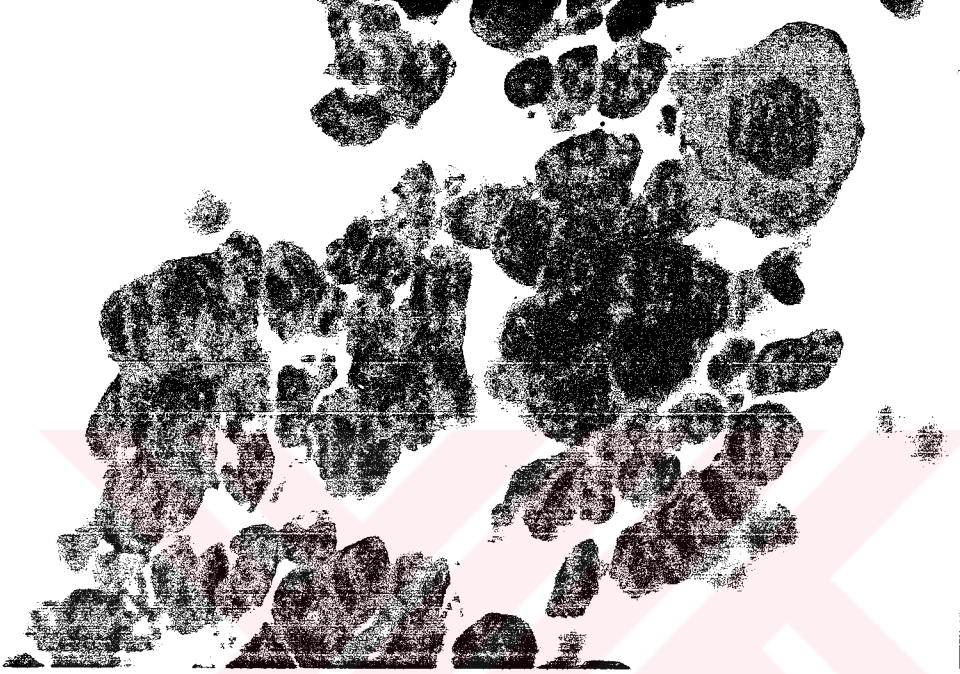
Şekil 4. 2.9. 0.2 mg/kg Vinkristin uygulanan II. grupta Eritrositer seri ile myelositer seri oranın 1/6 şeklinde artmış olduğu görüldü (Eozinofili nedeniyle). Eritropoezin baskılandığı, granülopoezin arttığı tespit edilmiştir. (H. E. X 320)



Şekil 4. 2.10. 0.2 mg/kg Vinkristin +30 mg/kg/gün Verapamil uygulanan V. grupta eritrositer seri ile myelositer seri oranı 1/3.7 tespit edilmiş Eritropoez yalnız Vinkristin verilen gruba göre az baskılanmış olup ve eozinofili görülmedi.(H. E. X 320)

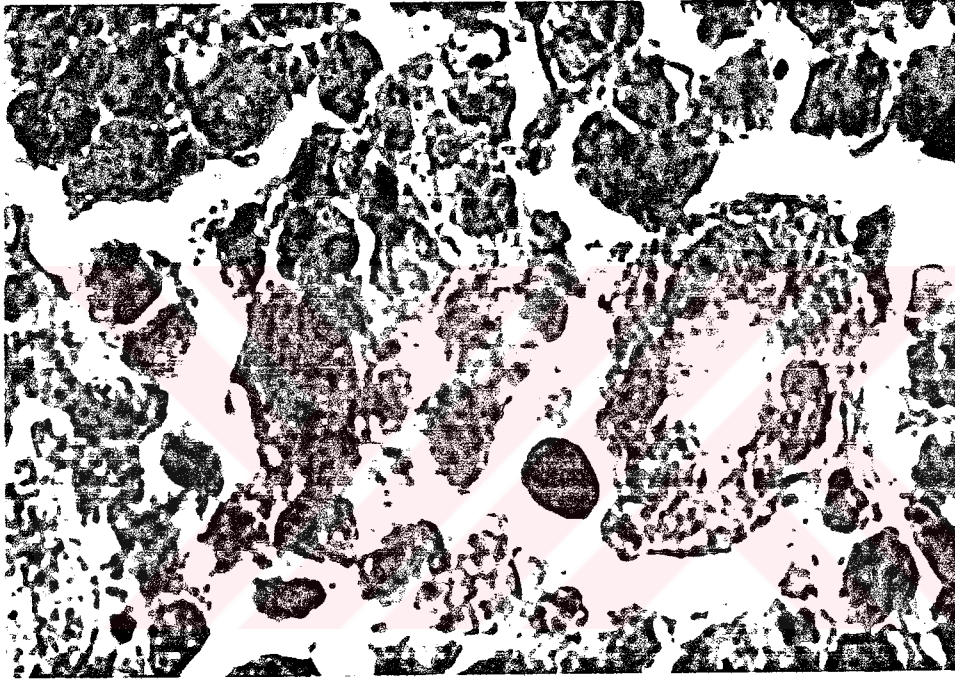


Şekil 4. 2.11. 0.2 mg/kg Vinkristin + 1 mg/kg/gün Nifedipin uygulanan VIII. grupta uygulananlarda eritrositer seri ile myelositik seri oranı 1/3.3 eozinofili yok. eritropoez ve granülopoez normal. (H. E. X 320)

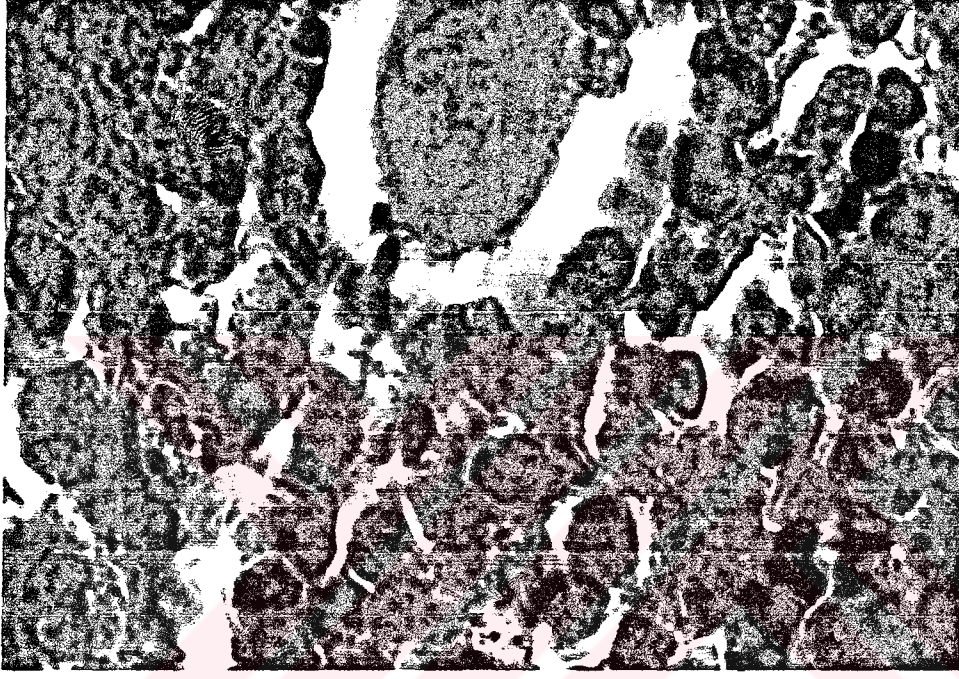


Şekil 4. 2.12. 0.2 mg/kg Vinkristin + 50 mg/kg/gün Diltiazem uygulanan XI. grup eritrosik seri ile myelositer seri oranı 1/3.9. Parçalar yetersiz ancak trombopoezise yeterli eozinofili olmadığı tespit edildi.(H. E. X 320)

Kemik iliğinin incelenmesinde; vinka alkaloidlerinden özellikle vinblastinin deprese edici etkisi dikkate alınarak çalışmaya bir grup 0.2 mg/kg vinblastin uygulanan ve 0.2 mg/kg vinblastin + 30 mg/kg verapamil uygulanan grup eklendi bu değerlendirmede:



Şekil 4. 2.13. 0.2 mg/kg Vinblastin verilen XII. grupta eozinofili görüldü. Eritrositer seri ile myelositik seri oranının 1/7 olduğu gözlemlendi. Megakaryositler yeterli, immatür hücre sayısının az olduğu ama trombopoezise yeterli olduğu tespit edildi. (H. E. X 320)



Şekil 4.2.14. 0.2 mg/kg Vinblastin + 30 mg/kg/gün Verapamil uygulanan XIII. grupta eritrositer seri ile myelositer seri oranı 1/4.5 olarak tespit edildi. Hafif eozinofili vardı . (H. E. X 320)

4. 3. Biyokimyasal bulgular

Plazma renin aktivitesi incelendiğinde kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır.

Çizelge 4. 3. Grupların plazma renin aktiviteleri. ml/dak.

Grup	Denek	Ortalama	St. Hata	Karşılaştırma
I	5	3.76	0.20	A
II	5	3.74	0.15	A
V	5	3.63	0.14	A
VIII	5	3.55	0.10	A
XI	5	3.73	0.09	A

p>0.05

Çizelge 4. 4. Hematokrit değerleri. mg/dl.

Grup	Denek	Ortalama	St. Hata	Karşılaştırma
I	10	31.50	0.98	A
II	10	30.20	0.65	A
V	10	31.60	0.72	A
VIII	10	31.20	0.57	A
XI	10	30.40	0.72	A

p>0.05

Grupların hematokrit değerleri karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunamadı. $p>0.05$

Çizelge 4. 5. Lökosit sayısı

Grup	Denek	Ortalama	St. Hata	Karşılaştırma
I*	10	9220.5	527.61	A
II	10	5980.0	641.29	B
V*	10	7960.5	580.31	A
VIII	10	6220.7	709.54	B
XI	10	5426.2	613.92	B

* $p<0.01$

Lökosit sayıları incelendiğinde kontrol grubu ile 0.2 mg/kg Vinkristin+30 mg/kg Verapamil uygulanan V. grupta diğer gruplara göre anlamlı fark vardı(* $p<0.01$)

Çizelge 4. 6. Ürikasit değerleri mg/dl

Grup	Denek	Ortalama	St. Hata	Karşılaştırma
I	7	12.45	1.97	A
II	7	18.24	3.41	A
V	7	13.31	1.91	A
VIII	7	15.12	4.21	A
XI	7	14.31	2.35	A

$p>0.05$

Ürik asit miktarının karşılaştırılmasında bütün gruplar arasında anlamlı farklılık görülmedi. $p>0.05$

Çizelge 4. 7. Plazma Kreatinin mg/dl

Grup	Denek	Ortalama	St. Hata	Karşılaştırma
I	7	2.96	0.63	A
II	7	2.92	0.60	A
V	7	3.14	0.55	A
VIII	7	2.76	0.49	A
XI	7	2.24	0.50	A

$p>0.05$

Plazma kreatinin miktarı karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi. $p>0.05$

Çizelge 4. 8. Kemik iliği hücre sayısı 10^6 ml.

Grup	Denek	Ortalama	St. Hata	Karşılaştırma
I	9	19.79	1.31	A
II*	9	14.41	0.93	B
V	9	18.76	0.81	A
VIII	9	18.17	1.54	A
XI	9	17.50	1.35	A

* $p<0.01$

Kemik iliği hücre sayıları karşılaştırıldığında II. grup ile diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık vardı. $p<0.01$

5. TARTIŞMA

Birçok çalışmada kalsiyum kanal blokörlerinin kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanılmasının sitotoksik etkinin artırılmasındaki rolüne değinilmiştir. Bugüne kadar kalsiyum kanal blokörleri vinka alkaloidleri(22, 23, 24, 27, 28) adriamsin (33), daunorubisin (34, 35), metotreksat (36), siklosporin A (37), 5 floro-urasil ve etopositler (26, 42) vb. kemoterapötikler ile birlikte çeşitli tümör hücreleri ile yapılan çalışmalarda in vitro ve in vivo olarak araştırılmıştır. Yapılan araştırmalarda vinkristin ile birlikte kullanılan kalsiyum kanal blokörlerinin farelerin yaşam süresini vinkristinin yalnız başına kullanılmasına oranla daha fazla uzattığı belirtilmiştir. Bunlardan Tsuruo T. ve arkadaşlarınca yapılan bir çalışmada P388 lösemi hücreleri bir grup fareye intra peritoneal yolla implante edilmiş ve 125 mg/kg, 100 mg/kg, 80 mg/kg, 60 mg/kg/gün dozlarında diltiazem ile 10 gün süreyle tedavi edilmiştir (23, 27). Ortalama yaşam süresi diltiazemin 100, 125 mg/kg dozlarında kontrol grubu ve Vinkristinin yalnız başına kullanıldığı gruplardan daha fazla uzamıştır. Yukarıda Tsuruo ve arkadaşlarının yaptığı belirtilen çalışmada da 60 mg/kg, 125 mg/kg dozda diltiazem ile vinkristin kombinasyonu uygulanan farelerde yaşam süresinde anlamlı uzama olmuştur. Bizim çalışmamızda 12.5-25-50 mg/kg diltiazem+0.2 mg/kg vinkristin kombinasyonu terapötik dozlara yakın olması bakımından tercih edilmiştir. Ancak 0.2 mg/kg vinkristin ile kombine edilen 12.5-25-50 mg/kg diltiazem uygulanan gruplarda yaşam süresi takibinde

kontrol ve diğer gruplara göre anlamlı bir farklılık tespit edilemedi. Diltiazemin vinkristinin antitümoral etkinliğini artırdığına ait sonuçların bu çalışmada doğrulanmadığı görüldü. Tsuruo ve arkadaşlarının bir başka çalışmasında kolon adenokarsinoma hücreleri kullanılarak 5×10^6 sayıda tümör hücresi farelere intraperitoneal yolla implante edildi. 10 gün süreyle 30, 50, 75, 100 mg/kg dozlarda verapamil ile 0.1 mg/kg vinkristin kombine edildiğinde 50 ve 75 mg/kg kullanılan verapamil+0.1 mg/kg vinkristin kombinasyonunun hem kontrole hem de yalnız vinkristin ile tedavi edilen gruplara göre farelerin ortalama yaşam süresini anlamlı olarak arttırdığını gözlemlendi. Marrow ve arkadaşları başka bir çalışmada (1)140 tane fareye intravenöz olarak 1×10^4 B₁₆₅₀ lösemi hücresi injekte edilerek tedavide iki hafta 30 mg/kg verapamil ile 0.1 mg/kg vinkristin kombinasyonu kullanılmıştır. Bu çalışmanın yaşam süresi izlemesinde 0.2mg/kg serum fizyolojik uygulanan kontrol grubunda ortalama yaşam süresi 31.7 gün, yalnız vinkristin ile tedavi edilen grupta 40.4 gün iken 30 mg/kg verapamil+0.1 mg/kg vinkristin kombinasyonu ile tedavi edilen grupta 53.7 gün olarak tespit etmişlerdir.

M. Marrow ve arkadaşlarının çalışmasına uyumlu olarak bizim çalışmamızda yaşam süresi izlemesinde serum fizyolojik uygulanan kontrol grubu ve 0.2 mg/kg vinkristin ile tedavi edilen II. grup ile karşılaştırılan 15-30 mg/kg Verapamil+0,2 mg/kg vinkristin kombinasyonu uygulanan IV. ve V. gruplar ile 0,2 mg/kg vinkristin+1 mg/kg nifedipin uygulanan VIII. ve . grup arasında anlamlı fark vardır $p < 0.01$. Verapamil ile yapılan başka bir çalışmada L.M. Slater ve arkadaşları dilue edilmemiş Ehrlich Ascites Carsinoma hücreleri intraperitoneal yolla farelere uygulayarak bunu sırasıyla 25-50 mg/kg verapamil+0,2-0.4 mg/kg daunorubisin ve 25-50 verapamil+0,2-0,4 Daunorubicin ile kombine ederek fareleri tedavi etmiştir(34).25mg/kg verapamil+0.4 mg/kg daunorubicin kombinasyonunda ortalama yaşam süresi 44 gün iken 50 mg/kg verapamil+0.4 mg kg

daunorubisin ile tedavi edilen grupta ortalama yaşam süresi 41.2 gün idi. 0.2 mg/kg daunorubisin yalnız uygulandığında ortalama yaşam süresi yaklaşık 19.6 gün, 0.4 mg/kg daunorubisin uygulandığında ortalama yaşam süresi yaklaşık 21.2 gün olarak tespit edildi. Verapamil hem 25 mg/kg hem de 50 mg/kg uygulandığında daunorubisinin yalnız başına uygulanmasına göre farelerin yaşam süresi daha fazla uzamıştır. Çalışmamızda 25 mg/kg verapamil (IV. grup) ile 50 mg/kg verapamil(V.grup)+0.2 mg/kg/hafta vinkristin kombinasyonu uygulanan fareler yaşam süreleri bakımından karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamadı. Bizim çalışmamızda 7.5-15-30 mg/kg verapamil + 0.2 vinkristin kombinasyonlarının birbirleriyle karşılaştırılmasında 7.5 mg/kg/gün verapamilli kombinasyonun olduğu III. grupta ortalama yaşam süresi 41 gün iken IV. grupta 48 gün ve V. grupta 50 gündü bu sonuç verapamilin vinkristinin antitümoral etkinliğini artırmasının doz bağımlı olduğunu düşündürmektedir. Diğer çalışmalarda da yüksek dozlarda verapamilin vinkristin ile birlikte kullanılmasıyla yaşam süresinde artışın olduğu görülmektedir. Ancak verapamil kemoterapide 1 mg/kg dan (36) 125 mg/kg'a kadar(28) değişik dozlarda kullanılmaktadır. Dozla etkinlik arasındaki bağlantının netleşmesi için ileri çalışmalar gerekmektedir. Ayrıca Pennoch G.P. ve arkadaşları insanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada (38) 15 mg/kg/gün Verapamil+0.1 mg/kg vinkristin, doksorubisin ile deksametazon rejimine dahil edildi ve 35 hastada bu dozun yan etkileri araştırıldığında hastalarda kalp bloğu, hipotansiyon, sinus bradikardisi olduğu ayrıca non kardiovasküler yan etkiler, konspitasyon, kilo alma, periferik ödem görüldü. Bu yan etkilerin doz bağımlı olduğu düşünüldü.

Aynı durum nifedipin kullanımında da karşımıza çıkmaktadır. Hayvanlarda in vivo çalışmalarda kullanılan yüksek dozların insanlarda aynen kullanılması, bu çalışmada olduğu gibi yan etkinin artması nedeniyle pek mümkün olmamaktadır.

Kan tablosu incelendiğinde Vinkristinin bilinen yan etkilerinin kalsiyum kanal blokörleri ile değişip değişmediğini araştırdığımızda kontrol grubu , 0.2 mg/kg vinkristin uygulanan II. grup , 30 mg/kg Verapamil+0.2 mg/kg Vinkristin uygulanan V.grup, 1 mg/kg Nifedipin + 0.2 mg/kg Vinkristin uygulanan VIII. grup ve 50 mg/kg Diltiazem+0.2 mg/kg Vinkristin uygulanan XI. gruplarda hemotokrit, ürik asit, plazma kreatinin değerlerinde ve plazma renin aktivitesinde anlamlı bir fark gözükmemekte iken grupların lökosit değerlerini incelediğimizde: II., VIII. ve XI. grupta ortalama lökosit sayısı azalırken hem kontrol hem de 30mg/kg/gün verapamil+0.2 mg/kg vinkristin uygulanan V. grupta daha yüksekti. Bu sonuç vinkristinin ancak yüksek dozlarda yaptığı lökopeninin verapamil kombinasyonu ile düzelebileceğini düşündürmektedir. Marrow ve arkadaşlarının yukarıda adı geçen çalışmasında lökosit miktarı değerlendirildiğinde: 30 mg/kg verapamil + 0.1 mg/kg vinkristin kombinasyonunda belirgin ölçüde lökosit artışı gözlenirken diğer gruplarda hafif lökopeni görüldü (1). Bu durum bizim çalışmamızda da ortaya konmuştur. Kombinasyon gruplarını birbiriyle kıyasladığımızda farklılığın olması Besso T. ve arkadaşlarının çalışmalarıyla da uyum göstermektedir (39). Bessho ve arkadaşlarınca lösemili çocuklar üzerinde yapılan araştırmada vinkristin+diltiazem kombinasyonun kan üzerine etkileri incelenmiş, vinkristin tedavisi ile vinkristin+diltiazem kombinasyonu karşılaştırıldı. Bu tabloda vinkristin tedavisi ile azalan lökosit miktarının 0.2 mg/kg vinkristin+25 mg/kg diltiazem kombinasyonu ile kısmen düzelmiş olduğu görülmüştür. Uyar R. ve arkadaşların metotreksatın kemik iliğine olan toksitesini araştırdıkları çalışmada lökosit sayısında 10 mg/kg metotreksatın yanına eklenen 2 mg/kg Verapamilin toksisiteyi önemli ölçüde azalttığını göstermiştir.

Kemik iliğinin incelenmesinde Uyar R. ve arkadaşlarının çalışmasında 2 mg/kg verapamil+10 mg/kg metotreksat kombinasyonu kullanılan farelerde

kemik iliğindeki toplam çekirdekli hücrelerin sayısı yalnız metotreksat uygulanan grupla anlamlı fark oluşturmuştur. Bu çalışmada verapamilin çok küçük dozlarda kullanıyor olmasına karşın vinkristinin kemik iliğindeki toksisiteyi azalttığı belirlenmiştir. Marrow (1) ve arkadaşları yetişkin 57B1/GJ farelerinde yaptığı verapamil+vinkristin ve verapamil+5 FU kombinasyonlarının kemik iliğine etkisini araştırdı. 0.1 mg/kg vinkristin+30 mg/kg verapamil kombinasyonu ile yalnız başına uygulanan 0.1 mg/kg vinkristin ve kontrole göre değerlendirildi. Her grupta 8 fare kullanılan bu çalışmada 0.1 mg/kg vinkristin+30 mg/kg verapamil uygulanan gruptaki hücre sayısı ile kontrol grubu arasında istatistiksel fark yoktu. Bizim çalışmamızdaki 30 mg/kg verapamil+0.2 mg/kg vinkristin, 1 mg/kg nifedipin+0.2 mg/kg vinkristin, 50 mg/kg diltiazem+0.2 mg/kg vinkristin kombinasyonları uygulanan farelerdeki kemik iliği hücre sayısı ile vinkristinin yalnız kullanıldığı farelerdeki kemik iliği hücre sayısı arasındaki istatistiksel fark uyum göstermektedir. Kan tablosu incelendiğinde ve diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında kalsiyum kanal blokerlerinin vinkristinle birlikte kullanılmasının vinkristinin yan etkilerini azaltma bakımından önem taşımakta olduğu savını güçlendirmektedir. Çalışmamızda kemik iliği hücre sayısının yanısıra histopatolojik incelemesi de yapıldı. 0.2 mg/kg vinkristin uygulanan II. gruptaki eritrositer seri ile myelositer seri oranı eozinofili nedeniyle (1/6 şeklinde) artmış olduğu gözlenirken eritropoezin baskılandığı belirlendi. 0.2 mg/kg vinkristin+30 mg/kg verapamil uygulanan V. grupta eritrositer seri ile myelositer seri oranı 1/3.7 olarak belirlenmiş vinkristin ile karşılaştırıldığında eritropoezin daha az baskılandığı anlaşılmış olup eozinofili görülmedi. 0.2 mg/kg vinkristin+1 mg/kg nifedipin uygulanan VIII. grupta eritrositer seri ile myelositik seri oranı 1/3.3 iken eritropoez ve gronülopoez normal bulunmuştur. 0.2 mg/kg vinkristin+50 mg/kg diltiazem uygulanan XI. grupta eritrositer seri ile myelositer seri oran 1/3.9 idi ve bunun trombopoezise yeterli olduğu anlaşıldı ve eozinofili görülmedi. Kalsiyum kanal blokörlerinin uygulandığı gruplar birbiri ile

karşılaştırıldığında 0.2 mg/kg vinkristin + 1 mg/kg/gün nifedipin uygulanan XI. grupta normal yapının en iyi korunduğu anlaşıldı. 0.2 mg vinblastin ile 0.2 mg/kg vinblastin+30 mg/kg verapamil uygulanan farelerin kemik iliği incelendiğinde; kombinasyonda oldukça hafif eosinofili görülürken yalnız vinblastin uygulanan farelerde kemik iliği daha eosinofili olarak tespit edildi.

Bizim sonuçlarımızda böbrek yapısının vinkristin ile verapamil, nifedipin, diltiazem kombinasyonlarında fazlaca bozulmadığı dejeneratif değişikliklerin pek olmadığı gözlenmesine rağmen Miyagana ve arkadaşlarının çalışmasında.(40) 5 ve 10 mg/kg verapamilin sisplatinle kombinasyonu antitümoral etkinliği arttırmış ancak nefrotoksisiteyi azaltmamıştır. Renal tubülüslerde bariz dilatasyon ve nekrotik değişikliklerin bir miktar arttığı gözlenmiş başka bir araştırmada Deray ve arkadaşları(41, 42, 43)) ise nifedipinin çeşitli dozlarıyla sisplatinle kombine ederek sisplatinin nefrotoksik etkisinin azaltılmasını araştırmışlar. Ancak nifedipinin küçük dozlarda yani 0.2 mg/kg dozlarında nekrotik vakuolleşme ve tubuler şişme miktarlarında azalma yaptığı yüksek dozlarda ise bu miktarları arttırdığı belirlenmiş ancak bu durum bizim çalışmamızda görülmemiştir. Bu çalışma da kombinasyona giren kalsiyum kanal blokörlerinin doz değerlendirilmesi dikkati çekmekte ve yaşam süresinin uzamasını sağlayan dozun yan etkinin önlenmesi için kullanılmasının doğru olamayacağı ortaya konmuştur (41). Grupların karaciğerlerinin incelenmesinde; kalsiyum kanal blokörleri ile vinkristin uygulanan grupta dejeneratif değişiklikler görülmedi. Masaru Mayazaki ve arkadaşları karaciğer tümörlü farelerde kemoterapilerin yanısıra verapamil kullanarak antitümöral etkiyi araştırdıklarında sitotoksik etkinin arttığını ve yan etkilerin azaldığını gösterdiler.(44)

İnsandaki farmokokinetik (25,41,42) çalışmaları da vinkristin ile kalsiyum kanal blokörlerinin (verapamil, nifedipin, diltiazem) birlikte uygulanması ile ilacın başlangıçta dağılım hızının arttığı ve eliminasyon fazının uzadığı

yani vinkristinin dokulara bağlanmada ısrarlı olduğu görüldü. Ayrıca kan örnekleri incelenen hastalarda vinkristin klerensinde azalma görüldü. Eliminasyondaki bu uzamada birkaç mekanizma söz konusu olabilir.

1. İlacın intrasellüler alandan dışarı taşıma mekanizmalarının inhibe olması,
2. Kalsiyum kanal blokörlerinin vinkristinin enterohepatik dolaşımdaki oranını arttırmış olması,
3. Dolaşımdaki kan hücrelerindeki vinkristin oranında artmadır .(21, 22, 23, 27, 30, 45,46,47,48)

Vinkristin+kalsiyum kanal blokörlerinin normal dokularda ek bir yan etki oluşturmayıp vinkristinin ve diğer kemoterapötiklerin yan etkilerini azalttığına dair birçok yayın vardır. Bu yayınlarda sonuçlar biyokimyasal, farmakokinetik ve histopatolojik olarak gösterilmiştir.(41-45)

Adriamisin kalsiyum kanal blokerleriyle kombinasyonu ile lösemi P388 hücreleri inkübe edilerek, sitotoksisite araştırılmasında, lösemi P388 hücrelerine adriamisin yalnız başına az etkili olmasına rağmen kombinasyonda sitotoksisite artmış ve hücredeki adriamisin düzeyi 2-2.5 kat artmıştır. Bu mekanizma da vinkristininkine benzemekle beraber bazı farklılıklar göstermektedir. Yani ilacın hücre çekirdeği komponentlerine bağlanmasında bir artış olmadığı gibi hücreye ilaç girişinde fazlalık da saptanmamıştır. Bu sırada hücre içinde biriken adriamisinin dışa çıkışının inhibe edilmiş olması dikkat çekmiştir. Kombinasyonun bu etkisini antagonize etmek için ekstraselüler sıvıdaki kalsiyum konsantrasyonu artırılmış ancak antagonizma sağlanamamıştır. Ayrıca buraya uygulanan kalsiyum şelatörü olan EDTA ve kalsiyum iyonoforu olan A23187 maddesi de bu etkiyi ortadan kaldırmamıştır(23). Bu lösemi hücrelerinin incelenmesinde, kalsiyum kanal blokörlerinin özellikle de nitrendipinin bağlanma alanları tespit edilememiş olması sitotoksisitedeki artışın nonspesifik non kalsiyum kanallarda bu ilaçlar tarafından bir düzenleme

yapıldığını düşündürmüştür. Yine bu hücrelerde duyarlılığın ve direncin lipid membran kompozisyonundaki farklılık nedeniyle ortaya çıktığı anlaşılmıştır.(23)

Bu konuda derinleştirilen araştırmalarda; verapamil tarafından antrasiklinlerin hidrofilik ve hidrofobik kompartmanlarda dağılımının değiştirildiği belirlenmiş olup hidrofilik fazda antrasiklin miktarında artış olduğu görülmüştür(47).

Kalsiyum blokörleri ile birlikte melfalan kombine olarak kullanıldığında fibrosarkomda sitotoksik etkinin daha da arttığı belirlenmiştir(49). Ancak melfalan gerçekte bu hücrelere az etkili olmasına rağmen verapamil ile tedavi oldukça başarılı olmuştur. Burada da biyokimyasal incelemeler sadece hücre içinde melfalan birikiminde artış değil aynı zamanda in vivo plazma seviyesinde de artış gözlenmiştir . Etoposidin kalsiyum kanal blokörleri ile birlikte kullanılması sitotoksitesini doz bağımlı artırmıştır. Bu etki DNA sarmalındaki kırılmanın artırılması olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca vinkristine dirençli olduğundan bu hücrelerde etoposide karşı gelişen çapraz direnç tamamen ortadan kalkmaktadır (26, 50).

Siklosporin A ile yapılan çalışmalar genelde olumlu cevap vermiştir(37). 1989 yılında İngiltere 106 hastaya siklosporin+nifedipin verilmiş bunlardan 71 hastada nefrotoksitenin azaldığı gözlenmiştir. Hayvan deneyleri siklosporin A'nın böbrek damarlarında şiddetli vazokonstriksiyon yaptığını göstermiştir. Nifedipin; siklosporinin yaptığı renal vazokonstriksiyonu önlemede çok etkili bulunmuştur. Burada kalsiyum kanallarının bloke edilmesinin bir etkisi olup olmadığı net değildir. Ancak kültürde kalsiyum kanal blokörlerinin böbrek hücrelerinden siklosporin uptake'ni önlediğine dair bazı deliller bulunmuştur. Ayrıca verapamilin siklosporin A'nın kan konsantrasyonunu arttırdığı da gözlenmiştir.(37, 51, 43)

Sonuç olarak kemoterapide kalsiyum kanal blok6rleri kullanılmaya başlanmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ancak kalsiyum kanal blok6rlerinin kemoterap6tiklerin sitotoksik etkilerini attırıcı, toksitelerini azaltıcı ve direnç gelişimini 6nleyici katkılarının mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır.



6. SONUÇLAR

1. 15-30 mg/kg verapamil+0.2 mg/kg vinkristin uygulanan farelerin ortalama yaşam süreleri, hem kontrole, hem vinkristin ile kombine edilen verapamilin daha düşük dozlarına göre hem de diğer kalsiyum kanal blokörleri uygulanan (nifedipin+vinkristin, diltiazem+vinkristin) gruplara göre daha fazla uzadı.($p<0.01$)
2. 1 mg/kg nifedipin+0.2 mg/kg vinkristin uygulanan farelerin yaşam ortalama süreleri hem kontrole, hem vinkristin ile kombine edilen nifedipinin daha düşük dozlarına hem de diltiazem+vinkristin uygulanan gruplara göre daha fazla uzadı.($p<0.01$)
3. 12.5-25-50 mg/kg diltiazem+0.2 mg/kg vinkristin uygulanan farelerin yaşam süreleri ile kontrol grubu ile anlamlı farklılık saptanamadı.($p>0.05$)
4. 0.2 mg/kg vinkristin uygulanan farelerin böbreklerinin histopatolojik incelenmesinde medulla dahil tüm dokularda hiperemik kapiller ve kortekste aşırı dilate damar görünümünün yanı sıra glomerüllerde atrofi görülürken kalsiyum kanal blokörleri ile kombine edilen vinkristin uygulanan farelerde

böbrek yapısının normal olduğu görüldü. 0.2 mg/kg vinkristin+30 mg/kg verapamil uygulanması ile böbrek yapısının en iyi korunduğu belirlendi.

5. 0.2 mg/kg vinkristin uygulanan farelerin karaciğerlerinin histopatolojik incelenmesinde hafif dejeneratif değişiklikler görülürken, kalsiyum kanal blokörleri ile kombine edilen vinristin uygulanan farelerin karaciğerlerinde yapı normale yakındı. 0.2 mg/kg vinkristin+50 mg/kg diltiazem uygulanması ile karaciğer dokusunun normal olarak korunduğu görüldü.

6. Kemik iliğinin histopatolojik incelenmesinde 0.2 mg/kg vinkristin uygulanan farelerde eozinofili görülürken, 0.2 mg/kg vinkristin ile kombine edilen kalsiyum kanal blokörleri uygulanan farelerde eozinofili görülmedi.

7. 0.2 mg/kg vinkristin ile kombine edilen kalsiyum kanal blokörlerinin plazma renin aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel bir farklılık görülmedi.

8. 0.2 mg/kg vinkristin ile kombine edilen kalsiyum kanal blokörlerinin kan tablosu üzerine etkileri incelendiğinde hematokrit, ürik asit ve plazma kreatinin değerlerinin gruplar arasında istatistiksel bir farklılık oluşturmadığı belirlendi.

9. Lökosit sayıları incelendiğinde kontrol grubu ile 0.2 mg/kg vinkristin+30 mg/kg verapamil uygulanan farelerde diğer gruplara göre anlamlı fark vardı. (p<0.01)

10. Kemik iliği hücre sayıları incelendiğinde 0.2 mg/kg vinkristin uygulanan farelerde diğer gruplara göre anlamlı fark vardı. (p<0.01) Kalsiyum kanal blokörleri ile kombine edilen farelerde kemik iliği hücre sayısında bir azalma görülmedi.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. M. Marrow, R.B. Wart, R.A. Rosenthal, RL Gamelli. Verapamil enhances antitumor activity without increasing myloid toxicity. J. Surgery 1987 volume 101 January
2. Godfraind. T, Miller. R. , and Wibo: Calcium antagonism and calcium entry blockers. Pharmacology Review 1986. 38. s321-417
3. Brouwer. R. M, Follath F. and Bühler F. R. : Review of the cardiovascular adversity of the calcium antagonist-beta blocker combination: implications for antihypertensive therapy. J. Cardiovascular Pharmacology. 1985. 7. suppl. 4. s38-s44,
4. Hedner, T. : Calcium channel blockers. : spectrum of side effects and drug interactions. A. Pharmacology et Toxicology. 58 suppl. II, 119-130, 1986.
5. De vito. J. M. and B. Friedman: Evaluation of the pharmacodynamic and pharmacokinetic interaction between calcium antagonists and digoxin. Pharmacotherapy. 1986. 6. pp. 73,82
6. Baeyens. Interaction between calcium channel blockers and non cardiovascular drugs:interaction with anticancer drugs.Pharmacology and Toxicology 1988. 63, 1-7,
7. McCall, D. : Excitation-contraction coupling in cardiac and vascular smooth muscle:modification by calcium entry blockade. Circ,75(suppl V):1987. V3-14,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

8. S. K. Carter. Principles of cancer chemotherapy. 95-105, 1992 New Yourk, USA.
9. Kayaalp, O : Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Dördüncü baskı, Feryal matbaacılık, Farmakoloji 1990, cilt 1 960-1000,
10. E. Rubenstein Cancer growth and chemotherapy. Scientific American Medicine 12 Oncology V, 1978-1992
11. Murad, F. :Calcium Channel Blockers. In : Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th ed. Edited by A. G. Gilman, T. W. Rall, A. S. Nies and P. Taylor. Permagon Press1990, pp. 774-784
12. Gilmor R. F. and Zipes, D. P. : Slow inward current and cardiac arhythmias. American JournalCardiology. 1985, 55: 89B-101B,
13. Katz, A. M. : Basic celluler mechanisims of action of the calcium channel blockers. Am. J. Cardiology, 1985, 55: 2 B-9B,
14. Epstaein M. and Louthzenhiser R. D. : Effects of calcium antagonists on renal hemodynamics. Am. J. Kidney Disease.1990 4 (suppl. 1) :10-14.
15. Schrier R. W. , Arnold P. E. , Van Putten and Burke T. J. : Celluler calcium in ischemic acute renal failure:Role of calcium entry blockers. Kidney İnternational. 1987. 32: 313-321.
16. Nephrology VI Acute Renal Failure. S. American. Medicine 1992. 10. VI-22.
17. Kayaalp, O : Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 2. cilt. Dördüncü baskı, Feryal matbaacılık, 1988, s. 1158-1170
18. Murad, F. :Vincristin. In : Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th ed. Edited by A. G. Gilman, T. W. Rall, A. S. Nies and P. Taylor. Permagon Press, 1990,
19. Kayaalp Oğuz: Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji 3. cilt dördüncü baskı. Feryal Matbaacılık. 1988. s 2767-2782 28.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam ediyor)

20. De Vita VT. Jr. Young Corellos G. Combination versus single agent chemotherapy. Areview of the basis for selection of drug treatment of cancer. Cancer 1975, 35:98-110.21. Besarab A. et al. Mechanisms of hypercalcemia in malignancy. Cancer 41: 2276-2285, 1978
22. Tsuruo T. et al. Circumvention of vincristine and resistance in vitro and in vivo by calcium influx blockers. Cancer Res. Jun 1983, 43, 2905-2910
23. Tsuruo T. et al. Potentiation of vincristine and adriamycin effects in human hemopoietic tumor cell lines by calcium antagonists and caldulin inhibitors. Cancer. Res. May 1983, 43, 2267-2272,
24. Treatment of Children with Refractory Acute Lymphocytic Leukemia with VCR and diltiazem
25. L.Fedeli et al Pharmacokinetics of vinkristine in cancer patients treated with nifedipin. Cancer 64:1805-1811, 1989id with nifedipin. Cancer 1989, 64:1805-1811,
26. Yallowich J.C. Ross WE Verapamil İnduced augmentation of etoposide accumulation in L1210 cells in vitro Cancer Res 45:1651.1985.
27. Tsuruo T. et al. High calcium of pleotropic drug resistant P388 and K562 leukemic cells and chinese hamster ovary cells. Cancer Res. 44, 144-148, 1984.
- 28.Tsuruo T. Lida T sukgoishi S. Sakurai Y. Overcoming of vincristine resistance in :388 leukemia in vivo and vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil cancer Res 41:1967. 1981)
29. Kaba K. , Tani E. Marimura T. and Matsumoto: Potentiaton of vincristine effects in human and murine gliomas by calcium channel blockers or calmodulin inhibitors. J. Neurosurgery. 1985. 63: 905-911

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

30. Tsuruo T. Lida H Nagamma K et al. Promotion by verapamil of vincristine responsiveness in tumor cell lines interently resistant to the drug. *Cancer*. 43:808. 1981
31. Tsuruo T. , H. Lida, H. Kabwata, S. Tuskagoshi, Y. Sakurai High calcium content of pleiotropic drug-resistans P388 and K562 leukemic cell and chinese hamster ovary cells. *Cancer Res*. 44, 144-148. 1984
Reversal of acguired resistance to vinca alkaloids and antracycline antibiotics *Cancer Treat. Rep* 67, 889-891, 1983,
32. Marcum J. et al. Control of microtubule assembly-disassembly by Calcium depent regulator proteins.
33. Rogan AM. Hamilton TC, Young RC et al Reversal of adriamycin resistance by verapamil in human ovarian cancer. *Science* 224.9, 94.1984
34. LM Slater S.L. Murray, M. W. Wetzel et al Verapamil Restoration of Daunorubicin Responsiveness in dounorubicin resistant Ehrlich Ascites Carsinome *J. Clinic Invest* Volume 70. 1131-1134-1982
35. Friche E. et al. Effects of verapamil on daunorubycin accumulation in ehrlich ascites tumor cells. *Cl. Cancer Chemotherapy Pharmacol*. 19, 2. 40, 1987.
36. Uyar R. Metotraksat'in kemik iligindeki toksisitesinin verapamil ile önlenmesi. *Anadolu Tıp Dergisi*. 12, 29-39, 1990
37. Iana A. et al. Calcium entry blockage with verapamil in cyclosporine A plus ischemia induced acute renal failure in rats. *Eur. J. Pharmacolgy*. 64: 21-29, 1986
38. Pennock G. D. et el. Systemic toxic effects associated with high dose verapamil infusion and chemotherapy administration. *J. Nat. Cancer. Inst*. 16, 83(2), 105-110, Jan. 1991

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

39. Bessho F. et al. Treatment of children with refractory acute lymphocytic leukemia with vincristine and diltiazem. *Medical and Ped onkoloji* 1985
40. Myagana et al. Enhanced antitumor effect by combinatiwon use of CDDP and verapamil on murine implanted bladder tumor. *J. of Urology* 1988
41. Deray G. et al. Effects of nifedipin on cisplatinum-induced nephrotoxicity in rats. *Clinic. Nephrology* Vol. 30. 3, 146-150, 1988
42. Mickisch G. Role of calcium antagonists in the treatment of chemoresistant cancer of kidney. *J. Urology* 96(3), 121-127, 1990
43. Feehally J. et al. Does nifedipin ameliorate cyclosporine A nephrotoxicity. *B. Medical J.* 295-310, 1986
44. Masaru Miyazaki et. al. Enhancement of cytotoxicity of doxorubicin by Verapamil in the hepatic artery infusion for zLiver tumors in rats. *Cancer* 1993: 72: 349-54
45. Ker D. J. et al. The effect of verapamil on the pharmacokinetics of adriamycin. *Cancer chemotherapy pharmacology.* 18(3), 239-242, 1986
46. Solary E. P-glycoprotein expression and in vitro reversion of doxorubycin resistance by verapamil in clinical specimens from acute leukoemia and myeloma. *Leukemia.* 5(7), 592, Jul. 1991
47. Alexander A. Et al. Effect of verapamil and other agents on the distribution of antracyclines and reversal of drug resestance. *Cancer Res.* 47, 1421-1425, March 1987
48. Kartner N. Multi drug resistance in cancer. *Scientific Americana Medicine.* 26-33, 1989
49. Robinson B. A. ,R. D. Clutterbuck, J. L. Millar. Verapamil potentiation of melfelan cytotoxicity and cellüler uptake in murine fibrosarcoma and bone morrow: *Brit. Journal Cancer* , 52, 813-822, 1985.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

50. Yallowich J. C. , W.E. Ross: Potentiation of etoposide-induced DNA damage by calcium antagonism L1210 cells in vitro. Cancer Res. 44, 3360-3365, 1984.
51. Simpsom W. G., M. T. Tseng K. Verapamil enhancement of chemotherapeutic efficacy in human bladder cancer cells. J. Urology , 132, 574. 576, 1984.

