

Bilimsel Araştırma

Kanserli Hastalarda İdrar Poliamin Düzeylerine Kemoterapinin Etkisi

Meral HASIRCI (*)
Aysen KARAN (**)
Levent KARACA (*)

Özet: Putresin, spermidin ve spermin malignitenin ve kemoterapiye verilen cevabın bir göstergesi olabilme açısından ilgi çekmektedir.

Bu çalışmada 8 lenfoma ve 7 squamous hücreli kanser olgusunda kemoterapi öncesi ve sonrasında idrar putresin ve spermidin değerleri saptandı. Hasta grubunda tedavi öncesi idrar poliamin düzeyleri kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($P < 0.05$). Tedavinin onbeşinci gününde idrarla poliamin atılımının tedavi öncesinden daha da yüksek olduğu görüldü ($P < 0.05$). Bu bulgu kemoterapiye cevabın bir göstergesi olarak değerlendirildi.

Kemoterapiden bir ay sonra idrar poliamin düzeylerinde gözlenen azalmanın ise kısmi remisyonun bir işareti olarak kabul edilebileceği kanısına varıldı.

THE EFFECT OF CHEMOTHERAPY ON THE URINARY POLYAMINE LEVELS IN HUMAN CANCER PATIENTS

Summary: Putrescine, spermidine and spermine have attracted interest as possible markers of malignancy and of response to chemotherapy.

In this study urinary putrescine and spermidine values were determined in 8 patients with lenfoma and 7 patients with squamous cell

(*) Gülhane Askerî Tıp Akademisi ve Eğitim Hastanesi, Biyokimya Birimi, Etlik - Ankara.

(**) H. Ü. Eczacılık Fakültesi, Klinik Analiz Birimi, Hacettepe - Ankara.

carcinoma prior to and after chemotherapy. Pretreatment levels of urinary polyamines in the study group were significantly increased as compared to the controls ($P < 0.05$). The urinary excretion of polyamines fifteen days after the therapy were also greater than the pretreatment values ($P < 0.05$). These results were evaluated as an indicator of the response to chemotherapy.

Decreased levels in urinary polyamines were observed one-month after the initiation of chemotherapy. This might be considered as a sign of a partial remission.

GİRİŞ :

Poliaminler olarak da adlandırılan putresin ($\text{NH}_2 (\text{CH}_2)_4 \text{NH}_2$), spermidin ($\text{NH}_2 (\text{CH}_2)_4 \text{NH} (\text{CH}_2)_3 \text{NH}_2$) ve spermin ($\text{NH}_2 (\text{CH}_2)_3 \text{NH} (\text{CH}_2)_4 \text{NH} (\text{CH}_2)_3 \text{NH}_2$) hayvansal ve bitkisel dokularda yaygın olarak bulunan organik katyonlardır (1). Bu bileşiklerin hücre zarları, DNA ve RNA ile kompleks oluşturarak (1, 2), aminoasit - tRNA sentezini uyararak (3), DNA ligazı aktive ederek (4) hücre metabolizması üzerinde etkili oldukları öne sürülmüştür. 1971 yılında Russel (5) kanserli olgularda idrar poliamin düzeylerinin arttığını ortaya koymuş ve daha sonra, bu konuda yapılan çalışma sonuçlarını da gözden geçirerek bu özellikten kanser kinetiğinin izlenmesinde yararlanılabileceğini bildirmiştir (6).

Poliamin biyosentezinin düzenlenmesinin moleküler mekanizması ayrıntılı olarak açıklanmamış olmakla beraber poliaminlerin, özellikle hücre proliferasyonunda önemli rol oynadıkları kabul edilmektedir (7). Çeşitli kanser olgularında

beyin - omurilik sıvısında (8), serumda (9), idrarda (10, 11) poliamin düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Hücre dışı sıvılarda artan poliamin düzeylerinin başlıca kaynağının tümör hücreleri olduğu ve böylece, poliaminlerin tümörün büyümesini ve tümör hücresi ölümünü izlemede biyokimyasal işaretçi olabileceği ortaya konmuştur (6, 12 - 14).

Son yıllarda çalışmalar kanser olgularında uygulanan kemoterapinin hücre dışı sıvılarda artmış poliamin düzeylerine etkisinin araştırılması yönünde yoğunluk kazanmış (6, 14 - 16) ve kanserli hastalarda serum veya idrar poliamin düzeylerinin kemoterapiden önce ve kemoterapiden sonra ölçülerek tedavinin etkinliğinin ortaya konabileceği bildirilmiştir (7).

Bu çalışmada, kanser olgularında idrar poliamin düzeylerini saptamak üzere olanaklarımıza uygun bir yönteme işlerlik kazandırılması ve uygulanan kemoterapinin idrar poliamin düzeyine etkisini araştırarak yayınlarla karşılaştırılması ve

böylece klinik çalışmalara katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hasta ve kontrol grubunu oluşturanlar: Hasta grubunu G.A.T.A. Eğitim hastanesinde lenfoma veya «squamous» hücreli kanser tanısı konan ve kemoterapi uygulanması planlanan 8'i erkek 15 hasta oluşturmaktadır. Hastaların yaş ortalaması 40.7 ± 3.3 'dür. Kemoterapi için lenfomalı hastalarda endoksan (200 mg/m^2 , 1-5 gün, I.V.), onkovin (1.4 mg/m^2 , 1. gün I.V) ve prednizon (60 mg/m^2 , 1-5 gün, P.O.) kullanılmıştır; «squamous» hücreli hastalarda ise aynı dozda ve sürede uygulanan endoksan ile onkovin yanısıra metotraksat (20 mg/m^2 , 1. ve 4. gün, I.V.) da kullanılmıştır. Çalışma materyeli olan idrar örnekleri her hastadan sabah idrarı olarak (17) kemoterapi öncesinde, kemoterapiye başladıktan yaklaşık onbeş gün sonra (kemoterapi ortası) ve bir ay sonra üç ayrı örnek halinde sağlanmıştır.

Kontrol grubunu yaş ortalaması 41.0 ± 4.0 olan, 10'u erkek 15 sağlıklı kişi oluşturmaktadır. Her iki grupta da idrar örnekleri alınırken kişilerde herhangi bir enfeksiyon durumunun bulunmamasına (10) ve kadınların menstürasyon döneminde olmamalarına (17) özen gösterilmiştir.

İdrarda poliaminlerin analizi:

Hastalardan ve kontrollardan sağlanan idrarlarda poliaminlerden ikisi,

putresin ve spermidin ölçüldü, spermin ölçümüne ise çalışmamızda yer verilmedi. Çünkü sperminin bazı kadın idrarında bulunmadığı (10) ve bazı kanser olgularında ise idrar spermin değerinde bir artış gözlenmediği (14) bildirilmektedir. İdrar örnekleri santrifüj edildikten sonra milipor filtreden ($0.22 \mu\text{m}$) süzüldü (18) ve aynı gün idrarlarda kreatinin miktarları saptandı (19). Putresin ve spermidin analizi yapılacak örnekler ise, analiz gününe kadar -20°C 'de saklandı (18).

İdrardaki putresin ve spermidin miktarları Östenberg ve diğ. (17) nin yönteminde bazı ufak değişiklikler yapılarak ölçüldü. Bu yöntem idrarın sıcakta, asit ile hidrolizi sonucu idrardaki konjuge poliaminlerin serbest hale geçmesi ve fluorensans veren dansil türevlerine çevrildikten sonra ince tabaka kromatografisi ile ayırımları esasına dayanır. Kromatografi çalışmalarında ince tabaka kromatografi plakları (TLC plates silica gel 60 F₂₅₄, 10×20 , Merck) kullanıldı.

Putresin dihidroklorür (Sigma) ve spermidin trihidroklorür (Sigma) den iki farklı derişimde hazırlanan standart çözeltilere, hidroliz sonrasında idrarlara uygulanan işlemler aynen uygulandı ve her plağa idrar örnekleri ile birlikte bu standartlar da tatbik edildi. Plaklarda oluşan poliamin lekelerinin fluorensans şiddeti «scanner» ve kaydedici ile donatılmış spektrofotometre (Camag TLC Scanner and Spectrophotofluorometer Model III, Camag

WW recorder 1100) yardımı ile saptandı. İdrar örneklerindeki putresin ve spermidin miktarları idrar kreatininin değerleri gözönüne alınarak μS poliamin/mg kreatinin olarak ifade edildi. Sonuçlar temel istatistik yöntemler ile değerlendirildi (20).

BULGULAR

Hasta grubunu oluşturanlarda henüz kemoterapiye başlanmadan önce, tedaviye başlandıktan onbeş gün sonra ve bir ay sonra alınan idrar örneklerinde yapılan spermidin ve putresin analizi sonuçları topluca tablo 1'de, aynı parametrelere ilişkin kontrol grubu sonuçları ise Tablo 2'de sunulmaktadır. Tablo 3'te kontrol grubundaki ve hasta grubunda tedaviye başlanmadan önce elde edilen sonuçların ortalama değerleri ve bu ortalamalar arasındaki farkların önem kontrolü analizi sonuçları verilmektedir. Hasta grubunda kemoterapi sonrası ölçülen idrar poliamin ortalama değerleri ise, kemoterapi öncesi değerlerle birlikte tablo 4'te gösterilmektedir.

Hastalara uygulanan kemoterapinin idrarla atılan poliamin düzeyleri üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere iki eş arasındaki farkın önemlilik testi uygulanmıştır. Spermidin için kemoterapi öncesi ve ortası arasındaki ortalama fark 7.54 ± 1.75 ($P < 0.05$), kemoterapi ortası ve birinci ayın sonu arasındaki ortalama fark 8.64 ± 2.21 ($P < 0.05$) ve kemoterapi öncesi ve birinci ayın

sonu arasındaki fark ise 1.07 ± 0.75 ($P > 0.05$) bulunmuştur.

Putresin için yapılan analizler sonunda kemoterapi öncesi ve ortası arasındaki ortalama fark 6.49 ± 1.47 ($P < 0.05$), kemoterapi ortası ve birinci ay sonunda 7.75 ± 2.02 ($P < 0.05$) ve kemoterapi öncesi ve birinci ayın sonundaki ortalama fark ise 1.25 ± 1.05 ($P > 0.05$) olarak hesaplanmıştır.

İdrardaki putresin ve spermidin değerleri arasındaki ilişki hasta ve kontrol grubunda ayrı ayrı incelenmiştir. Kontrol grubunda bu iki parametre arasında anlamlı pozitif bir ilişki ($r=0.56$, $P < 0.05$) olduğu anlaşılmıştır. Hasta grubunda da kemoterapi öncesinde kuvvetli bir ilişki saptanmıştır ($r=0.910$, $P < 0.05$). İdrar putresin ve spermidin değerleri arasındaki bu anlamlı pozitif ilişki kemoterapi ortasında ($r=0.950$, $P < 0.05$) ve kemoterapiye başlandıktan 1 ay sonra da ($r=0.950$, $P < 0.05$) önemini korumuştur.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Poliaminlerin kan ve idrar düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon bulunduğu belirtildiğinden bu araştırmada yalnızca idrar poliamin düzeylerinin saptanmasının yeterli olacağı düşünülmüştür (6, 13, 16).

Çalışmamıza benzer şekilde ince tabaka kromatografisi ile yapılan ve kreatinin üzerinden ifade edilen analiz sonuçlarına göre normal kişilerde idrar spermidin değerlerinin $2 \mu\text{S}/\text{mg}$ kreatinin ve putresin de-

Tablo 1. Hasta Grubunu Oluşturanlarda Kemoterapi Öncesi ve Sonrası Saptanan İdrar Spermidin ve Putresin Değerleri

Sıra No.	Spermidin ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Kreatinin)			Putresin ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Kreatinin)		
	Kemoterapi öncesi	Kemoterapi ortasında	Kemoterapiden 1 ay sonra	Kemoterapi öncesi	Kemoterapi ortasında	Kemoterapiden 1 ay sonra
1	6.1	8.3	5.5	8.5	9.2	7.1
2	2.2	6.6	3.2	4.1	8.2	4.5
3	8.6	29.6	4.8	10.4	18.5	6.3
4	12.3	35.3	5.2	18.9	36.8	8.7
5	3.3	11.6	3.0	10.8	15.6	8.9
6	2.8	9.1	3.8	8.9	11.7	9.0
7	2.1	6.1	2.9	4.4	9.5	5.9
8	16.4	28.9	14.2	20.3	38.6	19.5
9	8.7	13.3	10.2	10.7	18.7	15.4
10	9.1	14.3	6.9	16.8	20.5	13.7
11	22.8	31.7	20.3	28.4	39.9	25.3
12	27.6	24.8	22.5	30.8	28.4	25.1
13	17.4	21.8	22.0	20.8	25.3	27.8
14	10.2	17.0	9.6	15.4	21.3	13.8
15	8.5	12.8	7.9	9.7	14.1	9.0

ğerlerinin 5 µg/mg kreatinin'in altında olduğu bildirilmiştir (7). Kontrol grubumuzu oluşturanlarda saptanan derişimler bildirilen bu normal değerlere büyük ölçüde uygunluk göstermektedir (Tablo 2). Hasta grubunda tedavi öncesi ölçülen idrar spermidin ve putresin değerleri bildirilen normal değerlerin üzerindedir (Tablo 1). Heriki grubun ortalama değerleri arasında anlamlı bir fark bulunduğu Tablo 3'de görülmektedir. Bu bulgu yayınlarda bildirilen sonuçlara uymaktadır (10, 14, 18-21). Kanseri hastalarda idrar poliaminlerinde gözlenen bu yüksek değerler kanser hücrelerinin poliamin içeriğinin ve aynı za-

manda kanserli dokulardaki hücre kaybının fazla oluşu ile açıklanmaktadır (6).

Tablo 1 incelendiğinde uygulanan kemoterapinin incelediğimiz kanser olgularındaki idrar poliamin düzeylerinde değişikliğe yol açtığı anlaşılmaktadır. Kemoterapi uygulamasından onbeş gün sonra (kemoterapi ortası) idrardaki spermidin ve putresin değerleri kemoterapi öncesine göre daha yüksektir ve heriki parametre için ortalama değerler arasındaki fark anlamlıdır (Tablo 4). Farklı türdeki hematolojik kanser (lösemiler, miyeloma, Hodgkin vb.) ve solid kanser (mide, akciğer kanserleri vb.) olgularında yapılan

Tablo 2. Kontrol Grubunu Oluşturanlarda Saptanan İdrar Spermidin ve Putresin Değerleri

Sıra No.	Spermidin (µg/mg kreatinin)	Putresin (µg/mg kreatinin)
1	0.8	2.8
2	0.7	1.5
3	1.8	2.1
4	2.4	3.1
5	2.1	4.8
6	1.2	2.7
7	1.5	3.8
8	2.5	5.5
9	1.8	5.1
10	0.7	2.9
11	1.5	3.3
12	1.8	2.1
13	2.1	5.4
14	1.6	4.9
15	1.1	3.7

çalışmalarda, uygulanan kemoterapötik ilacın cinsine bağlı olmaksızın, tedaviye cevap olarak fizyolojik sıvılardaki poliaminlerde artış gözlemlendiği bildirilmektedir (6, 13, 16). Deney hayvanlarında yapılan çalışma sonuçları (22, 23) da gözönüne alınarak poliaminlerin tümörün büyümesini ve tümör hücre ölümünü izlemedeki biyokimyasal işaretçi rolünün mekanizması açıklanmaya çalışılmıştır (6). Bu açıklamaya göre, tümör hücresi çoğaldıkça hücreler içinde poliamin düzeyleri de artar; spontan hücre kaybı nedeniyle belirli bir değer gösteren serum ve idrar poliamin miktarları da, kemoterapi veya radyasyon tedavisi sonucunda artan tümör hücresi ölü-

müne bağlı olarak önemli artışlar gösterir.

Bu mekanizmaya göre hastaların tam veya kısmi remisyona girmesi durumunda idrar poliamin düzeylerinde bir azalma beklenmelidir (6). Hastalara kemoterapi uygulanmasından bir ay sonra yapılan analizler, ortalama poliamin değerlerinin kemoterapi ortasında saptananlardan anlamlı bir fark gösterdiğini orta koymuştur (Tablo 4). Kemoterapiden bir ay sonra idrar poliamin düzeyleri başlangıç değerlerine yaklaşmakta ve kemoterapi öncesi ile bir ay sonrası ortalama değerler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Tablo 4). Bu bulguları birarada değerlendirdiğimizde kemoterapi-

Tablo 3. Hasta Grubunda (Kemoterapiden Önce) ve Kontrol Grubunda Ölçülen İdrar Spermidin ve Putresin Değerlerinin Karşılaştırılması

Yapılan Analiz	Hasta grubu (tedavi öncesi)	Kontrol grubu	İki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi
	X ± S.H. (n)	X ± S.H. (n)	
Putresin	14.59 ± 2.08 (15)	3.58 ± 0.33 (15)	P < 0.05
Spermidin	10.54 ± 1.97 (15)	1.57 ± 0.15 (15)	P < 0.05

Tablo 4. Hastalara Uygulanan Kemoterapinin İdrar Poliamin Düzeylerine Etkisi

Yapılan Analiz	Kemoterapi öncesi	Kemoterapi ortasında	Kemoterapiden 1 ay sonra
	X ± S.H. (n)	X ± S.H. (n)	X ± S.H. (n)
Spermidin	10.54 ± 1.97 (15)	18.08 ± 2.54 (15)	9.47 ± 1.81 (15)
Putresin	14.59 ± 2.08 (15)	21.09 ± 2.76 (15)	13.33 ± 1.99 (15)

pinin ortasında poliaminlerde gözlenen artışı, tedavinin etkili olduğu şeklinde yorumlayabiliriz. Kemoterapiden bir ay sonra idrar poliaminlerinde görülen azalma ise, yayınlarda belirtilen açıklamaların ışığında, kısmi remisyona bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Hastaları bir aydan daha uzun bir süre izleyerek, idrar poliaminlerindeki azalmanın boyutlarına göre, uygulanan kemoterapinin tam remisyona sağladığı başarısının da ortaya konabileceği kanısındayız.

Çalışmanın sonuçları şu şekilde özetlenebilir :

1. Kanserli hastalarda kemoterapi öncesi idrar poliamin değerlerinin kontrollardan yüksek oluşu, idrar poliamin düzeylerinin kanser tanısı koymada yardımcı bir test olabileceği görüşünü desteklemektedir.

2. Kemoterapinin idrar poliamin düzeylerinde yol açtığı değişiklikleri izleyerek uygulanan tedavinin etkinliğini saptamanın mümkün olabileceği bu çalışmada da gösterilmiş olup, bu yolla değişik kemoterapötik ajanların etkilerinin karşılaştırılması da düşünülebilir.

3. Putresin ve spermidin değerleri arasında hem hasta hem de kontrol grubunda görülen pozitif korelasyon, incelediğimiz kanser türleri için, ikisinin birden çalışılmayacağı durumlarda yalnızca birinin analiz edilmesinin de yeterli olabileceğini göstermektedir.

4. Uyguladığımız yöntem duyarlı fakat zaman alıcı bir yöntemdir. Günlük işlemler arasında kanser tanısı koyma, tedaviyi izleme açısından poliamin tayinlerinden yararlanma düşünüldüğünde analizlerin, olanak var ise, bir amino asit analizörü ile yapılmasının daha uygun olacağı önerilebilir.

(Geliş Tarihi : 11.5.1982)

KAYNAKLAR

1. Bachrach, U., *Function of Naturally Occuring Polyamines*, Academic Press, New York and London, 1973.
2. Ikemura, T., «The relation between the strong binding of spermine to polynucleotides and conformation of polynucleotides», *Biochem. Biophys. Acta.* 195, 389 - 395, 1969.
3. Igarashi, K., Takeda, Y., «Polyamines and protein synthesis. VI. Role of spermine in aminoacyl-tRNA formation», *Biochem. Biophys. Acta.* 213, 240 - 243, 1970.
4. Teraoka, H., Tsukada, K., «Activation of mammalian DNA ligase by polyamines», *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 638 - 643, 1980.
5. Russel, D.H., «Increased polyamine concentrations in the urine of human cancer patients», *Nature*, 233, 144 - 145, 1971.
6. Russel, D.H., «Clinical relevance of polyamines as biochemi-

- cal markers of tumor kinetics», *Clin. Chem.*, 23, 22 - 27, 1977.
7. Janne, J., Pösö, H., Raina, A., «Polyamines in rapid growth and cancer», *Biochem. Biophys. Acta.* 473, 241 - 293, 1978.
 8. Marton, L.J., Heby, O., Levin, V.A., Lublich, W.P., Grafts, D.C., Wilson, C.B., «The relationship of polyamines in cerebrospinal fluid to the presence of central nervous system tumours», *Cancer Res.*, 36, 973 - 977, 1976.
 9. Nishioka, K., Romsdahl, M.M., «Elevation of putrescine and spermidine in sera of patients with solid tumors», *Clin. Chim. Acta*, 57, 155 - 161, 1974.
 10. Dreyfuss, F., Chayen, R., Dreyfuss, G., Dvir, R., Ratan, J., «Polyamine excretion in the urine of cancer patients», *Israel J. Med. Sci.*, 11, 785 - 795, 1975.
 11. Townsend, R.M., Banda, P.W., Marton, L.J., «Polyamines in malignant melanoma: Urinary excretion and disease progress», *Cancer*, 38, 2088 - 2092, 1976.
 12. Harik, S.I., Sutton, C.H., «Putrescine as a biochemical marker of malignant brain tumors», *Cancer Res.*, 39, 5010 - 5015, 1979.
 13. Heby, O., Andersson, G., «Tumor cell death: The probable cause of increased polyamine levels in physiological fluids», *Acta path. microbiol. scand., Sect. A*, 86, 17 - 20, 1978.
 14. Russel, D.H., Durie, B.G.M., Salmon, S.E., «Polyamines as predictors of success and failure in cancer chemotherapy», *Lancet*, 2, 797 - 799, 1975.
 15. Fujita, K., Nagatsu, T., Marute, K., Ito, M., Senba, H., Miki, K., «Urinary putrescine, spermidine, and spermine in human blood and solid cancers and in an experimental gastric tumor of rats», *Cancer Res.*, 36, 1320 - 1324, 1976.
 16. Durie, B.G.M., Salmon, S.E., Russel, D.H., «Polyamines as markers of response and disease activity in cancer chemotherapy», *Cancer Res.*, 37, 214 - 221, 1977.
 17. Östenberg, S., Rosen, S., Heby, O., «Urinary polyamine excretion during the menstrual cycle», *Clin. Chem.*, 24, 769 - 771, 1978.
 18. Fleisher, J.H., Russel, D.H., «Estimation of urinary diamines and polyamines by thin-layer chromatography», *J. Chromatogr.*, 110, 335 - 340, 1975.
 19. Özkurt, Ş., *Laboratuvar Metotları*, GATA Basımevi, Ankara, 52 - 53, 1975.
 20. Sümbüloğlu, K., *Sağlık Bilimlerinde Araştırma Teknikleri ve İstatistik*, Çağ Matbaası, Ankara, 1978.

21. Heby, O., Andersson, G., «Simplified micro-method for the quantitative analysis of putrescine, spermidine and spermine in urine», **J. Chromatogr.**, 145, 73-80, 1978.
22. Russel, D.H., Gullino, P.M., Marton, L.J., LeGendre, S.M., «Polyamine depletion of the MTW9 mammary tumor and subsequent elevation of spermidine in the sera of tumor-bearing rats as a biochemical marker of tumor regression», **Cancer Res.**, 34, 2378 - 2381, 1974.
23. Russell, D.H., Loon, W.B., Kovacs C.J., Hopkins, H.A., Dattilo, J.W., Morris, H.P., «Changes in serum putrescine and spermidine levels following local radiation to hepatoma 3924A of the rat», **Cancer Res.**, 36, 420-423, 1976