

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI

**ASETİL L-KARNİTİN’İN DENEYSEL SİSPLATİN  
NEFROTOKSİSİTESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Özlem TÜFEKÇİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**İZMİR - 2009**

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI

**ASETİL L-KARNİTİN'İN DENEYSEL SİSPLATİN  
NEFROTOKSİSİTESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Özlem TÜFEKÇİ**

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ**

**Prof. Dr. Nur OLGUN**

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 2007 KB SAG 22 sayı  
ile desteklenmiştir.

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim, tez konumun seçilmesi ve çalışmalarımın yürütülmesinde destek ve katkılarını esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Nur OLGUN'a; eğitim süresince yetişmemde emeği olan Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hale Ören ve tüm anabilim dalı öğretim üyelerine; tezimin hazırlanma sürecinde yardım ve desteğini esirgemeyen Yard. Doç. Dr. Dilek GÜNEŐ'e, Doç. Dr. Alper Soylu'ya; Deney Hayvanları Laboratuvarı öğretim üyesi Prof. Dr. Osman Yılmaz'a ve araştırma görevlisi Efsun Kolatan'a; Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Candan Özoğul'a ve diğer araştırma görevlilerine; Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Safiye AktaŐ'a, doktora öğrencileri Dr. Zekiye Altun ve Dr. Zübeyde Erbayraktar'a en içten teşekkürlerimi sunar; eğitim sürecimin her döneminde bana güç ve destek veren aileme ve çalışma arkadaşlarıma ayrıca teşekkür ederim.

Dr. Özlem TÜFEKÇİ

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Araştırma Görevlisi

İzmir 2009

## İÇİNDEKİLER

İçindekiler	I-III
Tablolar Dizini	IV
Şekiller Dizini	V
Resimler Dizini	VI-VII
Kısaltmalar	VIII
Özet	1
Summary	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1 Sisplatin	7
2.1.1 Sisplatinin moleküler yapısı özellikleri	8
2.1.1.1 Sisplatinin hücre içine alınışı	8
2.1.1.2 Biyotransformasyon ve DNA bağlarının oluşması	9
2.1.2 Sisplatin farmakokinetiği	10
2.1.3 Sisplatin toksisitesi	11
2.1.4 Sisplatin nefrotoksisitesi	13
2.1.4.1 Sisplatin nefrotoksisitesi patogenezi	13
<i>Sisplatinin böbrek hücreleri tarafından hücre içine alınışı</i>	14
<i>Sisplatin metabolizması</i>	16
<i>Sisplatin nefrotoksisitesinde mekanizmalar</i>	16
<i>Sisplatin nefrotoksisitesinde hücre ölümü: Nekroz, apoptoz</i>	17
<i>Sisplatin nefrotoksisitesinde apoptotik yollar</i>	18
<i>Sisplatin nefrotoksisitesinde oksidatif stres</i>	21
<i>Sisplatin nefrotoksisitesinde hipoksi ve mitokondriyal hasar</i>	23
<i>Sisplatin nefrotoksisitesinde inflamasyon</i>	23
<i>Sisplatin nefrotoksisitesinde fibrozis</i>	23
<i>Böbrekte sisplatine bağlı patofizyolojik etkiler</i>	24
<i>Sisplatin nefrotoksisitesinde histopatolojik değişiklikler</i>	25
2.1.4.2 Sisplatin nefrotoksisitesinin önlenmesi	26
<i>Atılım ve metabolizma</i>	26
<i>Hücre sel alım</i>	27

<i>Intraselüler dağılım</i>	28
<i>Antioksidan ilaçlar</i>	28
<i>Sinyal iletimi</i>	29
<i>Antiinflamatuvar ilaçlar</i>	29
2.1.4.3 Sisplatin nefrotoksisite tedavisi	29
2.2 Karnitin	30
2.2.1 Karnitin ve asetil L-karnitin: Biyosentez, fizyolojik rol, metabolizma	30
2.2.2 Karnitin: Antioksidan, antiapoptotik ve immünmodulator özellikleri	32
2.2.3 Karnitin: Primer ve sekonder eksiklik kullanım alanları	34
2.2.4 Karnitin ve kanser	34
2.2.5 Karnitin ve sisplatin	35
3.GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1 Deney hayvanları	36
3.2 Deney hayvanları grupları	36
3.3 Sıçanlara anestezi uygulanması	36
3.4 Sıçanlardan kan örneklerinin alınması	36
3.5 Sıçanların serum kreatinin düzeylerinin ölçülmesi	37
3.6 Sıçanların 24 saatlik idrarların toplanması ve hacim değerlendirmeleri	37
3.7 Sıçanların 24 saatlik idrarda kreatinin düzeylerinin ölçülmesi	37
3.8 Sıçanlarda GFR hesaplanması	38
3.9 Sıçanların 24 saatlik idrarda total L-karnitin düzeyinin ölçülmesi	38
3.10 Sisplatin	38
3.11 İntraperitoneal sisplatin veya serum fizyolojik uygulamaları	39
3.12 Asetil L-karnitin	40
3.13 Subkütan asetil L-karnitin veya serum fizyolojik uygulamaları	40
3.14 Hidrasyon	40
3.15 Grupların oluşturulması ve çalışmanın yürütülmesi	41
3.16 Sıçanların feda edilmesi, kan örneği alınması, her iki böbreğin cerrahi olarak çıkarılması	43
3.17 Böbrek doku homojenizasyonu	44
3.18 Örneklerde protein düzeylerinin belirlenmesi	45
3.19 Lipid peroksidasyonunun TBARS yöntemi ile belirlenmesi	45
3.20 Histopatolojik inceleme	45

3.20.1 Işık mikroskobi ile inceleme	45
3.20.2 İmmünfloresan mikroskobi ile inceleme	45
3.20.3 Elektron mikroskobi ile inceleme	46
3.21 Apoptotik hücre ölümünün saptanması	46
3.22 Kaspaz 3,8 ve 9 aktivite düzeylerinin belirlenmesi	47
3.23 İstatistiksel değerlendirme	47
4. BULGULAR	48
4.1 Grupların 24 saatlik idrar volümleri, serum kreatinin, GFR ve 24 saatlik idrar total L-karnitin/kreatinin değerleri	48
4.1.1 Çalışma başlangıcında elde edilen ortalama 24 saatlik idrar volümleri, serum kreatinin ve GFR değerleri	48
4.1.2 Çalışmanın üçüncü gününde elde edilen ortalama 24 saatlik idrar volümleri, serum kreatinin, GFR ve 24 saatlik idrarda total L- karnitin/kreatinin değerleri	49
4.1.3 Çalışmanın başlangıcında ve üçüncü gününde elde edilen ortalama 24 saatlik idrar volümlerinin, serum kreatinin ve GFR değerlerinin karşılaştırılması	51
4.2 Böbrek dokusunda TBARS yöntemi ile elde edilen MDA/protein oranları	52
4.3 Böbrek dokularının histopatolojik inceleme sonuçları	52
4.3.1 Böbrek dokularının ışık mikroskobi inceleme sonuçları	52
4.3.2 Böbrek dokularının elektron mikroskobi inceleme sonuçları	58
4.3.3 Böbrek dokularının immünfloresan mikroskobi inceleme sonuçları	61
4.4 Böbrek dokularında saptanan apoptotik hücre ölümü	63
4.5 Böbrek dokularında belirlenen kaspaz 3,8,9 aktivite düzeyleri	65
5. TARTIŞMA	69
6. SONUÇLAR	76
7. KAYNAKLAR	77

## TABLULAR DİZİNİ

No	Başlık	Sayfa
1	Sisplatinin kimyasal özellikleri	8
2	Sisplatine ait farmakokinetik özellikler	10
3	Sisplatine bağlı istenmeyen etkiler	12
4	Sisplatin metabolizması ve toksisiteye neden olan olaylar	24
5	Sıçan gruplarının çalışma başlangıcındaki ortalama serum kreatinin değerleri	48
6	Sıçan gruplarının çalışma başlangıcındaki ortalama GFR değerleri	49
7	Sıçan gruplarının çalışmanın üçüncü günündeki ortalama 24 saatlik idrar volümleri	49
8	Sıçan gruplarının çalışmanın üçüncü günündeki ortalama serum kreatinin değerleri	50
9	Sıçan gruplarının çalışmanın üçüncü günündeki ortalama GFR değerleri	50
10	Sıçan gruplarının çalışmanın üçüncü günündeki 24 saatlik idrar total L-karnitin/kreatinin değerleri	51
11	Gruplardaki sıçanların immünfloresan mikroskopi ile inceleme sonuçları	62
12	Sıçan gruplarının apoptoz skorları	64

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>No</b>	<b>Başlık</b>	<b>Sayfa</b>
1	Sisplatinin moleküler yapısı	8
2	Sisplatinin DNA ile oluşturduğu bağlar	9
3	Sisplatine bağlı sık görülen toksisiteler	11
4	Sisplatin nefrotoksitesinde patofizyolojik olaylara genel bir bakış	14
5	Nefronun kısımları	15
6	Sisplatine bağlı akut tübüler hücre hasarında yer alan başlıca yolaklar	17
7	Renal tübüler hücrelerde sisplatine bağlı gelişen apoptotik yolaklar	19
8	Hücrede sisplatine bağlı gelişen apoptoz ve apoptotik yolakların tümü.	22
9	Karnitinin moleküler yapısı	30
10	Asetil L-karnitinin moleküler yapısı	30



## RESİMLER DİZİNİ

No	Başlık	Sayfa
1	Bir sıçanın feda edilme işlemi sırasında abdominal venden kan alınması	37
2	Bir sıçanın anestezi altında intraperitoneal infüzyonla sisplatin infüzyonu alması	39
3	Aynı gruptaki dört sıçanın perfüzör makineleri aracılığı ile sisplatin infüzyonu almaları	39
4	Bir sıçana gluteal bölgeden subkütan asetil L-karnitin uygulaması	40
5	Bir sıçanın feda edildikten sonra böbrek dokusunun çıkarılması	44
6	Grup I'e (kontrol grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskopi ile incelenmesi	53
7	Grup I'e (kontrol grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskopi ile incelenmesi (Hematoksilen-eosin)	53
8	Grup II'ye (asetil L-karnitin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskopi ile incelenmesi (Hematoksilen-eosin)	54
9	Grup II'ye (asetil L-karnitin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskopi ile incelenmesi (Hematoksilen-eosin)	54
10	Grup III'e (sisplatin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskopi ile incelenmesi (Hematoksilen-eosin)	55
11	Grup III'e (sisplatin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskopi ile incelenmesi (Hematoksilen-eosin)	55
12	Grup IV'e (sisplatin+ asetil L-karnitin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskopi ile incelenmesi (Hematoksilen-eosin)	56
13	Grup I'e (kontrol grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskopi ile incelenmesi (PAS)	56
14	Grup II'ye (asetil L-karnitin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskopi ile incelenmesi (PAS)	57
15	Grup III'e (sisplatin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskopi ile incelenmesi (PAS)	57
16	Grup IV'e (sisplatin+asetil L-karnitin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskopi ile incelenmesi (PAS)	58
17	Grup I'e (kontrol grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin elektron mikroskopi ile incelenmesi	59

18	Grup II'ye (asetil L-karnitin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin elektron mikroskopi ile incelenmesi	59
19	Grup III'e (sisplatin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin elektron mikroskopi ile incelenmesi	60
20	Grup IV'e (sisplatin+asetil L-karnitin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin elektron mikroskopi ile incelenmesi	60
21	Gruplarda TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücreler	63
22	Kaspaz 3 bulguları	66
23	Kaspaz 8 bulguları	67
24	Kaspaz 9 bulguları	68

## KISALTMALAR

AIF: Apoptoz indükleyici faktör '*apoptosis inducing factor*'

AK: Açilkarnitin

ATM: Ataksi telanjiektazi mutasyona uğramış protein '*ataxia telangiectasia mutated protein*'

ATR: ATM ve Rad3 ilişkili protein '*ATM and Rad3 related protein*'

BDMA: Benzil dimetil amin

BUN: Kan üre nitrojeni

CRP: C-reaktif protein

CTR 1: Bakır transport proteini 1 '*copper transporter 1*'

DAB: Diaminobenzidin

DDSA: Dodesil süksinik anhidrit

ER: Endoplazmik retikulum

ERK: Ekstraselüler regüle kinaz

GFR: Glomerüler filtrasyon hızı

G6PD: Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz

HIF: Hipoksi indüklenebilir faktör '*hypoxia inducible factor*'

HIV: İnsan immün yetmezlik virüsü '*human immunodeficiency virus*'

JNK/SAPK: Jun N-terminal kinaz/stres aktive protein kinaz

KAT: Karnitin asetil transferaz

KoA: Koenzim A

MAPK: Mitojen aktive protein kinaz '*mitogen activated protein kinase*'

MDA: Malondialdehid

NO: Nitrik oksid

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz SAM: S-adenozil metiyonin

OCT: Organik katyon transport proteini '*organic cation transporter*'

PAS: '*Periodic asid-schiff*'

PLC: Propiyonil L-karnitin

ROS: Reaktif oksijen türleri

SK: Serbest karnitin

TBARS: Tiyobarbitürik asit reaktif madde

TNF- $\alpha$ : Tümör nekroz faktör-  $\alpha$

TNFR: Tümör nekroz faktörü reseptörü

TUNEL: '*Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling*'

## ÖZET

### ASETİL L-KARNİTİN'İN DENEYSEL SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

**Amaç:** Sisplatin nefrotoksitesi oluşturulmuş sıçanlarda asetil L-karnitinin nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkisinin araştırılması

**Gereçler ve yöntem:** Wistar Albino türü 28 adet dişi sıçanın oluşturduğu dört grup çalışmaya alındı. Çalışma başlangıcında tüm sıçanlarda serum kreatinin, 24 saatlik idrar volümü ve 24 saatlik idrarda kreatinin değerleri ölçüldü. Çalışmanın ilk gününde birinci gruba bir saat intraperitoneal serum fizyolojik infüzyonu, ikinci gruba subkütan asetil-L karnitin (200 mg/kg) injeksiyonu sonrasında bir saat intraperitoneal serum fizyolojik infüzyonu, üçüncü gruba bir saat intraperitoneal sisplatin (16 mg/kg/doz) infüzyonu, dördüncü gruba ise subkütan asetil-L karnitin injeksiyonu (200 mg/kg) sonrasında bir saat intraperitoneal sisplatin (16 mg/kg) infüzyonu uygulandı. Çalışmanın ikinci ve üçüncü günlerinde ikinci ve dördüncü gruplara subkütan asetil L-karnitin uygulaması, diğer gruplara da aynı hacimde serum fizyolojik uygulamaları yapıldı. Çalışmanın üçüncü günü 24 saatlik idrar volümleri toplanan tüm sıçanlar dördüncü gün serum örnekleme yapılarak feda edildi ve böbrek dokuları biyokimyasal inceleme, ışık mikroskopi, immünfloresan mikroskopi ve elektron mikroskobik inceleme için ayrıldı.

**Bulgular:** Sisplatin ve sisplatin+L-karnitin uygulanan gruplarda üçüncü gün ortalama serum kreatinin değeri başlangıç değerlerine göre yüksek bulundu; iki grubun karşılaştırmasında ise sisplatin grubundaki ortalama serum kreatinin değeri sisplatin+asetil L-karnitin uygulanan gruba göre daha yüksekti. Üçüncü gün toplanan idrarlardan elde edilen idrar total L-karnitin/kreatinin oranları, sisplatin uygulanan grupta en düşük olup; asetil L-karnitin uygulanan kontrol grubuna göre azalmış bulundu. Böbrek dokularının histopatolojik değerlendirmesinde ışık mikroskobide sisplatin uygulanan grupta peritübüler intersitisyel hücre proliferasyonu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, proksimal tübüllerde hücresel deskuamasyon, bazı proksimal tübüllerde tiroidizasyon, glomerüler nekroz ve proksimal tübül hücrelerinde mikrovillüs kaybı gözlenirken sisplatin+ asetil L-karnitin uygulanan grupta ise proksimal tübüllerde az sayıda hücresel deskuamasyon, az sayıda tiroidizasyon ve mikrovillüs kaybı gözlemlendi; interstisyel hücre proliferasyonu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonuna rastlanmadı. Böbrek dokularının elektron mikroskobik incelenmesinde sisplatin uygulanan

grupta glomerüler bazal membran düzensizliği ve ayaksı çıkıntılarda füzyon gözlendi. Sisplatin+asetil L-karnitin uygulanan grupta ise yer yer glomerüler bazal membran kalınlığı mevcut olduğu ancak ayaksı çıkıntıların korunduğu gözlendi. TUNEL boyası ile belirlenen apoptotik hücre ölümü sisplatin ve sisplatin+asetil L-karnitin uygulanan gruplarda diğer gruplara göre daha yüksek saptandı. İki grubun karşılaştırılmasında ise sisplatin alan grupta apoptotik hücre ölümünün anlamlı olarak daha fazla olduğu saptandı. Kaspaz 3,8 ve 9 aktivitelerinin sisplatin grubunda sisplatin+asetil L-karnitin grubuna göre artmış olduğu saptandı.

**Sonuç:** Sisplatin nefrotoksitesinde asetil L-karnitin kullanımının böbrek fonksiyonlarında düzelme sağladığı, doku düzeyinde böbreği koruyucu ve apoptozu önleyici etkisi olduğu gösterilmiş olup, asetil L-karnitinin antioksidatif, antiapoptotik ve antiinflamatuvar özellikleri desteklenmiş oldu.

**Anahtar kelimeler:** Asetil L-karnitin, sisplatin, nefrotoksisite

## SUMMARY

### EVALUATION OF THE EFFECT OF ACETYL L-CARNITINE ON EXPERIMENTAL CISPLATIN NEPHROTOXICITY

**Objective:** To investigate the protective effects of acetyl L-carnitine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats

**Materials and methods:** Four different groups of 28 adult female Wistar albino rats were studied. Baseline serum creatinine, 24 hour urine volume and urine creatinine values of all the rats were obtained at the beginning of the study. Rats in the first group were given one hour intraperitoneal infusion of normal saline, rats in the second group were given one hour intraperitoneal infusion of normal saline after subcutaneous injection of acetyl L- carnitine (200mg/kg), rats in the third group were given one hour intraperitoneal infusion of cisplatin (16 mg/kg) , rats in the fourth group were given one hour intraperitoneal infusion of cisplatin (200mg/kg) after subcutaneous injection of acetyl L- carnitine. On the second and third days of the study, the second and fourth group were injected with acetyl L-carnitine (200mg/kg) while the first and third group were injected with same doses of normal saline. Following the collection of 24 hour urine samples on the third day, all rats were sacrificed on the fourth day after serum sampling and kidney samples were isolated for biochemical and histopathological examination with light, immuneflourescent and electron microscopy.

**Results:** Among the four groups; the third day mean serum creatinine values were higher in the cisplatin and cisplatin+acetyl L-carnitine administered groups. On the comparison of these two groups the mean serum creatinine value was higher in the cisplatin administered group. The mean value of total L-carnitine /creatinine in 24- hour urine collected on the third day was lowest in the cisplatin administered group and found to be significantly decreased compared to the control group injected with acetyl L-carnitine. The histopathological examination of the kidney samples of the cisplatin administered group revealed peritubular intersititial cell proliferation, inflammatory cell infiltration, desquamation of proximal tubule cells, tubular thyroidisation, glomerular necrosis and loss of microvilli. On the other hand the findings of proximal tubular desquamation, tubular thyroidisation, glomerular necrosis and loss of microvilli were much more less in the cisplatin+acetyl L-carnitine administered group and there was no evidence of intersititial cell infiltration or inflammatory cell infiltration in

this group. Consistent with the light microscopic findings; the electron microscopic examination of the kidney in cisplatin administered group revealed irregular glomerular basement membrane and foot process fusion. There was focal thickening of the glomerular basement membrane in the group administered with cisplatin+ acetyl L-carnitine but the foot processes of podocytes were intact. TUNEL positive apoptotic cell death was higher in the cisplatin and cisplatin+acetyl L-carnitine administered groups. On the comparison of these two groups the apoptotic cell death was significantly higher in the group administered with cisplatin. Caspase 3,8 and 9 activities were higher in the cisplatin administered group compared to cisplatin+acetyl L-carnitine administered group.

**Conclusion :** Antioxidative, antiapoptotic and antiinflammatory properties of acetyl L-carnitine were supported by the findings that the use of this agent improves the kidney function tests and has the effects of tissue protection and inhibition of apoptosis in cisplatin induced nephrotoxicity.

**Key words:** Acetyl L-carnitine, cisplatin, nephrotoxicity,

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Sisplatin solid tümörlerin tedavisinde etkin olarak kullanılan en önemli antineoplastik ilaçlardan biridir. İlacın sitotoksik özelliklerini nükleer DNA'ya bağlanıp transkripsiyon ve DNA replikasyonunu bozarak ve çeşitli sinyal iletim yollarını aktive ederek sağladığı düşünülmektedir (1-4).

Birçok sistem üzerinde toksik etkileri bulunan sisplatinin en önemli doz sınırlayıcı yan etkisi nefrotoksisitedir (5-8). Sisplatin nefrotoksisitesi üzerinde yoğun olarak çalışmalar sürdürülmekle beraber nefrotoksisite patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. Sisplatin nefrotoksisitesine ait *in vivo* mekanizmalar apoptoz, nekroz, oksidatif stres, inflamasyon, fibrojeniz, hipoksi, mitokondriyal hasarı içerir ve oldukça karmaşıktır. İlaç hücre içine girdikten sonra birçok sinyal ileti yolağını aktive eder ve oluşan bir dizi olaylar sonucunda hücre apoptoza ya da nekroza gider (9,10).

Oksidatif stres, sisplatine bağlı gelişen akut böbrek hasarında aktif olarak rol alan önemli mekanizmalardan biridir. Sisplatin molekülünün renal tübül hücresi içindeki etkileşimleri sonucunda oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) doğrudan lipid, protein ve DNA gibi hücre komponentleri üzerinde etki gösterir ve yapılarını bozar (11). Sisplatin ayrıca renal damarsal yapılara hasar vererek azalmış kan akımına ve böbreğin iskemik hasarına yol açar ve glomerül filtrasyon hızının (GFR) azalmasına katkıda bulunur (9). Tüm bu olaylar sonucunda sisplatin böbrek fonksiyonlarının bozulmasına neden olarak akut böbrek yetmezliği gelişmesine yol açabilir.

Sisplatine ait nefrotoksisite mekanizmaları göz önünde bulundurularak bu önemli yan etkiyi azaltmak amacı ile birçok strateji geliştirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda nefrotoksisite patogenezinde oksidatif hasarın önemli bir role sahip olduğu anlaşılmış ve nefrotoksisiteyi önlemeye yönelik antioksidan ajanlarla yapılan çalışmalar artmıştır (12,13).

L-karnitin hücrenin enerji üretimi için beta oksidasyona gidebilmek üzere uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondri matrisine geçişinde görev alan, asetillenmiş Koenzim A (KoA) miktarını düzenleyen ve diğer hücre metabolik olaylarda yer alan, antioksidan özelliği kanıtlanmış vitamin benzeri bir bileşiktir (14-28). Çalışmalar L-karnitin antioksidatif özellikleri yanında antiapoptotik, immünmodulator ve antiinflamatuvar özellikleri olduğunu da desteklemektedir (29-32). Asetil L-karnitin, L-karnitin kısa zincirli bir ester türevidir olup L-karnitine ait özelliklerin yanı sıra güçlü nöroprotektif ve antiapoptotik özellikler taşımaktadır (15).

Sisplatin toksisitesi ile ilgili yapılan deneysel çalışmalarda L-karnitin kullanımının sisplatine bağlı hepatotoksisite, kardiyotoksisite, nörotoksisite ve ince barsak toksisitesini



azalttığı gösterilmiştir (33-36). Sisplatin nefrotoksitesinde L-karnitin ve türevlerinin kullanımı ile ilgili az sayıda çalışma vardır; ulaşılabilen İngilizce literatürde sisplatin nefrotoksitesinde asetil L-karnitin ile ilgili yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır (37-39).

Karnitin eksikliğinin sisplatine bağlı nefrotoksitede risk faktörü olduğu bilinmektedir. Bu maddenin, antitümör etkinliğini bozmadan sisplatin toksisitesine karşı koruyucu olduğu, böbrek fonksiyon testleri, histokimyasal incelemeler ve ışık mikroskobisi ile yapılan histopatolojik incelemelerde gösterilmiştir (38). Ancak bu etkinin hangi mekanizmalar aracılığı ile gerçekleştiği tam olarak anlaşılamamıştır. Ayrıca bu konuda ultrastrüktürel düzeyde elektron mikroskobisi ile yapılmış bir çalışma henüz mevcut değildir.

Bu çalışmada; sisplatin nefrotoksitesini oluşturulmuş sıçanlarda asetil L-karnitin kullanımının nefrotoksitesine karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. Bunun için asetil L-karnitin böbrek fonksiyonları ve nefrotoksitesine neden olabileceği düşünülen apoptotik yollar üzerindeki etkisi çalışılmış ve böbrek dokusu; ışık mikroskobisi, immünfloresan mikroskobisi ve elektron mikroskobisi ile incelenmiştir.

Sisplatin nefrotoksitesine yönelik daha detaylı araştırmalar yapmak sadece tam olarak çözülemeyen nefrotoksitesinin mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını sağlamakla kalmayacak aynı zamanda nefrotoksitesini engelleyebilecek başka etkin maddelerin kullanımı ile ilgili yeni açılımlar sağlayacaktır. Ayrıca antineoplastik etkinliği bozmadan antikanser ilaçların yan etkisini azaltmaya yönelik bulunan her yeni madde ve yapılan her yeni girişim, hastalara daha iyi bir hayat kalitesi sunması açısından büyük önem taşımaktadır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1 SİSPLATİN

Sisplatin, 1970'li yıllardan sonra kanser tedavisinde kullanılan en önemli antineoplastik ilaçlardan biridir. Erişkin çağda görülen pek çok tümörün yanı sıra, nöroblastom, Wilms tümörü, hepatoblastom, beyin tümörleri, germ hücreli tümör, osteosarkom gibi pek çok çocukluk çağı tümörünün tedavisinde yer alan sisplatin, kemoterapi protokollerinin vazgeçilmez bir elemanıdır.

Sisplatinin biyolojik özellikleri 1960'lı yıllarda biyofizikçi Barnett Rosenberg tarafından tesadüf eseri keşfedilmiştir. Elektromanyetik radyasyon uygulamasının bakteri ve memeli hücrelerinin bölünmesi üzerine etkisini araştıran Rosenberg, *Escherichia Coli* ile yaptığı ilk deneylerde büyüme alanında platin elektrodları kullanmaktaydı. Platin elektrodlarının bulunduğu bu büyüme alanında bakterinin normalden 300 kat daha uzun olan filamanlara sahip olduğunu gözledi. Kısa sürede bu etkinin elektromanyetik alandan değil platin elektrodlarından ortaya çıkan elektroliz ürünlerinden kaynaklandığını gösterdi. Ayrıntılı kimyasal analiz sonucunda bu biyolojik etkiye yol açan bileşenin ilk olarak 1845 yılında Peyron tarafından sentezlenip tanımlanan ve Peyron kloridi olarak da bilinen ve sonradan sisplatin adını alan platinin nötral bir *sis* izomeri olduğu saptandı. Bu bileşenin bakterinin hücre bölünmesini engellediği ancak diğer büyüme yapılarını engellemediği için çok uzun filamanların ortaya çıktığı gösterildi. Sisplatine ait bu bulgular 1965 yılında yayınlandı ve 1968 yılında sarkomlu bir farede intraperitoneal sisplatin uygulaması sonucunda tümör boyutunda belirgin gerileme olduğu gözlemlendi. İlk kez 1971 yılında kanser hastalarında başarı ile uygulanmaya başlanan ilaç Amerika Gıda ve İlaç kurumundan 1978 yılında onay almıştır (1).

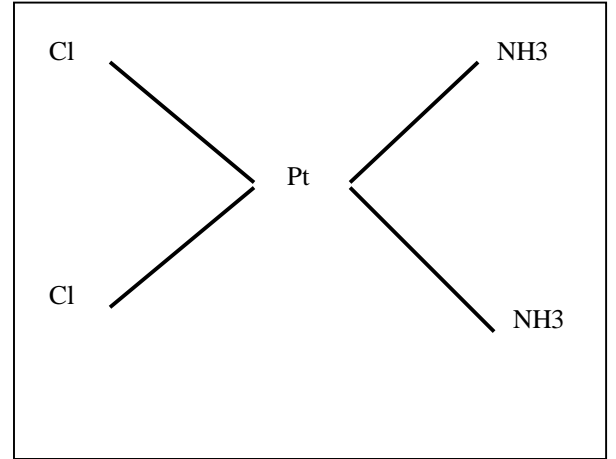
## 2.1.1 SISPLATİNİN MOLEKÜLER YAPISI ve ÖZELLİKLERİ

Sisplatin (*sis*-diaminodikloroplatinum (II) ) yatay düzlemde *sis* pozisyonda ortada platin atomu etrafında klor ve amonyom atomları ile çevrili inorganik bir platin kompleksidir (Şekil 1, Tablo 1).

**Tablo 1:** Sisplatinin kimyasal özellikleri

<p><b>Sistemik ad:</b> <i>cis</i>- diaminodikloroplatinum</p> <p><b>Moleküler formül:</b> Cl<sub>2</sub> H<sub>6</sub> N<sub>2</sub> Pt</p> <p><b>Moleküler ağırlık:</b> 300.1</p> <p><b>Renk:</b> Koyu sarı (kristal katı) ve berrak (çözelti)</p> <p><b>Yapı:</b> Tetragonal (kare) düzlemsel</p> <p><b>Erime noktası:</b> 270°C</p>
--

**Şekil 1:** Sisplatinin moleküler yapısı



Sisplatin uzun yıllardır başarı ile kanser tedavisinde kullanılmasına rağmen biyokimyasal etki mekanizması henüz kesin olarak aydınlatılamamıştır. İlacın sitotoksik özelliklerini nükleer DNA'ya bağlanıp transkripsiyon ve DNA replikasyonunu bozarak ve çeşitli sinyal iletim yollarını aktive ederek sağladığı düşünülmektedir. Sisplatin hücre mitokondrisine zarar verir, hücre siklusunu duraklatır, ATPaz aktivitesini engeller, hücresel transport sistemlerini değiştirir ve sonuç olarak apoptoz, inflamasyon, nekroz ve hücre ölümüne sebep olur (1,2).

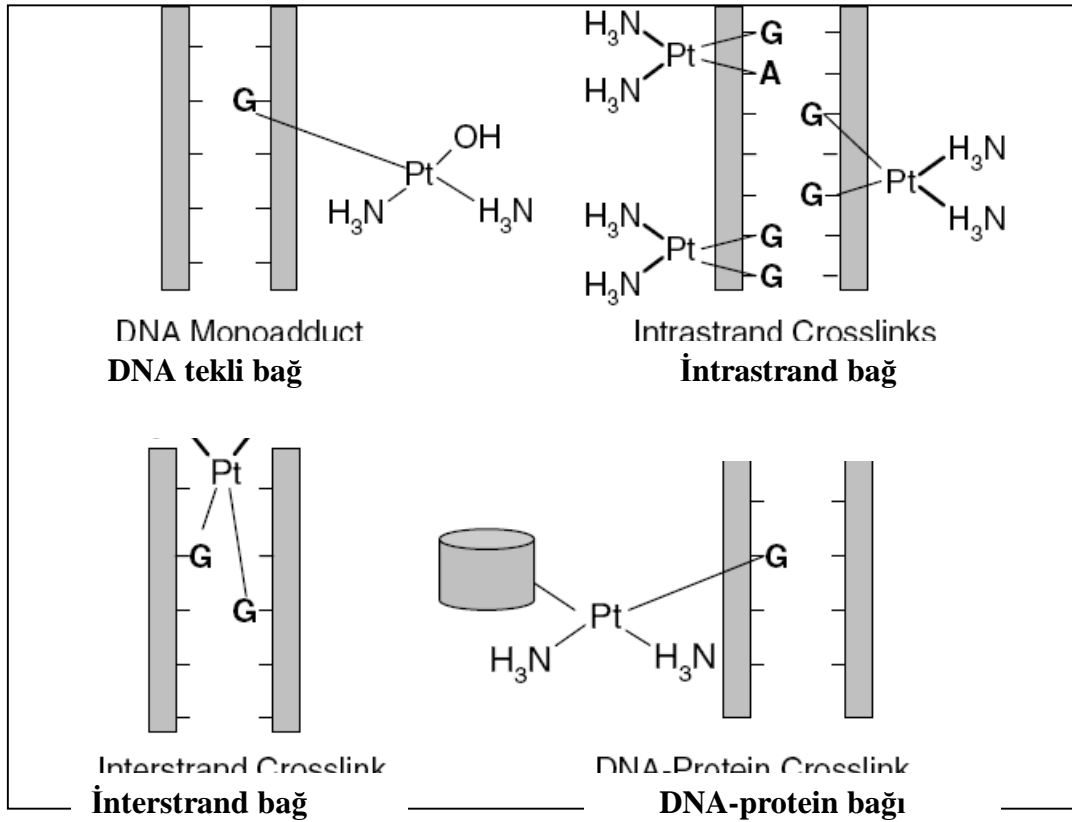
### 2.1.1.1 Sisplatinin hücre içine alınışı

Sisplatinin hücre içine alınışına yönelik mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Yapılan ilk çalışmalarda sisplatinin pasif difüzyon ile hücre içine girdiği öne sürülmüştür. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ise bakır transport proteini olan '*copper transporter 1*' in (CTR1) sisplatinin hücre içine aktif olarak alınmasında etkili olduğunu göstermektedir (2,40).

### 2.1.1.2 Biyotransformasyon ve DNA- platin bağlarının oluşması

Sisplatin hücre içine girdikten sonra su ile reaksiyona girerek iki klor iyonunu kaybeder ve iki su molekülü kazanır. Oluşan bu yeni pozitif yüklü molekül, hücre içindeki DNA, RNA ve proteinler gibi nükleofilik moleküllerle reaksiyona girme özelliğini kazanır. Bunlar arasında DNA, ilacın sitotoksik özelliklerini göstermedeki birinci hedefidir. İlaç DNA'da N7 pozisyonundaki pürin bazlarıyla reaksiyona girerek; tekli bağ, DNA-protein, interstrand (iki DNA zinciri arasında) ve intrastrand (tek DNA zincirinde bazlar arasında) kovalent çarpaz bağlar oluşturur. Bu bağların çoğu intrastrand bağlardır (3,4,40). (Şekil 2)

DNA ile kovalent bağların oluşması sonucunda DNA'nın yapısı bozulur ve sarmal üzerindeki bu bozulan yerlere hasarı farkedenden hücre içi proteinler bağlanır. Bu proteinler arasında en önemlileri; yanlış eşleşme tamir '*mismatch repair*'(MMR) kompleksi yapısında olan hMSH2 ve hMutSα proteinleri, histon olmayan kromozomal yüksek mobilite grup 1 ve 2 '*nonhistone chromosomal high-mobility group*' (HMG1 ve HMG2) proteinleri, insan RNA polimeraz 1 transkripsiyon yukarı bağlanma proteini '*human RNA polymerasa 1 transcription upstream binding factor*' (hUBF) ve transkripsiyonel faktör bağlanma proteini '*TATA binding protein*' (TBP) dir (4).



Şekil 2: Sisplatinin DNA ile oluşturduğu bağlar

DNA hasarını fark eden ve sarmal üzerine bağlanan proteinler bir çok sinyal ileti yolağını aktive hale getirmek sureti ile hücre hasarı ve ölümüne yol açarlar. Bu yollar ve sitotoksikite mekanizmaları ayrıntılı olarak sisplatin nefrotoksikitesi başlığı altında anlatılmıştır.

### 2.1.2 SİSPLATİN FARMAKOKİNETİĞİ

Sisplatinin farmakokinetik özellikleri Tablo 2’de gösterilmiştir.

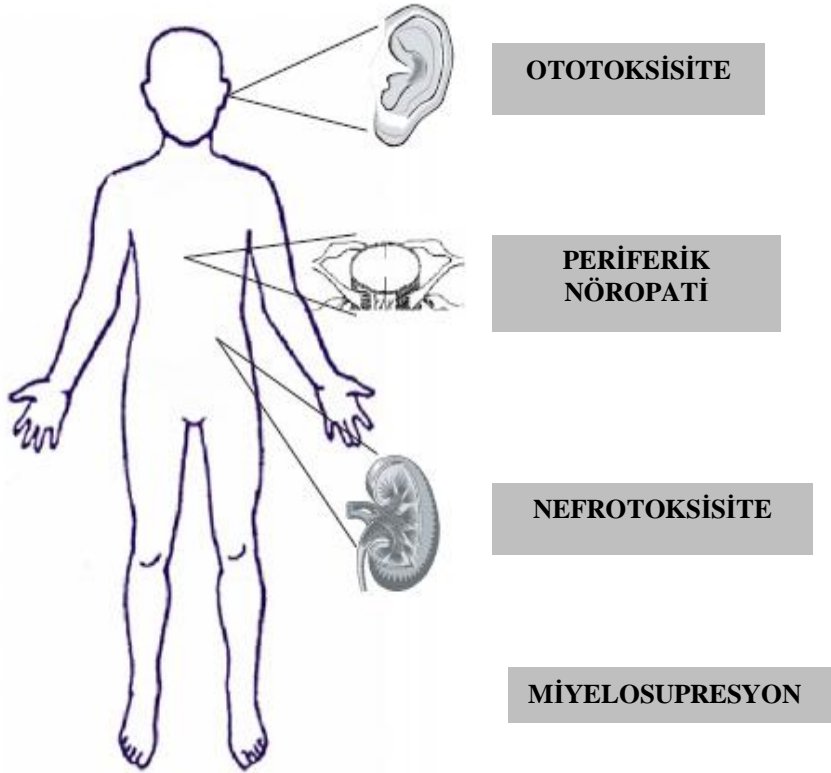
**Tablo 2:** Sisplatine ait farmakokinetik özellikler (5)

<b>Oral emilim</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hayır</li></ul>
<b>Dağılım</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Böbrek, karaciğer ve prostatta en yüksek seviyelere ulaşır.</li><li>• Anne sütüne geçer, amniyotik sıvı, pleural sıvı gibi üçüncü boşluk sıvılarına geçer.</li><li>• Placentayı geçer.</li><li>• Kan beyin bariyer geçişi bilinmiyor. ( Eser miktarda geçişten bahsedilmiştir)</li></ul>
<b>Metabolizma</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Enzimatik olmayan yollarla aktif ve inaktif metabolitlere dönüştürülür.</li></ul>
<b>Atılım</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Çoğunlukla idrar ile (%90)</li><li>• Renal sekresyon ve atılıma uğrar.</li><li>• Platin dokularda 180 güne kadar bulunur.</li><li>• Yarılanma ömrü: Sisplatin: 30 dakika Serbest kompleksler: <math>\geq 5</math> gün</li></ul>

### 2.1.3 SİSPLATİN TOKSİSİTESİ

Sisplatinin bir çok sistem üzerinde toksik etkileri bulunmakla beraber nefrotoksisite en önemli doz sınırlayıcı yan etkisidir. Ototoksisite, periferik nöropati ve miyelosupresyon diğer önemli yan etkileridir (Şekil 3, Tablo 3).

**Şekil 3:** Sisplatine bağlı sık görülen toksisiteler



**Tablo 3:** Sisplatine bağlı istenmeyen etkiler (5)

<b>ORGAN</b>	<b>YAN ETKİ</b>
<b>KARDİYOVASKÜLER</b>	Bradikardi , sol dal bloğu (nadir), hipertansiyon,serebral arterit, serebrovasküler olay (nadir)
<b>NÖROLOJİK</b>	<b>İşitme kaybı, tinnitus</b> * (%31), vertigo otonomik nöropati (nadir), nöbet (nadir), arka kolon nöropatisi (nadir), hıçkırık, periferik nöropati, optik nörit, görme bulanıklığı , renk algısında değişiklik, akut ensefalopati (nadir)
<b>GASTROİNTESTİNAL</b>	<b>Bulantı ve kusma*</b> , <b>diyare/ishal*</b> , <b>anoreksi/iştahsızlık*</b> , tad duyusunda bozukluk
<b>HEMATOLOJİK</b>	<b>Miyelosüpresyon</b> * (%25-30, nadir dönemi 18-23 gün), anemi, hemolitik anemi (Coombs pozitif), trombositik mikroanjyopati (nadir)
<b>NEOPLASTİK</b>	Akut lösemi
<b>DERMATOLOJİK</b>	Alopesi/saç dökülmesi, döküntü
<b>HEPATİK</b>	Karaciğer fonksiyon testlerinde yükselme, bilirubin yüksekliği (geçici, nadir)
<b>HİPERSENSİTİVİTE</b>	Tip 1 (anafilaktik) Tip 2 (hemolitik anemi)
<b>RENAL/METABOLİK</b>	<b>Toksik nefropati</b> * (%28-36), hipomagnezemi, hipokalsemi, hipokalemi, hiponatremi, hipofosfatemi, hiperürisemi, uygunsuz ADH sendromu
<b>REPRODÜKTİF</b>	İnfertilite
<b>DİĞER</b>	Kas krampları, serum demir düzeyinde yükselme, Raynaud fenomeni (nadir)

\*: Doz sınırlayıcı etki

## **2.1.4 SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTESİ**

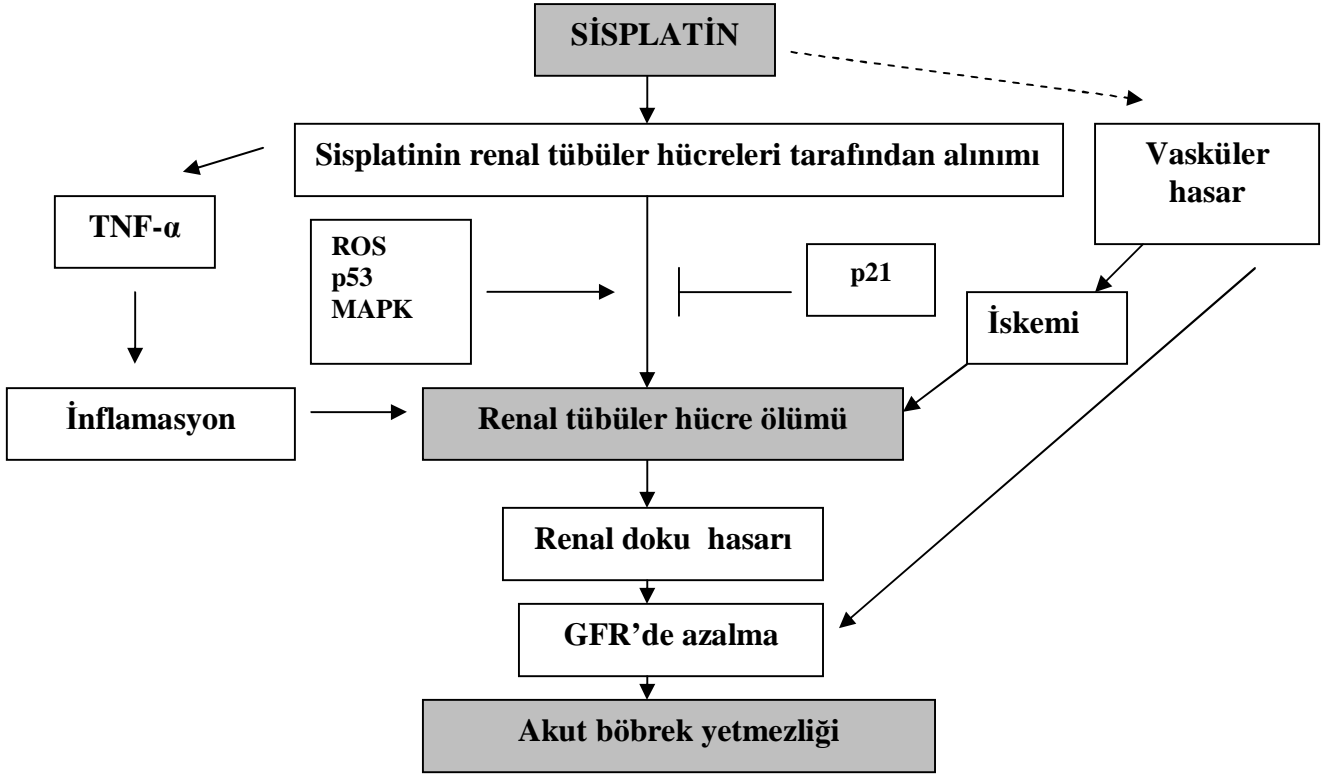
Nefrotoksisite sisplatinin en önemli doz sınırlayıcı yan etkisidir (6-8). Preklinik çalışmalarda bu etki saptanmış ve sisplatin tedavisinde yoğun hidrasyonun kullanılmadığı ilk protokollerde hastalarda ciddi ve geri dönüşümsüz böbrek hasarı görülmüştür (41,42). Bir çalışmada tek doz 50-100 mg/m<sup>2</sup> sisplatin verildikten sonra hastaların %28-36'sında doza bağlı nefrotoksisite geliştiği gösterilmiştir (43). Günümüzde de yoğun profilaktik önlemlere rağmen sisplatin alan hastaların üçte birinde geri dönüşümsüz böbrek hasarı oluşmaktadır (44,45).

### **2.1.4.1 SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTESİ PATOGENEZİ**

Sisplatin nefrotoksisitesi üzerinde son 30 yıldır çalışmalar yürütülmektedir. Sisplatin uygulaması renal tübül hücrelerde bir çok sinyal yolağını aktive ederek hücre hasarı ve ölümle sonuçlanır. Bu arada doku hasarını daha da arttıran güçlü bir inflamatuvar yanıt oluşur. Sisplatin ayrıca renal damarsal yapılara hasar vererek azalmış kan akımına ve böbreğin iskemik hasarına yol açarak GFR'nin azalmasına katkıda bulunur. Tüm bu olaylar sonucunda sisplatin nefrotoksisitesinde böbrek işlevini kaybeder ve akut böbrek yetmezliği gelişir (9,46,47). (Şekil 4)

Böbrek, sisplatinini diğer organlardan daha fazla oranda tutar ve sisplatinin vücuttan atılımındaki ana organdır (48). Sisplatinin böbrek dokusunda orantısız birikimi sisplatin nefrotoksisitesine katkıda bulunmaktadır (7). Proksimal tübül hücrelerindeki sisplatin konsantrasyonu serum konsantrasyonundan beş kat daha fazladır (49).



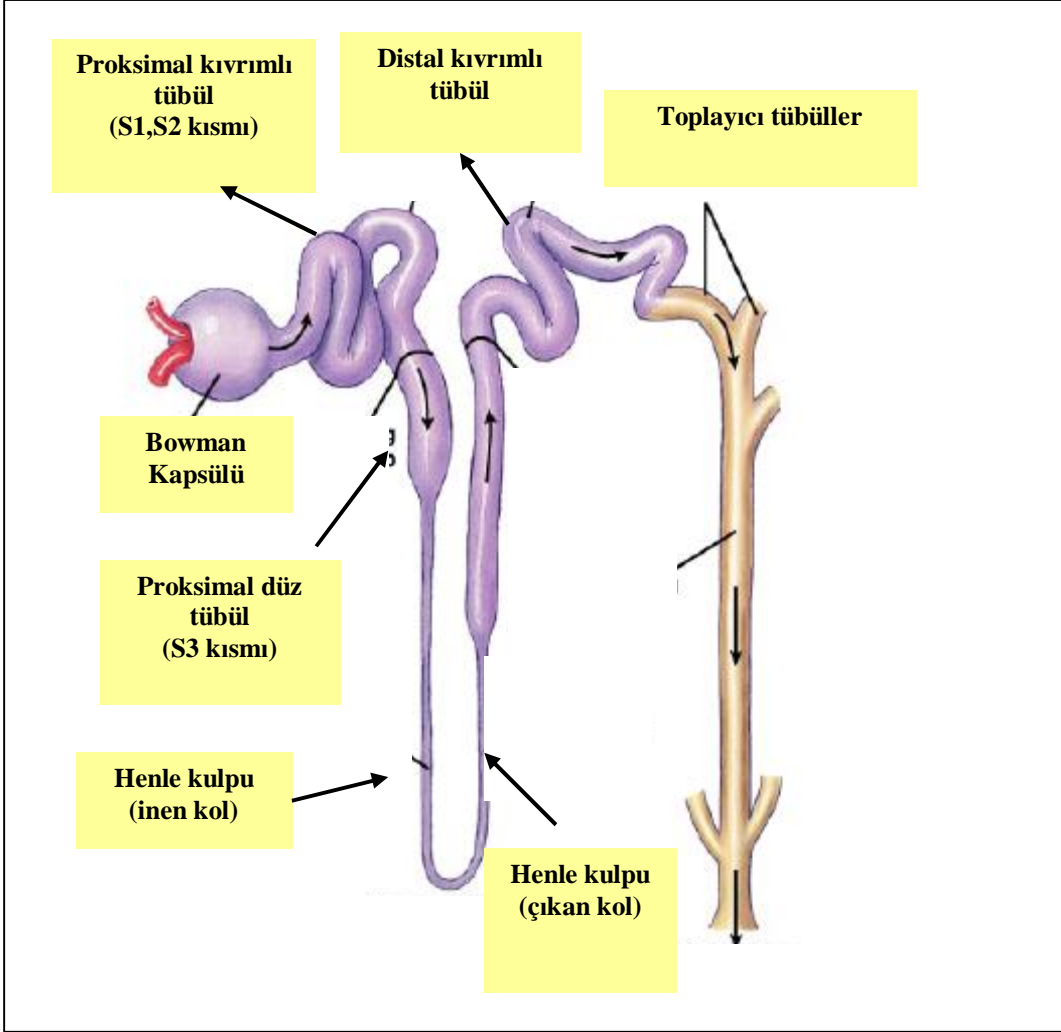


**Şekil 4:** Sisplatin nefrotoksitesinde patofizyolojik olaylara genel bir bakış (9)

### ***SISPLATİNİN BÖBREK HÜCRELERİ TARAFINDAN HÜCRE İÇİNE ALINIŞI***

Sisplatinin böbrek hücresi içine alınışı organik transport aracılı sistem ile olmaktadır. Sıçanda sisplatin atılımı ağırlıklı olarak glomerüler filtrasyonla, az miktarda da tübüler sekresyonla olmaktadır, tübüler reabsorpsiyon olduğuna dair bir kanıt yoktur. Sisplatin peritübüler alımla proksimal ve distal tübüllerde birikir (10). Proksimal tübülün S3 segmenti sisplatinin en yüksek konsantrasyonda biriktiği yerdir. Distal toplayıcı tübül ve proksimal tübülün S1 segmenti sisplatinin konsantrasyonunun yüksek olduğu diğer yerlerdir (50). (Şekil 5)

Sisplatinin hücre içine alınışı transport protein aracılıklı işlem yanısıra pasif difüzyonla da olmaktadır (51). Bu her iki alım şekli de yerlere göre değişiklik göstermektedir. Sisplatinin böbrek hücrelerine esas olarak transport protein aracılıklı sistem ile alındığı düşünülmektedir (50).



**Şekil 5:** Nefronun kısımları

Öte yandan sisplatinin hücre içine aktif alımında bakır transport proteini olan CTR1'in rolü olduğu gösterilmiştir (2,40). Bu proteinler renal proksimal tübüler hücrelerde yüksek oranda eksprese edildiği bilinmekle beraber renal modellerde sisplatin alımındaki rolü henüz bilinmemektedir (52).

İnsan ve hayvan çalışmaları sisplatinin proksimal tübüllere alınmasında organik katyon transporter (OCT ) proteinin kritik bir rol üstlendiğini göstermiştir. OCT'ler, renal tübüler hücrelerde birçok katyonik molekülün apikal ve bazolateral membrandan transportuna aracılık ederler (9) .Bu membran proteinleri tarafından yapılan transport polispesifik, elektrojenik, voltaj-bağımlı, her iki yönlü, pH-bağımsız ve Na-bağımsız özelliklere sahiptir. İnsanlarda OCT'nin üç izoformu tanımlanmıştır. Böbrekte görülen başlıca izoform OCT 2 iken karaciğerde OCT 1, plasentada ise OCT 3 görülür. Sisplatin OCT 1 tarafından transport edilemez ki, bu durum sisplatinin organ spesifik toksisitesini açıklamada yardımcı olabilir.

Sisplatinin daha az nefrotoksik türevleri olan karboplatin ve oksaliplatinin insan OCT 2 ile reaksiyona girmedikleri gösterilmiştir (46). Ludwig ve arkadaşları sisplatinin böbrek tübül hücresi bazolateral tarafa uygulanmasının apikal tarafa uygulanmasından daha fazla toksisiteye yol açtığını göstermişlerdir. İnsan OCT 2 transportunda bir organik katyon kompetitörü olan simetidinin de proksimal tübülde sisplatin ilişkili hücre apoptozunu azalttığı gösterilmiştir (47). Bir diğer çalışmada diyabetik hayvanlarda OCT izotiplerinin gen ve protein ekskresyonu azalmış bulunup sisplatin toksisitesine daha dirençli oldukları saptanmıştır (53).

### ***SİSPLATİN METABOLİZMASI***

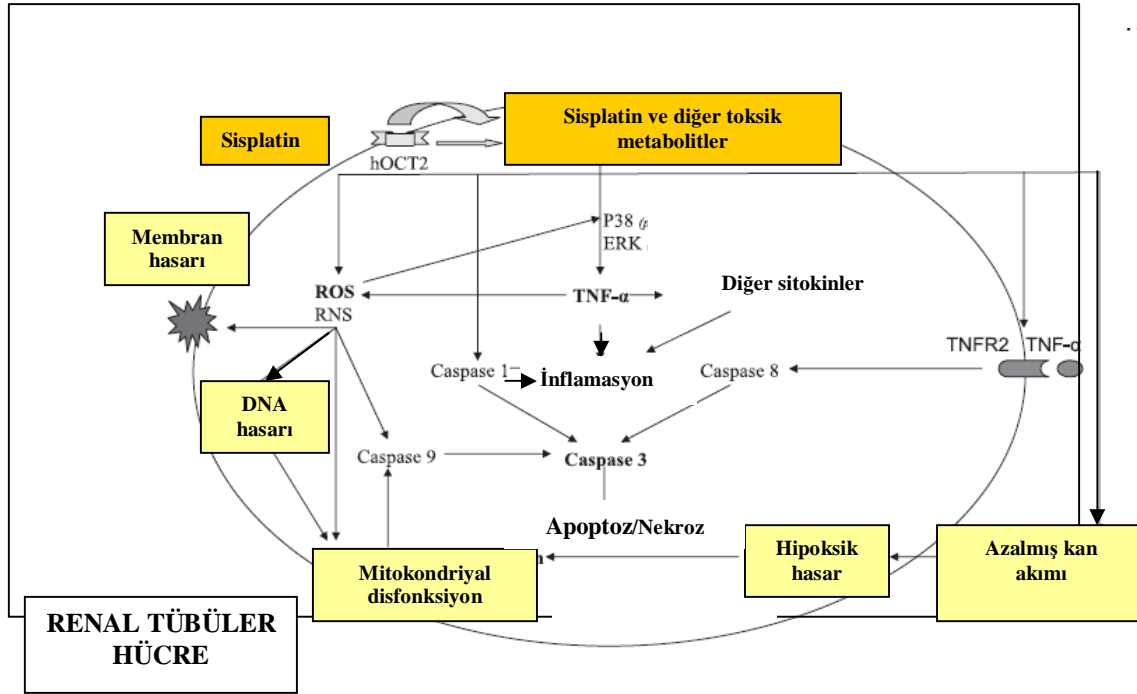
Renal hücre hasarının gerçekleşmesi için sisplatinin proksimal tübül hücrelerinde nefrotoksik moleküllere dönüşmesi gerekmektedir (54). Böbrek hücresinde en yüksek sisplatin konsantrasyonları sitozol, mitokondri, nükleus ve mikrozomlarda bulunur (49). Sisplatin glutatyon ile konjüge edilir ve gama glutamil transpeptidaz ve sistein S-konjugat beta-liyaz bağımlı yollarla etkin bir nefrotoksin olan reaktif tiol molekülüne dönüşür. Bu iki enzimin inhibisyonunun sisplatinin hücre içine alınmasına bir etkisi yoktur ancak nefrotoksisiteyi azaltırlar. Bunun yanında gama glutamil transpeptidaz inhibisyonunun sisplatinin antitümör etkinliğini azalttığı da gösterilmiştir (54,55).

Sisplatin, hidrolitik reaksiyonlarla monohidrat kompleksler oluşturur. Monohidrat kompleks, renal hücrelere sisplatinin kendisinden daha çok zarar verir ancak böbreğe özgül değildir. Düşük intraselüler klorür konsantrasyonu bu kompleksin oluşumuna katkıda bulunur. Hipertonik salin kullanımı monohidrat kompleks oluşumunu azaltmakla birlikte antitümör etkinliği değiştirebileceği gösterilmiştir (56).

Sisplatin spesifik gen değişikliklerine neden olur. İlaç direncinde, hücre iskelet yapı ve fonksiyonunda, hücre adhezyonunda, apoptozda, doku yeniden şekillenmesinde ve detoksifikasyonda rol alan bir çok gen, sisplatine bağlı hücre hasarı sonrası aktive olur. Sisplatin; proksimal tübüle lokalize, intraselüler kalsiyum hemostazında görev alan, büyüme faktörlerini ve bazı bağlayıcı proteinleri kodlayan genlerin de inaktif hale gelmesine neden olur (10).

### ***SİSPLATİN NEFROTOKSİTESİNDE MEKANİZMALAR***

Sisplatin nefrotoksitesine ait *in vivo* mekanizmalar ***apoptoz, nekroz, oksidatif stres, inflamasyon, fibrojeniz, hipoksi, mitokondriyal hasarı*** içerir ve oldukça karmaşıktır (Şekil 6, Tablo 4).



**Şekil 6:** Sisplatine bağlı akut tübüler hücre hasarında yer alan başlıca yollar (10)

### ***Sisplatin Nefrotoksitesinde Hücre Ölümü: Nekroz, Apoptoz***

Tübüler hücre ölümü ile karakterize renal doku hasarı sisplatin nefrotoksitesinin histopatolojik özelliklerinden biridir. Hücre ölümü nekroz veya apoptoz yolu ile olabilir (9). Bu iki hücre ölüm şekli arasındaki olası bağlantıları aydınlatmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Hücre kültür çalışmaları, uygulanan sisplatin dozunun miktarının nekroz ya da apoptoza gidişi belirtebileceğini göstermiştir. Yüksek doz sisplatin konsantrasyonunun proksimal tübül hücrelerinde nekroza yol açarken daha düşük konsantrasyonların kaspaz 9 bağımlı yolak ile apoptoza yol açtıkları gösterilmiştir (57). Bunun yanısıra hayvanlarda *in vivo* yapılan çalışmalarda sisplatin uygulamasının renal tübüllerde hem nekroz hem de apoptoza yol açtığı da gösterilmiştir (58-60).

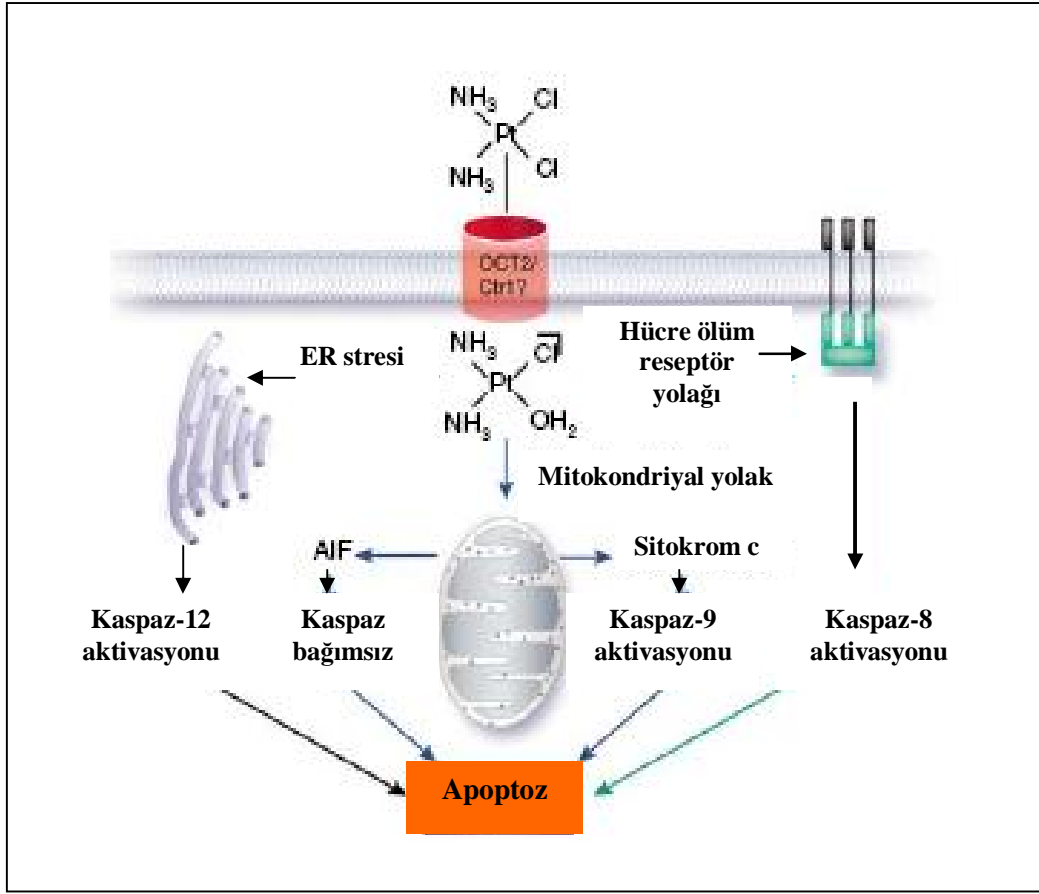
Nekroz ve apoptoz farklı morfolojilerde olmalarına rağmen ortak sinyal yollarını paylaşabilirler. Örnek olarak bid ve bax gibi proapoptotik proteinler hücre ölümüne yol açarlar. Eğer apoptoz yollarında bir sorun ya da eksiklik olursa hücre pasif hale gelir ve nekroz ile parçalanır (9). Ayrıca sisplatin nefrotoksitesinde kullanılan renoprotektif ajanların sıklıkla hem nekroz hem de apoptozu engellediği gösterilmiştir. *Bax* gibi apoptotik genlerin eksikliğinde tübül hücrelerinde apoptoz ile beraber nekroz varlığı da gösterilmiştir (61-63).

### ***Sisplatin Nefrotoksisitesinde Apoptotik Yolaklar***

Apoptoz, normal ve patolojik süreçlerde hücre ölümünün önemli bir yoludur. Apoptozdaki başlıca yolaklar; hücre ölüm reseptörlerinin aracılık ettiği ekstrinsik yolak, mitokondri üzerinden işleyen intrinsik yolak ve endoplazmik retikülüm (ER)- stres yolağıdır (Şekil 6, 7). DNA hasarını fark eden ve sarmal üzerine bağlanan proteinler bir çok sinyal ileti yolağını aktive hale getirmek sureti ile apoptoza yol açarlar. Ekstrinsik yolaktaki Fas ve Tümör Nekroz Faktör Reseptörü 1 ve 2 (TNFR 1 ve TNFR 2) gibi bazı hücre ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, kaspaz 8 aktivasyonu yolu ile apoptoza neden olur (64). Ramesh ve Reeves (65) farelerde sisplatinin büyük ölçüde Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) indüksiyonuna yol açtığını göstermişlerdir. Bu çalışmayı izleyen diğer çalışmalarda da TNFR1'den ziyade TNFR2'nin TNF- $\alpha$ 'ya patolojik sinyal iletiminden sorumlu olduğu gösterilmiştir (59). Ayrıca önemli bir infamatuvar sitokin olan TNF- $\alpha$ 'nın apoptoz ekstrinsik yolağının yanı sıra esas olarak ciddi inflamatuvar yanıt aracılığıyla da renal hasara yol açtığı bilinmektedir (66).

Sisplatin nefrotoksisitesinde esas apoptotik yol intrinsik ya da mitokondriyal yolak aracılığı ile olur. İntinsik yolakta hücrel stres proapoptotik Bcl-2 ailesinden Bax ve Bak proteinlerinin aktivasyonuna neden olarak mitokondri membranında hasar oluşmasına neden olur. Bunun sonucunda organellerden sitokrom-c, apoptoz indükleyici faktör '*apoptosis inducing factor*' (AIF), endonükleaz G gibi apoptogenik faktörler salınır. Sitokrom-c, sitozole salındıktan sonra kaspaz 9 aktivasyonuna ve sonrasında bir dizi etkileşim sonucunda apoptoza yol açar. AIF ise kaspaz bağımsız yollarla apoptoza neden olur (64,67,68).

Ekstrinsik ve intrinsik yolakların yanı sıra ER-stres yolağı da endoplazmik retikülümün sitozolik yüzünde bulunan ve ER stresi ile aktive olan kaspaz-12 yolu ile apoptozu uyarır (69). (Şekil 7)



**Şekil 7:** Renal tübüler hücrelerde sisplatine bağlı gelişen apoptotik yollar (9)

Kaspaz 8 ve 9 renal tübüler apoptozda kritik bir role sahip olan kaspaz 3'ü aktive eder. Kaspaz 1 sisplatin hasarı gelişmiş böbrekte kaspaz 3'ü doğrudan aktive etmenin yanısıra interlökin 1 $\beta$  seviyelerini arttırarak inflamasyona katkıda bulunur. Kaspaz 1'in bulunmadığı farelerde sisplatine bağlı apoptozun ve akut tübüler nekrozun azaldığı gösterilmiştir (61). Çalışmalarda güçlü endonükleaz aktivitesi olan deoksiribonükleaz 1'in de DNA fragmentasyonu yolu ile sisplatin nefrotoksisitesinde rol aldığı bildirilmektedir (70).

#### *Apoptotik yollarda p21 ve hücre siklus regülasyonu*

Hücre siklus proteinleri sisplatin nefrotoksisitesinde renal hücrelerin ölümü ve korunmasında yer alan esas regülatörlerdir (71). Normalde hücre siklusu siklin-bağımlı kinaz ailesi (cdk) ve bu aileye ait siklin denen spesifik düzenleyici proteinlerle regüle olur. Spesifik cdk/siklin kompleksleri hücre siklusundaki majör değişimlerde görev alırlar. Kritik rollerinden dolayı cdk'lar INK4 ve CIP/KIP ailesi inhibitörleri tarafından negatif olarak regüle edilirler (72-74). Bu inhibitörlerin en önemlilerinden biri p21'dir. P21 ve cdk'lar

arasındaki bu dengenin bozulması sonucu renal tübüler hücreler ölür ya da hayatta kalır. Sisplatin nefrotoksisitesinde cdk aktivasyonu yolu ile sessiz fazdaki hücreler hücre siklusuna girerler, bunun yanında cdk inhibitörü olan p21 de aktive olur. p21, p53 bağımlı ve p53 bağımsız yollarla aktive olur. (75). (Şekil 8).Yapılan çalışmalarda p21 bulunmayan farelerin sisplatin toksisitesine oldukça duyarlı oldukları bulunmuş , bu farelerin böbreklerinde ciddi doku hasarı ve tübüler hücre apoptozu saptanmıştır (58). P21'in cdk2'yi engelleyerek renal hücreleri apoptozdan koruduğu ve sisplatin nefrotoksisitesinde renoprotektif role sahip olduğu gösterilmiştir (76).

#### *Apoptotik yollarda p53 sinyal yolağı*

Apoptoza yol açan olaylarda en önemli ve karmaşık rollerden biri de tümör supresör proteini p53'e aittir. Bir dizi etkileşim sonucunda p53, ataksi telanjyektazi mutasyona uğramış protein '*ataxia telangiectasia mutated protein*' (ATM) ve özellikle de ATM ve Rad3 ilişkili protein '*ATM- and Rad3 related protein*'(ATR) kinaz tarafından fosforile edilerek aktive hale gelir. Ayrıca ATR, mitojen-aktive protein kinaz '*mitogen-activated protein kinase*' (MAPK) kaskatının da aktivasyonunda rol alır. Tümör supresör proteini p53, *bax* geni gibi proapoptotik genleri aktive ettiği gibi hücre duraklaması ve hücre tamirinde yer alan *gadd45a* genini de aktive eder. Bu aktivasyonlar sonucunda Bax sitozolden mitokondriye transfer olur, kaspaz 3 ve kaspaz 9'u aktive eder ve apoptoz oluşur. Bir başka apoptotik yol olan Fas/FasL ,kaspaz 8 ve kaspaz 3 aktivasyonunda da p53 görev alır. Bütün bu etkilerin sonucunda sinyal yoğunluğuna ve yollar arasındaki iletişime bağlı olarak hücre hayatta kalır ya da ölür (4,40). (Şekil 8)

#### *Apoptotik yollarda MAPK Yolları*

MAPK yolları çeşitli ekstraselüler fiziksel ve kimyasal stres nedeni ile aktive olan serin/treonin kinazlarından oluşmuş paralel kaskatlar serisidir. Hücrenin proliferasyonu, farklılaşmasını ve canlılığını düzenlerler. Üç temel MAPK yolağı ekstraselüler regüle kinaz (ERK), p38, Jun N-terminal kinaz/stres aktive protein kinaz (JNK/SAPK) enzimlerinde sonlanır. ERK yolağı ekstraselüler büyüme faktörleri tarafından aktive olup hem hücre yaşamı hem de hücre ölümü ile ilişkilidir. JNK/SAPK ve p38 yolları ise oksidan, ultraviyole ışın, hiperozmolalite, inflamatuvar sitokinler gibi bir çok stres faktörü tarafından aktive hale gelir ve hücre ölümü ile ilişkilidirler. Sisplatinin *in vitro* ve *in vivo* yapılan çalışmalarda bu üç MAPK yolağını aktive ettiği gösterilmiştir (10,77).ERK ve p38 ,TNF-  $\alpha$  uyarılmasında da rol alır. ERK ayrıca renal tübüler epitel hücrelerde apoptozu kontrol eden kaspaz 3'ü de aktive

eder. Fosforile-ERK özellikle distal nefrona lokalize bulunur, bu yüzden de ERK1/2 aktivasyonu distal nefron hasarında yer alabilir. ERK yolağının proksimal tübül hasarında yer alıp almadığı tam olarak bilinmemektedir ama distal nefrondaki yanıt otokrin ve parakrin işlemler sonucunda proksimal tübülü de etkileyebilir (78). P38 aktivasyonu proksimal tübül hasarına aracılık eder. P38'in uyarılması sisplatinin neden olduğu hidroksil radikaller aracılığı ile olur (62). JNK/SAPK yolağının sisplatin nefrotoksisitesindeki rolüne yönelik yeterli çalışma bulunmamaktadır.

### ***Sisplatin Nefrotoksisitesinde Oksidatif Stres***

Oksidatif stres hasarı sisplatine bağlı akut böbrek hasarında aktif olarak rol alır.

Oksidatif strese hücrelerde ksantin-ksantin oksidaz, mitokondri ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NADPH oksidaz) tarafından reaktif oksijen türleri (ROS) üretilir. Sisplatin varlığında ROS tüm bu yollarca üretilir. Oluşan bu oksidan moleküller doğrudan lipid, protein ve DNA gibi hücre komponentleri üzerinde etki gösterir ve yapılarını bozar. (11).

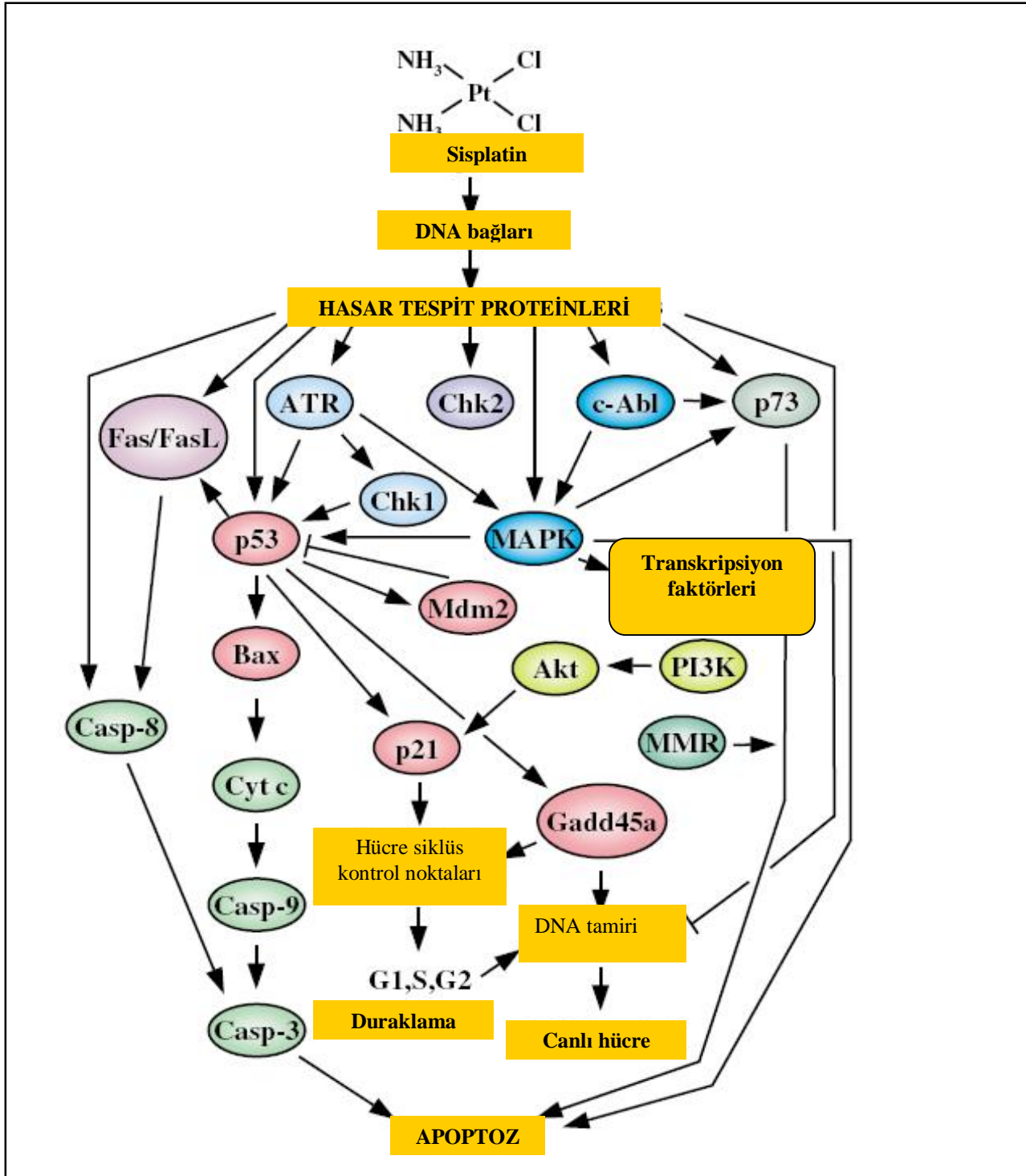
Sisplatin Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve heksokinaz aktivasyonu yolu ile de serbest radikal üretiminin artmasına ve antioksidan üretiminin azalmasına neden olur (79). Sisplatin intraselüler kalsiyum seviyesini arttırarak NADPH oksidazı aktive eder ve hasar görmüş mitokondri tarafından ROS üretimini uyarır (11). Süperoksid anyon, hidrojen peroksit ve hidroksil radikal sisplatinle tedavi edilmiş böbreklerde artmış olarak bulunmuştur (80-82). Bu serbest radikaller peroksidasyon ile hücre membranının lipid yapılarına zarar verirler, proteinleri denatüre ederek enzimatik inaktivasyona yol açarlar. Serbest radikaller aynı zamanda mitokondriyal disfonksiyona da yol açarlar (79). Antioksidan enzimler sisplatin tarafından inhibe edilirler ve süperoksid dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalazın renal aktiviteleri önemli ölçüde azalır (83,84). Antioksidan sistemlerin hasar görmesi sonucunda lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehidin (MDA) arttığı gözlenmiştir (37,85).

Hayvan çalışmalarında hiperbarik oksijen, , vitamin C , vitamin E, glutamin, melatonin gibi bir çok antioksidanın sisplatine bağlı akut nefrotoksisiteyi önlediği gösterilmiştir (12,13). Oksidan ve antioksidan sistemlerinin kronik nefrotoksisitedeki rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Reaktif nitrojen türleri de sisplatin nefrotoksisitesinde çalışılmıştır. Sisplatin verilmiş ratlarda peroksinitrit ve nitrit oksidin renal içeriğinin artmış olduğu gösterilmiştir. Peroksinitrit, protein yapı ve fonksiyonunda değişikliklere, lipid peroksidasyonuna, DNA'nın kimyasal yıkımına, tiol havuzlarının oksidasyonu yolu ile hücrel savunma sistemlerinin



zayıflamasına neden olur (86,87). Nitrik oksidin (NO) ise sisplatine bağlı böbrek hasarında toksik rol oynayıp oynamadığı henüz gösterilememiştir. Bazı çalışmalarda NO'nun nefrotoksisite gelişiminde rol alıp nitrik oksit sentez inhibitörünün nefrotoksisiteyi azaltıcı etkisinden bahsedilirken bazı çalışmalarda da tam tersi etkiden söz edilmektedir (88-90).



Şekil 8: Hücrede sisplatine bağlı gelişen apoptoz ve apoptotik yolların tümü (4)

### ***Sisplatin Nefrotoksisitesinde Hipoksi ve Mitokondriyal Hasar***

Hipoksi ve mitokondriyal hasar sisplatin nefrotoksisitesinde rol alır. Sisplatine bağlı nefrotoksisitede patolojik değişiklikler çoğunlukla proksimal tübülün S3 segmentinde meydana gelir. Böbreğin bu kısmı iskemiye oldukça duyarlıdır (91). Sisplatin nefrotoksisitesinin incelendiği çalışmalarda hipoksik hücrelerin önemli bir kısmını proksimal tübül hücrelerin oluşturduğu gösterilmiştir. Öte yandan sisplatin hasarında *in vivo* olarak proksimal tübül S3 segmentinde hipoksi indüklenebilir faktör'ün '***hypoxia inducible factor 1***' (HIF 1) aktive olduğu gösterilmiştir. HIF 1 anjiyogenez, eritropoez ve glikolitik adaptasyon gibi yollarla hipoksinin hücresel yanıtında rol alan bir transkripsiyon faktörüdür. Dominant negatif HIF-1 $\alpha$ -subunit hayvanlarda sisplatin nefrotoksisitesine duyarlılığın apoptoz yolu ile arttığı gösterilmiştir. Bu durumda sisplatine bağlı renal hasarda hipoksinin net etkisi henüz kesinlik kazanmamıştır (92,10).

### ***Sisplatin Nefrotoksisitesinde İnflamasyon***

Yapılan son çalışmalar sisplatine bağlı böbrek hasarında inflamasyonun önemli bir rolü olduğunu göstermişlerdir. Sisplatin TNF- $\alpha$ 'nın renal ekspresyonunu artırır. Transkribe edici büyüme faktör  $\beta$  '***transcribing growth factor- $\beta$*** ' (TGF-  $\beta$ ), monosit kemoatraktan protein-1 '***monocyte chemoattractant protein-1***' (MCP-1), interselüler adezyon molekülü '***intercelluler adhesion molecule***' (ICAM), hemoksijenaz-1 '***hemoxigenase-1***', TNFR1 ve TNFR2 gibi sitokinler de böbreklerde artmış olarak bulunurlar. TNF- $\alpha$  renal hasarda da merkezi bir rol oynar; apoptozu indükler, ROS üretimine katkıda bulunur, böbrekte bir çok kemokin ve sitokinin aktivasyonunu koordine eder. Çalışmalar TNF- $\alpha$  inhibitörlerinin sisplatine bağlı renal disfonksiyonu %50 oranında düzelttiği ve yapısal hasarı azalttığını göstermiştir (10). TNF- $\alpha$  bulunmayan farelerin sisplatin nefrotoksisitesinden büyük oranda korunduğu gözlenmiştir (59).

### ***Sisplatin Nefrotoksisitesinde Fibrozis***

Sisplatin, etkilenmiş tübüller etrafında makrofaj ve lenfosit infiltrasyonunun da gözlendiği fibrozise neden olur. Yapılan bir çalışmada bir hafta boyunca her gün 2 mg/kg sisplatin enjeksiyonu alan sıçanda bir hafta gibi kısa sürede kortikomedüller bileşkede fibrotik lezyonların oluştuğu ve beş haftada maksimuma ulaştığı gözlenmiş, sisplatin uygulaması kesildikten sonra ise yaklaşık 19 haftalık gözlem süresi içerisinde fibrotik dokuların azaldığı ve renal tübüllerin rejenere olduğu gözlenmiştir (92). Aynı zamanda BUN ve kreatinin

seviyelerinde de düşme görülmüştür. Bir çok kez sisplatin kemoterapisi almış insanlarda yaygın renal tübülointerstisyel nefroz gösterilmiştir (93).

Özet olarak; sisplatin bir çok mekanizma ile nefrotoksisiteye neden olur. Bu farklı yollar arasında önemli etkileşimler gerçekleşir. Bu yolların ve aralarındaki etkileşimlerin nefrotoksisiteye ne derecede katkıda bulunduğu halen tam olarak saptanamamıştır (Şekil 6-8, Tablo 4).

**Tablo 4:** Sisplatin metabolizması ve toksisiteye neden olan olaylar (10)

	<b>Olay</b>	<b>İlişki</b>
<b>Farmakokinetik ve atılım</b>	Renal atılım	Tübüllerde ilaç birikimi
<b>Hücre içine alım ve metabolizma</b>	Transport aracılıklı İntraselüler hidrasyon	Hücre içine alımın engellenmesi Artmış toksisite
<b>Genomik etkiler</b>	Gen aktivasyonu Genin inaktif hale gelmesi	Kaspaz 3 $\rightarrow$ Apoptoz Süperoksid dismutaz $\rightarrow$ $\uparrow$ ROS
<b>Doğrudan toksik etkiler</b>	ROS Mitokondriyal hasar	Lipid peroksidasyonu $\uparrow$ ROS, $\downarrow$ ATP üretimi
<b>İndirekt toksik etkiler</b>	MAPK yolları	$\uparrow$ TNF- $\alpha$ üretimi apoptozu aktive eder
<b>Organ etkileri: Histoloji</b>	Tübüler hasar	Apoptoz, nekroz
<b>Organ etkileri: Fonksiyon</b>	$\downarrow$ tübüler fonksiyon, $\downarrow$ GFR	Na, K, Mg kaybı

### ***BÖBREKTE SİSPLATİNE BAĞLI PATOFİZYOLOJİK ETKİLER***

Serbest sisplatin glomerülde filtre edilir, %80'i ilk 24 saat içinde vücuttan atılır. GFR doza bağımlı (kümülatif dozlarla) olarak düşebileceği gibi tek doz uygulamasından sonra da azalabilir (7). Sisplatin infüzyonundan sonraki ilk üç saat içinde böbrek kan akımı azalabilir ve bunun sonucunda GFR düşebilir. Renal kan akımının azalmasına ve GFR'nin düşmesine neden olan araçlar henüz saptanamamıştır (10). Maküla densada sodyum klorür alımının artması tübüloglomerüler geribildirim aracılığı ile renal vasküler dirençte artışa neden olur. Bu olayların sonucunda GFR'de ve renal kan akımında değişiklikler oluşur (94). Sisplatin tedavisi alan hastaların %25'inde tedaviden sonraki bir iki haftalık süreçte geri dönüşümlü azotemi saptanır (95). Hastaların önemli bir azınlığında renal fonksiyonlarda azalma görülür. Geri dönüşümsüz böbrek hasarı yüksek dozlarda ve tekrarlanan kürlerde olur. İleri yaş, renal radyasyon ve alkol alımı toksisiteyi artırır (10).

Sisplatin nefrotoksisitesinde görülen proksimal tübüler disfonksiyon renal hemodinamiklerde değişimlere neden olur. Sisplatin uygulamasından 48-72 saat sonra proksimal ve distal tübüler reabsorpsiyonda bozulma ve vasküler dirençte artış görülür (95). Akut toksisite mitokondriyal fonksiyonda, hücre katyon içeriği ve solüt transportunda azalmaya neden olur (94,95). Sisplatin uygulaması tübüler reabsorpsiyonda bozulmaya ve idrar konsantrasyonunda azalmaya neden olur. Proksimal tübülde sodyum reabsorpsiyonu, distal tübülde de sodyum ve su reabsorpsiyonu artışı ile su ve sodyum atılımı artmıştır. Poliüri genellikle sisplatin uygulaması ile birlikte görülür ve iki farklı fazda görülür. Birinci faz ilacın uygulanmasından 24-48 saat sonra gerçekleşir. İdrar ozmolalitesi azalır ancak GFR'de değişiklik gözlenmez. Bu fazın prostoglandin aracılığı ile olduğu düşünülmektedir; vazopressin ve aspirin ile engellenebilir. Erken fazda poliüri kendiliğinden düzelir. İkinci faz ise ilaç uygulamasından 72-96 saat sonra gerçekleşir ve GFR'de azalma ile karakterizedir. Bu fazda medüller tonisitede azalma ve proksimal tübül ve Henle kulpunun çıkan kolunda NaCl transportunda bozulma görülür. Bu faz herhangi bir ilaçla engellenemez. Birçok hasta idrarla sodyum, potasyum, magnezyum ve kalsiyum kaybeder ve bazılarında ortostatik hipotansiyon görülür (10).

### ***SISPLATİN NEFROTOKSİSİTESİNDE HİSTOPATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER***

Sisplatin nefrotoksisitesi öncelikle tübülointersitisyel lezyonlara neden olur (10). Hayvan modellerinde sisplatinin proksimal tübülün özellikle S3 segmentini etkilediği saptanmıştır (7,10,12). Proksimal tübül hücrelerinde nekroz, apoptoz, sitoplazmik vaküolizasyon, lizozomlarda değişiklikler, karyopiknoz ve tübüllerde silendirler izlenmiştir. Aynı zamanda bazı proksimal tübül hücrelerinde apikal hücre membranında fırçamsı kenar mikrovillus hasarı saptanmıştır. Distal tübüllerde de sitoplazmik vaküolizasyon, apoptoz, mitokondriyal şişme ve nükleer solukluk meydana geldiği gösterilmiştir (38,39,96). Yapılan çalışmaların çoğunda glomerüler morfoloji ve ultrastrüktürel yapı intakt olarak tanımlanmakla beraber glomerüler hasarın saptandığı çalışmalar da bildirilmiştir (39,96,97). Gentamisin ve sisplatin nefrotoksisitesinin incelendiği bir çalışmada hem sisplatin hem de sisplatin ve gentamisin verilen ratlarda tübüler hücrelerin yanısıra glomerülerde de önemli morfolojik değişiklikler saptanmıştır. Elektron mikroskopik incelemede vasküler lümende endotelial sitoplazmik uzantılar, kapiller bazal membranda kalınlaşma ve laminasyon, podosit ayakları çıkıntılarında fokal füzyonlar, epitelial ve parietal hücrelerin endotelial hücre stoplazmalarında vaküolizasyon ve glomerüllerde lipid ve myeloid cisimcikler gözlenmiştir (97). İnsanlarda sisplatin nefrotoksisite ile ilgili yapılmış az sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda hasar

distal tübül ve toplayıcı kanallar ya da proksimal ve distal tübüllerde saptanmıştır. Doza ve biyopsi zamanına bağlı olarak değişik yerlerde etkilenme gözlenmiştir. İlaç verildikten sonraki 3-60 gün içinde yapılan biyopsilerde segmental dejenerasyon, nekroz, proksimal tübülün pars konvolüta ve pars rekta kısımlarında epitel hücrelerin deskuamasyonu saptanmıştır. Akut böbrek yetmezliği olan hastalarda ise proksimal kıvrımlı tübüllerde belirgin nekroz izlenir. Nekroz derecesi doza, konsantrasyona ve zamana bağlıdır. İntersitisyel nefrit görülmez. Kronik nefrotoksisite olan hastalarda ise atipik nükleus ve mitotik figürlerle, hyalin silindiri içeren yassı epitelle döşenmiş kistik dilate tübüller gözlenmiştir. Uzun süreli sisplatin tedavisi tübüllerde kist oluşumuna ve interstisyel fibrozise neden olabilir (10).

#### **2.1.4.2 SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTESİNİN ÖNLENMESİ**

Sisplatin nefrotoksisitesinin önlenmesine yönelik ilacın etki mekanizması ve patogenez göz önüne alınarak bir çok yaklaşım denenmiştir.

##### ***Atılım ve Metabolizma***

Sisplatin uygulamadan önce, ilacı verirken ve ilacı verdikten sonra salin (%0.9 NaCl) ile etkin hidrasyon yapılması ve eş zamanlı manitol uygulamasının sisplatin nefrotoksisitesini büyük ölçüde azalttığı gösterilmiştir (94). Ancak yapılan çalışmalar diüretiklerin kullanımının gerekliliği ve hidrasyon sıvısının içeriği hakkında farklı görüşler bildirmektedir. Mannitol ve furosemid platinin idrardaki konsantrasyonunu azalttığı için bu ajanların sisplatin nefrotoksisitesini azaltabileceği öne sürülmüştür Ancak bu diüretiklerin plazma ya da böbrekteki platin miktarı ya da hücrel nekroz derecesi üzerinde olumlu bir etkide bulunmadıkları gösterilmiştir. Platinin çok önemli bir tübüler reabsorpsiyonu olmadığından hücredeki platin miktarı ilacın lüminal konsantrasyonuna bağlı olamaz (98). Bazı çalışmalarda mannitol ve furosemidin sisplatin nefrotoksisitesini azalttığı gösterilmişken bazı çalışmalarda daha da arttırdığı bildirilmiştir. Bir çalışmada salinin tek ya da furosemid ile beraber verilmesinin salin ve mannitole göre böbreği daha iyi koruduğu gösterilmiştir (99). Salin ya da daha hipertonic sıvılarla hidrasyon yapılması sisplatinin vücuttan atılımını arttırabilir (100). Salin aynı zamanda yüksek klorür konsantrasyonları sağlayarak klorür iyonlarının platin molekülünden ayrılmasını engeller ve böylelikle reaktif sisplatin türleri oluşmaz (101). Alternatif olarak, sodyum iyonlarının da böbrekte koruyucu etkisi olabilir. Son yıllarda salinin sisplatinin hücrel birikimini değiştirmedeği ancak hücrede sisplatine duyarlılığı modifiye eden stres yanıtı geliştirdiğini gösteren bir çalışma yayımlanmıştır. Bu çalışmada; stres yanıtı sonucunda sisplatinin DNA'ya ulaşip reaksiyona girmesi zorlaştığı, proksimal tübülde

apoptoza direnç geliştirdiği ve oluşan nefrotoksinlerin metabolik aktivasyonunda değişiklikler gözlemlendiği bildirilmiştir. Ancak bu etkinin sisplatinin tümörisidal etkilerini bloke ederek antineoplastik aktivitenin azalmasına da neden olabileceği ileri sürülmüştür (102).

Bütün bu bilgiler ışığında diüretik kullanımının nefrotoksik etkiyi önlediğine dair net bilgi yoktur ancak sisplatin uygulaması sırasında, öncesinde ve sonrasında etkin hidrasyon yapılması halen kullanılan en önemli koruyucu önlemdir.

Sisplatin nefrotoksitesinde GFR'de meydana gelen düşüklük tek bir dozda verilen miktarla doğrudan orantılıdır. Bu yüzden de sisplatin genellikle fraksiyone dozlar halinde 3-5 günlük kürler içinde kullanılmaktadır. Dozun bir uygulamada 120 mg/m<sup>2</sup> 'yi geçtiği durumlarda böbrek hasarı kaçınılmaz olabilir (7).

### ***Hücre sel alım***

İkinci ve üçüncü jenerasyon platin ilaçları olan karboplatin ve oksaliplatin daha az nefrotoksik etkileri olduğundan klinik kullanımda yerini almıştır. Bu ilaçlar, sisplatinin böbreklerde hücre içine alınmasında rol alan OTC 2 ile reaksiyona girmedikleri için renal tübül hücrelere alımları azalmıştır (46,47). Karboplatinin *in vitro* antitümör etkinliğinin sisplatinine benzer olduğu gösterilmiştir. Karboplatin eş zamanlı başka nefrotoksik ajanlar alan ya da mevcut renal disfonksiyonu olan hastalarda kullanılabilir (10). Sisplatinde daha az olmakla beraber karboplatin ile de doza bağımlı nefrotoksikite gözlenmiştir (94). Oksaliplatin kullanımının ise böbrek fonksiyonları üzerinde olumsuz etkisi bildirilmemiştir. İleri evre kolorektal kanser tedavisinde kullanımı onaylanmıştır ancak diğer tümörlerde etkinliği ve sisplatin ya da karboplatinin yerini alıp alamayacağı henüz değerlendirme aşamasındadır (103). Nedaplatin, satraplatin, BBR3464 ve ZD0473 gibi *in vitro* çalışmalarda olumlu sonuçlar veren yeni platin türevleri ise halen çalışma aşamasındadır (104).

Diyabetik hayvan modellerinde böbreklerde daha az sisplatin nefrotoksitesini gözlenmiştir. Bu hayvanlarda organik katyon transport sisteminin fonksiyonel olarak bozulmuş olması böbreğin sisplatinini daha az biriktirmesine ve dolayısı ile daha az nefrotoksik etkiye neden olmuştur. Bu durumda insülin tedavisi bu nefroprotektif etkiyi, organik katyon transportunun fonksiyonunu düzenleyip sisplatinin hücre içine alımını ve sitotoksitesini arttırma yolu ile tersine çevirebilir. İnsanlarda serum glukoz seviyesinin manipülasyonunun sisplatin nefrotoksitesini üzerine etkisini araştıran çalışmalara ihtiyaç vardır (105). Yapılan *in vitro* çalışmalarda simetidinin hOCT2 yolu ile hücre içine girmek için sisplatin ile yarıştığı gösterilmiştir. Simetidine ait bu özellik sisplatinin proksimal tübül hücreleri tarafından alımını engelleyip sisplatin nefrotoksitesini azaltabilir (46). Ortak bir yapısal element içeren sistein,

metiyonin, N-asetilsistein ve DL-homosisteinin proksimal tübül hücrelerinin S1, S3 kısmı ve distal toplayıcı tübüllerde sisplatin alımını engellediği gösterilmiştir (50).

### ***Intraselüler dağılım***

Prokainamidin böbrekte biriktikten sonra sisplatin ile reaksiyona girerek daha az toksik bir kompleks oluşmasını sağladığı ve sıçanlarda sisplatin toksisitesini azalttığı gösterilmiştir (106).

### ***Antioksidan ilaçlar***

Nefrotoksisite patogeneğinde oksidatif hasar önemli bir rol oynadığından nefrotoksisiteyi önlemeye yönelik çok sayıda antioksidan ajan çalışılmıştır (10,12).

Allopürinol ve ebselenin beraber kullanımının ratlarda nefrotoksisite ve ototoksisiteyi azalttığı gösterilmiştir. Ksantin oksidaz inhibitörü olan allopürinol ROS üretimini azaltmaktadır. Ebselen glutasyon peroksidaza benzeyen özellikleri nedeni ile peroksinitriti etkin bir şekilde ortadan kaldırır ve glutasyon ve diğer tiyoller varlığında lipid peroksidasyonunu engeller. Oral yoldan emilimi iyi olan ebselen akut iskemik stroke olan insanlarda denenmiş ve herhangi bir yan etkiye rastlanmamıştır (107).

Erdostein'in G6PD aktivitesini arttırarak oksidatif strese karşı hücreyi koruduğu gözlenmiştir (79). Edavorone ve N-asetilsistein azalmış glutasyon depolarının tekrar artmasına yardımcı olurlar (108).

Yapılan hayvan çalışmalarında antioksidan özelliklere sahip olan glutamin, kaspaisin, silmarin, Vitamin C ve Vitamin E gibi ajanların nefroprotektif özellikleri saptanmıştır (10,12).

Sülfür içeren bileşenlerle yapılan çok sayıda çalışmada da bu ajanların sisplatinin antitümöral etkinliğini etkilemeden nefrotoksisiteyi azalttığı yönünde kanıtlar elde edilmiştir (10).

Bir organik tiyofosfat olan amifostinin maliyn hücelere seçici olan bir özellikle tiyol grubu bağışlayarak sisplatin toksisitesini azalttığı gösterilmiştir. Amifostin, sisplatin alan ileri evre overyen ve küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastalarda kümülatif renal toksisiteyi azaltmaya yönelik Amerikan Gıda ve İlaç dairesinin kullanımını onayladığı tek ilaçtır (109). Bu ilaç serbest radikalleri bağlayarak toksisiteyi önler. Ayrıca amifostin platine bağlanarak DNA bağlarının oluşumunu azaltabilir. Ancak yan etkileri ve maliyeti nedeni ile sınırlı kullanımı mevcuttur (10).

### ***Sinyal iletimi***

Serum timik faktör timustan izole edilen ve T hücrelerinin aktivasyonu ve farklılaşmasında görev alan bir timik hormondur. Serum timik faktör rat modelinde ERK aktivasyonunu azaltarak sisplatine bağlı renal hasarı önlemiştir (110). Diğer selektif MAPK/ERK inhibitörlerinin de inflamasyon ve apoptozu azaltarak sisplatine bağlı renal hasarı azalttığı gösterilmiştir (78). Ancak sisplatine bağlı tümör hücrelerinin apoptozu MAPK/ERK yolları ile aktive olduğundan bu inhibitörlerin kullanılmasının sisplatinin antitümöral etkinliği üzerinde olumsuz bir etkisi olabilir (111).

### ***Antiinflamatuar ilaçlar***

Salisitlar bir çok infalamatuvar hastalığı tedavi etmekte kullanılırlar. Antiinflamatuar etkinliklerini siklooksigenaz aktivitesini ve prostoglandin sentezini engelleyerek gösterirler. Sisplatin toksisitesinin geliştirildiği rat modellerinde yüksek doz salisilat kullanımının TNF- $\alpha$  üretimini zayıflattığı ve renal inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir. Salisilatların sisplatinin antitümöral etkinliğini bozmadığı da yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (65). Hayvan modellerinde TNF- $\alpha$  üretimini baskılayan  $\alpha$ - melanosit uyarıcı hormon ' *$\alpha$ - melanocyte stimulating hormone*' ( $\alpha$ -MSH) ve interlökin 10'un sisplatine bağlı renal hasarı azalttığı gösterilmiştir (112). *In vitro* modellerde fibratların, sitratların mitokondriden çıkışını ve bax proteinlerinin sitoplazmadan mitokondriye geçişini önlemek sureti ile serbest yağ asidi oluşumunu engellediği ve apoptozu baskıladığı bildirilmiştir. Fibratların sisplatin nefrotoksitesini azalttığı hayvan çalışması ile desteklenmiştir (113). Ancak bu ajanların nefrotoksitesiyi önleyip önlemediğini ortaya çıkarmak için insan çalışmalarına ihtiyaç vardır.

### **2.1.4.3 SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTE TEDAVİSİ**

Sisplatine bağlı gelişen böbrek hasarında spesifik bir tedavi bulunmamaktadır. Sisplatin verilen hastalarda hidrasyona dikkat edilmelidir. Sıklıkla magnezyum ve potasyum replasmanına ihtiyaç duyulan bu hastalar elektrolit imbalansı açısından yakın takip edilmelidirler. Sisplatin ve magnezyum dış medullada aynı sodyum ve su kanallarını etkilerler. Sisplatin magnezyum kaybına neden olur ve magnezyum eksikliği de sisplatin nefrotoksitesini artırabilir. Sisplatin tedavisi sırasında ciddi gastrointestinal yan etkiler görülebilir ve bu durum anoreksi ve diyare nedeni ile magnezyum eksikliğine neden olabilir. Bu yüzden magnezyum desteği sisplatin toksisitesini azaltabilir (10). Germ hücreli tümörü olup sisplatin tedavisi alan 17 hastanın katıldığı bir çalışmada devamlı magnezyum desteğinin renal tübül hasarı azalttığı gösterilmiştir (114).

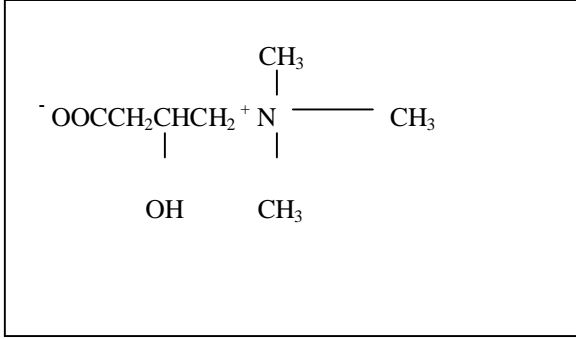


Sisplatin nefrotoksitesi gelişen diğer hastalarda diğer nefrotoksik ajanlar da dikkatle kullanılmalıdır. Çalışmalar sisplatin nefrotoksitesini önlemek amacı ile profilaktik önlemler üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak bu çalışmalarda da ilacın antitümöral etkinliğini yitirmemesi de göz önünde bulundurulmalıdır (10).

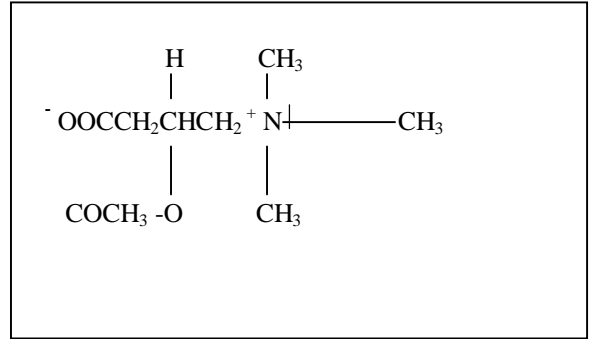
## 2.2 KARNİTİN

Karnitin hücrenin enerji üretimi için beta oksidasyona gidebilmek üzere uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondri matrisine geçişinde görev alan, asetillenmiş Koenzim A (KoA) miktarını düzenleyen ve diğer hücresel metabolik olaylarda yer alan, antioksidan özelliği kanıtlanmış vitamin benzeri bir bileşiktir. Vücutta L izoformunda bulunan karnitinin L-karnitin, asetil L-karnitin ve propiyonil L-karnitin türevleri bulunmaktadır.

**Şekil 9:** Karnitinin moleküler yapısı  
(4-N-trimetilamonyum-3-hidroksibütirik asit)



**Şekil 10:** Asetil L-karnitinin moleküler yapısı



### 2.2.1 KARNİTİN ve ASETİL-L KARNİTİN: BİYOSENTEZ, FİZYOLOJİK ROL, METABOLİZMA

Karnitin (4-N-trimetilamonyum-3-hidroksibütirik asit) 20. yy başlarında kas dokusunda keşfedilen esansiyel olmayan bir amin türevidir. Önceleri esansiyel bir vitamin olduğu düşünülmüş ancak daha sonraları karaciğer böbrek ve beyinde aminoasit öncüllerinden sentezlendiği gösterilmiştir (14,15).

Karnitin sentezinde iki esansiyel aminoasit görev alır; lizin ve metiyonin. Sentez, L-lizin aminoasidinin S-adenozilmetiyonin (SAM) ile metilasyonu ile başlar. Magnezyum, C vitamini, demir, B3 ve B6 vitaminleri, alfa ketoglutarat ve SAM sentezi için gerekli olan diğer kofaktörler ( metiyonin, folik asit, B12 vitamini,betain) endojen karnitin sentezinde görev

almaktadır (14). İnsanda iskelet kası, kalp, karaciğer, böbrek ve beyinde karnitin bir öncülü olan gamma-bütirobetain sentezlenir ancak sadece karaciğer böbrek ve beyinde bu madde karnitine dönüştürülebilir. Bu reaksiyon gamma-bütirobetain hidrosilaz enzimi tarafından gerçekleştirilir. Bu enzimin aktivitesi fetus ve yenidoğanlarda çok düşüktür (15). İnsanlarda karnitin %75'i diyetten sağlanır, geri kalan %25'i ise endojen olarak sentezlenir (16). Karnitin kaynakları çoğunlukla et, süt gibi hayvansal ürünler olmakla birlikte pişirmeye ve hazırlamaya bağlı diyetteki karnitin içeriği değişebilir (14,15).

Dışardan alınan ve endojen olarak sentezlenen karnitin L- izoformundadır (15). L-karnitin aktif transport ve pasif difüzyon yolları ile barsaklardan emilir. Maksimum kan konsantrasyonuna oral alımdan üç buçuk saat sonra ulaşılır ve 15 saatlik bir yarı ömrü vardır (14). Plazmada ve dokularda serbest ya da yağ asitlerine bağlı açilkarnitin türevi olarak bulunabilir (16). Kalp, iskelet kası, karaciğer, böbrekler ve epididimiste spesifik transport sistemleri bulunan karnitin bu dokular içinde yoğunlaşır. Kan yoluyla taşınan karnitin ağırlıklı olarak kalp ve iskelet kasında depolanır. Karnitin vücuttan atılımı esasen böbrekler yolu ile olur (14). Glomerüler filtrasyondan sonra karnitin proksimal tübüllerde bulunan spesifik bir transport sistemi tarafından etkin şekilde (filtre edilen karnitin %90'ı) reabsorpsiyonu yapılır. Böbrek karnitin transportunun sodyum- bağımlı olduğu ve açil karnitin gibi karnitin türevleri ile engellenebildiği gösterilmiştir (17,18).

Karnitin hücresel enerji metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Serbest uzun zincirli yağ asitlerinin hücre enerji üretimi için beta oksidasyona gidebilmek üzere mitokondri iç membranından mitokondri matriksine geçişinde esansiyel bir kofaktör olarak rol alır. L-karnitin beta oksidasyonu hızlandırarak asetil Koa miktarını artırır, potansiyel toksik asetil KoA metabolitlerini tamponlar ve asetil KoA/KoA oranını düzenler. Bu oran sitrik asit siklusu, glukoneogenez, üre siklusu ve yağ asit oksidasyonunda görev alan bir çok mitokondriyal enzim aktivitesinin düzenlenmesinde önemlidir (14,19,20). Karnitin sayılan bu önemli görevlerinin yanı sıra bir çok hücre içi metabolik olayda görev alır. Bunlar;

- 1-Dallı zincirli aminoasit (valin, lösin, izölösin) metabolizması
- 2- Keton cisimlerinin kullanımı
- 3-Peroksizomal beta oksidasyonu
- 4-Eritrosit membranda yağ asiti-fosfolipid dönüşümü
- 5-Yağ asit zincir kısaltma işlemlerinin yan ürünlerinin peroksizomlardan dışarı çıkarılması
- 6-Antioksidan etki, serbest radikal çöpçülüğü (20,21).

Asetil L-karnitin, L-karnitin kısa zincirli ester türevi olup vücutta en çok bulunan açilkarnitin türüdür. Bu karnitin türevi, L-karnitin fizyolojik özelliklerini taşımasının yanı sıra

sıra içerdiği asetil grubu nedeni ile , yüksek enerji metabolizması ve anabolik reaksiyonlar sırasında önemli bir asetil grubu donörü olarak görev alır ve normal mitokondriyal fonksiyonda stratejik bir rol üstlenir (16). Asetil L-karnitin, yağ asidi oksidasyonu sırasında asetil Ko-A'nın mitokondriye geçişini hızlandırır, asetilkolin üretimine katkıda bulunur ve protein ve fosfolipid sentezini uyarır (15).

## **2.2.2 KARNİTİN: ANTIOKSİDAN ,ANTIAPOPTOTİK ve İMMÜNMODULATOR ÖZELLİKLERİ**

L-karnitin ve türevlerinin güçlü antioksidan özelliklere sahip olduğu, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kanıtlanmıştır.

L-karnitin serbest uzun zincirli yağ asitlerinin beta oksidasyona gidebilmek üzere mitokondri matriksine geçişinde rol alır. Beta oksidasyon sonucu oluşan asetil KoA çok miktarda oksijenin tüketilip ATP üretildiği trikarboksilik asit siklusüne girer. Böylelikle bu siklus sonunda H<sub>2</sub>O'ya indirgenen oksijenin konsantrasyonu azalır ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu azalmış olur (22).

Hücre içi oksidatif hasar lipid peroksidasyonuna, fosfolipid yıkımına ve bu yolla serbest yağ asidi miktarının artışına neden olur (115,116). Serbest uzun zincirli yağ asitleri hidrofobik anyonlar olup anyonik deterjanlarla benzer özellikler taşırlar ve doku düzeylerindeki artışları mitokondri de dahil olmak üzere hücre membran yapılarında ve fonksiyonlarında değişikliğe yol açar (117,118). Bu uzun zincirli serbest yağ asitleri mitokondrilerdeki voltaj bağımlı kanallarla etkileşimde bulunup membran geçirgenliğinde değişikliğe ve sitokrom c salınımına ve apoptoza yol açarlar (68,118-120). Serbest yağ asitlerinin neden olduğu mitokondriyal disfonksiyonun karnitin tarafından engellendiği gösterilmiştir (118). Farklı hücre tiplerinde yapılan çalışmalar karnitin hücre membran geçirgenliğindeki değişiklikleri, apoptozu, mitokondriyal disfonksiyonu ve lipid peroksidasyonunu güçlü bir şekilde engellediğini göstermiştir (38,118,121).

L-karnitin oksidatif stresi engeller, nitrik oksidi ve oksidatif hasardan korunmaya yönelik enzimlerin aktivitesini düzenler, bir çok mitokondriyal toksik ajana karşı koruyucu etki sağlar (23-25). Süksinat dehidrogenaz gibi mitokondriyal enzimlerin yanı sıra katalaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde koruyucu rol oynar (26). L-karnitin bir antioksidan olarak antioksidatif savunma mekanizmasındaki üç enzimin-glutatyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz- peroksidatif hasardan korunmasında ve esasen serbest radikallerin neden olduğu yaşla meydana gelen değişikliklerin normal hale getirilmesinde önemli bir ajandır (27). Bir çalışmada yaşlı ratlara verilen L-karnitin güçlü bir antioksidan

ve serbest radikal çöpcüsü olduğu, askorbik asit, glutasyon ve E vitamini gibi antioksidanların etkisini arttırdığı ve nöronlarda peroksidatif hasarın göstergesi olan lipofuksin birikimini azalttığı gösterilmiştir (21). L-karnitinin propiyonil ester türü olan propiyonil-L-karnitin ile yapılan başka bir çalışmada ise bu maddenin etkin bir antioksidan olduğu süperoksit çöpcülüğü yaptığı ve DNA'yı kısmen koruyucu etkisi olduğu ortaya çıkarılmıştır (28). Yakın zamanda ülkemizden bildirilen bir çalışmada L-karnitin,  $\alpha$ -tokoferol ve troloks gibi referans antioksidanlarla karşılaştırılmış, lipid peroksidasyonunu önleyici etkisi ve antiradikal özellikleri bir kez daha kanıtlanmıştır (27).

Son zamanlardaki çalışmalar L-karnitinin antioksidatif özellikleri yanında immünmodulator özellikleri de olduğunu göstermektedir. Karnitin tedavisinin yaşlı inflamatuvar hücrelerde kemotaktik ve fagositik aktiveteleri iyileştirdiği, astrositleri oksidatif stres ve inflamatuvar sitokin maruziyetinden koruduğu ve vitamin E ve folatla birlikte Alzheimer hastalığını önlemede faydalı olabileceği bildirilmiştir (122-124).

Son dönemlerde karnitinin antiinflamatuvar etkinliğini kanıtlamaya yönelik bir çok çalışma yapılmıştır. L-karnitinin kardiyoprotektif etkisinde infalamatuvar sitokinlerin rolünün çalışıldığı bir hayvan deneyinde L-karnitin uygulamasının interlökin-1 $\beta$ , interlökin 6 ve TNF- $\alpha$  seviyelerini önemli oranda azaltarak inflamatuvar süreci zayıflattığı gösterilmiştir (29). Başka bir çalışmada da ratlarda oluşturulan artrit modellerinde L-karnitin ile beraber  $\alpha$ -lipoik asit uygulamasının TNF- $\alpha$  seviyelerini anlamlı oranda düşürdüğü gösterilmiştir (30). Kronik hemodiyaliz hastalarında yapılan başka bir çalışmada da intravenöz L-karnitin uygulamasının inflamatuvar süreçlerde artan bir belirteç olan serum C-reaktif protein (CRP) düzeyini anlamlı oranda azalttığı gösterilmiştir (31). Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada ise sıçanlarda karnitinin inaktif bir izomeri olan D-karnitin verilerek karnitin eksikliği oluşturulmuş ve beraberinde karboplatin verilerek karnitin eksikliğinin karboplatin nefropatisi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda ise karnitin eksikliğinin oksidatif hasarı ve TNF- $\alpha$  ve NO gibi inflamatuvar sitokinleri arttırarak karboplatin nefropatisini daha da arttırdığı gösterilmiştir (32).

Karnitin ve türevlerinin kanıtlanmış bu etkilerine ek olarak asetil L-karnitinin güçlü nöroprotektif ve antiapoptotik özellikleri kanıtlanmıştır. Nöroprotektif özelliklerini antioksidan, antiapoptotik aktivite, intraselüler membranların stabilizasyonu ve kolinerjik nörotransmisyon yolu ile sağlamaktadır (15). Son yıllardaki çalışmalarda asetil L-karnitinin apoptotik yollaklarda kaspaz 3 ve 9'u engelleyerek apoptozu etkin bir şekilde önlediği gösterilmiştir (125-127).

### **2.2.3 KARNİTİN:PRİMER VE SEKONDER EKSİKLİK, KULLANIM ALANLARI**

Karnitin her ne kadar diyetle alınabiliyor ve endojen olarak sentezleniyor olsa da primer ve sekonder karnitin eksiklikleri görülebilir (14). Prematürel ve yenidoğanlarda karnitin sentezinde yer alan gamma-bütirobetain hidrosilaz enzim aktivitesi düşük olduğundan primer karnitin eksikliği görülebilir. Organik asidüri gibi bazı metabolik hastalıklarda da primer karnitin eksikliği görülebilir. Her ne kadar karnitin %99 oranında intraselüler bulunsa da serum açıl karnitin (AK) ve serbest karnitin (SK) arasındaki ilişki intramitokondriyal metabolik değişikliklere oldukça duyarlıdır. Açlık, yaşlılık ve hamilelikte serumda serbest karnitin oranı azalmaktadır. AK/SK oranının değiştiği ve karnitin eksikliğinin görüldüğü diğer durumlar siroz, kronik böbrek yetmezliği, ciddi enfeksiyon, barsak rezeksiyonu, valproik asit tedavisi, diyabet, kalp yetmezliği, Alzheimer Hastalığı ve kanserdir (14,15).

Anoreksi, kronik yorgunluk, kardiyovasküler hastalık, difteri, hipoglisemi, erkek infertilitesi, kas myopati, Rett sendromu gibi durumlarda eksojen karnitin tedavisinin faydası gösterilmiştir. Karnitin tedavisinin hemodiyaliz ve kanser hastalarında kronik inflamasyon ve oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir (128,129). Ayrıca preterm infantlar, diyaliz hastaları ve HIV pozitif bireylerde de L-karnitin eksikliği görülebileceğinden bu grup hastalar L-karnitin tedavisinden fayda görebilirler (14,15). Yapılan bir çalışmada hemodiyalize giren hastalarda karnitin uygulamasının BUN, kreatinin ve fosfor gibi protein katabolizma ürünlerinin serum değerlerini anlamlı oranda düşürdüğünü saptanarak son dönem böbrek hastalığında karnitin kritik bir role sahip olduğu gösterilmiştir (130).

Asetil L-karnitinin nöroprotektif özelliklerinden dolayı nörolojik bozukluklarda kullanımının faydalı olabileceği, birçok çalışmada desteklenmiştir. Son zamanlarda, bu özelliklerinden dolayı Alzheimer Hastalığı, kronik yorgunluk sendromu, depresyon, HIV enfeksiyonu, diyabetik nöropati, beyine ait iskemi ve reperfüzyon hasarı, alkolizm ve yaşlılık gibi klinik durumlarda kullanımı söz konusudur Ayrıca diyabette, antikanser ve antiretroviral tedavi alanlarda ağrı set noktasını azaltarak antihiperalezik etkisi olduğu gösterilmiştir (15). Karnitin piyasada satılan L-karnitin, asetil-L-karnitin ve propiyonil-L-karnitin formları mevcuttur (131). Günlük oral doz günde iki ya da üç kez doz başına 1-2 g olmak üzere toplam 2-6 g/gün olarak önerilmektedir. Çok az yan etki bildirilmekle beraber bu yan etkiler; mide bulantısı, kusma, abdominal kramp ve diyare gibi gastrointestinal etkilerdir (14).

### **2.2.4 KARNİTİN VE KANSER**

Kanserli hastalarında yetersiz alım ya da kaşeksinin yanı sıra tedavi ve neoplastik süreçten kaynaklanan metabolik değişikliklerden dolayı karnitin eksikliği görülebilir (132). Bir çok

çalışmada L-karnitin ve türevlerinin kanser hastalarında kanserin kendisinden ya da kemoterapi, immünoterapi gibi uygulanan tedavilerden kaynaklanan yorgunluğu (*cancer related fatigue-CRF*) önemli ölçüde azalttığı kanıtlanmıştır (133-135).

Kemoterapiye bağlı periferik nörotoksistide karnitin kullanımı ile ilgili umut verici çalışmalar mevcuttur (136). Hayvan çalışmalarında antrasiklinlerin neden olduğu akut ve geç kardiyomyopatinin karnitin tedavisi ile anlamlı oranda önlendiği gösterilmiştir (137).

### **2.2.5 KARNİTİN VE SİSPLATİN**

Sisplatin toksisitesinde L-karnitin ve türevlerinin kullanımı ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Bazı hayvan çalışmalarında karnitin kullanımının sisplatine bağlı hepatotoksiste , kardiyotoksiste, nörotoksiste ve ince barsak toksisitesini azalttığı gösterilmiştir (33-36).

Sisplatin nefrotoksitesinde karnitin kullanımı ile ilgili az sayıda çalışma vardır (37-39). Sisplatin böbrekte proksimal tübüllerde belirgin hasara yol açar ve oksidatif strese neden olur. L-karnitin reabsorpsiyonu proksimal tübüllerden yapıldığından sisplatin toksisitesinde vücuttan karnitin atılımı artar. Karnitinin renal atılımının artışı sisplatine bağlı tübüler hasarın ilk göstergesi olabilir (138). Ayrıca bu durumda sekonder karnitin eksikliği de görülür ki bu da hastaların bozulmuş metabolik durumlarının daha da kötüye gitmesine neden olabilir.

Karnitin eksikliğin sisplatine bağlı nefrotoksistide bir risk faktörü olduğu bilinmektedir.L-karnitin ve propiyonil L-karnitin gibi karnitin türevlerinin antitümör etkinliği bozmadan sisplatin toksisitesine karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir ancak koruyucu etkinin hangi mekanizmalar aracılığı ile geliştiği tam olarak anlaşılamamıştır (37,38).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Deney hayvanları**

Her biri altı-sekiz haftalık ortalama ağırlıkları 200-300 g olan, içbesleme yetiştirilen , 28 adet Wistar türü Albino suşu dişi sıçan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı' ndan (DEÜTFHDAL) elde edildi. Sıçanlar çalışma süresince oda ısısında ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) ve 12'şer saatlik gün ışığı/karanlık ortamında tutulup, standart pelet sıçan yemi ile beslendi, suya serbestçe ulaşabilmeleri sağlandı. Sıçanların çalışmadan çıkarılma gerekçeleri; sepsis, lokal enfeksiyon, katabolizmada artış ve kanıtlanmış travma olarak belirlendi.

Çalışma için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 18.05.2007 tarih ve 57 sayılı etik kurul onayı alındı.

#### **3.2 Deney hayvanları grupları**

Sıçanlar rastgele seçilerek, her biri yedi sıçan içeren dört grup oluşturuldu.

Grup I (n=7): Serum fizyolojik uygulanan sıçan grubu

Grup II (n=7): Asetil L-karnitin uygulanan sıçan grubu

Grup III (n=7): Sisplatin uygulanan sıçan grubu

Grup IV (n=7): Asetil L- karnitin verildikten sonra sisplatin uygulanan sıçan grubu

#### **3.3 Sıçanlara anestezi uygulanması:**

Tüm sıçanlara girişimsel işlemlerden önce ketamin hidroklorid (40 mg/kg) ve ksilazin hidroklorid (5mg/kg) intraperitoneal uygulanarak anestezi sağlandı.

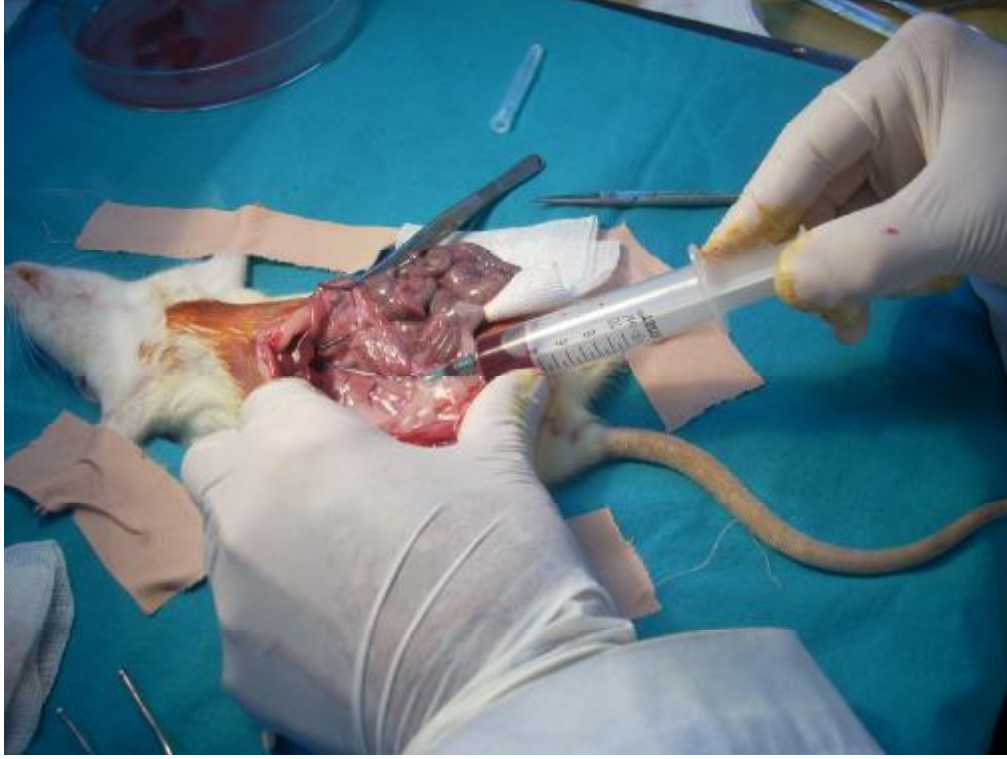
Girişimsel işlemler tamamlandıktan sonra sıçanlar yan yatırılarak uyanıncaya kadar derlenmeleri izlendi.

#### **3.4 Sıçanlardan kan örneklerinin alınması**

Sıçanların ilk kan örnekleri çalışma başlangıcında (sıfırıncı günde) ketamin hidroklorid (40 mg/kg) ve ksilazin hidroklorid (5mg/kg) intraperitoneal uygulanarak anestezi sağlandıktan sonra kuyrukları ılık su ıslatılıp kuyruk veninden (vena caudalis) venosuction ile (yaklaşık 0.5-1 mL) alındı.

Sıçanların ikinci kan örnekleri Sisplatin, asetil L-karnitin veya eşdeğer hacimde salin uygulamalarından 72 saat sonra (izlemin dördüncü gününde) ketamin hidroklorid (40 mg/kg) ve ksilazin hidroklorid (5mg/kg) anestezisi altında feda edilme işlemi sırasında abdominal venden (vena cava caudalis) venosuction ile (yaklaşık 5-8 mL) alındı (Resim 1).

**Resim 1:** Bir sıçanın feda edilme işlemi sırasında abdominal venden kan alınması



### **3.5 Sıçanların serum kreatinin düzeylerinin ölçülmesi**

Serum kreatinin düzeyi DP modüler cihazında (Roche ®) Jaffe yöntemi ile kinetik olarak ölçüldü. Bu yöntemde, alkali ortamda oluşan kreatinin ve pikrik asid kompleksi fotometrik olarak ölçüldü. Kreatinin sonuçları mg/dL olarak ifade edildi.

### **3.6 Sıçanların 24 saatlik idrarların toplanması ve hacim değerlendirmeleri**

Çalışma başlangıcında ve sisplatin , asetil L-karnitin veya eşdeğer hacimde salin uygulamalarından 48 saat sonra (izlemin üçüncü gününde) tüm sıçanların 24 saatlik idrarları metabolizma kafeslerinde toplandı. Toplanan 24 saatlik idrarların hacimleri ölçüldü.

### **3.7 Sıçanların 24 saatlik idrarda kreatinin düzeylerinin ölçülmesi**

Sıçanlardan toplanan 24 saatlik idrarlarda kreatinin düzeyi DP modüler cihazında (Roche ®) Jaffe yöntemi ile kinetik olarak ölçüldü. Bu yöntemde, alkali ortamda oluşan kreatinin ve pikrik asid kompleksi fotometrik olarak ölçüldü. Kreatinin sonuçları mg/dL olarak ifade edildi.



### 3.8 Sıçanlarda GFR hesaplanması

Sıçanlarda GFR; 24 saatlik idrar volümü, 24 saatlik idrarda kreatinin ve serum kreatinin değerleri kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{GFR } (\mu\text{L/dk}) = \frac{[\text{idrar kreatinini (mg/dL)} \times \text{idrar volümü (mL/dk)}]}{\text{plazma kreatinini (mg/dL)} \times 1000}$$

### 3.9 Sıçanların 24 saatlik idrarda total L- karnitin düzeylerinin ölçülmesi

Total ölçümünün prensibi:

Reaksiyon asetil koenzimA'nın karnitin asetiltransferaz (KAT) varlığında L-karnitin ile reaksiyona girerek serbest koenzimA üretmesine bağlı olarak gerçekleşir.

KAT

L-Carnitine + asetil-koA      «      Asetilkarnitine + koA

Serbest koenzimA tiol grubu içerir ve 5,5-ditiyo-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyona girer ve oluşumu karnitin miktarı ile orantılı olup tiopentolat iyonu oluşturur.

Çalışmada idrar örnekleri direkt olarak ölçümde kullanıldı.

120 mikrolitre 5,5-ditiyo-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB)ve Asetil Koenzim A içeren reaktif solusyonu , 200 mikrolitre su ve 250 mikrolitre idrar örneği karıştırıldı ve üç dakika inkübe edildi (139). Spektrofotometrede (T80+ UV/VIS Spectrometer, PG Instruments Ltd, United Kingdom) kinetik olarak absorbans değişimi enzimatik olarak 412 nm'de ölçüldü. 0-20 mg/dL aralığında L-karnitin standartları kullanılarak standart grafiği oluşturuldu.

### 3.10 Sisplatin

Çalışmada sisplatin (CISPLATİN-Ebewe ® Flakon 50mg/100 mL, Liba İlaç) kullanıldı.

Sisplatin nefrotoksitesisi oluşturulması için sıçanlara verilecek doz 0.5 mg/mL konsantrasyonunda 16 mg/kg olarak belirlendi.

### 3.11 İntraperitoneal sislatin veya serum fizyolojik uygulamaları

Sıçanlar ketamin hidroklorid ve ksilazin hidroklorid ile anesteziye alındıktan sonra steril şartlarda 22 nolu damaryolu branülü ile peritona girildi ve sislatin (0.5 mg/mL konsantrasyonda 16 mg/kg/doz) ışıktan korunarak, perfüzyör makineleri aracılığı ile bir saatlik intraperitoneal infüzyon şeklinde verildi. Plasebo olarak eşit hacimde serum fizyolojik (%0.9 NaCl) solüsyonu kullanıldı; aynı yolla ve aynı sürede verildi (Resim 2, 3).

**Resim 2:** Bir sıçanın anestezi altında intraperitoneal sislatin infüzyonu alması



**Resim 3:** Aynı gruptaki dört sıçanın perfüzyör makineleri aracılığı ile intraperitoneal sislatin infüzyonu almaları



### 3.12 Asetil L-karnitin

Çalışmada asetil L-karnitin (Sigma®) kullanıldı. Toz halinde olan asetil L-karnitin serum fizyolojik içinde çözülerek 10 mg/mL konsantrasyonda solüsyon hazırlandı.

### 3.13 Subkütan asetil L-karnitin veya serum fizyolojik uygulamaları

Sıçanlara asetil L-karnitin (10 mg/mL konsantrasyonda 200 mg/kg/doz) her iki gluteal bölgeden subkütan olarak uygulandı (Resim 4) . Plasebo olarak eşit hacimde serum fizyolojik solüsyonu kullanıldı ve aynı yolla verildi.

### 3.14 Hidrasyon

Çalışma süresince suya serbestçe ulaşmaları sağlanan sıçanlara çalışmanın bir, iki ve üçüncü gününde 5 mL/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal injeksiyon şeklinde uygulandı.

**Resim 4:** Bir sıçana gluteal bölgeden subkütan asetil L-karnitin uygulaması



### **3.15 Grupların oluşturulması ve çalışmanın yürütülmesi**

Çalışmanın başlangıcında tüm sıçanların venöz kan örnekleri alındı ve 24 saatlik idrarları metabolizma kafeslerinde toplandı. Sıçanlar rastgele seçilerek her biri yedi sıçan içeren dört grup oluşturuldu.

#### **GRUP I (Serum fizyolojik uygulanan kontrol grubu):**

##### **Çalışmanın birinci günü:**

- § **0. DAKİKADA** : 5mL/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal injeksiyon şeklinde uygulandı.
- § **30. DAKİKADA** : Grup II ve IV' deki asetil L- karnitin uygulaması ile eşdeğer hacimde serum fizyolojik subkütan injeksiyon şeklinde uygulandı.
- § **60. DAKİKADA** : Grup III ve IV' deki sisplatin uygulaması ile eşdeğer hacimde serum fizyolojik bir saatlik intraperitoneal infüzyonla uygulandı.

##### **Çalışmanın ikinci günü:**

- § **0. DAKİKADA** : 5mL/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal injeksiyon şeklinde uygulandı.
- § **30. DAKİKADA** : Grup II ve IV' deki asetil L- karnitin uygulaması ile eşdeğer hacimde serum fizyolojik subkütan injeksiyon şeklinde uygulandı.

##### **Çalışmanın üçüncü günü:**

- § **0. DAKİKADA** : 5mL/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal injeksiyon şeklinde uygulandı.
- § **30. DAKİKADA** : Grup II ve IV' deki asetil L- karnitin uygulaması ile eşdeğer hacimde serum fizyolojik subkütan injeksiyon şeklinde uygulandı.

Çalışmanın üçüncü gününde işlemler yapıldıktan sonra sıçanlar metabolizma kafeslerine konularak 24 saatlik idrarları toplandı ve idrar hacimleri ölçüldü.

#### **GRUP II (Asetil L-karnitin uygulanan sıçan grubu):**

##### **Çalışmanın birinci günü:**

- § **0. DAKİKADA** : 5mL/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal injeksiyon şeklinde uygulandı.
- § **30. DAKİKADA** : Asetil L-karnitin serum fizyolojik içinde çözülerek 10 mg/mL yoğunlukta solüsyon hazırlandı ve 200mg/kg/doz subkütan injeksiyon şeklinde uygulandı.

§ **60. DAKİKADA** : Grup III ve IV' deki sisplatin uygulaması ile eşdeğer hacimde serum fizyolojik bir saatlik intraperitoneal infüzyonla uygulandı.

**Çalışmanın ikinci günü:**

§ **0. DAKİKADA** : 5mL/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal injeksiyon şeklinde uygulandı.

§ **30. DAKİKADA** : Asetil L-karnitin serum fizyolojik içinde çözülerek 10 mg/mL yoğunlukta solüsyon hazırlandı ve 200mg/kg/doz subkütan injeksiyon şeklinde uygulandı.

**Çalışmanın üçüncü günü:**

§ **0. DAKİKADA** : 5mL/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal injeksiyon şeklinde uygulandı.

§ **30. DAKİKADA** : Asetil L-karnitin serum fizyolojik içinde çözülerek 10 mg/mL yoğunlukta solüsyon hazırlandı ve 200mg/kg/doz subkütan injeksiyon şeklinde uygulandı.

Çalışmanın üçüncü gününde işlemler yapıldıktan sonra sıçanlar metabolizma kafeslerine konularak 24 saatlik idrarları toplandı ve idrar hacimleri ölçüldü.

**Grup III (Sisplatin uygulanan sıçan grubu):**

**Çalışmanın birinci günü:**

§ **0. DAKİKADA** : 5mL/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal injeksiyon şeklinde uygulandı.

§ **30. DAKİKADA** : Grup II ve IV' deki asetil L-karnitin uygulaması ile eşdeğer hacimde serum fizyolojik subkütan injeksiyon şeklinde uygulandı.

§ **60. DAKİKADA** : Sisplatin 0,5 mg/mL konsantrasyonda ve 16 mg/kg/doz bir saatlik intraperitoneal infüzyonla ışıktan korunarak uygulandı.

**Çalışmanın ikinci günü:**

§ **0. DAKİKADA** : 5mL/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal injeksiyon şeklinde uygulandı.

§ **30. DAKİKADA** : Grup II ve IV' deki asetil L-karnitin uygulaması ile eşdeğer hacimde serum fizyolojik subkütan injeksiyon şeklinde uygulandı.

**Çalışmanın üçüncü günü:**

§ **0. DAKİKADA** : 5mL/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal injeksiyon şeklinde uygulandı.

§ **30. DAKİKADA** : Grup II ve IV' deki asetil L-karnitin uygulaması ile eşdeğer hacimde serum fizyolojik subkütan injeksiyon şeklinde uygulandı.

Çalışmanın üçüncü gününde işlemler yapıldıktan sonra sıçanlar metabolizma kafeslerine konularak 24 saatlik idrarları toplandı ve idrar hacimleri ölçüldü.

#### **Grup IV( Asetil L-karnitin verildikten sonra Sisplatin uygulanan sıçan grubu):**

##### **Çalışmanın birinci günü:**

§ **0. DAKİKADA** : 5mL/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal injeksiyon şeklinde uygulandı.

§ **30. DAKİKADA** : : Asetil L-karnitin serum fizyolojik içinde çözülerek 10 mg/mL yoğunlukta solüsyon hazırlandı ve 200mg/kg/doz subkütan injeksiyon şeklinde uygulandı.

§ **60. DAKİKADA** : Sisplatin 0,5 mg/mL konsantrasyonda ve 16 mg/kg/doz bir saatlik intraperitoneal infüzyonla ışıktan korunarak uygulandı.

##### **Çalışmanın ikinci günü:**

§ **0. DAKİKADA** : 5mL/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal injeksiyon şeklinde uygulandı.

§ **30. DAKİKADA** : : Asetil L-karnitin serum fizyolojik içinde çözülerek 10 mg/mL yoğunlukta solüsyon hazırlandı ve 200mg/kg/doz subkütan injeksiyon şeklinde uygulandı.

##### **Çalışmanın üçüncü günü:**

§ **0. DAKİKADA** : 5mL/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal injeksiyon şeklinde uygulandı.

§ **30. DAKİKADA** : : Asetil L-karnitin serum fizyolojik içinde çözülerek 10 mg/mL yoğunlukta solüsyon hazırlandı ve 200mg/kg/doz subkütan injeksiyon şeklinde uygulandı.

Çalışmanın üçüncü gününde işlemler yapıldıktan sonra sıçanlar metabolizma kafeslerine konularak 24 saatlik idrarları toplandı ve idrar hacimleri ölçüldü.

#### **3.16 Sıçanların feda edilmesi, kan örneği alınması, her iki böbreğin cerrahi olarak çıkarılması**

Sisplatin, asetil L-karnitin veya eşdeğer hacimde serum fizyolojik uygulamalarından 72 saat sonra (izlemin dördüncü gününde) sıçanlar feda edildi. Sıçanlar feda edilmeden önce ketamin hidroklorid ve ksilazin hidroklorid ile anestezi uygulandı. Karın ön duvarı önce alkol ardından

batikon ile silinip orta hat vertikal abdominal insizyon ile karın ön duvarı açıldı ve abdominal venden (vena cava caudalis) venosection ile 5-8 mL kan alınıp hipovolemi yaratılarak sıçanlar feda edildi. Takiben her iki böbrek immünohistokimyasal ve elektromikroskopik incelemeler için çıkarıldı. Çıkarılan böbrek dokuları disseke edilerek histopatolojik çalışmalar için formaldehid, elektromikroskopik çalışmalar için glutareldehid, immünfloresan çalışmalar için ise PBS solüsyonlarına konuldu ve -20 °C’de saklandı. Biyokimyasal çalışmalar için dokular kuru tüpte -80 °C’de saklandı (Resim 5).

**Resim 5:** Bir sıçanın feda edildikten sonra böbrek dokusunun çıkarılması



### **3.17 Böbrek doku Homojenizasyonu**

Böbrek dokuları serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra +4°C’de 100 mg’lık parçalara ayrıldı. Böbrek dokuları 100 mg doku için 900 µL’de %1.15 KCl solusyonu olacak şekilde MDA ölçümünde kullanılmak üzere sonikatör ile homojenize edildi . Daha sonra 3000 rpmde +4°C’de on dk santrifüj edildi. Süpernatantlar MDA ve protein analizi için porsiyonlanarak analize kadar -80°C’de saklandı.

### **3.18 Örneklerde Protein Düzeyinin Belirlenmesi**

Örneklerin protein miktarlarının belirlenmesinde duyarlılığı 1µg 'a kadar inebilen BCA protein tayin yöntemi kullanılmıştır. Yöntemin prensibi genel olarak kullanılan Lowry ve biüret yöntemlerine benzerdir. Proteinlerin peptid bağlarının alkali Cu çözeltisi ile reaksiyona girmesi sonucunda çözeltide bulunan Cu<sup>+2</sup>'nin Cu<sup>+1</sup>'e indirgenmektedir. Cu<sup>+1</sup> bicinchoninic asit (BCA) tarafından şelatlanmaktadır. Açık yeşil renkte olan serbest BCA Cu ile şelat oluşturduğunda pembe renk oluşturmaktadır. Oluşan renk şiddetinin 562 nm'de okunması ve standart eğriye göre değerlendirilmesi sonucunda protein konsantrasyonu hesaplanmıştır (140).

### **3.19 Lipid peroksidasyonunun tiyobarbitürik asit reaktif madde(TBARS) yöntemiyle belirlenmesi**

Lipid peroksidasyonu tiyobarbitürik asit reaktif madde (TBARS) yöntemiyle malondialdehit (MDA) düzeyleri HPLC cihazıyla ölçülerek değerlendirilmiştir. Yöntemde lipid hidroperoksidleri asit katalizi ile MDA'ya parçalanmış, meydana gelen MDA'nın tiobarbitürik asit ile oluşturduğu kompleks floresans dedektör ile (eksitasyon dalga boyu 515 nm/ emisyon dalga boyu 553 nm) değerlendirilmiştir. Mobil faz olarak %30 etanol içeren 10 mM pH 7.0 fosfat tamponu kullanılmıştır. 150-4.6 mm boyutlarında 5 µm tanecik çapında C18 kolon ve standart olarak 1, 1, 3, 3 tetraethoksi propan kullanılmıştır (141). MDA düzeyleri micromole/mg protein olarak ifade edildi.

### **3.20 Histopatolojik inceleme**

Böbrek dokularının histopatolojik ve morfometrik değerlendirmeleri ışık mikroskopi, immünfloresan mikroskopi ve elektron mikroskopi ile yapıldı.

#### **3.20.1 Işık mikroskopi ile inceleme**

%10 luk formaldehit ile tespit edilmiş böbrek dokularından rutin histoteknik işlemler sonrası parafin bloklar hazırlandı. Bu dokulardan alınan üç mikronluk kesitler histopatolojik inceleme için normal camlara yerleştirilerek Hematoksilen-Eosin, ve Periodik asit-schiff (PAS) boyamaları yapıldı.

#### **3.20.2 İmmünfloresan mikroskopi ile inceleme**

Direkt immunfloresan için ayrılan dokular dondurma jeli (OCT embedding matriks 2055 643726) ile örtülüp -25°C'de (Leica CM 1200) donduruldu. Dokulardan elde edilen dört



mikronluk kesitler 20 dakika oda ısısında havada kurutulduktan sonra cam şale içinde PBS solüsyonuna alınarak 15 dakika bekletildi. Lamların üzerindeki fazla sıvı işaretlendi ve limiting pen ile dokuların çevresi işaretlendi. Kesitler, florescein-isothiocyanide (FITC) ile konjuge edilmiş anti-rabbit fibrinojen, C3 ve anti-mouse IgG, IgA, IgM ve C1q antikorları ile oda sıcaklığında 30 dakika süre ile muamele edilip, arkasından PBS ile on dakika yıkandı ve gliserjel aköz mounting medium (Sigma) içeren lamellerle kapatıldı. Değerlendirmede immunfloresan mikroskobundan (Nicon Eclipse E400) yararlanılarak, preparatlar biriken immun komplekslerin yerleşimi ve miktarı yönünden incelendi

### 3.20.3 Elektron mikroskopi ile inceleme

Doku örnekleri %2.5'lük gluteraldehitte ön tespit ve ardından %1'lik osmiyum tetraoksitle ikinci kez tespit edildi. Alışılmış elektronmikroskopik takiplerden geçirilen örnekler araldit CY212-dodesil süksinik anhidrite (DDSA) den oluşan ön gömme materyalinde bir gece oda sıcaklığında bekletildikten sonra araldit CY212-dodesil süksinik anhidrit (DDSA) ve benzil dimetil amin (BDMA) karışına gömülerek bloklandı. Bloklar, 24 saat 40°C ve 48 saat 60°C derecede bekletilerek polimerize edildi. Hazırlanan bloklardan alınan kalın kesitler toluidin blue ile boyanarak ışık mikroskobunda incelendi ve istenen bölgeler işaretlendi. İşaretlenen bölgelerden alınan ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitratla boyandı ve Carl Zeiss Libra 120 elektron mikroskobuyla incelenerek değerlendirildi.

### 3.21 Apoptotik Hücre Ölümünün Saptanması:

Böbrek doku örnekleri **TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling)** boyama yöntemiyle apoptotik hücre ölümü açısından değerlendirildi (142).

Bu teknik için DeadEnd Colorimetric TUNEL system kiti (G7130, Promega, USA) kullanıldı. Kesitler boyama için bir gece 60 C°'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda beş dakika bekletildi. Kesitler 15 dakika %4'lük paraformaldehit ile on dakika muamele edildikten sonra, on dakika 20-µg/ml proteinase K ile inkübe edildi ve ardından tekrar üç defa beşer dakika tampon solüsyonu ile yıkandı. İkinci kez %4'lük paraformaldehit beş dakika uygulanıp yıkandıktan sonra, tampon solüsyonu ile beş dakika yıkanan kesitler TdT-enzimi solüsyonu ile 37°C de bir saat inkübe edildi. On dakika %22 NaCl ve % 11 sodyum sitrat içeren solüsyon ile (SSC) uygulanan kesitlere tampon

solusyonu ile yıkama yapıldıktan sonra endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla beş dakika %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (TA-015-HP, Lab vision, Fremont, CA) uygulandı. Ardından tampon solusyonu ile oda sıcaklığında on dakika yıkanan kesitler anti-streptavidin-peroksidaz enzimi ile 30 dakika inkübe edildi. Tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler TUNEL reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlanan kesitler %80 ve %95'lik alkollerde dehidratasyon ve 30 dakika ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı.

### **3.22 Kaspaz 3, 8, 9 Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi**

Kaspaz 3, 8, 9 aktivite düzeyleri kolorimetrik yöntemle Caspase Colorimetric Activity Assay kitleri kullanılarak çalışılmıştır.

Kaspaz 3 aktivite yöntemi; işaretli DEVD-p-Nitroanilin substrattan ayrılmasından sonra ortaya çıkan kromofor p-Nitroanilin spektrofotometrik olarak belirlenmesi esasına dayanır (143).

Kaspaz 8 aktivite yöntemi; esası işaretli IETD-p-Nitroanilin substrattan ayrılmasından sonra ortaya çıkan kromofor p-Nitroanilin spektrofotometrik olarak belirlenmesi esasına dayanır (143).

Kaspaz 9 aktivite yöntemi; esası işaretli LEHD-p-Nitroanilin substrattan ayrılmasından sonra ortaya çıkan kromofor p-Nitroanilin spektrofotometrik olarak belirlenmesi esasına dayanır (143).

### **3.23 İstatistiksel değerlendirme**

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri "SPSS 11.5 for Windows" bilgisayar istatistik programı ile yapıldı.

Çalışmanın başlangıcında ve üçüncü gününde serum ve idrar kreatinin, idrar karnitin, 24 saatlik idrar volümü ve apoptoz verilerinin gruplar arasında karşılaştırılması "Kruskar- Wallis varyans analizi" ile yapıldı. Bu değerlerin iki grup arasında karşılaştırılması "Mann-Whitney U testi" ile yapıldı.

Her bir grup içinde çalışma başlangıcındaki ve üçüncü günündeki 24 saatlik idrar volümü, GFR ve kreatinin değerlerinin karşılaştırılmaları "Wilcoxon işaretli sıralar testi" ile yapıldı.

İstatistiksel anlamlılık  $p < 0.05$  olarak kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Her bir grupta yedi sıçan olmak üzere toplam 28 sıçanın çalışma başlangıcında ortalama ağırlıkları  $266,35 \pm 22,3$  g idi. Gruplar arasında çalışma başlangıcındaki ağırlıklar açısından anlamlı bir fark bulunmamaktaydı ( $p=0.218$ ).

Grup IV'teki 7 numaralı sıçan dördüncü günün sabahı öldü. Böbrek dokusu alındı ancak kan alınmadığından dördüncü gün serum kreatinin değeri elde edilemedi.

#### 4.1 GRUPLARIN 24 SAATLİK İDRAR VOLÜMLERİ, SERUM KREATİNİN, GFR VE 24 SAATLİK İDRAR TOTAL L-KARNİTİN/KREATİNİN DEĞERLERİ

##### 4.1.1 Çalışma başlangıcında elde edilen ortalama 24 saatlik idrar volümleri, serum kreatinin ve GFR değerleri

**4.1.1.1** Dört gruptaki sıçanlardan çalışma başlangıcında toplanan ortalama 24 saatlik idrar volümleri  $15,9 \pm 4,7$  mL idi. Gruplar arasında 24 saatlik idrar volümleri açısından anlamlı bir fark bulunmamaktaydı ( $p=0.137$ ).

**4.1.1.2** Çalışma başlangıcında sıçanların ortalama serum kreatinin değerleri Tablo 5'de gösterilmiştir.

Başlangıçtaki ortalama serum kreatinin değerleri sıçanlara uygun normal değerler arasındaydı (144).

**Tablo 5:** Sıçan gruplarının çalışma başlangıcındaki ortalama serum kreatinin değerleri

GRUPLAR	SERUM KREATİNİN DEĞERLERİ (mg/dL)
	Ortalama±standart sapma
Grup I (n=7)	$0,42 \pm 0,06$
Grup II (n=7)	$0,44 \pm 0,06$
Grup III (n=7)	$0,50 \pm 0,07$
Grup IV (n=7)	$0,62 \pm 0,03$

**4.1.1.3** Çalışma başlangıcında sıçanların hesaplanan ortalama GFR değerleri Tablo 6'de gösterilmiştir. Gruplar arasında GFR değerleri açısından anlamlı fark bulunmamaktaydı ( $p=0.11$ ).

**Tablo 6:** Sıçan gruplarının çalışma başlangıcındaki ortalama GFR değerleri

GRUPLAR	GFR DEĞERLERİ (µL/dk)
	Ortalama±standart sapma
Grup I (n=7)	964±403
Grup II (n=7)	998±307
Grup III (n=7)	881±440
Grup IV (n=7)	815±411

#### 4.1.2 Çalışmanın üçüncü gününde elde edilen ortalama 24 saatlik idrar volümleri, serum kreatinin, GFR ve 24 saatlik idrarda total L-karnitin/kreatinin değerleri

4.1.2.1 Dört gruptaki sıçanın çalışmanın üçüncü gününde toplanan ortalama 24 saatlik idrar volümleri Tablo 7’de gösterilmiştir. Gruplar arasında 24 saatlik idrar volümleri açısından anlamlı bir fark bulunmamaktaydı (p=0.249).

**Tablo 7:** Sıçan gruplarının çalışmanın üçüncü günündeki ortalama 24 saatlik idrar volümleri

GRUPLAR	24 SAATLİK İDRAR VOLÜMLERİ (mL/gün)
	Ortalama±standart sapma
Grup I (n=7)	18,4±6,9
Grup II (n=7)	19,4±4,9
Grup III (n=7)	15,7±4,3
Grup IV (n=7)	14,4±4,9

4.1.2.2 Çalışmanın üçüncü gününde sıçanların ortalama serum kreatinin değerleri Tablo 8’te gösterilmiştir. Gruplar arasında, elde edilen serum kreatinin değerleri açısından anlamlı fark bulunmaktaydı (p=0,000). Çalışmanın üçüncü günündeki ortalama serum kreatinin değerleri Grup I ve Grup II’de normal değerler arasındayken Grup III ve Grup IV’teki ortalama serum kreatinin değerleri normal değerlerin üstünde yüksek olarak saptanmıştı. Grup III ve Grup IV arasında yapılan karşılaştırmada ise grup III’teki ortalama serum kreatinin değeri anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştu (p= 0.032).

**Tablo 8 :** Sıçan gruplarının çalışmanın üçüncü günündeki ortalama serum kreatinin değerleri

GRUPLAR	SERUM KREATİNİN DEĞERLERİ (mg/dL)
	Ortalama±standart sapma
Grup I (n=7)	0,55±0,04
Grup II (n=7)	0,55±0,04
Grup III (n=7)	3,50 ±1,08
Grup IV (n=6)	2,93±0,80

**4.1.2.3** Çalışmanın üçüncü gününde sıçanların hesaplanan ortalama GFR değerleri Tablo 9’te gösterilmiştir. Gruplar arasında GFR değerleri açısından anlamlı fark bulunmaktaydı ( $p=0.01$ ). Gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda ise Grup I ve Grup II arasında fark bulunmazken; Grup III ve Grup IV’e ait GFR değerleri diğer gruplara göre anlamlı oranda düşük bulunmuştu (Grup I ve II  $p=0.655$ ; Grup I ve Grup III  $p=0.002$ ; Grup I ve Grup IV  $p=0.007$ ; Grup II ve III  $p=0.002$ ; Grup II ve Grup IV  $p=0.015$ ). Grup III ve Grup IV kendi aralarında karşılaştırıldığında ise Grup III’e ait ortalama değer daha düşük bulunmasına rağmen her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p=0.568$ ).

**Tablo 9:** Sıçan gruplarının çalışmanın üçüncü günündeki ortalama GFR değerleri

GRUPLAR	GFR DEĞERLERİ ( $\mu\text{L}/\text{dk}$ )
	Ortalama±standart sapma
Grup I (n=7)	587±315
Grup II (n=7)	574±467
Grup III (n=7)	69±26
Grup IV (n=6)	125±119

**4.1.2.4** Çalışmanın üçüncü gününde sıçanlardan elde edilen 24 saatlik idrarlarda total L-karnitin/kreatinin oranları Tablo 10’da gösterilmiştir. Gruplar arasında 24 saatlik idrar total L-karnitin/kreatinin oranları açısından anlamlı fark saptanmadı ( $p=0.093$ ). Gruplar kendi aralarında ikili olarak karşılaştırıldığında ise Grup III’teki idrar total L-karnitin/kreatinin değeri en düşük saptanmış olup; Grup II ile olan karşılaştırmasında anlamlı fark elde edildi ( $p=0.035$ ). Diğer ikili grup karşılaştırmalarında ise anlamlı fark elde edilmedi.

**Tablo 10:** Sıçan gruplarının çalışmanın üçüncü gününde 24 saatlik idrar total L-karnitin /kreatinin değerleri

GRUPLAR	24 SAATLİK İDRARDA TOTAL L-KARNİTİN/KREATİNİN DEĞERLERİ (mg/mg)
	Ortalama±standart sapma
Grup I (n=7)	0,042±0,021
Grup II (n=7)	0,084±0,052
Grup III (n=7)	0,037±0,025
Grup IV (n=7)	0,069±0,033

#### 4.1.3 Çalışmanın başlangıcında ve üçüncü gününde elde edilen ortalama 24 saatlik idrar volümlerinin, serum kreatinin ve GFR değerlerinin karşılaştırılması

**4.1.3.1** Gruplar arasında çalışmanın başlangıcında ve üçüncü gününde elde edilen ortalama 24 saatlik idrar volümleri açısından anlamlı fark saptanmamıştı. Her bir grup kendi içinde karşılaştırıldığında çalışma başlangıcında ve üçüncü gündeki 24 saatlik idrar volümleri arasında fark yoktu (Grup I p= 0.865; Grup II p= 0.463; Grup III p= 1; Grup IV p=0.67).

**4.1.3.2** Gruplar arasında çalışmanın başlangıcında ve üçüncü gününde elde edilen ortalama serum kreatinin değerleri açısından anlamlı fark bulunmaktaydı (p=0.000). Gruplar kendi içinde başlangıç ve üçüncü gün serum kreatinin düzeylerine göre karşılaştırıldığında; Grup I ve Grup II’de anlamlı bir artış saptanmazken; Grup III ve Grup IV’ün üçüncü gün serum kreatinin değerleri başlangıç değerlerine göre artmış olarak bulunmuştu (Grup III p=0.018 Grup IV p=0.028). Grup III’ün ortalama serum kreatinin değeri yaklaşık yedi kat artış gösterirken, Grup IV’te dört kat kadar artış saptanmıştı.

**4.1.3.3** Gruplar arasında çalışmanın başlangıcında ve üçüncü gününde elde edilen ortalama GFR değerleri arasında fark bulunmaktaydı (p=0.000). Her bir grup kendi içinde karşılaştırıldığında Grup I ve II’nin başlangıç ve üçüncü gün GFR değerleri arasında anlamlı fark saptanmazken; Grup III ve Grup IV’teki üçüncü gün GFR değerleri başlangıç değerlerine göre anlamlı olarak düşük bulundu (Grup III p=0.018; Grup IV p= 0.028).

## **4.2 BÖBREK DOKUSUNDA TBARS YÖNTEMİ İLE ELDE EDİLEN MDA/PROTEİN ORANLARI**

Çalışmanın dördüncü günü feda edilen sıçanların böbrek dokularından elde edilen MDA/protein değerlerinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0.62$ ).

## **4.3 BÖBREK DOKULARININ HİSTOPATOLOJİK İNCEME SONUÇLARI**

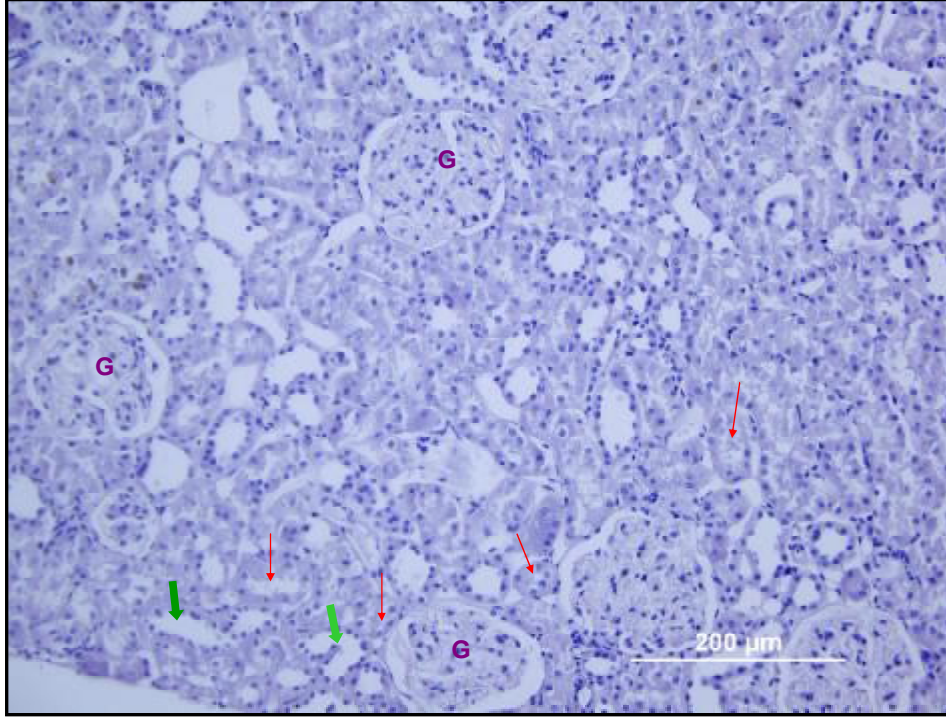
### **4.3.1 Böbrek dokularının ışık mikroskopi inceleme sonuçları**

Grup I ve Grup II'de glomerül yapısı, proksimal ve distal tübüller normal görünümde iken (Resim 6-10), Grup III'te peritübüler intersitisyel hücre proliferasyonu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, proksimal tübüllerde hücresel deskuamasyon, bazı proksimal tübüllerde tiroidizasyon ve glomerüler nekroz gözlemlendi (Resim 10,11) .

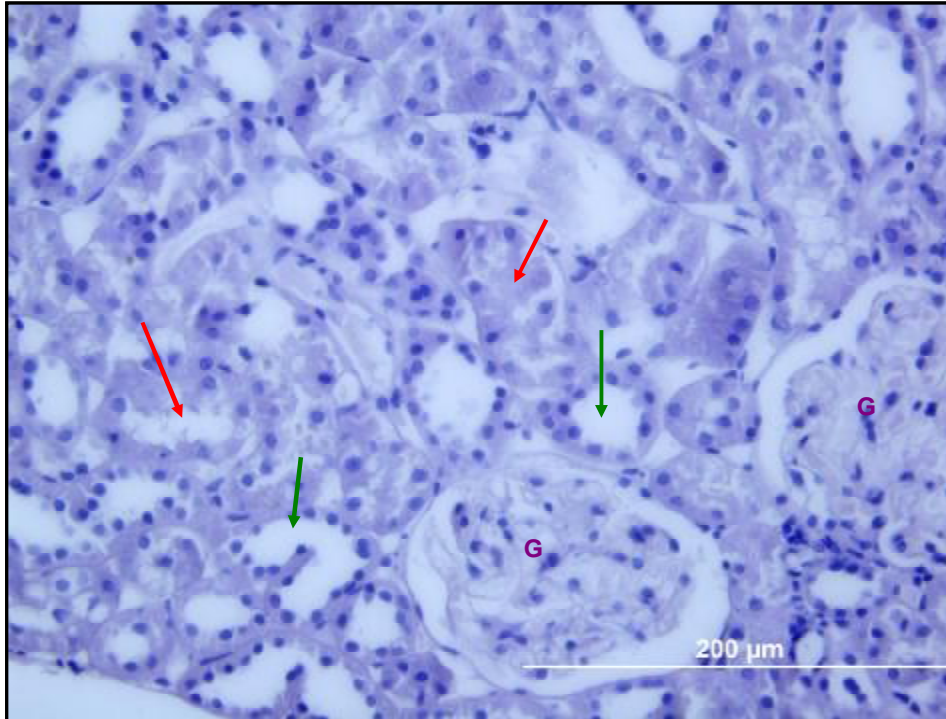
Grup IV'te genellikle subkapsüler proksimal tübüllerde az sayıda hücresel deskuamasyon, az sayıda tiroidizasyon gözlenirken, tek tük nekroze glomerüllere rastlandı (Resim 12).

PAS boyası ile yapılan incelemelerde Grup I ve Grup II'de proksimal tübüllerde belirgin PAS pozitifliği gösteren mikrovillüs yapısı varken (Resim13,14), Grup III'te mikrovillüs kaybı belirgindi (Resim 15).Grup IV'te ise bazı proksimal tübüllerde mikrovillüs kaybı belirgindi (Resim16).

**Resim 6 :** Grup I'e (kontrol grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskobisi ile incelenmesi:  
Normal glomerül (G); proksimal tübül ( kırmızı ok); distal tübül (yeşil ok), (Hematoksilen-Eosin)

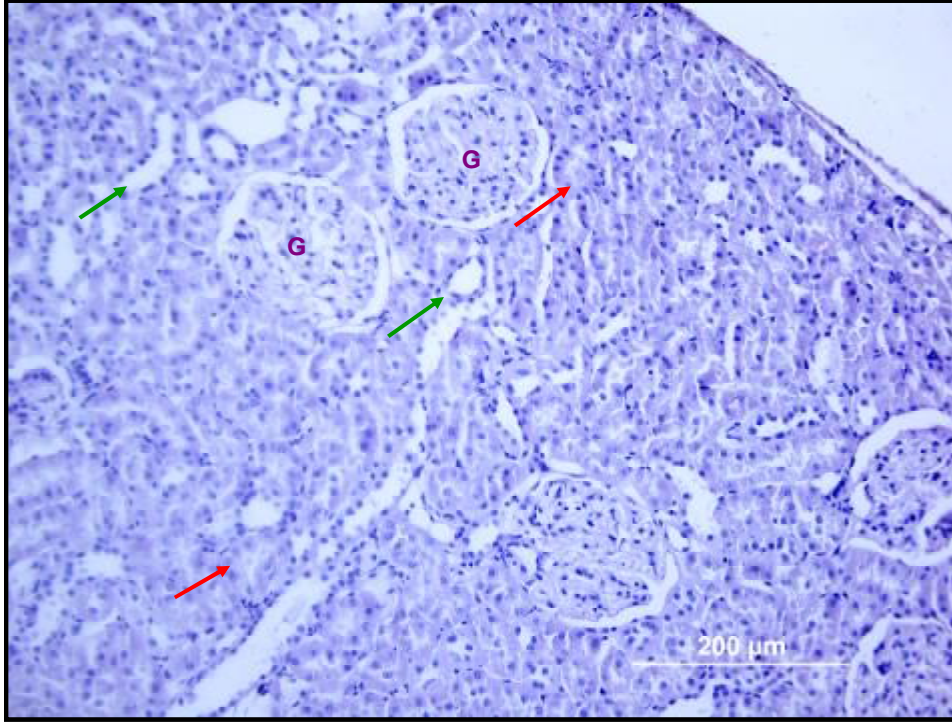


**Resim 7:** Grup I'e (kontrol grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskobisi ile incelenmesi:  
Normal glomerül (G); proksimal tübül ( kırmızı ok); distal tübül (yeşil ok), (Hematoksilen-Eosin)

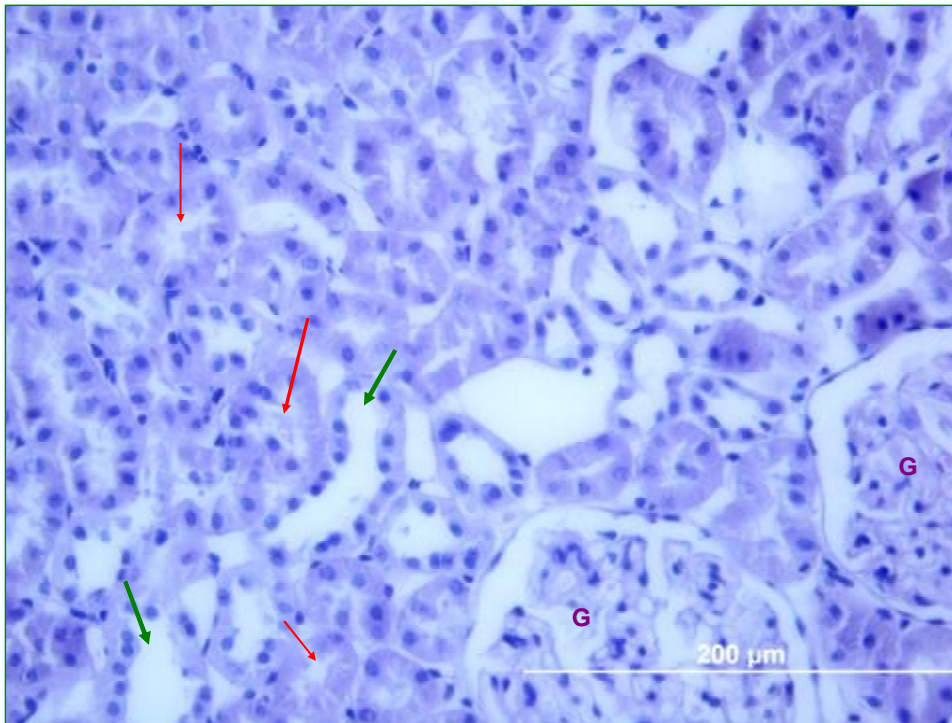




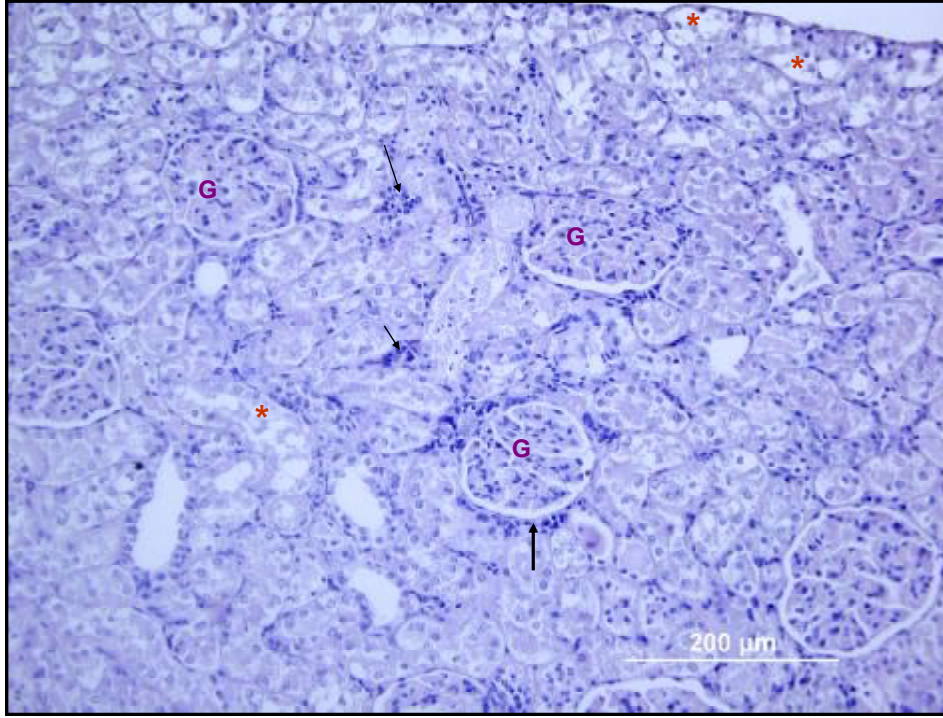
**Resim 8:** Grup II'ye (asetil L-karnitin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskobisi ile incelenmesi: Normal glomerül (G); proksimal tübül ( kırmızı ok); distal tübül (yeşil ok), (Hematoksilen-Eosin)



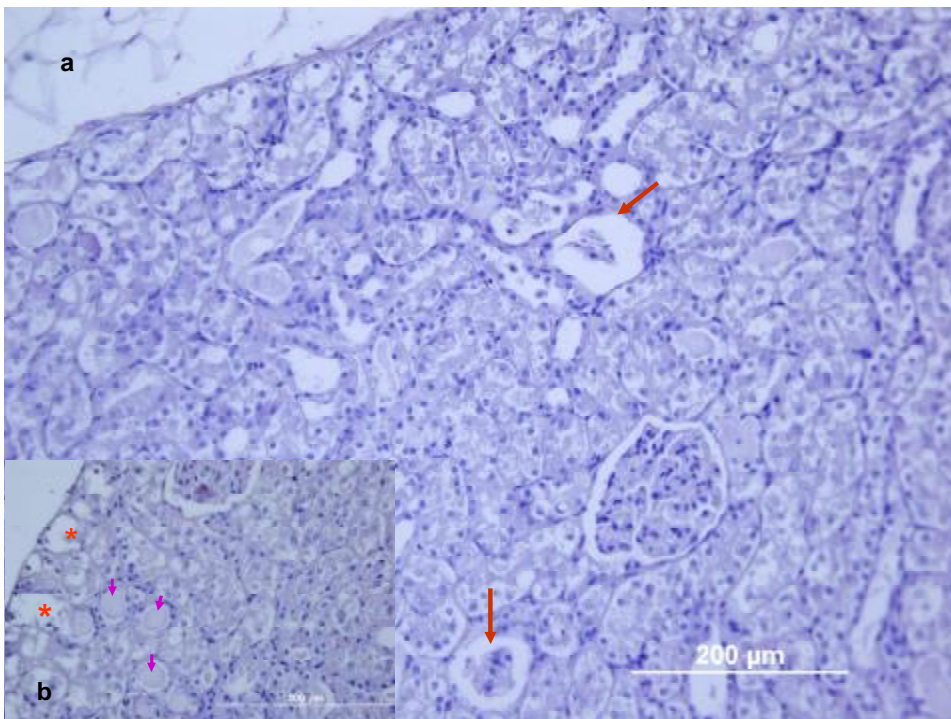
**Resim 9:** Grup II'ye (asetil L-karnitin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskobisi ile incelenmesi: Normal glomerül (G); proksimal tübül ( kırmızı ok); distal tübül (yeşil ok), (Hematoksilen-Eosin)



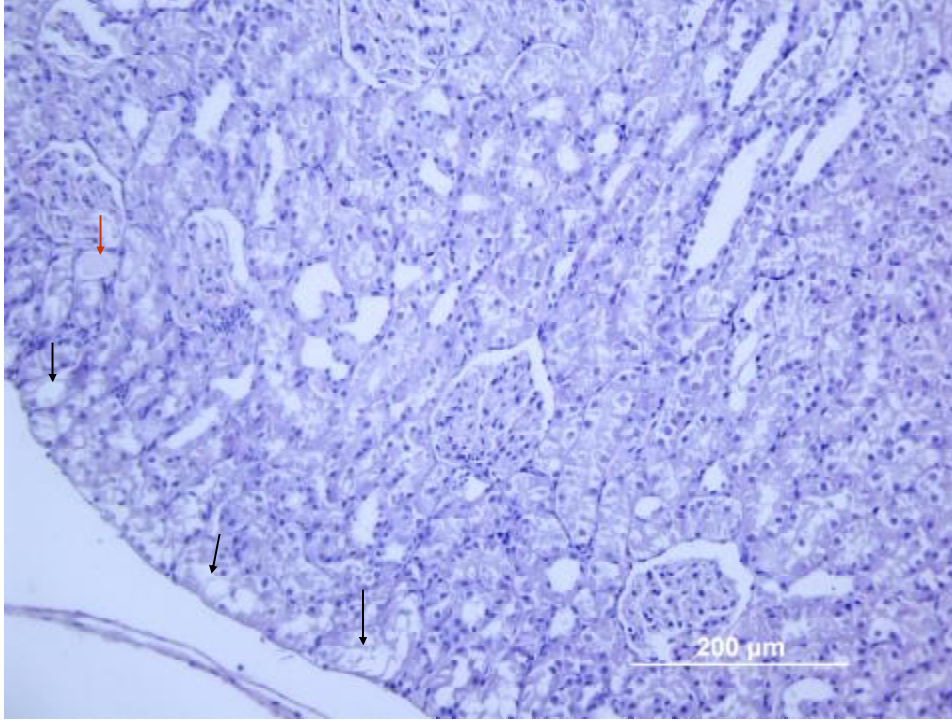
**Resim 10:** Grup III'e (sisplatin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskobu ile incelenmesi: Normal glomerül (G) intersitisyel hücre proliferasyonu (siyah oklar), proksimal tübülde hücresel desquamasyonu (\*) (Hematoksilen-Eosin)



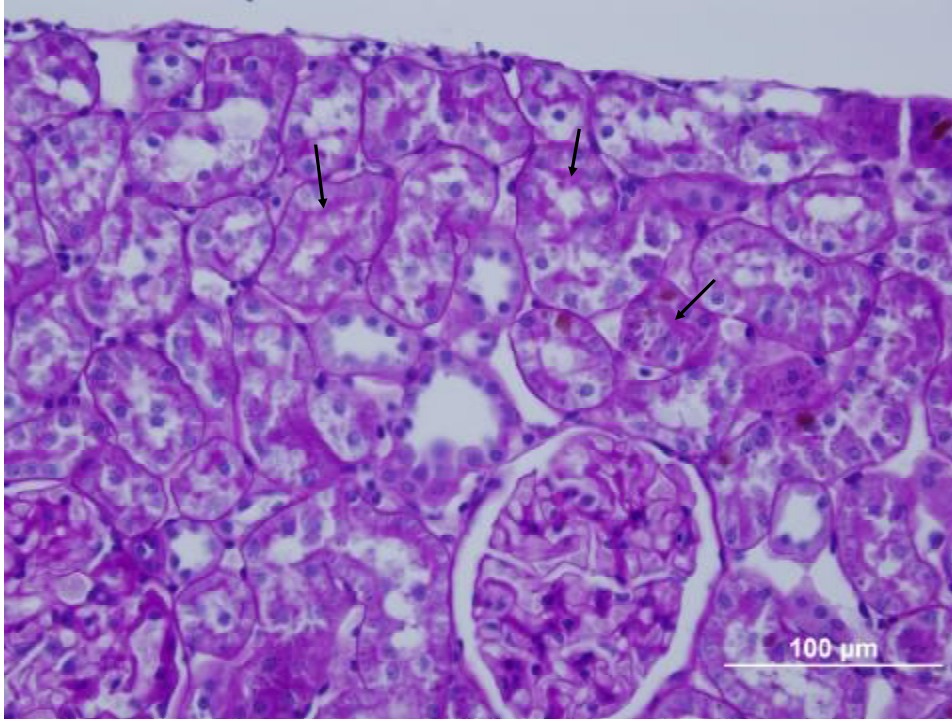
**Resim 11:** Grup III'e (sisplatin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskobu ile incelenmesi: **a)** Glomerüler nekroz (kırmızı oklar) **b)** tiroidizasyon (mor oklar), proksimal tübülde hücresel desquamasyonu (\*) (Hematoksilen-Eosin)



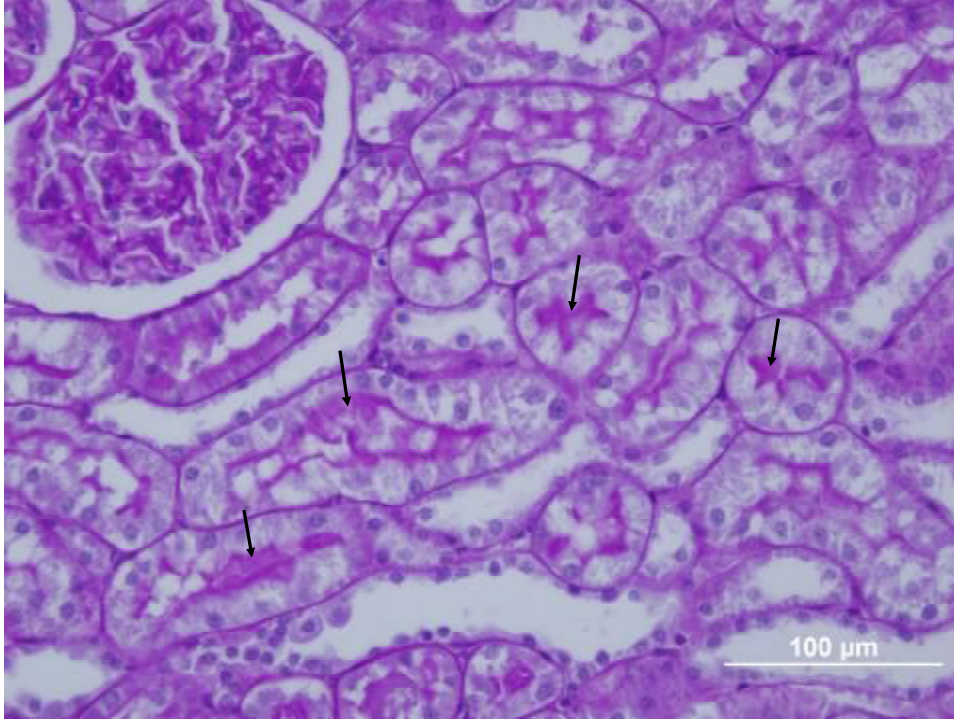
**Resim 12:** Grup IV'e (sisplatin+ asetil L-karnitin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskobisi ile incelenmesi: Proksimal tübülde hücresel desquamasyon (oklar) (Hematoksilen-Eosin)



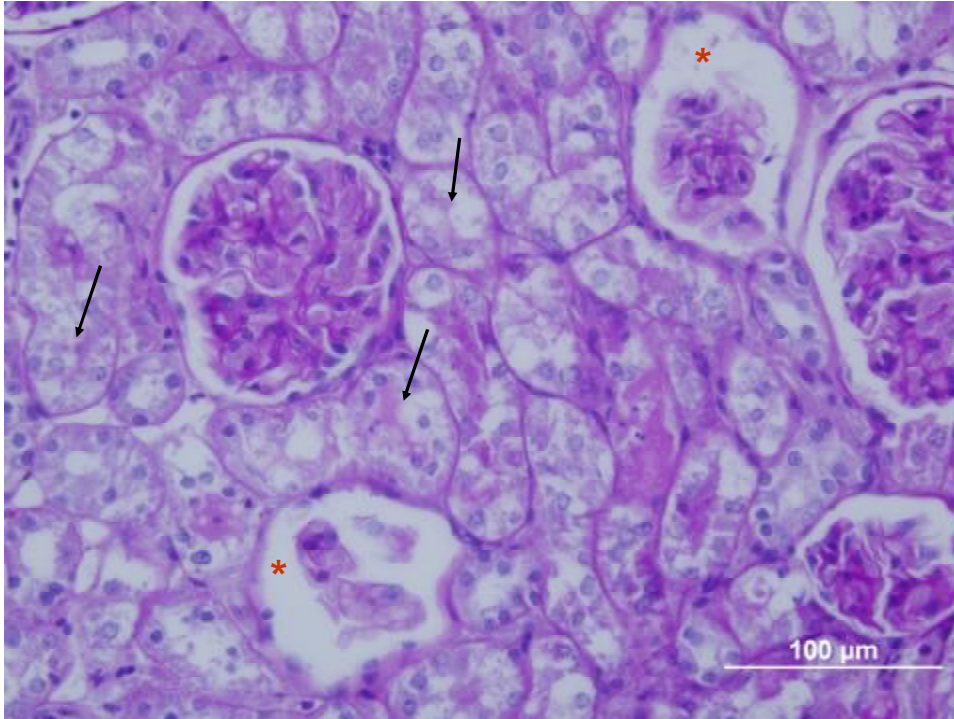
**Resim 13:** Grup I'e (kontrol grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskobisi ile incelenmesi: Proksimal tübülde mikrovillüs yoğunluğu (oklar) (PAS)



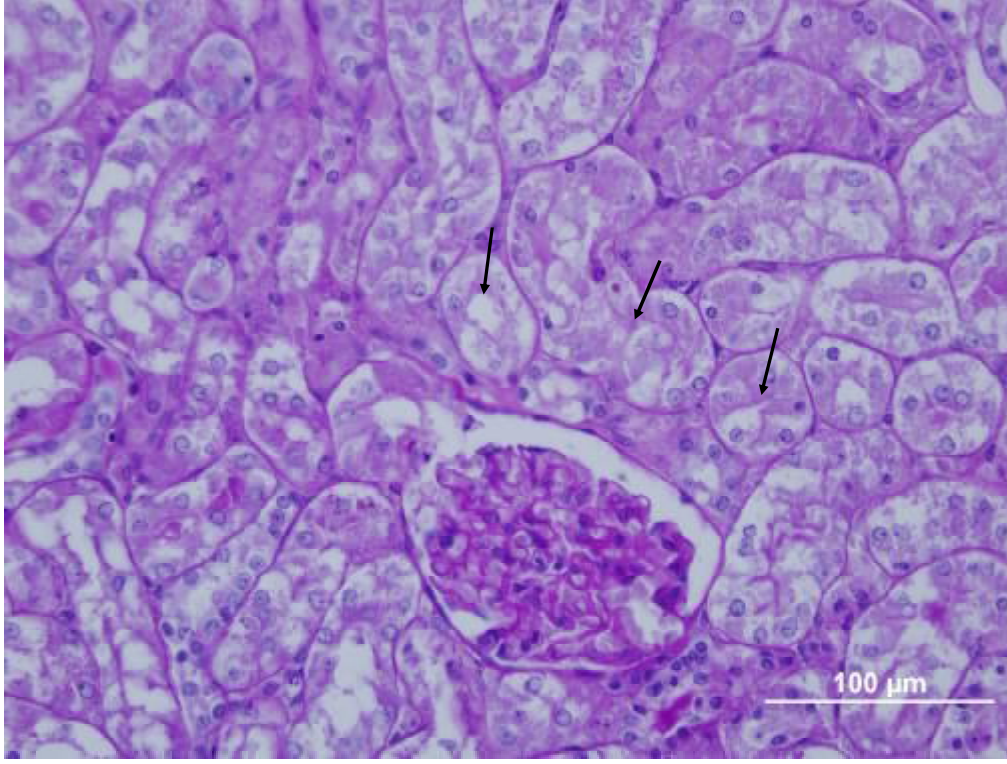
**Resim 14:** Grup II'ye (asetil L-karnitin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskobisi ile incelenmesi: Proksimal tübülde mikrovillüs yoğunluğu (oklar) (PAS)



**Resim 15:** Grup III'e (sisplatin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskobisi ile incelenmesi: Glomerüler dejenerasyon (\*), proksimal tübüllerde mikrovillüs kaybı (oklar) (PAS)



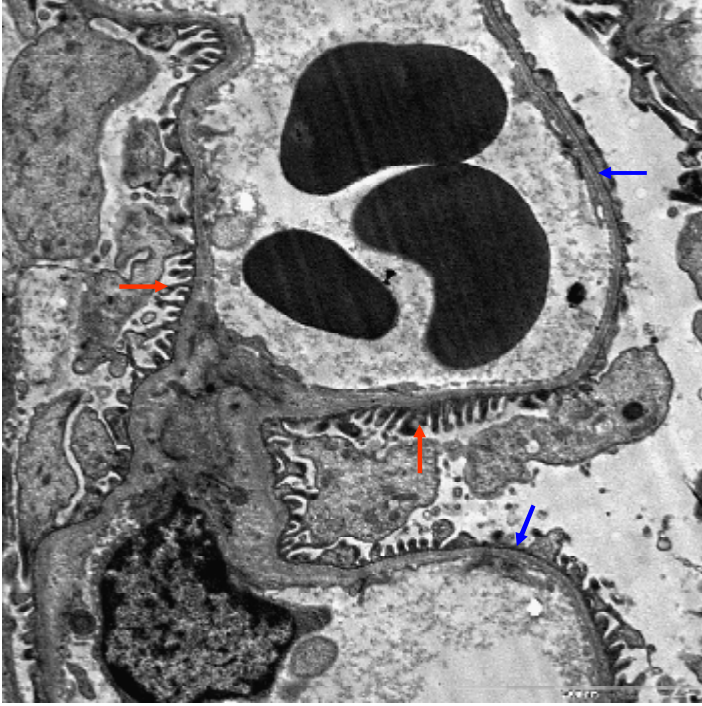
**Resim 16:** Grup IV'e (sisplatin+asetil L-karnitin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin ışık mikroskobisi ile incelenmesi: Proksimal tübüllerde mikrovillüs kaybı (oklar) (PAS)



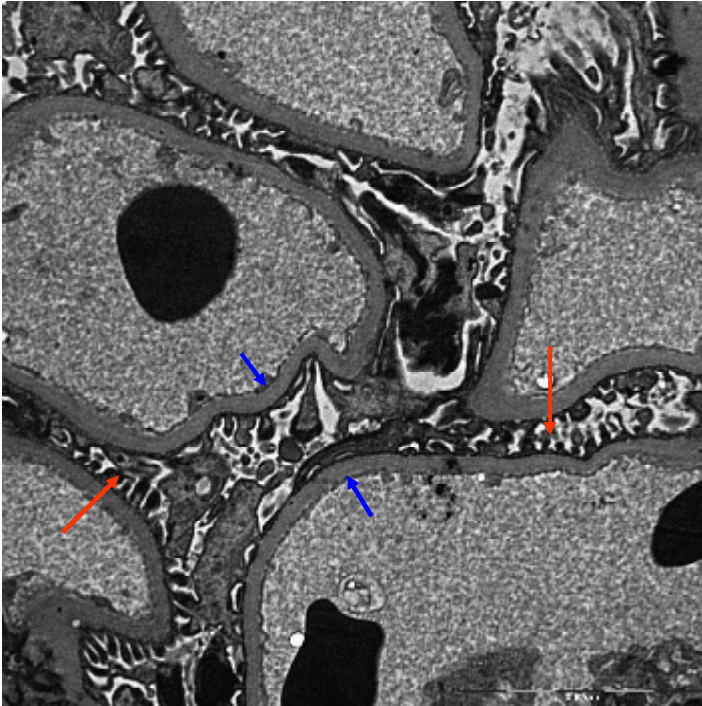
#### **4.3.2 Böbrek dokularının elektron mikroskopik inceleme sonuçları**

Grup I ve Grup II'nin ultrastruktürel incelemesinde düzenli normal yapıda ayaklı çıkıntılar ve düzenli kalınlıkta bazal membran gözlemlendi (Resim17-18). Grup III'te glomerüler bazal membran düzensizliği ve ayaklı çıkıntılarda füzyon gözlenirken Grup IV'te yer yer glomerüler bazal membran kalınlığı mevcuttu (Resim 19-20).

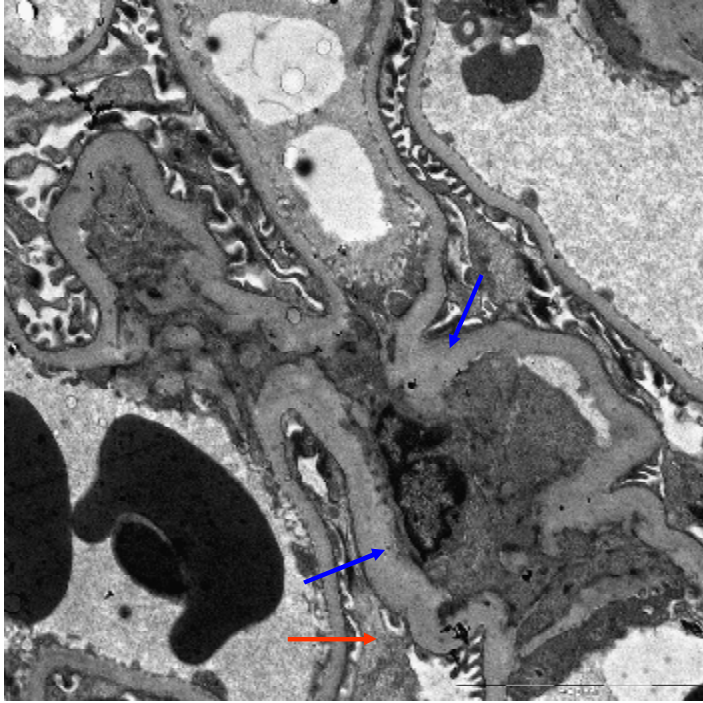
**Resim 17:** Grup I'e (kontrol grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin elektron mikroskopi ile incelenmesi: Normal görünümde ayaklı çıkıntılar (kırmızı oklar) ve glomerüler bazal membran (mavi oklar)



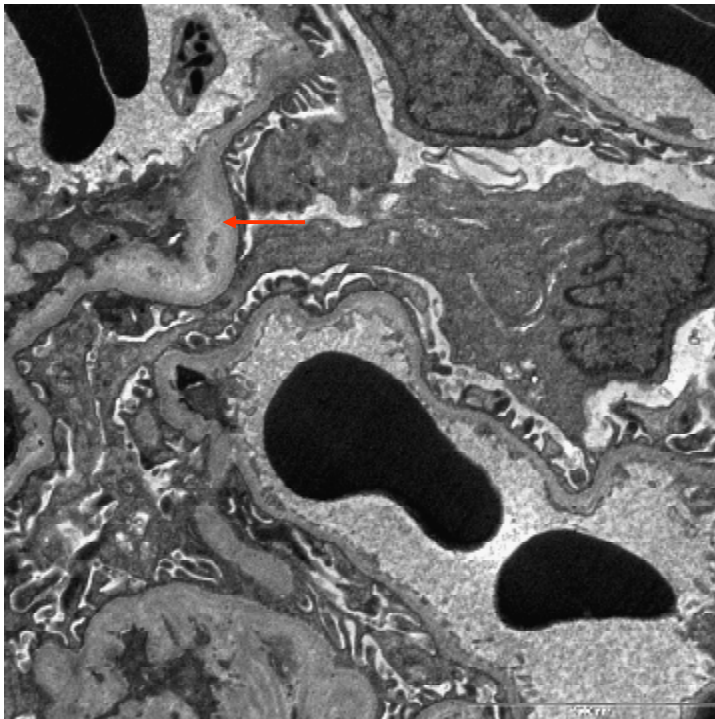
**Resim 18:** Grup II'ye (asetil L-karnitin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin elektron mikroskopi ile incelenmesi: Normal görünümde ayaklı çıkıntılar (kırmızı oklar) ve glomerüler bazal membran (mavi oklar)



**Resim 19:** Grup III'e (sisplatin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin elektron mikroskopi ile incelenmesi: Ayaksı çıkıntılarda füzyon (kırmızı oklar) ve glomerüler bazal membran düzensizliği (mavi oklar)



**Resim 20:** Grup IV'e (sisplatin+asetil L-karnitin grubu) ait bir sıçanda böbrek kesitinin elektron mikroskopi ile incelenmesi: Glomerüler bazal membran düzensizliği (kırmızı ok)



### **4.3.3 Böbrek dokularının immünfloresan mikroskobi inceleme sonuçları**

Gruplardaki sıçanlarda böbrek dokularının immünfloresan mikroskobi ile inceleme sonuçları Tablo 11’de gösterilmiştir.

Gruplardaki sıçanlarda böbrek immünfloresan inceleme sonuçları değerlendirildiğinde Grup I’de IgM ve IgG birikimi yokken; Grup II’de orta düzeyde IgG birikimi, Grup III’te hafif düzeyde IgG ve hafif ve az düzeyde IgM birikimi izlenmiştir. Grup IV’te hafif düzeyde IgG birikimi saptanmıştır. Hiçbir grupta IgA, C3, C3, C1q, fibrinojen birikimi saptanmamıştır.



**Tablo 11:** Dört grupta böbrek dokularının immünfloresan mikroskopi ile inceleme sonuçları

GRUPLAR	Sıçan numarası	IgG	IgA	IgM	C3	C1q	Fibrinojen
<b>Grup I</b>	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-
<b>Grup II</b>	1	++	-	-	-	-	-
	2	++	-	-	-	-	-
	3	++	-	-	-	-	-
	4	++	-	-	-	-	-
	5	++	-	-	-	-	-
	6	++	-	-	-	-	-
	7	++	-	-	-	-	-
<b>Grup III</b>	1	+	-	+/-	-	-	-
	2	+	-	+	-	-	-
	3	+	-	+	-	-	-
	4	+	-	+	-	-	-
	5	+	-	+/-	-	-	-
	6	+	-	+/-	-	-	-
	7	+	-	+/-	-	-	-
<b>Grup IV</b>	1	+	-	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-	-
	4	+	-	-	-	-	-
	5	+	-	-	-	-	-
	6	+	-	-	-	-	-
	7	+	-	-	-	-	-

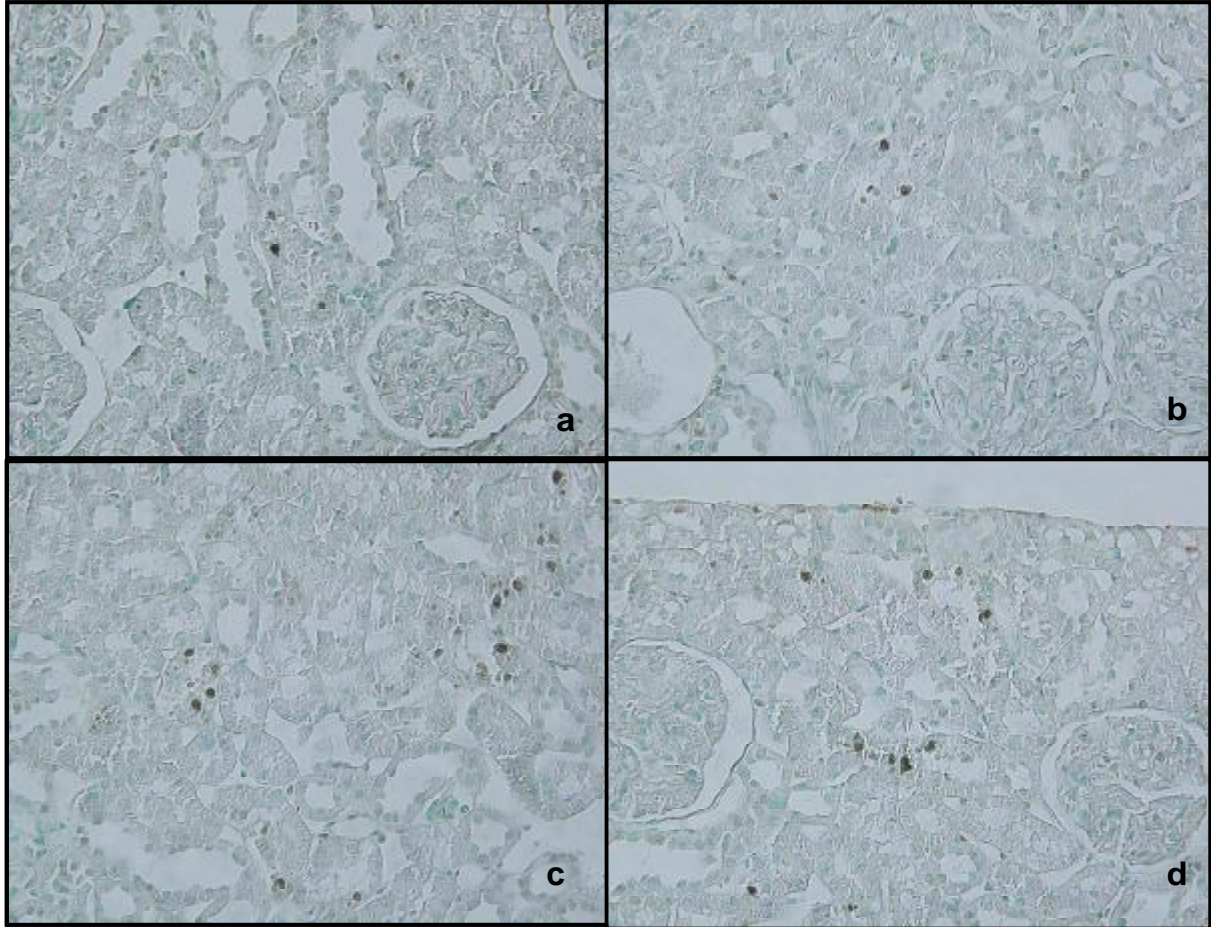
#### 4.4 BÖBREK DOKULARINDA SAPTANAN APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜ

Grup I ve Grup II ile karşılaştırıldığında Grup III'te TUNEL boyası ile pozitif boyanan hücre sayısı belirgin olarak artmıştı. Grup IV'te ise, Grup III'e göre pozitif tutulum gösteren hücreler sayıca azalmıştı (Resim 21). Dört gruba ait apoptoz skorları Tablo 12'de gösterilmiştir. Gruplar arasında yapılan değerlendirmede dört grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p=0.001$ ). Grup I ve Grup II'nin apoptoz skorları arasında fark yokken ( $p=0.234$ ) Grup III ve Grup IV apoptoz skorları diğer gruplara göre anlamlı oranda yüksek bulundu (Grup I ve Grup III  $p=0.008$ ; Grup I ve Grup IV  $p=0.008$ ; Grup II ve Grup III  $p=0.009$ ; Grup II ve Grup IV  $p=0.009$ ).

Grup III ve Grup IV kendi aralarında karşılaştırıldığında ise Grup III'e ait apoptoz skoru anlamlı olarak daha yüksek bulundu ( $p=0.016$ ).

**Resim 21:**Gruplarda TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücreler

**a:**Grup I **b:**Grup II **c:**Grup III **d:**Grup IV



**Tablo 12:** Gruplardaki sıçanların apoptoz skorları

<b>Grup numarası</b>	<b>Sıçan numarası</b>	<b>Böbrek apoptoz skorları</b>
<b>GRUP I</b>	1 numaralı sıçan	3,3,2,4,2
	2 numaralı sıçan	4,2,3,2,3
	3 numaralı sıçan	2,4,3,4,1
	4 numaralı sıçan	3,1,3,1,3
	5 numaralı sıçan	3,3,4,3,2
<b>GRUP II</b>	1 numaralı sıçan	4,2,1,2,4
	2 numaralı sıçan	3,3,4,3,4
	3 numaralı sıçan	4,2,3,2,4
	4 numaralı sıçan	5,4,3,3,3
	5 numaralı sıçan	2,4,3,3,3
<b>GRUP III</b>	1 numaralı sıçan	12,13,10,11,13
	2 numaralı sıçan	11,13,9,11,10
	3 numaralı sıçan	14,14,14,13,11
	4 numaralı sıçan	10,11,13,10,13
	5 numaralı sıçan	12,10,13,14,11
<b>GRUP IV</b>	1 numaralı sıçan	9,12,9,11,11
	2 numaralı sıçan	10,10,7,10,8
	3 numaralı sıçan	11,11,12,9,12
	4 numaralı sıçan	8,9,10,9,9
	5 numaralı sıçan	9,10,10,9,10

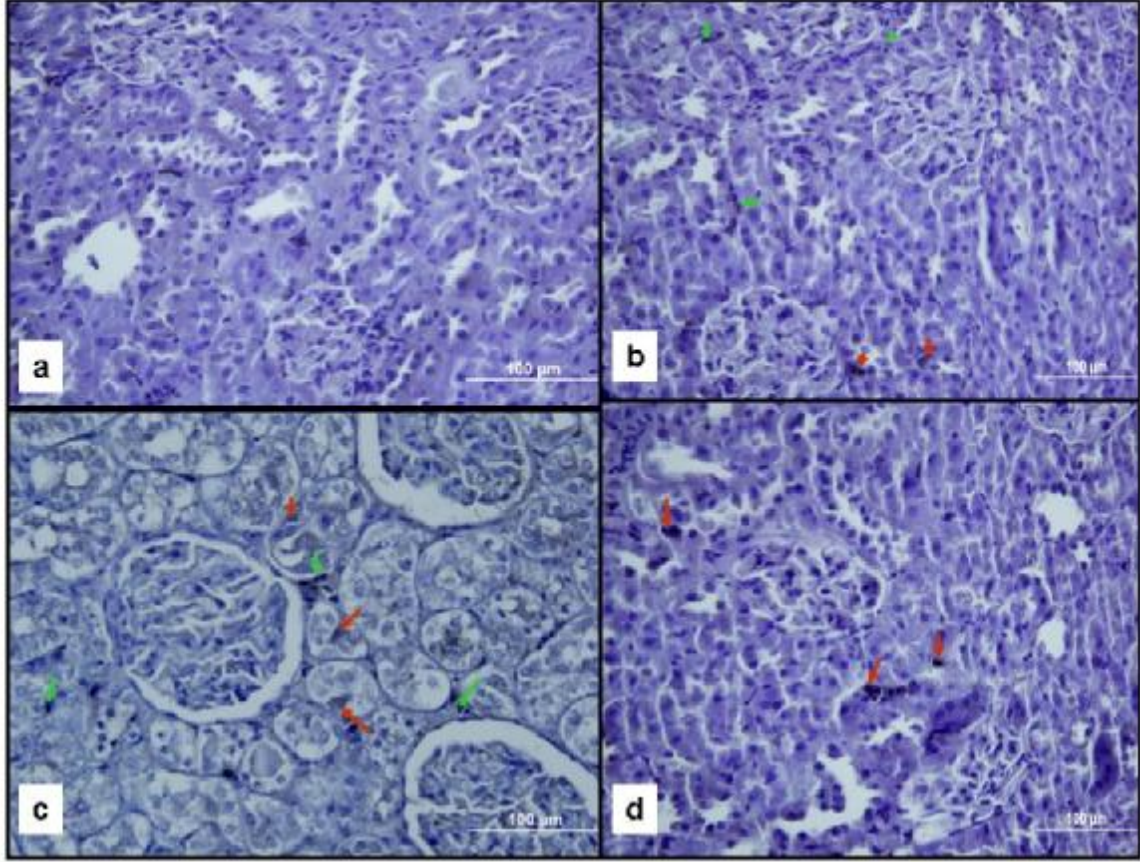
#### **4.5 BÖBREK DOKULARINDA BELİRLENEN KASP AZ 3, 8, 9 AKTİVİTE DÜZEYLERİ**

**Kaspaz 3:** Grup I normal görünümde iken grup II'de tek tük proksimal tübül ve interstisyel hücrelerde pozitif tutulum gözlendi. Grup III'te interstisyel hücrelerde ve proksimal tübül hücrelerinde kuvvetli tutulum gözlenirken Grup IV'te bu bulgular Grup III'e göre sayıca azalmıştı (Resim 22).

**Kaspaz 8:** Grup I ve Grup II'de tek tük interstisyel hücre tutulumu gözlenirken Grup III'de çok sayıda proksimal tübül hücrelerinde ve distal tübül ve interstisyel hücrelerde pozitif tutulum gözlendi. Grup IV'te ise Grup II'ye eşdeğer bulgular gözlendi (Resim23).

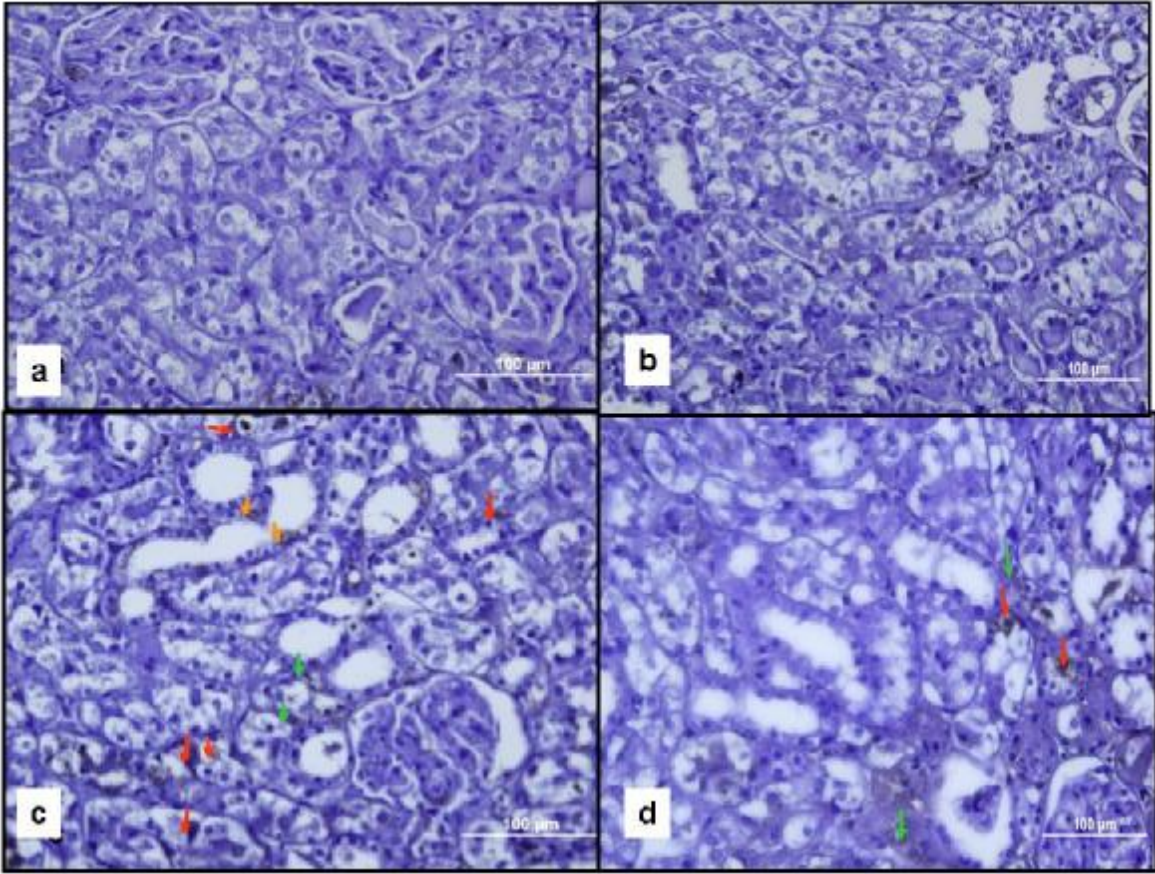
**Kaspaz 9:** Grup I'de çok az sayıda interstisyel ve proksimal tübül hücrelerinde pozitif tutulum gözlenmiş olup Grup II'deki bulgular bunlarla eşdeğerdi. Grup III'te birçok proksimal tübül hücresi ve glomerüler mezangiyal hücrelerde pozitif tutulum gözlenirken Grup IV'te daha az sayıda olmakla birlikte proksimal tübül hücrelerinde, glomerüler mezangiyal hücrelerde ve interstisyel damar düz kas hücrelerinde pozitif tutulum gözlenmiştir (Resim24).

**Resim 22:** Kaspaz 3 bulguları: Pozitif immünreaktif proksimal tübül hücreleri (kırmızı ok), intersitisyel hücreler (yeşil ok) **a)** Grup I **b)** Grup II **c)** Grup III **d)** Grup IV



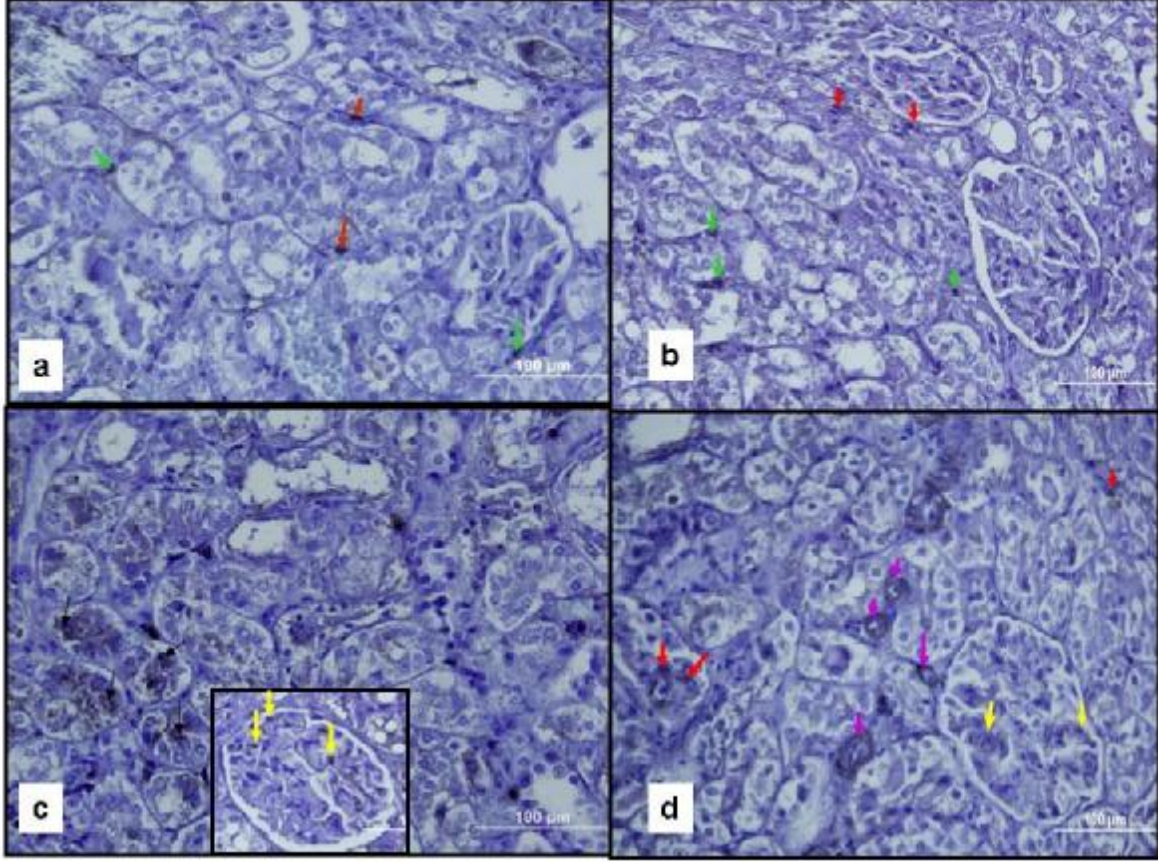
**Resim 23:** Kaspaz 8 bulguları: Pozitif immünreaktif proksimal tübül hücreleri(kırmızı ok),distal tübül hücreleri (turuncu ok) intersitisyel hücreler (yeşil ok)

**a)** Grup I **b)** Grup II **c)** Grup III **d)** Grup IV



**Resim 24:** Kaspaz 9 bulguları: Pozitif immünreaktif proksimal tübül hücreleri (kırmızı ok), intersitisyel hücreler (yeşil ok), intraglomerüler mezangial hücreler (sarı ok)

a) Grup I b) Grup II c) Grup III d) Grup IV



## 5.TARTIŞMA

Sisplatin solid tümörlerin tedavisinde kullanılan en önemli antineoplastik ilaçlardan biridir. En önemli doz sınırlayıcı yan etkisi nefrotoksisitedir.

Sisplatin hücre içi birçok sinyal ileti yolağını aktive ederek apoptoz, nekroz ve inflamasyona neden olur. Oksidatif hasar, hipoksi ve mitokondriyal hasar sisplatin nefrotoksisitesinin patogenezinde yer alan önemli olaylardandır. Bütün bu mekanizmaların yanı sıra sisplatin böbrekte vasküler hasara yol açarak iskemiye, renal doku hasarına ve GFR'de azalma sureti ile akut böbrek yetmezliğine neden olabilir (9,10).

Sisplatin nefrotoksisitesi üzerinde yoğun çalışmalar yapılmakla beraber patogeneze tam olarak aydınlatılamamıştır. Nefrotoksisite patogenezinin aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalar sisplatin nefrotoksisitesinin önlenmesinde yeni çözümler sunulmasına yardımcı olacaktır. Nefrotoksisitenin önlenmesi ile ilgili; ilacın etki mekanizması ve patogeneze göz önünde bulundurularak birçok yaklaşım denenmiştir. Patogeneze oksidatif hasar önemli bir rol oynadığından bunu önlemeye yönelik çok sayıda antioksidan ajan çalışılmıştır (10,12).

L-karnitin, hücrenin enerji üretimi için beta oksidasyona gidebilmek üzere uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondri matriksine geçişinde görev alan, asetillenmiş KoA miktarını düzenleyen ve diğer hücresel metabolik olaylarda yer alan, güçlü antioksidan özelliği kanıtlanmış vitamin benzeri bir bileşiktir. Asetil L-karnitin, L-karnitinin kısa zincirli bir ester türevidir olup L-karnitine ait özelliklerin yanı sıra güçlü nöroprotektif ve antiapoptotik özellikler taşımaktadır (14-28).

Bu çalışmada sisplatinin böbrek fonksiyonları ve yapısı üzerindeki etkileri çalışılmış ve güçlü bir antioksidan olduğu kanıtlanmış asetil L-karnitinin nefrotoksisite üzerindeki koruyucu rolü araştırılmıştır.

Sisplatin uygulamasından sonra GFR kümülatif dozlarla düşebileceği gibi tek doz uygulamadan sonra da düşebilir (7). Sisplatin tedavisi alan hastaların %25'inde tedaviden sonraki bir iki haftalık süreçte geri dönüşümlü azotemi saptandığı bilinmektedir (95). İlacın nefrotoksisitesi ile ilgili yapılan hayvan çalışmalarında nefrotoksisite indeksleri atılmış bulunmuş, serum kreatinin oranlarında yükselik saptanmıştır (37-39). Bu çalışmada serum fizyolojik ve asetil L-karnitin uygulanan kontrol gruplarında başlangıç ve üçüncü gün ortalama serum kreatinin değerleri normal değerler arasında bulunmuştur. Asetil L-karnitinin tek başına uygulandığında böbrek fonksiyonlarını değiştirmemesi literatürdeki bulgular ile uyumluydu (37,38). Sisplatin uygulanan grupta sisplatin nefrotoksisitesine ait bulgular saptanmış olup, ortalama serum kreatinin değerinin sisplatin tedavisi sonrasında yaklaşık yedi



kat arttığı görülmüştür. Sisplatin+ asetil L-karnitin uygulanan grupta ise ortalama serum kreatinin değeri başlangıç değerlerine göre dört kat artmış bulunmuştur. İki grup kendi arasında karşılaştırıldığında ise ortalama serum kreatinin değerinin sisplatin uygulanan grupta sisplatin+asetil L-karnitin uygulanan gruba göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde sisplatin ve sisplatin+asetil L-karnitin uygulanan gruplarda ortalama GFR değerlerinde sisplatin tedavisi sonrasında anlamlı oranda düşüklük bulunmuştur. Sisplatin +asetil L-karnitin uygulanan grupta ortalama GFR değeri daha düşük olmasına rağmen iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. İdrar toplamadaki problemler nedeni ile GFR'deki hata oranlarının yüksek olabileceği bilinmektedir. Bu çalışmada da serum kreatinin düzeyleri arasında anlamlı fark olmasına rağmen GFR'de anlamlı fark olmayışı yöntemden kaynaklanıyor olabilir. Öte yandan sisplatin nefrotoksisitesinde karnitin kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalarda karnitin GFR üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmaya henüz rastlanmamıştır. Literatürde sisplatin nefrotoksisitesinde karnitin kullanımı ile ilgili ilk çalışma Chang ve arkadaşları (38) tarafından yapılmıştır. Sisplatin sıçanlara 5 mg/kg dozda intraperitoneal enjeksiyonla verilerek nefrotoksisite oluşturulmuş ve 200 mg/kg dozda subkütan olarak uygulanan L- karnitin serum kreatinin değerlerini normale döndürerek nefrotoksisiteyi önlediği gösterilmiştir. Sayed-Ahmed ve arkadaşları (37) karnitin inaktif izomeri olan D-karnitini vererek L-karnitin eksikliği oluşturdukları sıçanlarda sisplatin nefrotoksisite indekslerinde belirgin artış saptamış ve karnitin eksikliğinin tek başına sisplatin nefrotoksisitesi için bir risk faktörü olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Aynı çalışmada 500 mg/kg/doz L-karnitin verdikleri sıçanlarda sisplatin nefrotoksisitesinin önemli oranda önlediği de gösterilmiştir. Aleisa ve arkadaşları (39) ise 7 mg/kg dozda intraperitoneal enjeksiyonla verdikleri sisplatinle oluşturdukları nefrotoksisitede L-karnitin kısa zincirli bir türevi olup benzer etkilere sahip olan propiyonil L-karnitin (PLC) kullanmışlardır. Subkütan uygulama ile 250 mg/kg dozda verdikleri PLC'nin sisplatin nefrotoksisitesini önlediğini; serum kreatinin değerlerini normale döndürdüğünü göstermişlerdir. Bahsedilen üç çalışmada sisplatin 5-7 mg/kg/doz intraperitoneal enjeksiyonla; karnitin ise 200-500 mg/kg dozlarda verilmiştir. Bu çalışmada farklı olarak, sisplatin daha yüksek dozda (16 mg/kg/doz) ve intraperitoneal bir saat infüzyonla; asetil L-karnitin ise literatürdeki çalışmalara benzer 200 mg/kg/doz olarak verilmiştir. Sonuç olarak bu araştırmada yüksek doz sisplatin uygulaması ile beraber asetil L-karnitin uygulamasının ortalama serum kreatinin değerlerini tamamen normale çevirmediği ama anlamlı oranda düşürdüğü ve asetil L- karnitin sisplatin nefrotoksisitesi üzerinde koruyucu rolü olduğu saptanmıştır.

Daha önce sisplatin nefrotoksitesisi ile ilgili yapılan çalışmalar, sisplatin uygulaması ile birlikte ilki 24-48 saat sonra ikincisi de 72-96 saat sonra olmak üzere iki farklı fazda poliüri görülebileceğini ortaya çıkarmıştır (10). Bu araştırmada, gruplar arasında üçüncü günde ortalama 24 saatlik idrar volümleri açısından fark saptanmamıştır. Her bir grubun kendi içinde 24 saatlik idrar volümleri birinci ve üçüncü gün karşılaştırıldığında da anlamlı fark bulunmamıştır. Öte yandan sisplatin ve sisplatin+ asetil L-karnitin uygulanan gruplarda üçüncü gün GFR değerleri düşük saptanmıştır. GFR düşüklüğü ile beraber idrar miktarlarında da azalma olması beklenmektedir. Bu durumda her iki grupta da GFR düşüklüğü ile beraber idrar miktarında azalmanın olmaması göreceli olarak sisplatin nefrotoksitesisi ile ilgili poliüri lehine değerlendirilebilir.

L-karnitin reabsorpsiyonu proksimal tübüllerden yapıldığından sisplatin toksisitesinde vücuttan karnitin atılımı artar. Heuberger ve arkadaşları (135) sisplatin alan hastalarda yaptıkları çalışmada renal karnitin atılımının sisplatin tedavisinin hemen ardından yaklaşık on kat kadar arttığını ve idrarda karnitin atılımının sisplatine tedavisinden yaklaşık bir hafta sonra normale döndüğünü göstermişlerdir. Bu çalışmada idrarda total karnitin atılımı araştırılmış ve üçüncü gün elde edilen idrar total L-karnitin/kreatinin oranları, sisplatin grubunda en düşük olup; asetil L-karnitin uygulanan kontrol grubuna göre anlamlı oranda azalmış bulunmuştur. Bunun bir nedeni ikinci idrarların üçüncü gün toplanması olabilir. Bu dönemde sisplatin verilen sıçanlarda GFR azaldığından idrardaki karnitin atılımı da azalmış olabilir. Bu araştırmada doku ve serum karnitin değerleri ölçülemedi. Sisplatin toksisitesinin vücuttaki karnitin miktarı üzerindeki etkisini anlamak için idrar karnitin değerleri ile beraber doku ve serum karnitin düzeylerinin değerlendirildiği başka çalışmalara ihtiyaç vardır.

Tübüler hücre ölümü ile karakterize renal doku hasarı sisplatin nefrotoksitesisinin histopatolojik özelliklerinden biridir. Bu çalışmada sisplatin nefrotoksitesisinde gerçekleşen histopatolojik değişiklikler ve asetil L-karnitin bunlar üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Serum fizyolojik ve asetil L-karnitin uygulanan kontrol gruplarında böbrek morfolojisi tamamen normaldi. Sisplatin ve sisplatin+asetil L-karnitin uygulanan gruplarda saptanan histopatolojik değişiklikler ise literatürle uyumlu olarak proksimal tübülde daha belirgindi (7,10,12,37-39). Işık mikroskopisi ile yapılan incelemede sisplatin uygulanan grupta proksimal tübüllerde hücresel deskuamasyon, belirgin mikrovillüs kaybı ve yer yer tiroidizasyon görüldü. İntersitisyel hücre proliferasyonu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve glomerüler nekroz ise bu grupta görülen diğer bulgular. Sisplatin+ asetil L-karnitin uygulanan grupta ise proksimal tübül hasarı çok daha az olup, bazı proksimal tübüllerde

mikrovillus kaybı mevcuttu. Bu grupta intersitisyel hücre proliferasyonu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonuna rastlanmamış olup tek tük, nadir nekroze glomerüller gözlemlendi. Sisplatin nefrotoksisitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda glomerüler morfoloji çoğunlukla sağlam tanımlanmakla beraber glomerüler hasarın olduğu çalışmalar da bildirilmiştir (39,96,97). Bu çalışmada yüksek doz verilen sisplatin, yaygın proksimal tübül hasarının yanı sıra glomerüler hasara da yol açmıştır. Ancak sisplatin+ asetil L-karnitin uygulanan grupta glomerüllerin büyük oranda korunduğu gözlenmiştir. Tüm bu bulgular histopatolojik düzeyde de asetil L-karnitinin sisplatine bağlı böbrek hasarını azaltıcı etkisi olduğunu göstermekte olup literatürde bu konuda ışık mikroskobisi ile yapılmış çalışmalarla uyum sağlamaktadır (37-39). Çalışmada böbrek kesitlerinin elektron mikroskobik incelemelerinin de bu bulguları desteklediği görülmüştür. Serum fizyolojik ve asetil L-karnitin uygulanan ilk iki grupta böbrek ultrastrüktürel yapısı tamamen normalken, sisplatin grubunda glomerüler bazal membran düzensizliği ve ayaklı çıkıntılarda füzyon gözlemlendi. Sisplatin+asetil L-karnitin grubunda ise yer yer glomerüler bazal membran kalınlığı mevcuttu ancak ayaklı çıkıntılar korunmuştu. Sisplatin nefrotoksisitesinde karnitin kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalara ek olarak bu çalışmada ilk kez elektron mikroskobisi ile asetil L-karnitinin ultrastrüktürel düzeyde de koruyucu etkisinin olduğu saptanmıştır.

Sisplatin nefrotoksisite patogenezi daha iyi aydınlatmak amacıyla böbrek dokularında immünfloresan mikroskobik inceleme yapılmıştır. Serum fizyolojik uygulanan kontrol grubunda IgM ve IgG birikimi yokken; asetil L-karnitin uygulanan kontrol grubunda orta düzeyde IgG birikimi, sisplatin uygulanan grupta hafif düzeyde IgG ve hafif ve az düzeyde IgM birikimi izlenmiştir. Sisplatin+asetil L-karnitin uygulanan grupta ise hafif düzeyde IgG birikimi varken, hiçbir grupta IgA, C3, C3, C1q, fibrinojen birikimi saptanmamıştır. Sisplatin uygulanan grupta ışık mikroskobik ve elektron mikroskobik nefrotoksisite bulguları ile birlikte var olan immünfloresan IgM birikimine diğer gruplarda rastlanmamıştır. Bu bulgular ışık mikroskobik ve elektron mikroskobik nefrotoksisite bulgularında azalmanın gözlemlendiği bulgularla birleştirildiğinde nefrotoksisiteden koruyuculuğu desteklemektedir. Öte yandan immünfloresan IgG bulguları değerlendirildiğinde; hem asetil L-karnitin hem de asetil L-karnitin+ sisplatin ve sisplatin uygulanan gruplarda direkt immünfloresan incelemede IgG birikiminin saptanmış olması asetil L-karnitinin yol açtığı bir bulguyu düşündürmemektedir. Bu durum uygulama ile ilgili nonspesifik bir bulgu olabilir. Ulaşılabilen literatürde L-karnitin ya da türevlerinin IgG birikimine yol açtığına dair bir bilgiye ulaşılamamıştır. Ancak ışık mikroskobik ve elektron mikroskobik olarak asetil L-karnitin grubunda nefrotoksisite

bulgularının olmaması immünfloresan olarak tek başına IgG birikiminin nefrotoksisite yönünden önemini desteklememektedir.

Apoptoz normal ve patolojik süreçlerde hücre ölümünün önemli bir yoludur. Sisplatin nefrotoksisitesi ile ilgili yapılan hücre kültür çalışmalarında yüksek doz sisplatin konsantrasyonunun proksimal tübül hücrelerinde nekroza yol açarken daha düşük konsantrasyonların apoptoza yol açtıkları gösterilmiştir (57). Bunun yanı sıra hayvanlarda *in vivo* yapılan çalışmalarda sisplatin uygulamasının renal tübüllerde hem nekroz hem de apoptoza yol açtığı da gösterilmiştir (58-60). Hücre ölüm reseptörlerinin aracılık ettiği ekstrinsik yolak, mitokondri üzerinden işleyen intrinsik yolak ve endoplazmik retikülüm (ER)- stres yolağı apoptozdaki başlıca yolaklardır. Kaspaz 8 ekstrinsik yolağın aktivasyonu ile aktive hale gelerek apoptoza neden olurken; sisplatin nefrotoksisitesinde esas apoptotik yol olan intrinsik ya da mitokondriyal yolağın aktivasyonu ile sitokrom *c* salınımı olur ve bir dizi etkileşim sonucu kaspaz 9 aktive hale gelir. Kaspaz 8 ve 9 renal tübüler apoptozda kritik bir role sahip olan kaspaz 3'ü aktive ederek apoptoza neden olur (9). Çalışmada, bu bilgiler ışığında literatürle uyumlu olarak sisplatin nefrotoksisitesinde kaspaz 3, 8 ve 9 aktivitesinin artmış olduğu gösterilmiştir. Serum fizyolojik ve asetil L-karnitin uygulanan gruplarda önemli değişiklik gözlenmezken; sisplatin uygulanan grupta proksimal tübülde belirgin kaspaz 3,8 ve 9 tutulumu, distal tübüllerde ve interstisyel hücrelerde kaspaz 8, bunlara ek olarak glomerüler mezangial hücrelerde de kaspaz 9 tutulumu artmış olarak saptanmıştır. Benzer bulgular sisplatin+asetil L-karnitin uygulanan grupta da görüldü ancak sisplatin uygulanan gruba göre çok daha az tutulum mevcuttu. Özellikle de kaspaz 8 aktivasyonu sisplatin+asetil L-karnitin uygulanan grupta asetil L-karnitin uygulanan kontrol grubuna benzer özellikler taşımaktaydı.

Hücre içi birçok yolağın aktivasyonu sonucu gelişen apoptozu göstermeye yönelik yapılan incelemede sisplatin ve sisplatin + asetil L-karnitin uygulanan gruplarda, proksimal tübüllerde TUNEL pozitif boyanan hücrelerle, apoptozun artmış olduğu gösterildi. İki grup arasında yapılan karşılaştırmada ise sisplatin uygulanan grupta apoptotik hücre ölümünün anlamlı oranda daha fazla olup asetil L-karnitinin apoptozu önleyici etkisi olduğu gösterilmiştir.

Asetil L-karnitinin sisplatin nefrotoksisitesi üzerindeki koruyucu etkisi öncelikle antioksidatif ve antiapoptotik özelliklerinden kaynaklanıyor olabilir. Oksidatif stres hasarı sisplatinine bağlı akut böbrek hasarında aktif olarak rol alır. Sisplatin nefrotoksisitesine bağlı gelişen oksidatif streste hücrelerde ksantin-ksantin oksidaz, mitokondri ve NADPH oksidaz tarafından üretilen reaktif oksijen türleri doğrudan lipid, protein ve DNA gibi hücre komponentleri üzerinde etki gösterir ve yapılarını bozar (11). Sisplatin G6PD ve heksokinaz aktivasyonu yolu ile de serbest radikal üretiminin artmasına ve antioksidan üretiminin

azalmasına neden olur (79). Süperoksid anyon, hidrojen peroksit ve hidroksil radikal sisplatinle tedavi edilmiş böbreklerde artmış olarak bulunmuştur (80-82). Bu serbest radikaller peroksidasyon ile hücre membranının lipid yapılarına zarar verirler, proteinleri denatüre ederek enzimatik inaktivasyona ve mitokondriyal disfonksiyona yol açarlar. Süperoksid dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz antioksidan enzimlerin sisplatin tarafından inhibe edildikleri ve böbrekteki aktivitelerinin önemli oranda azaldığı gösterilmiştir (79,83,84). Öte yandan oksidatif hasarın lipid peroksidasyonu ve fosfolipid yıkımına neden olarak hidrofobik, anyonik deterjanlarla benzer özellikler taşıyan serbest uzun zincirli yağ asitlerinin oluşumuna ve dokularda birikimine yol açtıkları bilinmektedir (115-118). Bu uzun zincirli serbest yağ asitleri mitokondrilerdeki voltaj bağımlı kanallarla etkileşimde bulunup membran geçirgenliğinde değişikliğe ve sitokrom *c* salınımına ve apoptoza yol açarlar (68,118-120). Sisplatin nefrotoksisitesinde oksidatif hasarın benzer şekilde serbest yağ asitlerinin artışına, membran geçirgenliğinde değişikliklere ve sitokrom *c* salınımına ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (11,38,79). Sisplatin nefrotoksisitesinde lipid peroksidasyonun sonucu olarak böbrek dokusunda MDA'nın arttığı gösterilmiştir (37,85). Bu çalışmada ise dört grup arasında böbrek dokularındaki MDA/protein değerlerinde dört grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

L-karnitin ve türevlerinin oksidatif stresi engellediği, mitokondriyal toksik ajanlara karşı koruyucu etki sağladığı, süksinat dehidrogenaz gibi mitokondriyal enzimlerin yanı sıra katalaz ve süperoksid dismutaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde de koruyucu rol oynayarak güçlü bir antioksidan ve serbest radikal çöpcüsü olduğu yapılan birçok çalışmada kanıtlanmıştır (23-27). Bu özelliklerine ek olarak yağ asitlerinin beta oksidasyonunu hızlandırarak uzun zincirli yağ asitlerinin toksik etkilerini azalttığı bilinmektedir. Serbest uzun zincirli yağ asitlerinin neden olduğu mitokondriyal disfonksiyonun karnitin tarafından engellendiği ve karnitinin birçok hücre tipinde mitokondriyal membran geçirgenliğindeki değişiklikleri ve apoptozu güçlü olarak önlediği gösterilmiştir (38,118,121).

Sisplatin nefrotoksisitesinde inflamasyonun önemli mekanizmalardan biri olduğu ve TNF- $\alpha$ 'nın bunun gelişiminde merkezi bir rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca etkilenmiş tübül etraflarında görülen makrofaj ve lenfosit infiltrasyonu da sisplatin nefrotoksisitesinde görülen özelliklerindedir. Bahsedilen bulgular bu çalışmada sisplatin uygulanan grupta görülmüş olup sisplatin+asetil L-karnitin uygulanan grupta görülmemiştir. Son zamanlarda yapılan deneysel çalışmalarda ve insan çalışmalarında L-karnitin ve türevlerinin antioksidan özellikleri yanında immünmodulator ve antiinflamatuvar özellikleri olduğu gösterilmiş ve L-karnitin uygulamasının TNF- $\alpha$  gibi inflamasyonda önemli rol alan sitokin düzeylerinde ve

önemli bir inflamatuvar belirteç olan CRP düzeylerinde azalmaya neden olduğu ve inflamasyonu baskılayıcı etkisi olduğu kanıtlanmıştır (29-32). Bu bilgiler ışığında bulgularımız asetil L-karnitinin antiinflamatuvar etkinliğini de desteklemektedir, ancak bu konuda daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 6. SONUÇLAR:

1. Sisplatin+asetil L-karnitin uygulanan grupta, serum kreatinin değerlerinde sisplatin uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı azalma olması asetil L-karnitinin sisplatin ile oluşturulmuş nefrotoksisitede böbrek fonksiyonları üzerindeki koruyucu etkisini göstermiştir.

2. Böbrek dokularının ışık mikroskopi ile incelemesinde sisplatin uygulanan grupta; peritübüler intersitisyel hücre proliferasyonu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, proksimal tübüllerde hücresel deskuamasyon, bazı proksimal tübüllerde tiroidizasyon, glomerüler nekroz ve proksimal tübül hücrelerinde mikrovillüs kaybı gözlenmiştir.

Sisplatin+asetil L-karnitin uygulana grupta ise proksimal tübüllerde az sayıda hücresel deskuamasyon, az sayıda tiroidizasyon ve mikrovillüs kaybı gözlenmesi, asetil L-karnitin uygulamasının doku düzeyinde koruyucu etkisini göstermiştir.

3. Sisplatin+asetil L-karnitin uygulanan grupta intersitisyel hücre proliferasyonu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonuna rastlanmayışı, asetil L-karnitinin antiinflamatuvar özelliğini desteklemiştir. Bu sonuç preliminere bir sonuç olup daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

4. Böbrek dokularının elektron mikroskopik incelenmesinde sisplatin uygulanan grupta glomerüler bazal membran düzensizliği ve ayaksı çıkıntılarda füzyon gözlenmiştir. Sisplatin+asetil L-karnitin uygulanan grupta ise yer yer glomerüler bazal membran kalınlığı mevcut olduğu ancak ayaksı çıkıntıların korunduğu saptanmıştır. Bu, asetil L-karnitinin sisplatine bağlı nefrotoksisitede koruyucu bir ajan olduğunu ultrastrüktürel düzeyde gösteren ilk ve önemli bir bulgudur.

5. Asetil L-karnitin, sisplatinin böbrek dokusunda yarattığı apoptotik hücre ölümünü anlamlı oranda azaltmıştır. Kaspaz 3, 8 ve 9 aktivitelerinin sisplatin+asetil L-karnitin uygulanan grupta azalması da bu sonucu desteklemektedir.

Sonuç olarak; sisplatine bağlı nefrotoksisite oluşturulan sıçanlarda asetil L-karnitin kullanımının böbrek fonksiyonlarında düzelme sağladığı ve doku düzeyinde böbreği koruyucu ve apoptozu önleyici etkisi olduğu gösterilerek, asetil L-karnitinin antioksidatif, antiapoptotik ve antiinflamatuvar özellikleri desteklenmiştir. Bu bulgular ve literatürde bununla ilgili yapılmış olan çalışmalar ışığında; çok az yan etkiye sahip, kanser hastalarında kaşeksi ve yorgunluğu azaltıcı etkisi de kanıtlanmış olan asetil L-karnitinin sisplatin nefrotoksisitesini önlemek amacı ile insanlarda da kullanılabileceği düşünülmüştür.

## 7. KAYNAKLAR:

1. Kelland L. The resurgence of platinum based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 573-584
2. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 307-320
3. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 2007; 33: 9-23
4. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7265-7279
5. <http://www.cancercare.on.ca/pdfdrugs/CISPLATI.pdf>
6. Sastry J, Kellie SJ. Severe neurotoxicity, ototoxicity and nephrotoxicity following high-dose cisplatin and amifostine. *Pediatr Hematol Oncol* 2005; 22: 441-445
7. Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol* 2003; 23: 460-464
8. Boulikas T, Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncol Rep* 2003; 10: 1663-1682
9. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int.* 2008; 73: 994-1007
10. Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, et al. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci* 2007; 334(2): 115-124
11. Kawai Y, Nakao T, Kunimura N, et al. Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to cisplatin-related renal cell injury. *J Pharmacol Sci* 2006; 100: 65-72
12. Ali BH, Al Moundhri MS. Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds: a review of some recent research. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 1173-1183
13. Şener G, Satiroğlu H, Kabasakal L, et al. The protective effect of melatonin on cisplatin nephrotoxicity. *Fundam Clin Pharmacol* 2000; 14: 553-560
14. Monograph. L-carnitine. *Altern Med Rev* 2005;10: 42-50
15. Calabrese V, Giuffrida Stella AM, Calvani M, et al. Acetylcarnitine and cellular stress response: roles in nutritional redox homeostasis and regulation of longevity genes. *J Nutr Biochem* 2006;17: 73-88
16. Bremer J. Carnitine-metabolism and functions. *Physiol Rev* 1983; 63: 1420-1480



17. Stieger B, O'Neill B, Krähenbühl S. Characterization of L-carnitine transport by rat kidney brush-border-membrane vesicles. *Biochem J* 1995; 309: 643-647
18. Rebouche CJ, Mack DL. Sodium gradient-stimulated transport of L-carnitine into renal brush border membrane vesicles: kinetics, specificity, and regulation by dietary carnitine. *Arch Biochem Biophys* 1984; 235: 393-402
19. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principles of biochemistry. 2nd ed. New York; Worth Publishers; 1993
20. Chen W, Huang YC, Shultz TD, et al. Urinary, plasma, and erythrocyte carnitine concentrations during transition to a lactoovo vegetarian diet with vitamin B-6 depletion and repletion in young adult women. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 221-230
21. Arockia Rani PJ, Panneerselvam C. Carnitine as a free radical scavenger in aging. *Exp Gerontol* 2001; 36: 1713-1726
22. Mayes, PA. Lipids of physiologic significance. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, editors. *Harper's Biochemistry*. 25th ed. Stamford: Appleton and Lange; 2000. pp. 160-171
23. Brown GC. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 351-369
24. Kremser K, Stangl H, Pahan K, et al. Nitric oxide regulates peroxisomal enzyme activities. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 763-774
25. Arrigoni-Martelli E, Caso V. Carnitine protects mitochondria and removes toxic acyls from xenobiotics. *Drugs Exp Clin Res* 2001; 27: 27-49
26. Binienda ZK, Ali SF. Neuroprotective role of L-carnitine in the 3-nitropropionic acid induced neurotoxicity. *Toxicol Lett* 2001; 125: 67-73
27. Gülçin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* 2006; 217: 213-220
28. Vanella A, Russo A, Acquaviva R, et al. L -propionyl-carnitine as superoxide scavenger, antioxidant, and DNA cleavage protector. *Cell Biol Toxicol* 2000; 16: 99-104
29. Miguel-Carrasco JL, Mate A, Monserrat MT, Arias JL, et al. The role of inflammatory markers in the cardioprotective effect of L-carnitine in L-NAME- induced hypertension. *Am J Hypertens* 2008; 21: 1231-1237
30. Tastekin N, Aydogdu N, Dokmeci D, et al. Protective effects of L-carnitine and alfa-lipoic acid in rats with adjuvant arthritis. *Pharmacol Res* 2007; 5: 303-310

31. Savica V, Santoro D, Mazzaglia G, et al. L-carnitine infusions may suppress serum C-reactive protein and improve nutritional status in maintenance hemodialysis patients. *J Ren Nutr* 2005; 15: 225-230
32. Arafa HM. Carnitine deficiency aggravates carboplatin nephropathy through deterioration of energy status, oxidant/anti-oxidant balance, and inflammatory endocoids. *Toxicology* 2008; 254: 51-60
33. Al-Majed AA. Carnitine deficiency provokes cisplatin-induced hepatotoxicity in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007;100: 145-150
34. Al-Majed AA, Sayed-Ahmed MM, Al-Yahya AA, et al. Propionyl-L-carnitine prevents the progression of cisplatin-induced cardiomyopathy in a carnitine-depleted rat model. *Pharmacol Res* 2006; 53: 278-286
35. De Grandis D. Acetyl-L-carnitine for the treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a short review. *CNS Drugs* 2007;21 Suppl 1: 39-43
36. Pisano C, Pratesi G, Laccabue D, et al. Paclitaxel and Cisplatin-induced neurotoxicity: a protective role of acetyl-L-carnitine. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5756-5767
37. Sayed-Ahmed MM, Eissa MA, Kenawy SA, et al. Progression of cisplatin-induced nephrotoxicity in a carnitine-depleted rat model. *Chemotherapy* 2004; 50: 162-170
38. Chang B, Nishikawa M, Sato E, et al. L-Carnitine inhibits cisplatin-induced injury of the kidney and small intestine. *Arch Biochem Biophys* 2002; 405: 55-64
39. Aleisa AM, Al-Majed AA, Al-Yahya AA, et al. Reversal of cisplatin-induced carnitine deficiency and energy starvation by propionyl-L-carnitine in rat kidney tissues. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34:1252-1259
40. Holzer AK, Samimi G, Katano K, et al. The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 2004; 66: 817-823
41. Schaeppi U, Heyman IA, Fleischman RW, et al. cis-Dichlorodiammineplatinum(II) (NSC-119 875): preclinical toxicologic evaluation of intravenous injection in dogs, monkeys and mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1973; 25: 230-241
42. Gonzales-Vitale JC, Hayes DM, Cvitkovic E, et al. The renal pathology in clinical trials of cis-platinum (II) diamminedichloride. *Cancer* 1977; 39: 1362-1371
43. Ries F, Klastersky J. Nephrotoxicity induced by chemotherapy with special emphasis on cisplatin toxicity. *Am J Kidney Dis* 1986; 8: 368-379

44. Santoso JT, Lucci JA 3rd, Coleman RI, et al. Saline, mannitol and furosemide hydration in acute cisplatin nephrotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003; 52: 13-18
45. Taguchi T, Nazneen A, Abid MR, et al. Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contrib Nephrol* 2005; 148: 107-121
46. Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, et al. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol* 2005; 167: 1477-1484
47. Ludwig T, Riethmuller C, Gekle M, et al. Nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic cation transport. *Kidney Int* 2004; 66: 196-202
48. Litterst CL, Torres IJ, Guarino AM. Plasma levels and organ distribution of platinum in the rat, dog and dog fish following intravenous administration of cis-DDP(II). *J Clin Hemat Oncol* 1977; 7: 169
49. Kuhlmann MK, Burkhardt G, Kohler G. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 2478-2480
50. Kroning R, Lichtenstein AK, Nagami GT. Sulfur-containing aminoacids decrease cisplatin cytotoxicity and uptake in renal tubule epithelial cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 45: 43-49
51. Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer* 1993; 67: 1171-1176
52. Kuo YM, Gybina AA, Pyatskowitz JW, et al. Copper transport protein (Ctr1) levels in mice are tissue specific and dependent on copper status. *J Nutr.* 2006; 136: 21-26
53. Thomas MC, Tikellis C, Kantharidis P, et al. The role of advanced glycation in reduced organic cation transport associated with experimental diabetes. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311: 456-466
54. Townsend DM, Deng M, Zhang L, et al. Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1-10
55. Townsend DM, Hanigan MH. Inhibition of gamma- glutamyl transpeptidase or cysteine S-conjugate beta lyase activity blocks the nephrotoxicity of cisplatin in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 142-148
56. Ekborn A, Lindberg A, Laurell G, et al. Ototoxicity, nephrotoxicity and pharmacokinetics of cisplatin and its monohydrated complex in the guinea pig. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003; 51: 36-42

57. Lierberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol* 1996; 270: 700-708
58. Megyesi J, Safirstein RL, Price PM. Induction of p21WAF1/CIP1/SDI1 in kidney tubule cells affects the course of cisplatin-induced acute renal failure. *J Clin Invest.* 1998;101:777-782
59. Ramesh G, Reeves WB. TNFR2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285: F610-618
60. Liu H, Baliga R. Cytochrome P450 2E1 null mice provide novel protection against cisplatin-induced nephrotoxicity and apoptosis. *Kidney Int.* 2003; 63: 1687-1696
61. Faubel S, Ljubanovic D, Reznikov L, et al. Caspase-1-deficient mice are protected against cisplatin-induced apoptosis and acute tubular necrosis. *Kidney Int* 2004; 66: 2202-2213.
62. Ramesh G, Reeves WB. p38 MAP kinase inhibition ameliorates cisplatin nephrotoxicity in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289: 166-174
63. Li S, Basnakian A, Bhatt R, et al. PPAR-alpha ligand ameliorates acute renal failure by reducing cisplatin-induced increased expression of renal endonuclease G. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287: F990-998
64. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem.*2000; 69: 217-245
65. Ramesh G, Reeves WB. TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest* 2002; 110: 835-842
66. Ramesh G, Reeves WB. Inflammatory cytokines in acute renal failure. *Kidney Int Suppl* 2004; 91: S56-61
67. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death critical control points. *Cell* 2004; 116: 215-219
68. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1312
69. Boyce M, Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ* 2006; 13: 363-373
70. Basnakian AG, Apostolov EO, Yin X, et al. Cisplatin nephrotoxicity is mediated by deoxyribonuclease I. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 697-702
71. Price PM, Megyesi J, Safirstein RL. Cell cycle regulation repair and regeneration in acute renal failure. *Semin Nephrol* 2003; 23. 449-459
72. Delaval B, Birnbaum D. A cell cycle hypothesis of cooperative oncogenesis. *Int J Oncol* 2007; 30: 1051-1058

73. Bloom J, Cross FR. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 149-160
74. Ishikawa K, Ishii H, Saito T. DNA damage-dependent cell cycle check points and genomic stability. *DNA Cell Biol* 2006; 25: 406-411
75. Megyesi J, Udvarhelyi N, Safirstein RL, et al. The p53-independent activation of p21 WAF1/CIP1/SDI1 after acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 1996; 271: F1211-F1216.
76. Price PM, Safirstein RL, Megyesi J, et al. Protection of renal cells from cisplatin renal toxicity by cell cycle inhibitors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286: F378-F384.
77. Arany I, Megyesi JK, Kaneto H, et al. Cisplatin- induced cell death is EGFR/src/ERK signaling dependent in Mouse proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287: 543-549
78. Jo SK, Cho WY, Sung SA, et al. MEK inhibitor, U0126, attenuates cisplatin-induced renal injury by decreasing inflammation and apoptosis. *Kidney Int* 2005; 67: 458-466
79. Yılmaz HR, Iraz M, Sogut S, et al. The effects of erdosteine on the activities of some metabolic enzymes during cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res* 2004; 50: 287-290
80. Davis CA, Nick HS, Agarwal A. Manganese superoxide dismutase attenuates cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2683-2690
81. Kadıköylü G, Bolaman Z, Demir S, et al. The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. *Hum Exp Toxicol* 2004; 23: 29-34
82. Shino Y, Itoh Y, Kubota T, et al. Role of poly(ADP-ribose-)polymerase in cisplatin-induced injury in LLC-PK1 cells. *Free Radic Biol Med* 2003; 35: 966-977
83. Badary OA, Abdel-Maksoud S, Ahmed WA, et al. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. *Life Sci* 2005; 76: 2125-2135
84. Durak İ, Özbek H, Karaayvaz M, et al. Cisplatin induces acute renal failure by impairing antioxidant system in guinea pigs: effects of antioxidant supplementation on the cisplatin nephrotoxicity. *Drug Chem Toxicol* 2002; 25: 1-8.
85. Santos NA, Catão CS, Martins NM, et al. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Arch Toxicol.* 2007; 81: 495-504

86. Chirino YI, Hernandez-Pando R, Pedraza- Chaverri J. Peroxynitrite decomposition catalysat ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Pharmacol* 2004; 4: 20
87. Yıldırım Z; Söğüt S, Odacı E, et al. Oral erdosteine administration attenuates cisplatin-induced renal tubular damage in rats. *Pharmacol Res.* 2003; 47: 149-156
88. Srivastava RC, Farookh A, Ahmad N, et al. Evidence for the involvement of nitric oxide in cisplatin- induced toxicity in rats. *Biometals* 1996; 9: 139-142
89. Saad SY, Najjar T, Daba MH, et al. Inhibition of nitric oxide synthase aggravates cisplatin-induced nephrotoxicity: effect of 2-amino-4-methylpyridine. *Chemotherapy* 2002; 48: 309-315
90. Saleh S, El-Demerdash E. Protective effects of L-arginine against cisplatin-induced renal oxidative stress and toxicity: role of nitric oxide. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 97: 91-97
91. Winston JA, Safirstein R. Reduced renal blood flow in early cisplatin-induced acute renal failure in the rat. *Am J Physiol* 1985; 249: F490-496
92. Yamate J, Sato K, Ide M, et al. Participation of different macrophage populations and myofibroblastic cells in chronically developed renal interstitial fibrosis after cisplatin-induced renal injury in rats. *Vet Pathol* 2002; 39: 322-333
93. Guinee DG Jr, van Zee B, Houghton DC. Clinically silent progressive renal tubulointerstitial disease during cisplatin chemotherapy. *Cancer* 1993; 71: 4050-4054.
94. Cornelison TL, Reed E. Nephrotoxicity and hydration management for cisplatin, carboplatin, and ormaplatin. *Gynecol Oncol* 1993; 50: 147-158
95. Daugaard G, Abildgaard U. Cisplatin nephrotoxicity. A review. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; 25: 1-9
96. Fenoglio C, Boicelli CA, Ottone M, et al. Protective effect of procaine hydrochloride on cisplatin-induced alterations in rat kidney. *Anticancer Drugs* 2002; 13: 1043-1054
97. Kohn S, Fradis M, Ben-David J, Zidan J, et al. Nephrotoxicity of combined treatment with cisplatin and gentamicin in the guinea pig: glomerular injury findings. *Ultrastruct Pathol* 2002; 26: 371-382
98. Launay-Vacher V, Rey JB, Isnard-Bagnis C, et al; European Society of Clinical Pharmacy Special Interest Group on Cancer Care. Prevention of cisplatin nephrotoxicity: state of the art and recommendations from the European Society of Clinical Pharmacy Special Interest Group on Cancer Care. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 61: 903-909

99. Santoso JT, Lucci JA 3rd, Coleman RL, et al. Saline, mannitol, and furosemide hydration in acute cisplatin nephrotoxicity: a randomized trial. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003; 52: 13-18
100. Dumas M, de Gislain C, d'Athis P, et al. Influence of hydration on ultrafilterable platinum kinetics and kidney function in patients treated with cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Chemother Pharmacol* 1990; 26: 278-282
101. Daley-Yates PT, McBrien DC. A study of the protective effect of chloride salts on cisplatin nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* 1985; 34: 2363-2369
102. Hanigan MH, Deng M, Zhang L, et al. Stress response inhibits the nephrotoxicity of cisplatin. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288: F125-132
103. Fu S, Kavanagh JJ, Hu W, et al. Clinical application of oxaliplatin in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 1717-1732
104. Piccart MJ, Lamb H, Vermorken JB. Current and future potential roles of the platinum drugs in the treatment of ovarian cancer. *Ann Oncol* 2001;12: 1195-203
105. Sarangarajan R, Cacini W. Early onset of cisplatin-induced nephrotoxicity in streptozotocin-diabetic rats treated with insulin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 95: 66-71
106. Viale M, Vannozzi MO, Pastrone I, et al. Reduction of cisplatin nephrotoxicity by procainamide: does the formation of a cisplatin-procainamide complex play a role? *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293: 829-836
107. Lynch ED, Gu R, Pierce C, et al. Reduction of acute cisplatin ototoxicity and nephrotoxicity in rats by oral administration of allopurinol and ebselen. *Hear Res* 2005; 201: 81-89
108. Nisar S, Feinfeld DA. N-acetylcysteine as salvage therapy in cisplatin nephrotoxicity. *Ren Fail* 2002; 24: 529-533
109. Capizzi RL. Amifostine reduces the incidence of cumulative nephrotoxicity from cisplatin: laboratory and clinical aspects. *Semin Oncol* 1999; 26(2 Suppl 7): 72-81
110. Kohda Y, Kawai Y, Iwamoto N, et al. Serum thymic factor, FTS, attenuates cisplatin nephrotoxicity by suppressing cisplatin-induced ERK activation. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 1408-1416
111. Schweyer S, Soruri A, Meschter O, et al. Cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines depends on MEK/ERK activation. *Br J Cancer* 2004; 91: 589-598

112. Deng J, Kohda Y, Chiao H, et al. Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. *Kidney Int* 2001; 60: 2118-2128
113. Nagothu KK, Bhatt R, Kaushal GP, et al. Fibrate prevents cisplatin-induced proximal tubule cell death. *Kidney Int* 2005; 68: 2680-2693
114. Willox JC, McAllister EJ, Sangster G, et al. Effects of magnesium supplementation in testicular cancer patients receiving cis-platin: a randomised trial. *Br J Cancer* 1986; 54: 19-23
115. Pacifici EH, McLeod LL, Sevanian A. Lipid hydroperoxide-induced peroxidation and turnover of endothelial cell phospholipids. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 297-309
116. Madesh M, Balasubramanian KA. Activation of liver mitochondrial phospholipase A2 by superoxide. *Arch Biochem Biophys* 1997; 15: 187-192
117. Sultan A, Sokolove PM. Free fatty acid effects on mitochondrial permeability: an overview. *Arch Biochem Biophys* 2001;386: 52-61
118. Furuno T, Kanno T, Arita K, Asami M, et al. Roles of long chain fatty acids and carnitine in mitochondrial membrane permeability transition. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 1037-1046
119. Sparagna GC, Hickson-Bick DL, Buja LM, McMillin JB. A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H2124-2132
120. Schönfeld P, Bohnensack R. Fatty acid-promoted mitochondrial permeability transition by membrane depolarization and binding to the ADP/ATP carrier. *FEBS Lett* 1997; 420:167-70
121. Pastorino JG, Snyder JW, Serroni A, Hoek JB, et al. Cyclosporin and carnitine prevent the anoxic death of cultured hepatocytes by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem.* 1993; 268: 13791-13798
122. Izgüt-Uysal VN, Ağaç A, Derin N. Effect of L-carnitine on carrageenan-induced inflammation in aged rats. *Gerontology* 2003; 49: 287-292
123. Calabrese V, Ravagna A, Colombrita C, Scapagnini G, et al. Acetylcarnitine induces heme oxygenase in rat astrocytes and protects against oxidative stress: involvement of the transcription factor Nrf2. *J Neurosci Res* 2005; 79: 509-521
124. Dhitavat S, Ortiz D, Rogers E et al. Folate, vitamin E, and acetyl-L-carnitine provide synergistic protection against oxidative stress resulting from exposure of human neuroblastoma cells to amyloid-beta. *Brain Res* 2005; 1061: 114-117



125. Di Cesare Mannelli L, Ghelardini C, et al. Protective effect of acetyl-L-carnitine on the apoptotic pathway of peripheral neuropathy. *Eur J Neurosci* 2007; 26: 820-827
126. Di Cesare Mannelli L, Ghelardini C, Calvani M, et al. Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine on neuropathic pain and apoptosis: a role for the nicotinic receptor. *J Neurosci Res* 2009; 87: 200-207
127. Zhu X, Sato EF, Wang Y, et al. Acetyl-L-carnitine suppresses apoptosis of thioredoxin 2-deficient DT40 cells. *Arch Biochem Biophys* 2008; 15; 478: 154-160
128. Ahmad S. L-carnitine in dialysis patients. *Semin Dial* 2000; 14: 209-217
129. Calvani M, Benatti P, Mancinelli A, D'Iddio S, et al. Carnitine replacement in end-stage renal disease and hemodialysis. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1033: 52-66
130. Ahmad S, Thomas Robertson H, Golper TA, et al. Multicenter trial of L-carnitine in maintenance hemodialysis patients. II. Clinical and biochemical effects. *Kidney Int.* 1990; 38: 912-918
131. Hathcock JN, Shao A. Risk assessment for carnitine. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2006; 46: 23-28
132. Rogalidou ME, Stiakaki E, Evangelidou A, et al. Childhood malignant diseases: which is the carnitine's role? *J Pediatr Hematol Oncol* 2007; 29: 291-292
133. Graziano F, Bisonni R, Catalano V, et al. Potential role of levocarnitine supplementation for the treatment of chemotherapy-induced fatigue in non-anaemic cancer patients. *Br J Cancer* 2002;86: 1854-1847
134. Cruciani RA, Dvorkin E, Homel P, et al. L-carnitine supplementation for the treatment of fatigue and depressed mood in cancer patients with carnitine deficiency: a preliminary analysis. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1033: 168-176
135. Cruciani RA, Dvorkin E, Homel P, et al. Safety, tolerability and symptom outcomes associated with L-carnitine supplementation in patients with cancer, fatigue, and carnitine deficiency: a phase I/II study. *J Pain Symptom Manage* 2006; 32: 551-559
136. Malik B, Stillman M. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Curr Pain Headache Rep* 2008;12: 165-174
137. Peluso G, Barbarisi A, Savica V, et al. Carnitine: an osmolyte that plays a metabolic role. *J Cell Biochem* 2000; 80: 1-10
138. Heuberger W, Berardi S, Jacky E, Pey P, et al. Increased urinary excretion of carnitine in patients treated with cisplatin. *Eur J Clin Pharmacol* 1998; 54: 503-508

139. Prieto JA, Andrade F, Aldámiz-Echevarría L, et al. Determination of free and total carnitine in plasma by an enzymatic reaction and spectrophotometric quantitation spectrophotometric determination of carnitine. *Clin Biochem* 2006; 39: 1022-1027
140. Hill HD, Straka JG. Protein determination using Bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents. *Anal Biochem* 1988; 170:203-208
141. Carbonneau MA, Peuchant E, Sess D, et al. Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. *Clin Chem* 1991; 37:1423-1429
142. Frankfurt OS. Detection of apoptotic cell leukemic and breast cancer cells with monoclonal antibody to single-stranded DNA. *Anticancer Res.* 1994; 14: 1861-1870
143. Nicholson, DW, Ali A, Thornberry NA, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 1995; 376, 37-43
144. Waynforth HB. *Experimental and the surgical technique in the rat.* 2nd ed. London: Academic Pres Inc. Ltd;1980