

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

**DENEYSEL HAYVAN MODELİNDE ASETİL
L–KARNİTİNİN, SİSPLATİNE BAĞLI
MİYELOSUPRESİF ETKİYİ DEĞİŞTİRİCİ
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Dr. DENİZ KIZMAZOĞLU

UZMANLIK TEZİ

İZMİR – 2011

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

**DENEYSEL HAYVAN MODELİNDE ASETİL
L-KARNİTİNİN, SİSPLATİNE BAĞLI MİYELOSUPRESİF
ETKİYİ DEĞİŞTİRİCİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. DENİZ (ÇAKIR) KIZMAZOĞLU

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
Doç. Dr. DİLEK İNCE**

TEŞEKKÜR

Çalışkanlığı, hekimliği, bilgisi ve kişiliği ile her zaman örnek aldığım değerli tez hocam Doç. Dr. Dilek İnce'ye, uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde emeği olan başta Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hale Ören olmak üzere tüm değerli anabilim dalı öğretim üyelerine, uzmanlara, çalışma arkadaşlarıma; tezimin hazırlanma sürecinde yardım ve desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Nur Olgun'a; Deney Hayvanları Laboratuvarı öğretim üyesi Prof. Dr. Osman Yılmaz'a ve araştırma görevlisi Efsun Kolatan'a; Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Safiye Aktaş ve Doç. Dr. Zekiye Altun'a; Uzm. Dr. Özlem Tüfekçi'ye teşekkür ederim. Ne olursa olsun bana destek olan olan, emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim aileme ve her zaman yanımda olacağına inandığım eşim Ceren Kızmazoğlu'na...

Dr. Deniz KIZMAZOĞLU

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Araştırma Görevlisi

İzmir 2011

İÇİNDEKİLER

İçindekiler	I-II
Tablolar Dizini	III
Şekiller Dizini	IV
Resimler Dizini	V
Kısaltmalar	VI-VII
Özet	1
Summary	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1 Sisplatin	7
2.1.1 Sisplatinin moleküler yapısı ve özellikleri	8
2.1.1.1 Sisplatinin hücre içine alınışı	9
2.1.1.2 Biyotransformasyon ve DNA platin bağlarının oluşması	9
2.1.2 Sisplatine ait farmakokinetik özellikler	10
2.1.3 Sisplatin toksisitesi	11
2.2 Miyelosupresyon	13
2.2.1 Anemi	13
2.2.2 Trombositopeni	14
2.2.3 Nötropeni	14
2.2.3.1 İlaçlara bağlı nötropeni	15
2.2.3.2 Kemoterapiye bağlı nötropeni	15
2.3 Karnitin	18
2.3.1 Karnitin ve asetil L-karnitin biyosentezi, fizyolojisi, metabolizması	18
2.3.2 Karnitin antioksidan, antiapoptotik ve immünmodülatör özellikleri	20
2.3.3 Karnitin eksikliği ve karnitin kullanım alanları	22
2.3.4 Karnitin ve kanser ilişkisi	23
2.3.5 Karnitin ve sisplatin	23
2.3.6 Karnitin ve miyelosupresyon	24

3.	GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1	Deney hayvanları	25
3.2	Deney hayvanları grupları	25
3.3	Sıçanlara anestezi uygulanması	25
3.4	Sıçanlardan kan örneklerinin alınması	25
3.5	Sıçanların tam kan sayımlarının ve periferik kan yaymalarının değerlendirilmesi	26
3.6	Sisplatin	26
3.7	İntraperitoneal sisplatin veya serum fizyolojik uygulamaları	27
3.8	Asetil L-karnitin	28
3.9	Subkutan asetil L-karnitin veya serum fizyolojik uygulamaları	28
3.10	Hidrasyon	28
3.11	Grupların oluşturulması ve çalışmanın yürütülmesi	29
3.12	Sıçanların feda edilmesi, femurların disseke edilmesi, kemik iliklerinin örneklenmesi	34
3.13	Kemik iliği örneklerinin değerlendirilmesi	36
3.13.1	Kemik iliği örneklerinde sellülaritenin değerlendirilmesi	36
3.13.2	Kemik iliği örneklerinde her üç serinin değerlendirilmesi	36
3.13.3	Kemik iliği örneklerinde kemoterapiye bağlı hücresel değişikliklerin değerlendirilmesi	36
3.14	Verilerin istatistiksel analizi	37
4.	BULGULAR	38
4.1	Grupların tam kan sayımları ve periferik yaymaları	38
4.2	Kemik iliği örneklerinin değerlendirme sonuçları	40
4.2.1	Kemik iliği örneklerinde sellülarite değerlendirme sonuçları	40
4.2.2	Kemik iliği örneklerinde her üç serinin değerlendirilmesinin sonuçları	43
4.2.3	Kemik iliği örneklerinde kemoterapiye bağlı hücresel değişikliklerin değerlendirilmesinin sonuçları	48
5.	TARTIŞMA	51
6.	SONUÇLAR	57
7.	KAYNAKLAR	58

TABLÖLAR DİZİNİ

No	Başlık	Sayfa
1	Sisplatinin kimyasal özellikleri	8
2	Sisplatine bağlı istenmeyen etkiler	12
3	Grup uygulamalarının özeti	29
4	Sıçanların ortalama $\pm$ standart sapma (SS) ağırlıkları	38
5	Sıçana ait normal tam kan sayımı değerleri ve sıçanların ortalama $\pm$ SS (en düşük-en yüksek) hemoglobin, kırmızı küre, beyaz küre, trombosit değerleri	39
6	Sıçana ait normal lökosit formül değerleri ve sıçanların ortalama $\pm$ SS (en düşük-en yüksek) nötrofil, lenfosit, monosit, eozinofil yüzdeleri	39
7	Sıçanların kemik iliği biyopsi örneklerinde sellülarite yüzdeleri	40
8	Kemik iliği biyopsi örneklerinde grupların ortalama kemik iliği sellülarite yüzdeleri	40
9	Sıçanların kemik iliği miyeloid, eritroid, lenfositler seri ve sellülarite yüzdeleri	43
10	Grupların ortalama miyeloid, lenfositler, eritroid seri yüzdeleri	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

No	Başlık	Sayfa
1	Sisplatinin moleküler yapısı	8
2	Sisplatinin DNA ile oluşturduğu bağlar	10
3	Sisplatine bağlı sık görülen toksisiteler	11
4	Karnitinin moleküler yapısı	18
5	Asetil L-karnitinin moleküler yapısı	18

RESİMLER DİZİNİ

No	Başlık	Sayfa
1	Bir sıçanın anestezi altında intraperitoneal sisplatin infüzyonu alması	27
2	Aynı gruptaki dört sıçanın perfüzör makineleri aracılığı ile intraperitoneal sisplatin infüzyonu almaları	28
3	Bir sıçana subkutan asetil L-karnitin uygulaması	29
4	Bir sıçanın feda edildikten sonra femurunun ortaya çıkartılması	34
5	Bir sıçanın feda edildikten sonra femurunun ayrılması	35
6	Feda edilen sıçanın femurları	35
7	Femurdan kemik iliğine ulaşılması	37
8	Kontrol grubunun kemik iliği doku incelemesi	41
9	ALCAR grubunun kemik iliği doku incelemesi	42
10	Sisplatin grubunun kemik iliği doku incelemesi	42
11	ALCAR + Sisplatin grubunun kemik iliği doku incelemesi	43
12	Grup 1'e (kontrol) ait bir sıçanın kemik iliği değerlendirmesi	46
13	Grup 2'ye (ALCAR) ait bir sıçanın kemik iliği değerlendirmesi	46
14	Grup 3'e (sisplatin grubu) ait bir sıçanın kemik iliği değerlendirmesi	47
15	Grup 4'e (ALCAR + Sisplatin grubu) ait bir sıçanın kemik iliği değerlendirmesi	47
16	Wright boyalı imprint preparatlarda kemoterapiye bağlı akut hücresel değişiklikler	49
17	Hematoksilen eozin boyalı kemik iliği biyopsi örnekleri	50

KISALTMALAR

ADH: Antidiüretik hormon

AK: Açıl karnitin

ALCAR: Asetil L-karnitin

ATP: Adenintrifosfat

ATPaz: Adenintrifosfataz

BUN: Blood urea nitrogen

CAR: Chemical Abstract Registry

CAT: Katalaz

CDDP: Cis-diamminedichloridoplatinum (sisplatin)

CoA: Koenzim A

CRF: Cancer related fatigue (kanser ilişkili yorgunluk)

CRP: C reaktif protein

CSF: Koloni uyarıcı faktör

CTR 1: Copper transporter 1

DDP: Diamminedichloridoplatinum

DEÜTFDHAL: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı

DNA: Deoksiribonükleik asit

EDTA: Etilen diamin tetraasetik asit

EPO: Eritropoetin

G-CSF: Granülosit koloni uyarıcı faktör

GM-CSF: Granülosit monosit koloni uyarıcı faktör

GSH: Glutatyon

H₂O: Su

HIV: Human immunodeficiency virus

HMG: Nonhistone chromosomal high-mobility group

hUBF: Human RNA polymerasa 1 transkripsiy upstream binding factor

KT: Kemoterapi

LCAR: L-karnitin

MDA: Malondialdehid

MMR: Mismatch repair
MNS: Mutlak nötrofil sayısı
NaCl: Sodyum klorür
NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz
RNA: Ribonükleik asit
ROS: Reaktif oksijen türleri
RT: Radyoterapi
SAM: S-adenozilmetiyonin
SF: Serum fizyolojik
SK: Serbest karnitin
SS: Standart sapma
TBP: TATA binding protein
TNF- α : Tümör nekrozis faktör alfa

ÖZET

DENEYSEL HAYVAN MODELİNDE ASETİL L-KARNİTİNİN, SİSPLATİNE BAĞLI MİYELOSUPRESİF ETKİYİ DEĞİŞTİRİCİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Sıçanlarda asetil L-karnitin uygulamasının sisplatine bağlı miyelosupresif etkiyi değiştirici rolü olup olmadığının değerlendirilmesi

Gereçler ve yöntem: Wistar Albino türü 28 adet dişi sıçanın oluşturduğu dört grup çalışmaya alındı. Oluşturulan gruplar şu şekildeydi: Grup 1: Kontrol (serum fizyolojik), Grup 2: Asetil L-karnitin (ALCAR), Grup 3: Sisplatin, Grup 4: ALCAR+Sisplatin uygulanan gruplardı. Başlangıçta sıçanlarda herhangi bir kemik iliği baskılanması olup olmadığını görmek üzere tüm sıçanlardan tam kan sayımı ve periferik yayma bakıldı. Tüm sıçanlara 3 gün boyunca (-2, -1 ve 0. günlerde) hidrasyon amaçlı serum fizyolojik (SF) 5 ml/kg/doz/gün intraperitoneal enjeksiyon şeklinde uygulandı. Yine üç gün boyunca (-2, -1 ve 0. günlerde) grup 2 ve grup 4'teki sıçanlara ALCAR 200 mg/kg/doz subkutan; grup 1 ve grup 3'teki sıçanlara eşit hacimde SF subkutan olarak uygulandı. Çalışmanın 3. gününde (0. gün) grup 3 ve grup 4'teki sıçanlara sisplatin 8 mg/kg/doz intraperitoneal bir saatlik infüzyonla verildi; grup 1 ve grup 2'deki sıçanlara eşit hacimde SF intraperitoneal bir saatlik infüzyonla verildi. Sisplatin uygulamasının 10. gününde tüm sıçanlar feda edildi ve femurları disseke edildi. Kemik iliği preparatları Wright boyası ile boyanıp sellülarite ve her üç serinin hücresel elemanları (miyeloid, lenfoid ve eritroid seri) değerlendirildi. Kemoterapiye bağlı akut hücresel değişiklikler Wright boyalı imprint preparatlarda değerlendirildi. Hücrelerde kontür ve boyut düzensizlikleri, sitoplazmik çıkıntılar, nükleer vakuolizasyon, nükleer membranda bozulma; şiddet ve etkilediği hücre sayısına göre değerlendirildi. Parafin bloktan hazırlanan kesitler hematoksilen eozin ile boyanıp ışık mikroskopunda sellülarite, kemik iliği elemanlarının kompozisyonları, matürasyon, fibrosis, nekroz, kanama, adipoz doku oranı yönünden değerlendirildi.

Bulgular: Çalışmanın başlangıcında tüm sıçanların tam kan sayımı ve periferik yaymaları normal bulundu. Tüm sıçan gruplarının kemik iliği inceleme sonuçları şu şekildeydi: Grup 1'de (Kontrol) sellülarite ortalama 93.57 ± 3.7 idi; matürasyon duraklaması yoktu. Kemik iliği hücreleri ışık mikroskobu ile değerlendirildiğinde miyeloid seri ortalama 40.85 ± 3.4 , lenfositler seri 47.42 ± 3.7 , eritroid seri 11.71 ± 1.7 oranında görüldü. Grup 2'de (ALCAR) sellülarite ortalama 95 ± 4 idi; matürasyon duraklaması yoktu. Kemik iliği hücreleri ışık

mikroskobu ile değerlendirildiğinde miyeloid seri ortalama $\%43.14 \pm 2.5$, lenfositler seri $\%45.42 \pm 2.5$, eritroid seri $\%11.42 \pm 1.5$ oranında görüldü. Grup 3'te (Sisplatin) sellülarite ortalama $\%61.66 \pm 5.1$ idi; matürasyon duraklaması vardı. Kemik iliği hücreleri ışık mikroskobu ile değerlendirildiğinde miyeloid seri ortalama $\%22.33 \pm 1.5$, lenfositler seri $\%26.66 \pm 3.2$, eritroid seri $\%50.66 \pm 4.1$ oranında görüldü. Grup 4'te (ALCAR+Sisplatin) sellülarite ortalama $\%71.42 \pm 4.7$ idi; sisplatin grubuna göre daha ılımlı bir matürasyon duraklaması vardı. Kemik iliği hücreleri ışık mikroskobu ile değerlendirildiğinde miyeloid seri ortalama $\%32.00 \pm 1.6$, lenfositler seri $\%36.28 \pm 2.6$, eritroid seri $\%31.71 \pm 3.3$ oranında görüldü. Kontrol ve ALCAR grupları ile karşılaştırıldığında sisplatin grubunda sell laritede, miyeloid ve lenfositler serilerde hücre düzeyinde düşme, eritroid seride rölatif yükseklik görüldü. ALCAR+Sisplatin grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bir miktar miyelosupresyon vardı. Sadece sisplatin alan grup ile karşılaştırıldığında sellülarite, miyeloid ve lenfositler serilerdeki hücre düzeyi anlamlı olarak yüksek saptandı.

Sonuç: Bu araştırmada sıçanlarda sisplatin verilerek oluşturulan deneysel miyelosupresyon modelinde, asetil L-karnitinin sisplatin ilişkili kemik iliği toksisitesini azalttığı gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Asetil L-karnitin, sisplatin, miyelosupresyon

SUMMARY

THE INVESTIGATION OF PROTECTIVE ROLE OF ACETYL L-CARNITINE ON CISPLATIN MYELOSUPPRESSION IN EXPERIMENTAL ANIMAL MODEL

Objective: To evaluate the protective role of acetyl L-carnitine on cisplatin-induced myelosuppression in rats

Materials and methods: Four groups of twenty-eight adult female Wistar albino rats were taken in this study. The groups were like these: Group 1: Control, group 2: Acetyl L-carnitine (ALCAR), group 3: Cisplatin, group 4: ALCAR+Cisplatin administered groups. Baseline complete blood count and peripheral blood smear of all the rats were obtained for confirming if there was any bone marrow suppression at the beginning of the study. All rats were given 5 ml/kg/dose intraperitoneal normal saline injection once a day for hydration over three days. Yet over three days (-2, -1 and 0. days) group 2 and group 4 were injected with acetyl L-carnitine (200 mg/kg) subcutaneously while group 1 and group 3 were injected with same volumes of normal saline. On the third day (0.day) of study, rats in group 3 and group 4 were given cisplatin 8 mg/kg/dose by intraperitoneal infusion in one hour; rats in group 1 and group 2 were given intraperitoneal infusion of normal saline in equal volume. All rats were sacrificed on the tenth day of cisplatin infusion and their femurs were dissected. Bone marrow samples were painted with Wright stain and all three sequences (myeloid, lymphoid and erythroid cells) were evaluated. Acute cellular changes related to chemotherapy evaluated on Wright stained imprints. Contour and size irregularities in cells, stoplasmic bulges, nuclear vacuolization, disruption on nuclear membrane; all of these were evaluated for severity and the number of effected cells. Sections of parafine blocs prepared with hematoxilen eosin stain were evaluated in light microscope for cellularity, bone marrow cell components, maturation, fibrosis, necrosis, hemorrhage, adipose tissue rate.

Results: All baseline complete blood count and peripheral blood smear of rats were normal at the beginning of the study. Bone marrow evaluation of all rat groups were like following: In group 1 (Control) mean cellularity was 93.57 ± 3.7 , there was no maturation halt. Bone marrow cells assessed on light microscope, myeloid colony 40.85 ± 3.4 , lymphoid colony 47.42 ± 3.7 , erythroid colony 11.71 ± 1.7 in this group. In group 2 (ALCAR) mean cellularity was 95 ± 4 , there was no maturation halt. Myeloid colony 43.14 ± 2.5 , lymphoid

colony 45.42 ± 2.5 , erythroid colony 11.42 ± 1.5 in this group. In group 3 (Cisplatin) mean cellularity was 61.66 ± 5.1 , there was maturation halt in this group. Myeloid colony 22.33 ± 1.5 , lymphoid colony 26.66 ± 3.2 , erythroid colony 50.66 ± 4.1 in this group. In group 4 (ALCAR+Cisplatin) mean cellularity was 71.42 ± 4.7 and maturation halt was more mild compared to cisplatin administered group. Myeloid colony 32 ± 1.6 , lymphoid colony 36.28 ± 2.6 , erythroid colony 31.71 ± 3.3 in group 4. As compared to control and ALCAR groups; cellularity, lymphoid and myeloid cell rates were lower in cisplatin administered group. As compared to control group, there was myelosuppression in ALCAR+cisplatin administered group. As compared to only cisplatin administered group cellularity, lymphoid and myeloid colonies were significantly high.

Conclusion : In this study, it was featured that the myelosuppressive effect of cisplatin reduced by using acetyl L-carnitine in experimental myelosuppression model created by cisplatin administrating.

Key words: Acetyl L-carnitine, cisplatin, myelosuppression

1.GİRİŞ VE AMAÇ:

Sisplatin, erişkin çağda görülen pek çok tümörde kullanıldığı gibi beyin tümörleri, nöroblastom, Wilms tümörü, hepatoblastom, germ hücreli tümörler, osteosarkom, nazofarinks karsinomu gibi pek çok çocukluk çağı tümörünün tedavisinde de kemoterapi protokollerinde yer almaktadır (1-3). Sisplatin uygulamasına bağlı doz sınırlayıcı yan etki olarak nefrotoksisite ve ototoksisite gelişebilmektedir. Özellikle klinikte önemli olan diğer yan etkileri miyelosupresyon, nörotoksisite ve kardiyotoksisitedir (4-8).

Sisplatinin sitotoksik etkilerini, nükleer DNA'ya bağlanıp transkripsiyon ve DNA replikasyonunu bozarak, çeşitli sinyal iletim yollarını aktive ederek gösterdiği düşünülmektedir (4,5,9,10). Sisplatin DNA'yı etkileyerek, mitokondri fonksiyonlarını bozmakta ve apoptoz sürecini başlatmaktadır (11). Hücre içine girdikten sonra sisplatin molekülü içindeki klor bağları su ile yer değiştirerek yüksek derecede reaktif elektrofilik araçlar oluşturur (12). Bu ajanlar hücrel DNA, RNA ve proteinlerle reaksiyona girer, protein sentezi azalır, mitokondri hasarı oluşur. Buna bağlı olarak hücreler apoptoza gider. Sisplatin ve diğer platin ajanları tiyol grupları ve makromoleküllerle reaksiyona girer (13). Tiyol grubu içeren pek çok potansiyel koruyucu ajanın sisplatin toksisitesinde etkinliği test edilmiştir (14). Sisplatin etkisi ile antioksidan savunma sisteminde önemli olan GSH ve NADPH'nin azaldığı; lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehidin (MDA) arttığı gösterilmiştir (15, 16). Toksik etkilerinin gelişmesinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu rol oynamaktadır (11).

Sisplatin toksisitesinin mekanizmaları göz önünde bulundurularak yan etkilerini azaltmak amacı ile pek çok strateji geliştirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda oksidatif hasarın önemli bir role sahip olduğu anlaşılmış ve antioksidan ajanlarla yapılan çalışmalar artmıştır (17,18).

L-karnitin (LCAR), hücrenin enerji üretimi için gerekli beta oksidasyona gidebilmek üzere serbest uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondri matriksine geçişinde gerekli olup, serbest uzun zincirli yağ asitlerinin açıl karnitinlere transformasyonunda kofaktör olarak rol alır. Asetillenmiş koenzim A (CoA) miktarını düzenleyen ve diğer hücrel metabolik olaylarda yer alan antioksidan özelliği kanıtlanmış vitamin benzeri bir bileşiktir (19-33). Antioksidan özelliğinin yanı sıra immünmodülatör ve antiinflamatuvar özellikleri de yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (34-37).

Asetil L-karnitin (ALCAR), L-karnitinin kısa zincirli bir ester türevi olup L-karnitine ait özelliklerin yanı sıra güçlü nöroprotektif ve antiapoptotik özellikler de taşımaktadır (20).

Sisplatin toksisitesi ile ilgili yapılan deneysel çalışmalarda; L-karnitin kullanımının sisplatine bağlı nefrotoksisite, nörotoksisite, kardiyotoksisite, hepatotoksisite ve ince barsak toksisitesini azalttığı gösterilmiştir (38-45).

Asetil L-karnitin, platinum bileşiklerinin oluşturduğu miyelosupresyonu azaltıcı etkisini gösteren tek bir çalışma vardır (46).

Daha nce Dokuz Eylül niversitesi ocuk Onkoloji bölümünde yapılan iki çalışmada asetil L-karnitin sisplatine bağlı nefrotoksisite, ototoksisite ve nörotoksisiteye karşı koruyucu rolünü olduğu gösterilmiştir (43, 47). Bu çalışmalardan yola çıkarak bu çalışmada, sıçanlarda asetil L-karnitin uygulamasının sisplatine bağlı miyelosupresif etkiyi değiştirici rolü olup olmadığının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 SİSPLATİN

Sisplatin, 1970'li yıllardan sonra kanser tedavisinde kullanılmaya başlanan en önemli antineoplastik ilaçlardan biridir. Beyin tümörleri, nöroblastom, Wilms tümörü, hepatoblastom, germ hücreli tümörler, osteosarkom, nazofarinks karsinomu gibi pek çok çocukluk çağı tümörünün tedavisinde yer almaktadır (1-3). Erişkin çağda görülen pek çok tümörde de kullanılır.

Sisplatinin biyolojik özellikleri, 1960'lı yıllarda biyofizikçi Barnett Rosenberg tarafından tesadüfen keşfedilmiştir. Elektromanyetik radyasyon uygulamasının bakteri ve memeli hücrelerinin bölünmesi üzerine etkisini araştıran Rosenberg, *Escherichia Coli* ile yaptığı deneylerde büyüme alanında platin elektrotları kullanmaktaydı. Platin elektrotlarının bulunduğu bu büyüme alanında bakterinin normalden 300 kat daha uzun olan filamanlara sahip olduğunu gözledi. Kısa sürede bu etkinin elektromanyetik alandan değil platin elektrotlarından 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 (9). İlk olarak germ hücreli tümörlerde kullanılmıştır (48).

2.1.1 SİSPLATİNİN MOLEKÜLER YAPISI ve ÖZELLİKLERİ

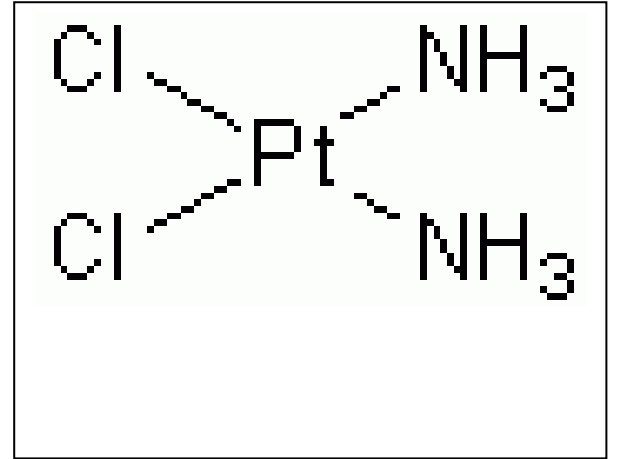
Sisplatin alkilleyici ajan olarak değerlendirilse de alkil grubu içermediğinden alkilleyici benzeri ajan olarak değerlendirmek daha doğrudur. Platin bazlıdır ve bu grupta geliştirilmiş ilk ilaçtır. Bu gruptaki diğer ilaçlar arasında karboplatin ve okzaliplatin sayılabilir. DDP, sisplatinyum, CDDP (*cis-diamminedichloridoplatinum*) sisplatin için kullanılan diğer isimler arasındadır (9,49).

Sisplatinin kimyasal formülü $PtCl_2(NH_3)_2$ dir ve moleküler ağırlığı 300.045 daltondur. CAR (Chemical Abstract Registry) numarası ise 15663-27-1'dir (49). Sisplatin yatay düzlemde cis pozisyonda, ortada platin atomu, etrafında iki klor ve iki amonyum atomunda oluşan inorganik bir platin kompleksidir. Bileşik cis ve trans olmak üzere iki izomere sahiptir. Sadece cis formu sitotoksik özelliğe sahiptir (Tablo 1, Şekil 1).

Tablo 1: Sisplatinin kimyasal özellikleri

Sistemik ad: <i>cis- diaminodikloroplatinum</i>
Moleküler formül: $Cl_2 H_6 N_2 Pt$
Moleküler ağırlık: 300.1
Renk: Koyu sarı (kristal katı) ve berrak (çözelti)
Yapı: Tetragonal (kare) düzlemsel
Erime noktası: 270°C

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, 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 (9,10).

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 (10,50).

2.1.1.2 Biyotransformasyon ve DNA- platin bağlarının oluşması

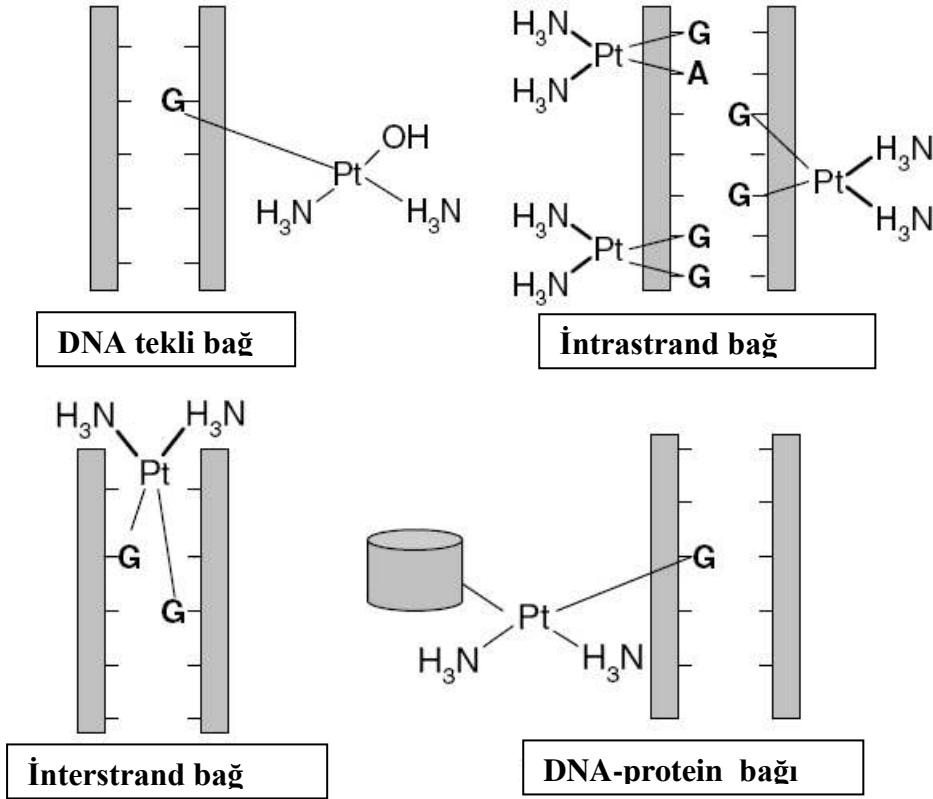
Sisplatin suda çözünebilen ve nükleofilik bir ajandır. Yapısındaki kovalent bağlar kolaylıkla su dahil başka moleküllere bağlanabilir. Vücudun sudan zengin ortamında, sisplatin molekülündeki klor atomu hidroksil grubu ile yer değiştirir ve bu sayede çok reaktif platin kompleksleri oluşur (5,10).

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 (4,5,50) (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 polymerase 1 transcription upstream binding factor*' (hUBF) ve transkripsiyonel faktör bağlanma proteini '*TATA binding protein*' (TBP) dir (5).

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 bağlanma sonucunda hücrede DNA tamir mekanizmaları devreye girseler de, tamir gerçekleştirilemediğinden hücre apoptoza gider (5, 10).

Şekil 2: Sisplatinin DNA ile oluşturduğu bağlar



2.1.2 SİSPLATİNE AİT FARMAKOKİNETİK ÖZELLİKLER

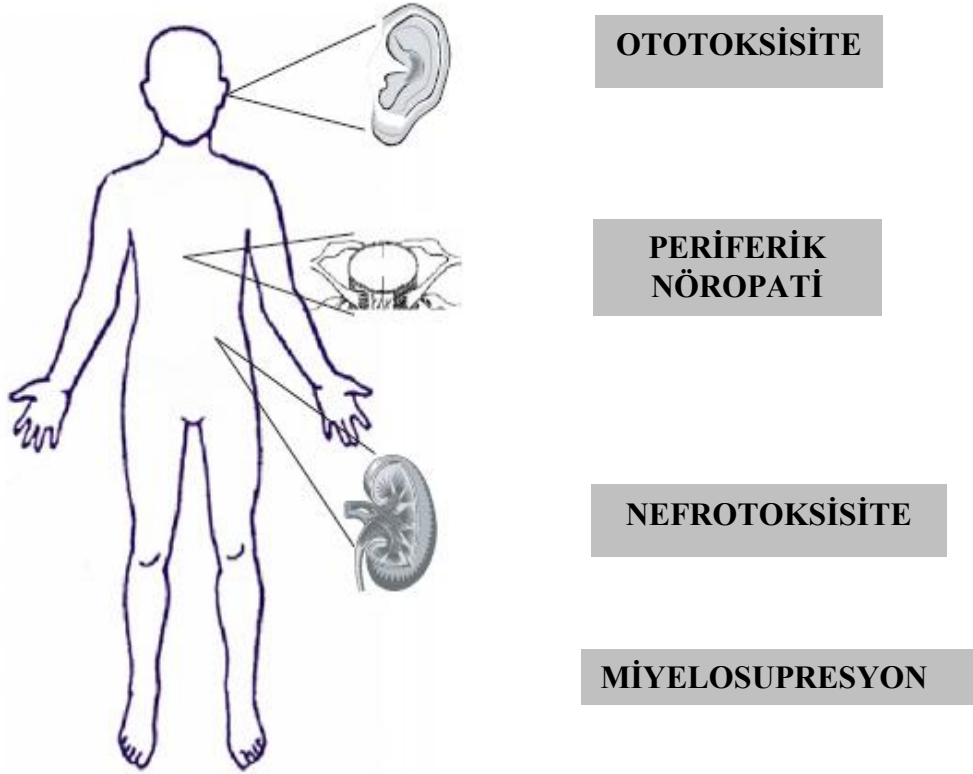
Sisplatinin oral emilimi kötüdür, mide barsak kanalından absorbe olmadığından sadece intravenöz veya intraperitoneal olarak kullanılır. İlacın %90'dan fazlası plazma proteinlerine bağlanır. Hidrofilik olduğundan vücut içinde dağılımı oldukça iyidir. En çok böbrek, karaciğer ve prostatta birikir. Anne sütüne geçer, asit, plevral sıvı gibi üçüncü boşluk sıvılarına geçer. Plasentayı geçer. Kan beyin bariyerinden geçişi iyi değildir. Eser miktarda geçişten bahsedilmiştir.

Enzimatik olmayan yollarla aktif ve inaktif metabolitlere dönüştürülür. Çoğunlukla böbreklerden idrar ile (%90) atılır. İlk altı saatte ilacın çok az bir kısmı böbreklerden atılır. Yirmidört saate kadar %25'i elimine olur ve beş güne kadar alınan dozun %43 kadarı idrarda saptanabilir. İlaç, hızlı enjeksiyon yerine infüzyon şeklinde verilirse, plazma yarılanma ömrü daha kısa ve elimine edilen ilaç miktarı daha çok olur. Platin dokularda 180 güne kadar gösterilebilir. Yarılanma ömrü 30 dakikadır, serbest komplekslerin ise beş günden uzundur (49,51,52).

2.1.3 SİSPLATİN TOKSİSİTESİ

Sisplatinin birçok sistem üzerinde toksik etkileri bulunmaktadır. Nefrotoksisite ve ototoksisite doz sınırlayıcı iken nörotoksisite, kardiyotoksisite ve miyelosupresyon gibi yan etkiler klinikte önemlidir (Şekil 3, Tablo 2). Dokuz Eylül Üniversitesi Çocuk Onkoloji bölümünde yapılan bir çalışmada, sisplatin uygulanan çocuk onkoloji hastalarında %56 oranında, sisplatin+karboplatin uygulanan hastalarda %47 oranında ototoksisite geliştiği saptanmıştır (47).

Şekil 3: Sisplatine bağlı sık görülen toksisiteler



Tablo 2: Sisplatine bağı istenmeyen etkiler (51,53).

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

*: Doz sınırlayıcı etki

Sisplatin neredeyse tüm hastalarda orta-ağır derecede bulantı ve kusmaya neden olur. Bulantı kusma ilaç infüzyonunu takiben bir saat içinde başlar ve 24 saate kadar devam edebilir. Yeterli intravenöz hidrasyon ve antiemetik kullanımı ile bu yan etkilerin azaldığı gözlenirse de iştahsızlık ve bulantı bir hafta süreyle devam edebilir.

Sisplatin verilen hastaların takibinde:

- Düzenli böbrek fonksiyon testlerinin yapılması
- Nörolojik muayene
- Kan magnezyum, sodyum, potasyum, fosfor, kalsiyum düzeylerinin yakın takibi
- Tam kan sayımı
- İştahın sorgulanması ve düzenli odyometrik testlerin uygulanması önerilmektedir (49,51).

2.2 MİYELOSUPRESYON

Miyelosupresyon, kemik iliği baskılanmasıdır. Kemoterapiye bağlı miyelosupresyon kemik iliğindeki her üç hücre serisini (miyeloid, eritroid ve megakaryositer) etkiler. Miyelosupresyona bağlı üç önemli durum klinik açıdan önemlidir. Bunlar: Anemi, trombositopeni ve nötropenidir.

2.2.1 ANEMİ

Eritrosit sayısındaki düşme ve hemoglobin konsantrasyonunda azalma sonucu ortaya çıkan anemi halsizliğe yol açarak yaşam kalitesini ve performansı düşürmektedir. Kemoterapi ile ilişkili aneminin ana tedavisi eritrosit süspansiyonu transfüzyonlarının uygulanmasıdır. Ancak bu tedavi uygulamaları da transfüzyonla ilişkili komplikasyonlara ve ciddi mali yüke neden olmaktadır. Rekombinan eritropoetin tedavisi ilk kez 1989 yılında böbrek yetmezlikli hastalarda kullanıma girmiş olan ve erişkin kanser hastalarında KT ile ilişkili aneminin tedavisinde etkinliği gösterilmiş alternatif bir tedavi yöntemidir (54). Ancak kanserli çocuklarda eritropoetin ile anemi tedavisinin, tedavi yanıtı ve genel sağkalım oranları üzerindeki etkisi henüz açıklık kazanmadığından rutin kullanıma girmemiştir.

2.2.2 TROMBOSİTOPENİ

Trombositopeni, azalmış trombosit üretimine bağlı trombosit sayısının 150000'in altına düşmesidir. Kanama ve transfüzyonla ilişkili komplikasyonlar nedeniyle ciddi morbidite ve hatta mortalite nedenidir. Bunun yanısıra önemli ekonomik maliyetlere neden olmaktadır. Trombositopeninin temel tedavisi trombosit transfüzyonları olup, alternatif tedavi stratejisi olarak kemoterapötik dozlarının azaltılması gündeme gelmektedir.

2.2.3 NÖTROPENİ

Nötrofiller kandaki lökositlerin büyük bir kısmını (>%70) oluşturmakta olup, konağın enfeksiyonlara karşı savunmasında önemli rol üstlenirler. Nötropeni, periferik kanda dolaşan nötrofillerin sayısında azalma olup, mutlak nötrofil sayısının (MNS) <1500 hücre/mm³ olmasıdır. Nötropeni azalmış nötrofil üretimi, artmış kullanım, nötrofillerin kompartmanlara kayması veya bu faktörlerin kombinasyonu sonucu ortaya çıkabilir. Nötropeninin şiddeti MNS 1000 – 1500 hücre /mm³ arasında ise hafif, 500-999 hücre/mm³ arasında orta ve <500 hücre/mm³ ise ağır nötropeni olarak değerlendirilir. Günümüzde kanser tedavisinde uygulanan yoğun kemoterapi rejimleri ağır mielosupresyona yol açmakta ve hastaların nötrofil, lenfosit ve monosit sayıları uzun süre çok düşük düzeylerde seyretmektedir (54). Nötropeni, enfeksiyon gelişimine neden olmakta, dolayısıyla tedavi gecikmesi ve maliyet artışına yol açmaktadır. Nötrofil sayısının <1000 /mm³ olması durumunda enfeksiyon riskinin arttığı, bu sayı <500 /mm³'e indiğinde risk artışının iyice belirginleştiği gösterilmiştir (55). Nötropenik enfeksiyonlar destek tedavi olanaklarının gelişiminden önce en önemli erken mortalite ve morbidite nedeni iken günümüzde erken dönemde ampirik antibiyotik tedavilerinin başlanması ve destek tedavi olanaklarının gelişmesi ile bu konuda büyük ilerleme kaydedilmiştir. Buna rağmen nötropenik ateş ve invaziv enfeksiyonlar kanser hastalarında halen yaşam kalitesini, mortalite oranlarını ve tedavi maliyetini etkilemektedir (56,57).

Nötropeni doğumdan itibaren olduğunda konjenital nötropeni ya da çeşitli faktörler nedeniyle sonradan geliştiğinde edinsel nötropeni olarak tanımlanır (58) .

2.2.3.1 İlaçlara bağlı nötropeni

İlaça bağlı nötropeni ilk olarak 1931 yılında analjezik piramidene bağlı olarak gelişen bir agranülositoz olgusunda bildirilmiştir. Son on yılda ilaçlara bağlı nötropeni oranında belirgin bir artış görülmüştür. Bu artış genel olarak tüm ilaçların daha yaygın kullanımının yanında kemoterapötik ajanların kullanımına da bağlıdır. Yaş arttıkça ilaçlara bağlı nötropeni oranında dramatik bir artış görülür, ilaca bağlı nötropeni olgularının %90'ı genç erişkin döneminden sonra daha ileriki yaşlarda görülmektedir (59). İlaça bağlı nötropeni gelişiminden immünite sorumlu gibi görünmektedir; bununla birlikte kemik iliğindeki öncüllerin direkt supresyonunun da rolü olduğu gösterilmiştir. İlaça bağlı immün nötropeni gelişiminde çok sayıda mekanizma rol oynayabilir. Bazı ilaçlar hapten olarak davranarak antikör oluşumuna yol açarlar. İlaçların hapten olarak davrandığı durumlarda, neden olan ilacın kesilmesi nötropenin bir hafta içinde düzelmesi ile karakterizedir. Hapten olarak davranabilen ilaçlardan en sık karşılaşılanlar arasında aminopirin, propiltiyourasil, penisilin ve altın bileşikler gelmektedir (60). Klozapin gibi bazı antipsikotik ilaçların nötrofil apoptozunu hızlandırdığı gösterilmiştir. Apoptoz artışında ilacın metabolizması sonucu ortaya çıkan stabil olmayan metabolitlerin nötrofillere bağlanarak intrasellüler glutatyon depolarını azaltması rol oynamaktadır. Bazı ilaçlar immün kompleks oluşumuna yol açarak nötrofillere bağlanırlar ve onları yok ederler. Bu mekanizmada ilacın sürekli verilmesi gerekli değildir. Başka bir mekanizma ise nötrofillerin kompleman aracılı lizisidir. Otoimmün nötropeniden farklı olarak antinötrofil antikörler, kompleman aracılı mekanizma ile nötrofilleri yok ederler. Beta laktam antibiyotiklerin yüksek dozda uygulanması, karbamazepin ve valproik asit gibi bazı antikonvülzan ilaçlar, kemik iliğindeki granülosit ve makrofaj öncüllerini inhibe ederler. Tiklopidin, sulfasalazin ve klorpromazinin de kemik iliğindeki miyeloid öncülleri suprese ettiği gösterilmiştir (60).

2.2.3.2 Kemoterapiye bağlı nötropeni

Sistemik kemoterapinin en sık karşılaşılan ve en ciddi komplikasyonlarından birisi kemik iliğinin baskılanmasıdır. Kemik iliği baskılanması sonucu ortaya çıkan nötropeni, infeksiyöz komplikasyonlar açısından önemli bir risk faktörü oluşturur. Kemik iliğini yaygın olarak tutan lösemi, multipl miyelom, lenfoma ve metastatik solid tümörler nötropeniye neden olabilirler ve sitotoksik KT sonrası uzayan nötropeni riski bu hastalarda daha da yüksektir. Kemoterapinin ilk kürlerinden sonra ortaya çıkan nötropenin ağırlığı, sonraki kürlerde ortaya çıkacak nötropenin derecesi hakkında fikir vermektedir.

Kemoterapiye bağılı nötropeni gelişiminde hasta, hastalık ve tedavi ile ilişkili faktörler rol oynar. Hasta ile ilişkili en önemli faktör yaştır (61). Yaşla ilişkili hücresel değişiklikler nedeniyle yaşlı hastalar KT'nin miyelosupresif etkilerine geçen hastalara göre daha duyarlıdırlar. Yapılan çalışmalarda yaşlı hastaların nötrofillerinin fagositoz yeteneklerinin daha az olduğu ve intrasellüler öldürme yeteneklerinde fonksiyon bozukluğu olduğu gösterilmiştir (62). Hasta ile ilişkili diğer risk faktörleri ise maln trisy n, tip 2 diyabet, kronik obstrüktif akciğer hastalığı veya böbrek disfonksiyonu gibi komorbid durum varlığıdır. Nötropeni sıklıkla kanser hastalarına verilen sistemik KT'nin miyeloablatif etkisi olarak karşımıza çıkmaktadır, nötropeni ve nötropeniye bağlı infeksiyöz komplikasyonlar sitotoksik kanser tedavisinin en sık doz sınırlayıcı yan etkisidir. N trophenin ağırlığı verilen KT rejiminin yoğunluğu ve ilaçların uygulama biçimleri ile ilişkilidir (63,64).

Hastalıkla ilişkili faktörler değerlendirildiğinde ise hematolojik maliynitelerde n trophenik komplikasyonların solid tümörlere göre daha yüksek olduğu bilinmektedir. Hematolojik maliynitelerde kemik iliği tutulumu varlığı ve kemoterapi doz yoğunluğunun yüksek oluşu bunda rol oynamaktadır. Ayrıca ileri evre hastalık ve kontrol edilemeyen maliyn hastalık da n trophenik komplikasyonlar açısından risk faktörüdür (64).

Radyoterapi (RT) ile eş zamanlı olarak veya tek başına KT alan tüm maliyniteli hastalar KT'ye sekonder nötropeni gelişimi açısından risklidirler. Hastalık ile ilişkili faktörler ise kemik tutulumu, kanser tipi ve önceki tedaviler sonrası anemi veya nötropeni öyküsüdür.

Tedavi ile ilişkili faktörler KT ile eş zamanlı veya önceden RT uygulanması öyküsü veya önceden yoğun KT verilmesidir. Bazı KT rejimlerinde tedaviyi alan hastaların %40-80'inde ağır nötropeni gelişme riski vardır. Kemoterapiye bağılı nötropeni kanser hastalarının tüm tedavisini etkileyen önemli bir yan etkidir (65). N trophenik ateşli kanser hastalarının en azından yarısında infeksiyonun klinik bulguları veya gizli infeksiyon olup, nötrofil sayısı $<100/\text{mm}^3$ olan hastaların en azından beşte birinde bakteriyemi gelişir (66). Nötrofil sayısı $<1000/\text{mm}^3$ 'e düştüğünde, n tropheninin ağırlığı ve sıklığı ile ilişkili olarak infeksiyonlara eğilim artar (67). Nötrofil sayısı $<500/\text{mm}^3$ 'e düştüğünde infeksiyon riski daha yüksektir, nötrofil sayısı $<100/\text{mm}^3$ 'e düştüğünde ise infeksiyon riski daha da artar. Bu hastalarda n tropheninin başlangıcından sonraki 1–4 hafta içinde ciddi infeksiyon gelişmektedir (57). Genel olarak nötrofil sayısı $<100/\text{mm}^3$ olan n trophenik ateşli hastaların %20'sinde bakteriyemi saptandığı bildirilmiştir (68). Nötrofil sayısındaki düşüklüğü ek olarak n tropheninin süresi de infeksiyon eğilimini belirlemede önemlidir. Ağır n tropheninin uzun süre devam etmesi (10 gün süre ile nötrofil sayısı $<500/\text{mm}^3$) infeksiyon gelişimi açısından

en önemli risk faktörüdür. Nötrofil sayısındaki değişikliklerin yanında, nötrofillerin fagositer fonksiyonları ve immün yanıtındaki diğer eksiklikler de nötropenik konakta enfeksiyona eğilimi artırır (66). Kemoterapi ile total lökosit mobilizasyonunun, nitroblue tetrazolium testine yanıtın, fagositozun ve nötrofillerin öldürme yeteneklerinin baskılandığı da gösterilmiştir (69, 70).

Nötropeninin tedavisinde rekombinant DNA teknolojisindeki hızlı gelişmeler ve hematopoezin daha iyi anlaşılması aktif hematopoetik büyüme faktörlerinin klinik kullanıma girmesine yol açmıştır. Ülkemizde klinik kullanımda yerini alan rekombinant büyüme faktörleri; granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF), granülosit monosit koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) ve eritropoetindir (EPO). Hematopoetik büyüme faktörleri ve interlökinler kord kanı, kemik iliği ve periferik kanda kök hücrelerin aktivitelerini düzenlerler. Periferik kan progenitör hücrelerini mobilize ederler. Nötrofil sayısını, kök hücreden olgun nötrofile geçiş süresini kısaltarak artırırlar. CSF'lerin klinik kullanıma girmesinden önce kemoterapiye bağlı nötropeniyi kontrol etmekte ilaç dozları azaltılmakta veya tedavi geciktirilmekteydi. G-CSF ve GM-CSF'lerin pediatrik kanser hastalarında kemoterapiye bağlı miyelosupresyonu önlemedeki etkileri birçok çalışmada gösterilmiştir (71-76). Fakat kanser tedavisinde G-CSF kullanımıyla ilgili çeşitli kısıtlılıklar vardır. Kanser tedavisine direkt etkileri yoktur ve bu nedenle survi ve tedavi başarısına katkı sağlamazlar. Sadece uygun kullanımda enfeksiyonla ilişkili morbiditeyi azaltırlar. Maliyetleri çok yüksektir (3).

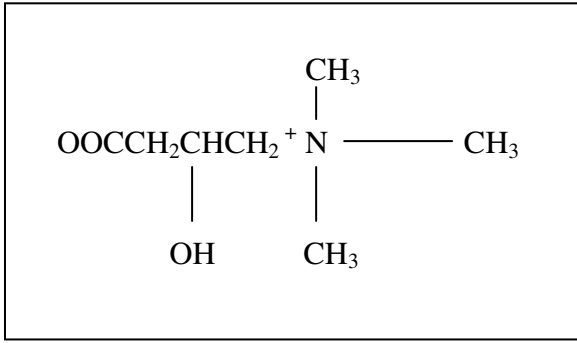
Bu kısıtlılıklar nedeniyle miyelosupresyonu azaltmada farklı maddelerin kullanımı gündeme gelmiştir. Son yıllarda özellikle antioksidan maddelerle yapılan araştırmalar artmıştır (17,18).

2.3 KARNİTİN

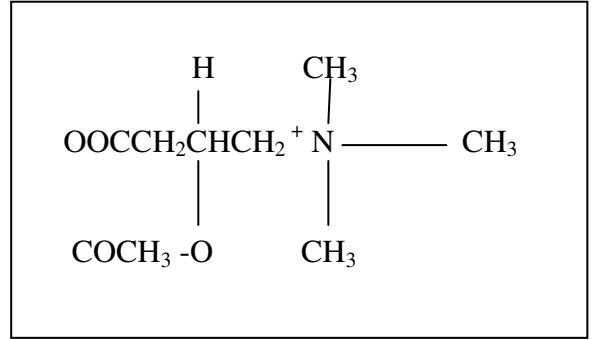
Karnitin hücrenin enerji üretimi için beta oksidasyona gidebilmek üzere uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondri matriksine geçişinde görev alan, asetillenmiş koenzim A (CoA) miktarını düzenleyen ve diğer hücrel metabolik olaylarda yer alan, antioksidan özelliği kanıtlanmış vitamin benzeri bir bileşiktir. Vücutta L izoformunda bulunan karnitinin L-karnitin (LCAR), asetil L-karnitin (ALCAR) ve propiyonil L-karnitin türevleri bulunmaktadır (Şekil 4, 5).

Şekil 4 : Karnitinin moleküler yapısı

(4-N-trimetilamonyum-3-hidroksibütirik asit)



Şekil 5: Asetil L-karnitinin moleküler yapısı



2.3.1 KARNİTİN ve ASETİL L-KARNİTİNİN BİYOSENTEZİ, FİZYOLOJİSİ, METABOLİZMASI

Karnitin (4-N-trimetilamonyum-3-hidroksibütirik asit) 20. yüzyıl 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 (19,20).

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 (19). İnsanda iskelet kası, kalp, karaciğer, böbrek ve beyinde karnitinin bir öncülü olan gamma-bütirobetain sentezlenir ancak sadece karaciğer böbrek ve beyinde bu madde karnitine dönüştürülebilir. Bu reaksiyon gamma-bütirobetain hidroksilaz enzimi tarafından gerçekleştirilir. Bu enzimin aktivitesi fetus ve yenidoğanlarda çok düşüktür (20). İnsanlarda

karnitinin %75'i diyetten sağlanır, geri kalan %25'i ise endojen olarak sentezlenir (21). Karnitin kaynakları çoğunlukla et, süt gibi hayvansal ürünler olmakla birlikte pişirilmeye ve hazırlamaya bağlı diyetteki karnitin içeriği değişebilir (19,20).

Dışardan alınan ve endojen olarak sentezlenen karnitin L izoformundadır (20). 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 (19). Plazmada ve dokularda serbest ya da yağ asitlerine bağlı açıl karnitin türevi olarak bulunabilir (21). 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. Karnitinin vücuttan atılımı esasen böbrekler yolu ile olur (19). Glomerüler filtrasyondan sonra karnitinin proksimal tübüllerde bulunan spesifik bir transport sistemi tarafından etkin şekilde (filtre edilen karnitin %90'ı) reabsorpsiyonu yapılır. Böbrek karnitin transportunun sodyum bağımlı olduğu ve açıl karnitin gibi karnitin türevleri ile engellenebildiği gösterilmiştir (22,23).

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 CoA miktarını artırır, potansiyel toksik asetil CoA metabolitlerini tamponlar ve asetil CoA/CoA oranını düzenler. Bu oran sitrik asit siklusu, glukoneogenez, üre siklusu ve yağ asit oksidasyonunda görev alan bir çok mitokondriyal enzim aktivitesinin düzenlenmesinde önemlidir (19,24,25).

Karnitin sayılan bu önemli görevlerinin yanı sıra bir çok hücre içi metabolik olayda görev alır. Bunlar;

- 1-Dallı zincirli aminoasit (valin, lösin, izolösin) 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 (25,26).

Asetil L-karnitin, L-karnitin kısa zincirli ester türevi olup vücutta en çok bulunan açıl karnitin türüdür. Bu karnitin türevi, L-karnitin fizyolojik özelliklerini taşımasının yanı 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 (21). Asetil L-karnitin, yağ asidi oksidasyonu sırasında asetil KoA'nın

mitokondriye geçişini hızlandırır, asetilkolin üretimine katkıda bulunur ve protein ve fosfolipid sentezini uyarır (20).

2.3.2 KARNİTİNİN ANTİOKSİDAN, ANTİAPOPTOTİK ve İMMÜNMODÜLATOR 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 CoA çok miktarda oksijenin tüketilip ATP üretildiği trikarboksilik asit siklüsüne girer. Böylelikle bu siklus sonunda H₂O'ya indirgenen oksijenin konsantrasyonu azalır ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu azalmış olur (27).

Hücre içi oksidatif hasar lipid peroksidasyonuna, fosfolipid yıkımına ve bu yolla serbest yağ asidi miktarının artışına neden olur (77,78). 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 (79,80). Bu uzun zincirli serbest yağ asitleri mitokondrilerdeki voltaj bağımlı kanallarla etkileşimde bulunup membran geçirgenliğinde değişikliğe ve sitokrom c salınımına ve apoptoza yol açarlar (80-83). Serbest yağ asitlerinin neden olduğu mitokondriyal disfonksiyonun karnitinin tarafından engellendiği gösterilmiştir (80). Farklı hücre tiplerinde yapılan çalışmalar karnitinin, hücre membran geçirgenliğindeki değişiklikleri, apoptozu, mitokondriyal disfonksiyonu ve lipid peroksidasyonunu güçlü bir şekilde engellediğini göstermiştir (80, 84, 85).

L-karnitin oksidatif stresi engeller, nitrik oksidi ve oksidatif hasardan korunmaya yönelik enzimlerin aktivitesini düzenler, birçok mitokondriyal toksik ajana karşı koruyucu etki sağlar (28-30). Süksinat dehidrogenaz gibi mitokondriyal enzimlerin yanı sıra katalaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde koruyucu rol oynar (31). L-karnitin bir antioksidan olarak antioksidatif savunma mekanizmasındaki üç enzimin -glutasyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz- peroksidatif hasardan korunmasında ve esasen serbest radikallerin neden olduğu yaşla meydana gelen değişikliklerin normal hale getirilmesinde önemli bir ajandır (32). Bir çalışmada yaşlı sıçanlara verilen L-karnitinin güçlü bir antioksidan ve serbest radikal yakalayıcısı olduğu; askorbik asit, glutasyon ve E vitamini gibi antioksidanların etkisini arttırdığı ve nöronlarda peroksidatif hasarın göstergesi olan lipofuksin birikimini azalttığı gösterilmiştir (26). L-karnitinin propiyonil ester türü olan

propiyonil L-karnitin ile yapılan başka bir çalışmada ise bu maddenin etkin bir antioksidan olduğu süperoksit çöçülüğü yaptığı ve DNA'yı kısmen koruyucu etkisi olduğu ortaya çıkarılmıştır (33). Yakın zamanda ülkemizden bildirilen bir çalışmada L-karnitin, α -tokoferol ve troloks gibi referans antioksidanlarla karşılaştırılmış, lipid peroksidasyonunu önleyici etkisi ve antiradikal özellikleri bir kez daha kanıtlanmıştır (32).

Son zamanlardaki çalışmalar L-karnitinin antioksidatif özellikleri yanında immünmodulator özellikleri de olduğunu göstermektedir. Karnitin tedavisinin yaşlı inflamatuvar hücrelerde kemotaktik ve fagositik aktiviteleri iyileştirdiği, astrositleri oksidatif stres ve inflamatuvar sitokin maruziyetinden koruduğu ve vitamin E ve folatla birlikte Alzheimer hastalığını önlemede faydalı olabileceği bildirilmiştir (86-88).

Son dönemlerde karnitinin antiinflamatuvar etkinliğini kanıtlamaya yönelik birçok çalışma yapılmıştır. L-karnitinin kardiyoprotektif etkisinde inflamatuvar sitokinlerin rolünün çalışıldığı bir hayvan deneyinde L-karnitin uygulamasının interlökin-1 β , interlökin 6 ve TNF- α seviyelerini önemli oranda azaltarak inflamatuvar süreci zayıflattığı gösterilmiştir (34). Başka bir çalışmada da sıçanlarda oluşturulan artrit modellerinde L-karnitin ile beraber α -lipoik asit uygulamasının TNF- α seviyelerini anlamlı oranda düşürdüğü gösterilmiştir (35). 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 (36). 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- α ve nitrik oksit gibi inflamatuvar sitokinleri artırarak karboplatin nefropatisini daha da arttırdığı gösterilmiştir (37).

Karnitin ve türevlerinin 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 (87). Son yıllardaki çalışmalarda asetil L-karnitinin apoptotik yollarda kaspaz 3 ve 9'u engelleyerek apoptozu etkin bir şekilde önlediği gösterilmiştir (89-91).

2.3.3 KARNİTİN EKSİKLİĞİ VE KARNİTİNİN KULLANIM ALANLARI

Karnitin her ne kadar diyetle alınabiliyor ve endojen olarak sentezleniyor olsa da primer ve sekonder karnitin eksiklikleri görülebilir (19). Prematüreler 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. Primer karnitin eksikliği ile nadir karşılaşırken; sekonder karnitin eksikliği diyaliz, kronik böbrek yetmezliği, intestinal rezeksiyon, ağır infeksiyonlar, karaciğer hastalıkları ve kanser ile ilişkili gelişebilir (19). Her ne kadar karnitin %99 oranında intrasellüler bulunsun 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, valproik asit tedavisi, diyabet, kalp yetmezliği, Alzheimer hastalığıdır (19, 20).

Anoreksi, kronik yorgunluk, kardiyovasküler hastalık, difteri, hipoglisemi, erkek infertilitesi, musküler miyopati, Rett sendromu gibi durumlarda ekzojen karnitin tedavisinin faydası gösterilmiştir. Karnitin tedavisinin hemodiyaliz ve kanser hastalarında kronik inflamasyon ve oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir (92, 93). Ayrıca preterm infantlar, diyaliz hastaları ve HIV pozitif bireylerde de L-karnitin eksikliği görülebileceğinden bu grup hastalar L-karnitin tedavisinden fayda görebilirler (19,20). 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 (94). Bir başka çalışmada, hemodiyaliz uygulanan son dönem böbrek yetmezliği hastalarında, L-karnitin tedavisinin solunum fonksiyonları üzerine kronik etkileri araştırılmıştır. L-karnitin kullanımı ile serum düzeylerinde anlamlı yükselme ve solunum fonksiyon testlerinde düzelme saptanmıştır. L-karnitin çocuklarda hemodiyaliz sırasında gelişen subklinik bronkospazmı önleyebileceği düşünülmüştür (95).

ALCAR mitokondri fonksiyonlarında önemli rol oynayan nöroprotektif bir ajandır. Asetil L-karnitin nöroprotektif özelliklerinden dolayı nörolojik bozukluklarda kullanımının faydalı olabileceği, birçok çalışmada desteklenmiştir (96). 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 antihiperalejik etkisi olduğu gösterilmiştir (20).

Karnitinin piyasada satılan L-karnitin, asetil L-karnitin ve propiyonil L-karnitin formları mevcuttur (97). Günlük oral doz günde iki ya da üç kez doz başına 1-2 gram olmak üzere toplam 2-6 gr/gün olarak önerilmektedir. Çok az yan etki bildirilmekle beraber bu yan etkiler; mide bulantısı, kusma, abdominal kramp ve diyare gibi gastrointestinal etkilerdir (19).

2.3.4 KARNİTİN VE KANSER İLİŞKİSİ

Kanserli hastalarında yetersiz alım ya da kaşeksinin yanı sıra tedavi ve neoplastik süreçten kaynaklanan metabolik değişikliklerden dolayı karnitin eksikliği görülebilir (98). 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 (99-101).

Kemoterapiye bağlı periferik nörotoksisitede karnitin kullanımı ile ilgili umut verici çalışmalar mevcuttur (102). Hayvan çalışmalarında antrasiklinlerin neden olduğu akut ve geç kardiyomiyopatinin karnitin tedavisi ile anlamlı oranda önlendiği gösterilmiştir (103).

2.3.5 KARNİTİN VE SİSPLATİN

Sisplatin toksisitesinde L-karnitin ve türevlerinin kullanımı ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Bazı hayvan çalışmalarında karnitin kullanımının sisplatine bağlı hepatotoksisite, kardiyotoksisite, nörotoksisite ve ince barsak toksisitesini azalttığı gösterilmiştir (38-41).

Sisplatin nefrotoksisitesinde karnitin kullanımı ile ilgili az sayıda çalışma vardır (16, 43, 85, 104). 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 (105). 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 nefrotoksisitede 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 (16, 85).

2.3.6 KARNİTİN VE MİYELOSUPRESYON

Kemoterapötiklere bağlı miyelosupresyon özellikle klinikte önemli bir yan etkidir. Yapılan bir çalışmada platinum bileşiklerinden karboplatine bağlı miyelosupresyonun asetil L-karnitin uygulaması ile azaltıldığı gösterilmiştir. LCAR, karboplatinin indüklediği apoptozu önler, diğer bir etki mekanizması antioksidan ve serbest radikal bağlayıcı özelliği aracılığıyla. Mitokondrial süperoksit dismutazı aktive ederek antikanser hücresel hasarı önleyebilir. (105-108). L-karnitin, CD4+ ve CD8+'ün apoptotik düzeylerini azaltır (109-111).

Yapılan bir çalışmada vitamin E ve L-karnitin antioksidan, antiinflamatuvar ve sitoprotektif etkilerle hayvan modelinde radyoterapi ile oluşturulan miyelosupresyonu azalttığı gösterilmiştir (112).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Deney hayvanları:

Her biri altı-sekiz haftalık, ortalama ağırlıkları 200 – 250 gram olan, iç besleme ile yetiştirilen, 28 adet Wistar türü Albino suşu dişi sıçan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından (DEÜTFDHAL) elde edildi. Sıçanlar çalışma süresince oda ısısında (20 ± 2 °C) ve 12'şer saatlik aydınlık / karanlık ortamında tutulup, standart pelet sıçan yemi ile beslendi, suya serbestçe ulaşabilmeleri sağlandı. Çalışmaya başlamadan önce sıçanlar bir hafta süreyle bu ortamda izlendi ve ortama uyum sağlamaları gözlemlendi. Sıçanların çalışmadan çıkarılma gerekçeleri; sepsis, lokal infeksiyon, katabolizmada artış ve kanıtlanmış travma olarak belirlendi.

Çalışma için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 05.03.2010 tarih ve 66 sayılı etik kurul onayı alındı.

3.2 Deney hayvanı grupları:

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

- Grup 1** (n: 7) : Serum fizyolojik uygulanan sıçan grubu
- Grup 2** (n: 7) : Asetil L-karnitin uygulanan sıçan grubu
- Grup 3** (n: 7) : Sisplatin uygulanan sıçan grubu
- Grup 4** (n: 7) : Asetil L-karnitin verildikten sonra sisplatin uygulanan sıçan grubu

3.3 Sıçanlara anestezi uygulanması:

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

Girişimsel işlemler tamamlandıktan sonra sıçanlar yan yatırılarak uyanmaları yakın gözlemlendi.

3.4 Sıçanlardan kan örneklerinin alınması:

Çalışmanın başlangıcında (-2. gün), ketamin hidroklorid (40 mg/kg) ve ksilazin hidroklorid (5 mg/kg) intraperitoneal uygulanarak anestezi sağlandıktan sonra sıçanların kuyrukları ılık su ile ıslatılarak tüm sıçanların kuyruk veninden (vena caudalis) kan alınarak (yaklaşık 0.5-1 ml) tam kan sayımı ve periferik yayma yapıldı.

3.5 Sıçanların tam kan sayımlarının ve periferik kan yaymaların değerlendirilmesi:

Sıçanlardan özel EDTA'lı tüplere (0.5 cc kan ile tam kan sayımı yapılabilen) alınan kanlardan özel bir laboratuvarında Beckman Coulter LH 750 Analyzer cihazı ile tam kan sayımı çalıştırıldı.

Her bir sıçan için, hemogram alınırken bir damla kan önceden alkolle iyice temizlenmiş olan lama damlatıldı. Başka bir temiz lamla 45 derece açı oluşturacak şekilde ve kan hücrelerinin ezilmemesine özen gösterilerek ince bir yayma yapıldı. Yayma havada iyice kurutulduktan sonra periferik yaymalar hematoloji laboratuvarında Wright boyası ile boyandı. Boyama şu şekilde yapıldı: Kurutulan preparatlar bir dakika metil alkolle tespit edildi. Yayma havada kurutulduktan sonra üzerine lamı örtecek kadar Wright boyası döküldü. Bu şekilde 2.5 dakika bekletildi. Süre sonunda önceden hazırlanmış tampondan boyanın 1.5 misli miktarda boyanın üzerine ilave edildi. 12 dakika beklenerek boya ve tamponun birbirine homojen dağılması için hafifçe üflendi. Süre sonunda da musluk suyu ile yıkanıp kurutuldu. Boyalı preparatlar ışık mikroskobunda 100'lük büyütmede toplam 100 beyaz küre sayılarak; parçalı, lenfosit, monosit, eozinofil olarak formüle edildi. Eritrosit morfolojisi ve trombositlerin kümeli olup olmadıkları da değerlendirildi.

3.6 Sisplatin

Çalışmada sisplatin (Cisplatin-Ebewe®, flakon 50 mg/100 ml, Liba İlaç, İstanbul) kullanıldı. İngilizce literatürde deneysel sıçan modelinde sisplatinin miyelosupresif etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla sisplatinin sıçanlarda miyelosupresif etki oluşturacak dozu araştırmamız öncesinde yaptığımız pilot çalışmalarla belirlendi. Literatürde sıçanlarda oluşturulmuş sisplatin nefrotoksisite ve ototoksisite modellerinde 10, 13, 16 mg/kg dozlar ile toksik etki oluşturulduğu görülmüştür (13,15,114,115). Bölümümüzde sisplatin nefrotoksisitesi, sisplatin ototoksisitesi ve nörotoksisitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda 16 mg/kg/doz sisplatin uygulanmıştı (43,113). Ancak bu nefrotoksisite ve ototoksisite çalışmalarında sıçanlar sadece 3 gün yaşatılmış. Bizim oluşturmayı planladığımız miyelotoksisite modelinde, hem miyelosupresif etkiyi oluşturmak hem de sıçanları 10 gün yaşatmak üzere dozu belirlemek için ön çalışmalar yapıldı.

İlk yapılan ön çalışmada tek bir sıçana 5 mg/kg dozda sisplatin bir saatte intraperitoneal infüzyonla verildi, on gün sonra sakrifiye edildi, femuru disseke edildi, elde edilen kemik iliği örneğinde hafif derecede miyelosupresyon görüldü. Bunun üzerine ikinci bir ön çalışma yapıldı; iki adet sıçana 8 mg/kg ve 10 mg/kg dozlarında bir saatlik sisplatin infüzyonu uygulandı. 10 mg/kg'dan sisplatin alan sıçan izlemin 7. gününde ağır diyare ve dehidratasyon

nedeniyle öldü. Diğer sıçan 10. günde sakrifiye edildi, kemik iliğinde orta derecede miyelosupresyon görüldü. Sisplatin miyelosupresyonu oluşturulması için sıçanlara verilecek doz, literatür incelemesi ve ön çalışmalar sonrası 0.5 mg/mL konsantrasyonunda 8 mg/kg/doz olarak belirlendi (116,117).

3.7 İntraperitoneal sisplatin veya serum fizyolojik uygulamaları

Sıçanlar ketamin hidroklorid ve ksilazin hidroklorid ile anesteziye alındıktan sonra steril şartlarda 22 nolu damaryolu branülü ile peritona girildi ve sisplatin (0.5 mg/ml konsantrasyonda 8 mg/kg/doz) ışıktan korunarak , perfüzör 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 1,2). Grup 3'teki 6 numaralı sıçan 0. günde sisplatin infüzyonu sırasında anestezi altındayken öldü, çalışmaya alınamadı.

Resim 1: Bir sıçana anestezi altında intraperitoneal sisplatin infüzyonu uygulanması: Sisplatin içeren solüsyon 50 cc'lik enjektörlerde hazırlandı, enjektörün dışı alüminyum folyo ile kaplanarak ışıktan korundu. Perfüzör kullanılarak 60 dakikalık infüzyonla sisplatin intraperitoneal uygulandı. İntraperitoneal girişim için 22 numaralı sarı branül kullanıldı. İnfüzyon setiyle bağlantı üçlü musluk kullanılarak sağlandı.



Resim 2: Aynı gruptaki dört sıçanın perfüzör makineleri aracılığı ile intraperitoneal sisplatin infüzyonu almaları



3.8 Asetil L-karnitin

Çalışmada asetil L-karnitin (Sigma®) kullanıldı. Toz halinde olan asetil L-karnitin serum fizyolojik içinde çözülerek 100 mg/ml konsantrasyonda solüsyon hazırlandı.

3.9 Subkutan asetil L-karnitin veya serum fizyolojik uygulamaları

Sıçanlara asetil L-karnitin (100 mg/ml konsantrasyonda 200 mg/kg/doz) subkutan olarak uygulandı (Resim 3). Plasebo olarak eşit hacimde serum fizyolojik solüsyonu yine subkutan verildi.

3.10 Hidrasyon

Çalışma süresince suya serbestçe ulaşmaları sağlanan sıçanlara, çalışmanın -2, -1 ve 0. günlerinde 5 ml/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal enjeksiyon şeklinde üç gün boyunca uygulandı.

Resim 3 : Bir sıçana subkutan asetil L-karnitin uygulaması



3.11 Grupların oluşturulması ve çalışmanın yürütülmesi

Çalışmanın başlangıcında tüm sıçanların venöz kan örnekleri alındı ve periferik yaymaları yapıldı. Sıçanlar rastgele seçilerek her biri yedi sıçandan oluşan dört gruba ayrıldı. (Tablo 3).

Tablo 3: Grup uygulamalarının özeti

GRUPLAR	-2. gün	-1. gün	0. gün
Grup 1 (Kontrol)	hidrasyon SF sc	hidrasyon SF sc	hidrasyon SF sc SF i.p
Grup 2 (ALCAR)	hidrasyon ALCAR sc	hidrasyon ALCAR sc	hidrasyon ALCAR sc SF i.p
Grup 3 (Sisplatin)	hidrasyon SF sc	hidrasyon SF sc	hidrasyon SF sc sisplatin i.p
Grup 4 (ALCAR+Sisplatin)	hidrasyon ALCAR sc	hidrasyon ALCAR sc	hidrasyon ALCAR sc sisplatin i.p

GRUP 1 (Serum fizyolojik uygulanan kontrol grubu):

Çalışmanın -2. günü:

Tam kan sayımı için venöz kan örnekleri alındı ve periferik yaymalar yapıldı.

- **0. DAKİKADA** : 5 ml/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal enjeksiyon şeklinde uygulandı.
- **30. DAKİKADA** : Grup 2 ve 4'teki asetil L-karnitin uygulaması ile eşdeğer hacimde serum fizyolojik subkutan enjeksiyon şeklinde uygulandı.

Çalışmanın -1. günü:

- **0. DAKİKADA** : 5 ml/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal enjeksiyon şeklinde uygulandı.
- **30. DAKİKADA** : Grup 2 ve 4'teki asetil L-karnitin uygulaması ile eşdeğer hacimde serum fizyolojik subkutan enjeksiyon şeklinde uygulandı.

Çalışmanın 0. günü:

- **0. DAKİKADA** : 5 ml/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal enjeksiyon şeklinde uygulandı.
- **30. DAKİKADA** : Grup 2 ve 4'teki asetil L-karnitin uygulaması ile eşdeğer hacimde serum fizyolojik subkutan enjeksiyon şeklinde uygulandı.
- **60. DAKİKADA** : Grup 3 ve 4'teki sisplatin uygulaması ile eşdeğer hacimde serum fizyolojik bir saatlik intraperitoneal infüzyonla uygulandı.

Çalışmanın 10. günü:

Anestezi altında abdominal venden kan alınarak hipovolemi yaratıldı. Bu yöntem ile sıçanlar feda edilerek femurları disseke edildi.

GRUP 2 (Asetil L-karnitin uygulanan sıçan grubu):

Çalışmanın -2. günü:

Tam kan sayımı için venöz kan örnekleri alındı ve periferik yaymalar yapıldı.

- **0. DAKİKADA** : 5 ml/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal enjeksiyon şeklinde uygulandı.
- **30. DAKİKADA** : Asetil L-karnitin serum fizyolojik içinde çözülerek 100 mg/ml yoğunlukta solüsyon hazırlandı ve asetil L-karnitin 200 mg/kg/doz subkutan enjeksiyon şeklinde uygulandı.

Çalışmanın -1. günü:

- **0. DAKİKADA** : 5 ml/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal enjeksiyon şeklinde uygulandı.
- **30. DAKİKADA** : Asetil L-karnitin serum fizyolojik içinde çözülerek 100 mg/ml yoğunlukta solüsyon hazırlandı ve asetil L-karnitin 200 mg/kg/doz subkutan enjeksiyon şeklinde uygulandı.

Çalışmanın 0. günü:

- **0. DAKİKADA** : 5 ml/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal enjeksiyon şeklinde uygulandı.
- **30. DAKİKADA** : Asetil L-karnitin serum fizyolojik içinde çözülerek 100 mg/ml yoğunlukta solüsyon hazırlandı ve asetil L-karnitin 200 mg/kg/doz subkutan enjeksiyon şeklinde uygulandı.
- **60. DAKİKADA** : Grup 3 ve 4'teki sisplatin uygulaması ile eşdeğer hacimde serum fizyolojik bir saatlik intraperitoneal infüzyonla uygulandı.

Çalışmanın 10. günü:

Anestezi altında abdominal venden kan alınarak hipovolemi yaratıldı. Bu yöntem ile sıçanlar feda edilerek femurları disseke edildi.

GRUP 3 (Sisplatin uygulanan sıçan grubu):

Çalışmanın -2. günü:

Tam kan sayımı için venöz kan örnekleri alındı ve periferik yaymalar yapıldı.

- **0. DAKİKADA** : 5 ml/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal enjeksiyon şeklinde uygulandı.
- **30. DAKİKADA** : Grup 2 ve 4'teki asetil L-karnitin uygulaması ile eşdeğer hacimde serum fizyolojik subkutan enjeksiyon şeklinde uygulandı.

Çalışmanın -1. günü:

- **0. DAKİKADA** : 5 ml/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal enjeksiyon şeklinde uygulandı.
- **30. DAKİKADA** : Grup 2 ve 4'teki asetil L-karnitin uygulaması ile eşdeğer hacimde serum fizyolojik subkutan enjeksiyon şeklinde uygulandı.

Çalışmanın 0. günü:

- **0. DAKİKADA** : 5 ml/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal enjeksiyon şeklinde uygulandı.
- **30. DAKİKADA** : Grup 2 ve 4'teki asetil L-karnitin uygulaması ile eşdeğer hacimde serum fizyolojik subkutan enjeksiyon şeklinde uygulandı.
- **60. DAKİKADA** : Sisplatin solüsyonu 0,5 mg/ml konsantrasyonda ve 8 mg/kg/doz bir saatlik intraperitoneal infüzyonla ışıktan korunarak uygulandı.

Çalışmanın 10. günü:

Anestezi altında abdominal venden kan alınarak hipovolemi yaratıldı. Bu yöntem ile sıçanlar feda edilerek femurları disseke edildi.

GRUP 4 (Üç gün asetil L-karnitin verildikten sonra sisplatin uygulanan sıçan grubu):

Çalışmanın -2. günü:

Tam kan sayımı için venöz kan örnekleri alındı ve periferik yaymalar yapıldı.

- **0. DAKİKADA** : 5 ml/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal enjeksiyon şeklinde uygulandı.
- **30. DAKİKADA** : Asetil L-karnitin serum fizyolojik içinde çözülerek 100 mg/ml yoğunlukta solüsyon hazırlandı ve asetil L-karnitin 200 mg/kg/doz subkutan enjeksiyon şeklinde uygulandı.

Çalışmanın -1. günü:

- **0. DAKİKADA** : 5 ml/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal enjeksiyon şeklinde uygulandı.
- **30. DAKİKADA** : Asetil L-karnitin serum fizyolojik içinde çözülerek 100 mg/ml yoğunlukta solüsyon hazırlandı ve asetil L-karnitin 200 mg/kg/doz subkutan enjeksiyon şeklinde uygulandı.

Çalışmanın 0. günü:

- **0. DAKİKADA** : 5 ml/kg/doz serum fizyolojik günde bir defa intraperitoneal enjeksiyon şeklinde uygulandı.
- **30. DAKİKADA** : Asetil L-karnitin serum fizyolojik içinde çözülerek 100 mg/ml yoğunlukta solüsyon hazırlandı ve asetil L-karnitin 200 mg/kg/doz subkutan enjeksiyon şeklinde uygulandı.
- **60. DAKİKADA** : Sisplatin solüsyonu 0,5 mg/ml konsantrasyonda ve 8 mg/kg/doz bir saatlik intraperitoneal infüzyonla ışıktan korunarak uygulandı.

Çalışmanın 10. günü:

Anestezi altında abdominal venden kan alınarak hipovolemi yaratıldı. Bu yöntem ile sıçanlar feda edilerek femurları disseke edildi.

3.12 Sıçanların feda edilmesi, femurlarının disseke edilmesi

Sisplatin, asetil L-karnitin veya eşdeğer hacimde salin uygulamalarından sonra izlemin 10. 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) 5-8 ml kan alınıp hipovolemi yaratılarak sıçanlar feda edildi. Sıçanların femurları disseke edilerek serum fizyolojik içinde soğuk zincirle DEÜ Onkoloji Enstitüsü laboratuvarına ulaştırıldı (Resim 4,5,6).

Resim 4: Bir sıçanın feda edildikten sonra femurunun ortaya çıkartılması



Resim 5: Bir sıçanın feda edildikten sonra femurunun ayrılması



Resim 6: Feda edilen sıçanın femurları



3.13 Kemik iliği örneklerinin değerlendirilmesi

Disseke edilen femurlar +4°C soğuk zincire uyularak Temel Onkoloji laboratuvarına getirildi. Hemen metafizer bölgeden enine ikiye kesilip kemik iliğine ulaşıldı (Resim 7). Polilizin kaplı lamlara insülin iğnesi ile aspirasyon yapıp lamlara püskürtme ve imprint yapılarak -20 derecede saklandı. Her femurdan birer lam Wright boyası ile boyandı. Aynı femurlar örneğin 10 katı hacimde %10 luk formalin fiksasyonuna konuldu. 24 saat sonra dekalsifikasyon için formalin dökülüp örneğin 5 katı hacimde %5 asetik asit solüsyonuna konuldu. 24 saat sonra bistüri ile yumuşama saptanınca kasetlenip çeşme suyunda yıkanıp tekrar formaline alındı ve otomatik uzun süreli standart patoloji doku takibi uygulandı.

3.13.1 Kemik iliği örneklerinde sellülaritenin değerlendirilmesi

Femurlardan hazırlanan kemik iliği parafin blok kesitlerinde; yani kemik iliği biyopsi örneklerinde sellülarite yüzdeleri mikroskobik olarak değerlendirildi.

3.13.2 Kemik iliği örneklerinde her üç serinin değerlendirilmesi

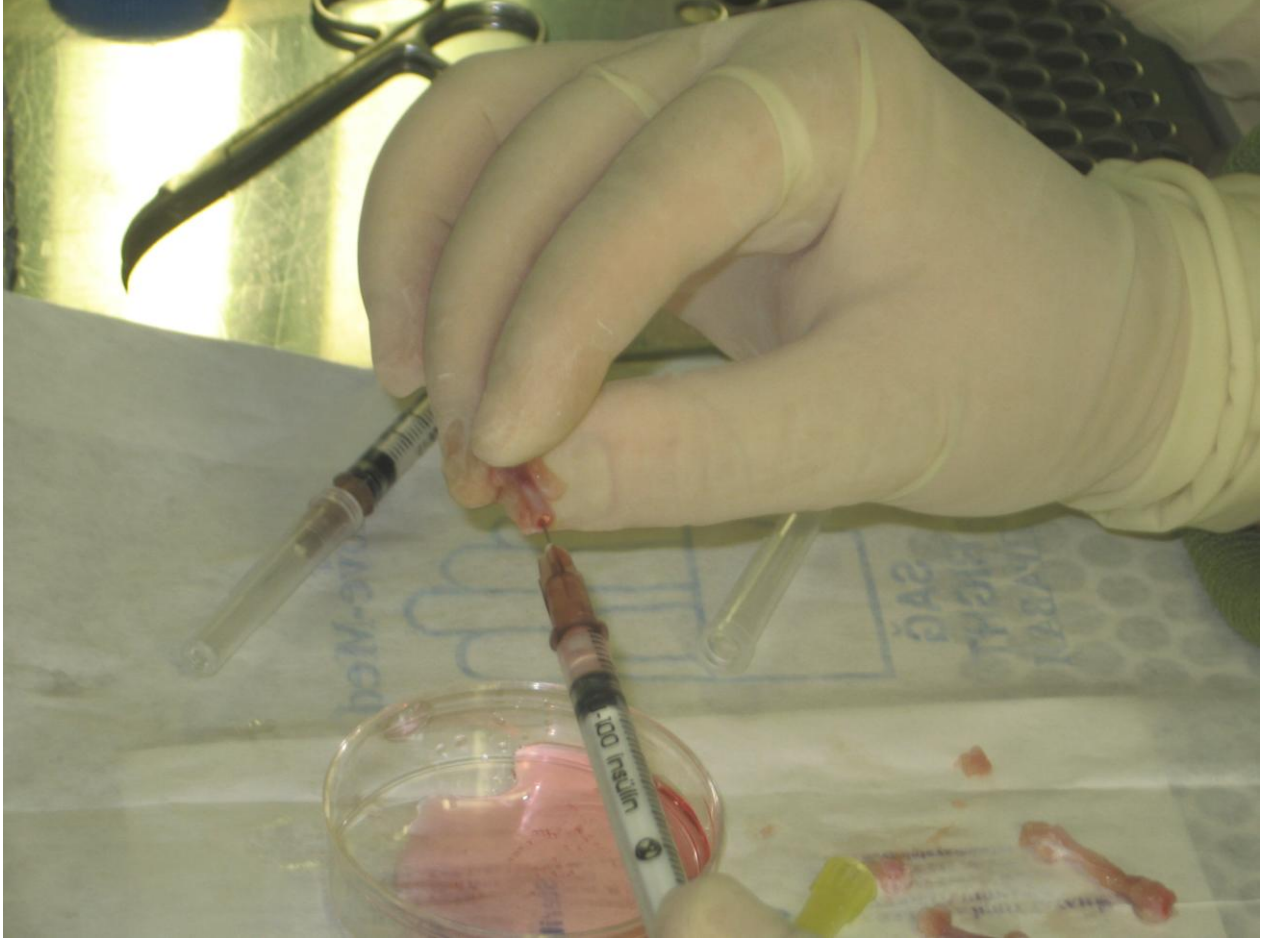
Her bir sıçanın kemik iliği kesitini içerir birer lam Wright boyası ile boyanıp kemik iliği elemanlarının morfolojik değerlendirmesi çocuk onkoloji polikliniğindeki ışık mikroskop (Olympus BH-2) ile yapıldı. Işık mikroskobunda önce x10 luk büyütmede sellülarite ve megakaryositler genel olarak değerlendirildi; ardından x100 lük büyütmede kemik iliğinde 1000 hücre sayılıp miyeloid, lenfositler ve eritroid seri elemanlarının yüzde oranları hesaplandı.

3.13.3 Kemik iliği örneklerinde kemoterapiye bağlı hücresel değişikliklerin değerlendirilmesi

Kemoterapiye bağlı akut hücresel değişiklikler Wright boyalı imprint preparatlarda büyük büyütmede değerlendirildi. Hücrelerde kontür ve boyut düzensizlikleri, sitoplazmik çıkıntılar, nükleer vakualizasyon, nükleer membranda bozulma; şiddet ve etkilediği hücre sayısına göre değerlendirildi. Söz konusu değişiklikler gözlenmezse yok, hafif ve az hücrede ise az, artan derecelerde orta ve çok olarak derecelendirildi.

Femurlar 24 saat formalinde fikse edilip, 24 saat %5 asetik asitte dekalsifikasyon işlemi uygulandıktan sonra doku takibi işlemi sonrası parafine gömüldü. Parafin bloktan hazırlanan 5 mikrometre kalınlıkta kesitler hematoksilin eozin ile boyanıp ışık mikroskobunda sellülarite, kemik iliği elemanlarının kompozisyonları, matürasyon, fibrosis, nekroz, kanama, adipoz doku oranı yönünden değerlendirildi.

Resim 7: Femurdan kemik iliğine ulaşılması. Metafizler bölgeden kesilen femurda insülin iğnesi ile aspirasyon



3.14 Verilerin istatistiksel analizi

Çalışmada elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma biçiminde verildi. Araştırma sonuçlarının istatistik analizi, SPSS için Windows istatistik programının 15.0 versiyonu kullanılarak $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde incelendi. İki'den fazla grubun varyans analizi ile değerlendirilmesinde p anlamlılık değeri için Bonferroni düzeltmesi yapıldı. Grup ortalamalarının gruplar arası karşılaştırması Kruskal- Wallis varyans analizi ile yapıldı. İkili grupların karşılaştırılması ise Mann Whitney U testi ile yapıldı.

4. BULGULAR

Her grupta yedi sıçan olmak üzere toplam 28 sıçanın çalışma başlangıcında ortalama ağırlıkları 223.55 ± 15.4 gr idi (Tablo 3). Gruplar arasında çalışma başlangıcındaki ağırlıklar açısından anlamlı bir fark bulunmamaktaydı ($p=0.74$).

Tablo 4: Sıçanların ortalama $\pm$ standart sapma (SS) ağırlıkları

GRUPLAR	VÜCUT AĞIRLIKLARI (gram)
	Ortalama $\pm$ standart sapma
Grup 1 (n=7)	226.57 $\pm$ 19.9
Grup 2 (n=7)	223.28 $\pm$ 12.5
Grup 3 (n=7)	226,50 $\pm$ 18.8
Grup 4 (n=7)	218.28 $\pm$ 11.2
Toplam (n=28)	223.55 $\pm$ 15.4

4.1 GRUPLARIN TAM KAN SAYIMLARI VE PERİFERİK KAN YAYMALARI

Çalışma başlangıcında elde edilen tam kan sayımlarında hemoglobin, kırmızı küre, beyaz küre, trombosit değerlerine bakıldı. Ortalama hemoglobin, kırmızı küre, beyaz küre, trombosit değerleri sıçanlar için literatürde belirtilen normal referans değerler arasındaydı (118) (Tablo 4).

Periferik yaymalardaki nötrofil, lenfosit, monosit, eozinofil yüzdeleri de sıçanlar için literatürde belirtilen normal referans değerler içindeydi. Hiçbir grupta başlangıçta miyelosupresyon yoktu (118) (Tablo 5).

Tablo 5: Sıçanlara ait normal tam kan sayımı referans değerleri ve sıçan gruplarının başlangıçtaki ortalama $\pm$ SS (en düşük-en yüksek) hemoglobin, kırmızı küre, beyaz küre, trombosit değerleri

Sıçan	Normal değerler	Grup 1 (Kontrol) Ortalama $\pm$ SS (en düşük-en yüksek)	Grup 2 (ALCAR) Ortalama $\pm$ SS (en düşük-en yüksek)	Grup 3 (Sisplatin) Ortalama $\pm$ SS (en düşük-en yüksek)	Grup 4 (ALCAR+Sisplatin) Ortalama $\pm$ SS (en düşük-en yüksek)
Hemoglobin (gr/dL)	11-19	14.41 $\pm$ 0.8 (13.6-16.1)	13.10 $\pm$ 0.3 (12.6-13.6)	13.65 $\pm$ 0.3 (13.1-14.0)	13.47 $\pm$ 1.0 (12.1-14.8)
Kırmızı küre ($\times 10^6$ μ L)	5-10	7.75 $\pm$ 0.5 (7.27-8.83)	7.07 $\pm$ 0.2 (6.78-7.46)	7.15 $\pm$ 0.2 (6.73-7.36)	7.04 $\pm$ 0.7 (6.04-8.02)
Beyaz küre ($\times 10^3$ μ L)	3-17	13.50 $\pm$ 1.8 (10.2-15.8)	13.50 $\pm$ 3.0 (10.3-19.2)	14.9 $\pm$ 1.9 (11.3-16.7)	14.5 $\pm$ 4.4 (9.3-20.5)
Platelet ($\times 10^3$ μ L)	200-1500	862.42 $\pm$ 159 (689-1099)	894.14 $\pm$ 118 (682-1058)	913.00 $\pm$ 88 (812-1027)	868.71 $\pm$ 169 (583-1070)

Tablo 6: Sıçana ait normal lökosit formül referans değerleri ve sıçanların başlangıçtaki ortalama $\pm$ SS (en düşük-en yüksek) nötrofil, lenfosit, monosit, eozinofil yüzdeleri

Sıçan	Normal değerler %	Grup 1 (Kontrol) Ortalama $\pm$ SS (en düşük-en yüksek)	Grup 2 (ALCAR) Ortalama $\pm$ SS (en düşük-en yüksek)	Grup 3 (Sisplatin) Ortalama $\pm$ SS (en düşük-en yüksek)	Grup 4 (ALCAR+Sisplatin) Ortalama $\pm$ SS (en düşük-en yüksek)
Nötrofil (%)	13-26	15.00 $\pm$ 2.7 (12-20)	14.42 $\pm$ 7.1 (8-25)	11.83 $\pm$ 3.1 (8-16)	16.71 $\pm$ 7.8 (10-28)
Lenfosit (%)	65-83	83.00 $\pm$ 2.8 (78-86)	80.42 $\pm$ 8.7 (66-90)	84.33 $\pm$ 2.2 (82-88)	77.71 $\pm$ 8.8 (64-84)
Monosit (%)	0-4	0.85 $\pm$ 1.0 (0-3)	4.14 $\pm$ 2.0 (2-8)	3.00 $\pm$ 0.8 (2-4)	3.71 $\pm$ 0.7 (3-5)
Eozinofil (%)	0-4	1.14 $\pm$ 1.0 (0-3)	1.00 $\pm$ 1.0 (0-2)	0.83 $\pm$ 1.3 (0-3)	1.85 $\pm$ 1.0 (0-3)

4.2 KEMİK İLİĞİ ÖRNEKLERİNİN DEĞERLENDİRME SONUÇLARI

Disseke edilen femurlar uzunlamasına ikiye kesilip kemik iliğine ulaşıldı. On adet polilizin kaplı lamlara imprint yapıp -20 derecede saklandı.

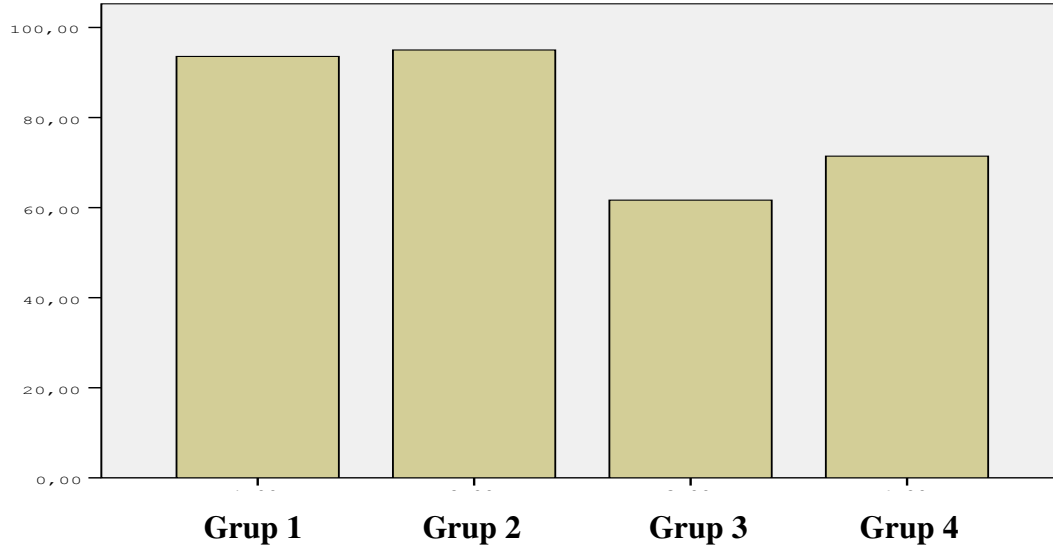
4.2.1 Kemik iliği örneklerinde sellülarite değerlendirme sonuçları

Kemik iliği biyopsi örneklerinde mikroskobik değerlendirme yapıldı (Tablo 6,7).

Tablo 7: Sıçanların kemik iliği biyopsi örneklerinde sellülarite yüzdeleri

Sellülarite %	Ortalama±SS (en düşük-en yüksek)
Grup 1 (Kontrol)	93.57±3.7 (90-100)
Grup 2 (ALCAR)	95.00±4.0 (90-100)
Grup 3 (Sisplatin)	61.66±5.1 (55-70)
Grup 4 (ALCAR+Sisplatin)	71.42±4.7 (65-80)

Tablo 8: Kemik iliği biyopsi örneklerinde grupların ortalama kemik iliği sellülarite yüzdeleri



Dört grubun kemik iliği sellülaritesi Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı ve aralarında anlamlı fark olduğu saptandı (X^2_{K-W} : 21.674, SD:3, p:0.000).

Kemik iliği sellülaritesinin gruplar arası karşılaştırması Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi ile analiz edildi, istatistiksel anlamlılık gösteren p değeri $p < 0.0125$ ($0.05/4=0.0125$) alındı.

Grup 1 (Kontrol) ve Grup 2 (ALCAR)'nin kemik iliği sellülarite ortalaması arasındaki fark anlamlı bulunmadı (M-W U: 19.5, p:0.493).

Grup 1 (Kontrol) ve Grup 3 (Sisplatin)'ün kemik iliği sellülarite ortalaması arasındaki fark anlamlı bulundu (M-W U: 0, p 0.002).

Grup 1 (Kontrol) ve Grup 4 (ALCAR+sisplatin)'ün kemik iliği sellülarite ortalaması arasındaki fark anlamlı bulundu (M-W U: 0, p 0.001).

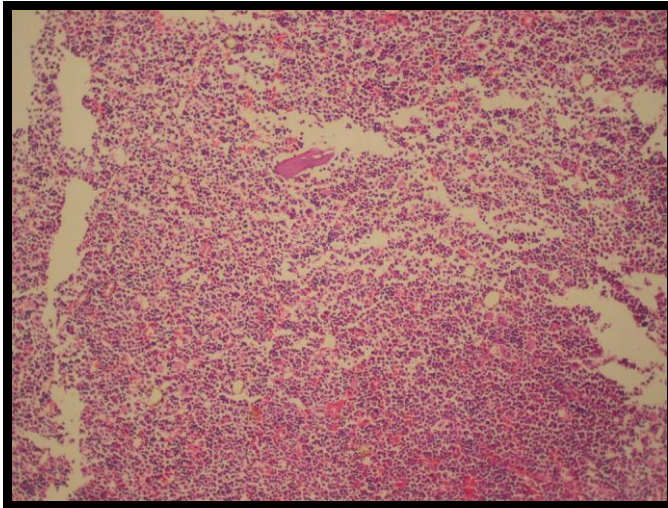
Grup 2 (ALCAR) ve Grup 3 (Sisplatin)'ün kemik iliği sellülarite ortalaması arasındaki fark anlamlı bulundu (M-W U: 0, p 0.002).

Grup 2 (ALCAR) ve Grup 4 (ALCAR+Sisplatin)'ün kemik iliği sellülarite ortalaması arasındaki fark anlamlı bulundu (M-W U: 0, p 0.001).

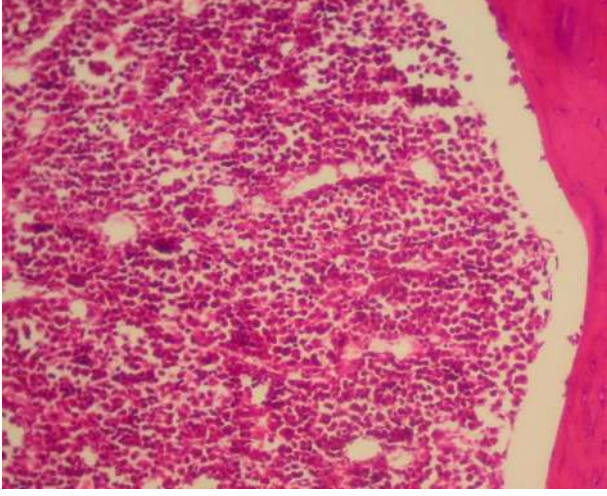
Grup 3 (Sisplatin) ve Grup 4 (ALCAR+Sisplatin)'ün kemik iliği sellülarite ortalaması arasındaki fark anlamlı bulundu (M-W U: 3.5, p 0.01).

Grupların Wright boyalı kemik iliği örnekleri aşağıdaki resimlerde görülmektedir (Resim 8,9,10,11).

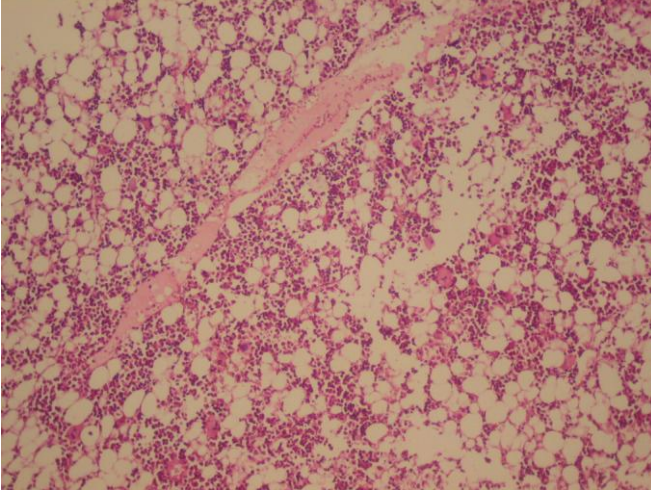
Resim 8: Kontrol grubunun kemik iliği doku incelemesi: (H.Ex40) % 90'ların üzerinde sellülarite ve kemik iliğinde olağan hücre dağılımı



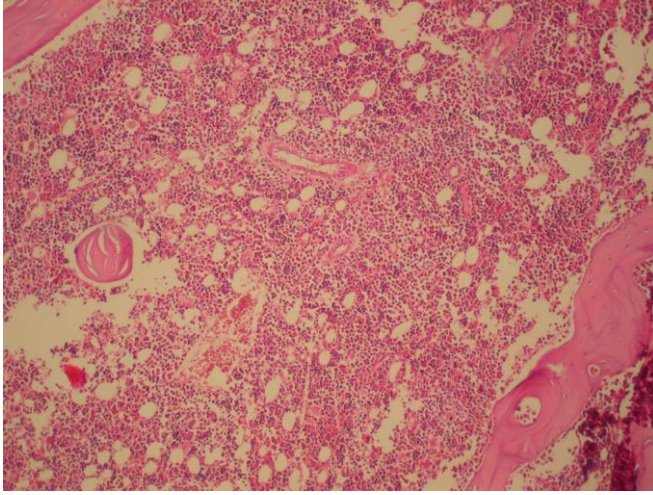
Resim 9: ALCAR grubunun kemik iliği doku incelemesi: (H.Ex200) % 90'ların üzerinde sellülerite ve kemik iliğinde olağan hücre dağılımı



Resim 10: Sisplatin grubunun kemik iliği doku incelemesi: (H.Ex40) Küçük büyütmede sellüleritede azalma dikkati çekmektedir.



Resim 11: ALCAR + Sisplatin grubunun kemik iliği doku incelemesi: (H.Ex40) %70'lerde sellülerite



4.2.2 Kemik iliği örneklerinde her üç serinin değerlendirilmesinin sonuçları

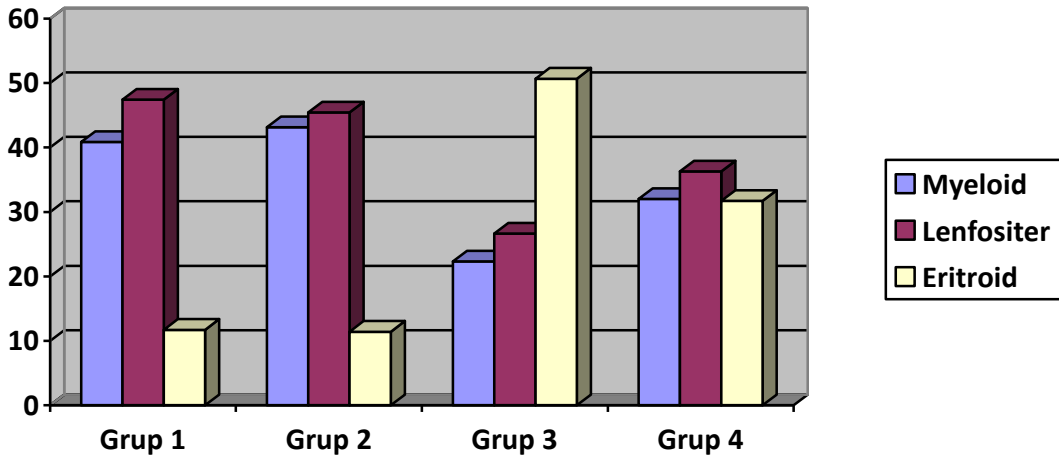
Her bir sıçanın kemik iliği kesitini içerir birer lam Wright boyası ile boyanıp kemik iliği elemanlarının morfolojik değerlendirmesi yapıldı. Kemik iliğinde 1000 hücre sayılıp miyeloid, lenfositler ve eritroid seri elemanlarının yüzde oranları hesaplandı.

Kemik iliğinde miyeloid, eritroid ve lenfositler seri elemanlarının yüzde ortalamaları tablolardadır (Tablo 8,9).

Tablo 9: Sıçanların kemik iliği miyeloid, eritroid, lenfositler seri ve sellülarite yüzdeleri

% Ortalama $\pm$ SS (en düşük-en yüksek)	Miyeloid	Lenfositler	Eritroid	Sellülarite
Grup 1 (Kontrol)	40.85 $\pm$ 3.4 (36-46)	47.42 $\pm$ 3.7 (42-54)	11.71 $\pm$ 1.7 (10-14)	93.57 $\pm$ 3.7 (90-100)
Grup 2 (ALCAR)	43.14 $\pm$ 2.5 (40-48)	45.42 $\pm$ 2.5 (42-48)	11.42 $\pm$ 1.5 (10-14)	95.00 $\pm$ 4.0 (90-100)
Grup 3 (Sisplatin)	22.33 $\pm$ 1.5 (20-24)	26.66 $\pm$ 3.2 (22-30)	50.66 $\pm$ 4.1 (46-56)	61.66 $\pm$ 5.1 (55-70)
Grup 4 (ALCAR+Sisplatin)	32.00 $\pm$ 1.6 (30-34)	36.28 $\pm$ 2.6 (32-40)	31.71 $\pm$ 3.3 (26-36)	71.42 $\pm$ 4.7 (65-80)

Tablo 10: Grupların ortalama miyeloid, lenfositler, eritroid seri yüzdeleri



Kemik iliği miyeloid seri yüzdelерinin grup ortalamaları dört grup arasında Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı ve aralarında anlamlı fark olduğu saptandı (X^2_{K-W} : 22.318, SD:3, p:0.000).

Kemik iliği miyeloid seri yüzdelерinin ikili gruplar arası karşılaştırması Mann-Whitney U testi ile analiz edildi, istatistiksel anlamlılık gösteren p değeri için Bonferroni düzeltmesi uygulandı ve $p < 0.0125$ ($0.05/4 = 0.0125$) anlamlı kabul edildi.

Grup 1 (Kontrol) ve Grup 2 (ALCAR)'nin kemik iliği değeri değerlendirilmesinde miyeloid seri yüzdeleri arasındaki fark anlamlı bulunmadı (M-W U: 14.5, p:0.192).

Grup 1 (Kontrol) ve Grup 3 (Sisplatin)'ün kemik iliği değeri değerlendirilmesinde miyeloid seri yüzdeleri arasındaki fark anlamlı bulundu (M-W U: 0, p 0.002).

Grup 1 (Kontrol) ve Grup 4 (ALCAR+Sisplatin)'ün kemik iliği değeri değerlendirilmesinde miyeloid seri yüzdeleri arasındaki fark anlamlı bulundu (M-W U: 0, p 0.002).

Grup 2 (ALCAR) ve Grup 3 (Sisplatin)'ün kemik iliği değeri değerlendirilmesinde miyeloid seri yüzdeleri arasındaki fark anlamlı bulundu (M-W U: 0, p 0.002).

Grup 2 (ALCAR) ve Grup 4 (ALCAR+Sisplatin)'ün kemik iliği değeri değerlendirilmesinde miyeloid seri yüzdeleri arasındaki fark anlamlı bulundu (M-W U: 0, p 0.002).

Grup 3 (Sisplatin) ve Grup 4 (ALCAR+Sisplatin)'ün kemik iliği değeri değerlendirilmesinde miyeloid seri yüzdeleri arasındaki fark anlamlı bulundu (M-W U: 0, p 0.002).

Kemik iliği lenfositler seri yüzdelilerinin grup ortalamaları dört grup arasında Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı ve aralarında anlamlı fark olduğu saptandı (X^2_{K-W} : 22.201, SD:3, p:0.000).

Kemik iliği lenfositler seri yüzdelilerinin ikili gruplar arası karşılaştırması Mann-Whitney U testi ile analiz edildi, istatistiksel anlamlılık gösteren p değeri için Bonferroni düzeltmesi uygulandı ve $p < 0.0125$ ($0.05/4 = 0.0125$) anlamlı kabul edildi.

Grup 1 (Kontrol) ve Grup 2 (ALCAR)'nin kemik iliği değerlendirmesinde lenfositler seri yüzdeleri arasındaki fark anlamlı bulunmadı (M-W U: 17.5, p:0.347).

Grup 1 (Kontrol) ve Grup 3 (Sisplatin)'ün kemik iliği değerlendirmesinde lenfositler seri yüzdeleri arasındaki fark anlamlı bulundu (M-W U: 0, p 0.003).

Grup 1 (Kontrol) ve Grup 4 (ALCAR+Sisplatin)'ün kemik iliği değerlendirmesinde lenfositler seri yüzdeleri arasındaki fark anlamlı bulundu (M-W U: 0, p 0.002).

Grup 2 (ALCAR) ve Grup 3 (Sisplatin)'ün kemik iliği değerlendirmesinde lenfositler seri yüzdeleri arasındaki fark anlamlı bulundu (M-W U: 0, p 0.002).

Grup 2 (ALCAR) ve Grup 4 (ALCAR+Sisplatin)'ün kemik iliği değerlendirmesinde lenfositler seri yüzdeleri arasındaki fark anlamlı bulundu (M-W U: 0, p 0.002).

Grup 3 (Sisplatin) ve Grup 4 (ALCAR+Sisplatin)'ün kemik iliği değerlendirmesinde lenfositler seri yüzdeleri arasındaki fark anlamlı bulundu (M-W U: 0, p 0.03).

Kemik iliği eritroid seri yüzdelilerinin grup ortalamaları dört grup arasında Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı ve aralarında anlamlı fark olduğu saptandı (X^2_{K-W} : 22.103, SD:3, p:0.000).

Kemik iliği eritroid seri yüzdelilerinin ikili gruplar arası karşılaştırması Mann-Whitney U testi ile analiz edildi, istatistiksel anlamlılık gösteren p değeri için Bonferroni düzeltmesi uygulandı ve $p < 0.0125$ ($0.05/4 = 0.0125$) anlamlı kabul edildi.

Grup 1 (Kontrol) ve Grup 2 (ALCAR)'nin kemik iliği değerlendirmesinde eritroid seri yüzdeleri arasındaki fark anlamlı bulunmadı (M-W U: 22.5, p:0.784).

Grup 1 (Kontrol) ve Grup 3 (Sisplatin)'ün kemik iliği değerlendirmesinde eritroid seri yüzdeleri arasındaki fark anlamlı bulundu (M-W U: 0, p 0.002).

Grup 1 (Kontrol) ve Grup 4 (ALCAR+Sisplatin)'ün kemik iliği değerlendirmesinde eritroid seri yüzdeleri arasındaki fark anlamlı bulundu (M-W U: 0, p 0.002).

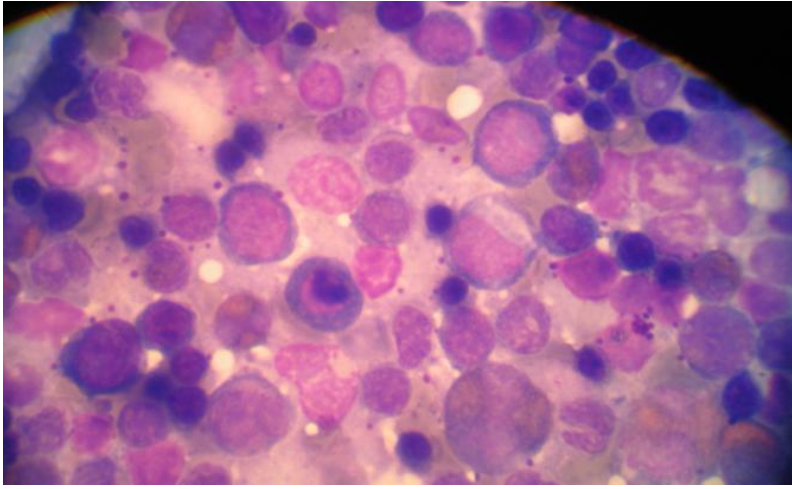
Grup 2 (ALCAR) ve Grup 3 (Sisplatin)'ün kemik iliği değerlendirmesinde eritroid seri yüzdeleri arasındaki fark anlamlı bulundu (M-W U: 0, p 0.002).

Grup 2 (ALCAR) ve Grup 4 (ALCAR+Sisplatin)'ün kemik iliği değerlendirmesinde eritroid seri yüzdeleri arasındaki fark anlamlı bulundu (M-W U: 0, p 0.002).

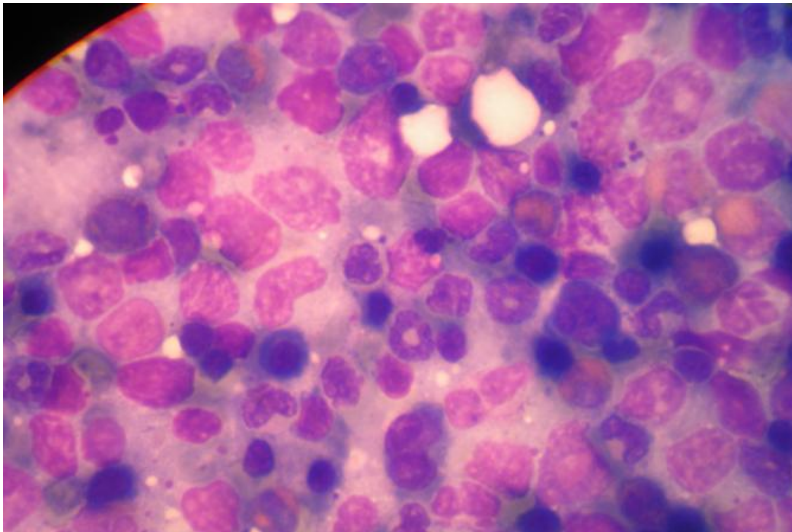
Grup 3 (Sisplatin) ve Grup 4 (ALCAR+Sisplatin)'ün kemik iliği değerlendirmesinde eritroid seri yüzdeleri arasındaki fark anlamlı bulundu (M-W U: 0, p 0.03).

Grupların Wright boyalı preparatlarından görüntü kesitleri resimlerde (Resim 12,13,14,15).

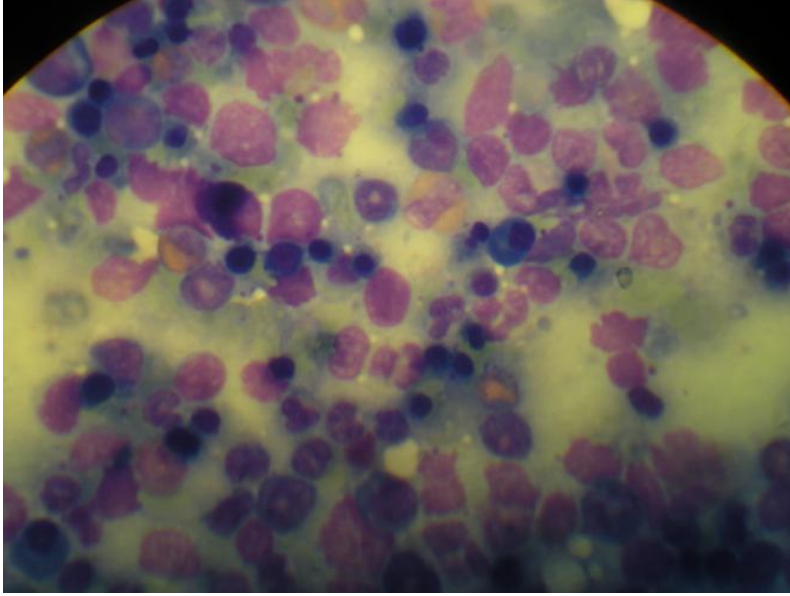
Resim 12: Grup 1'e (Kontrol) ait bir sıçanın kemik iliği değerlendirmesi: (H.Ex100) Miyeloid ve lenfositler seri hakimiyeti.



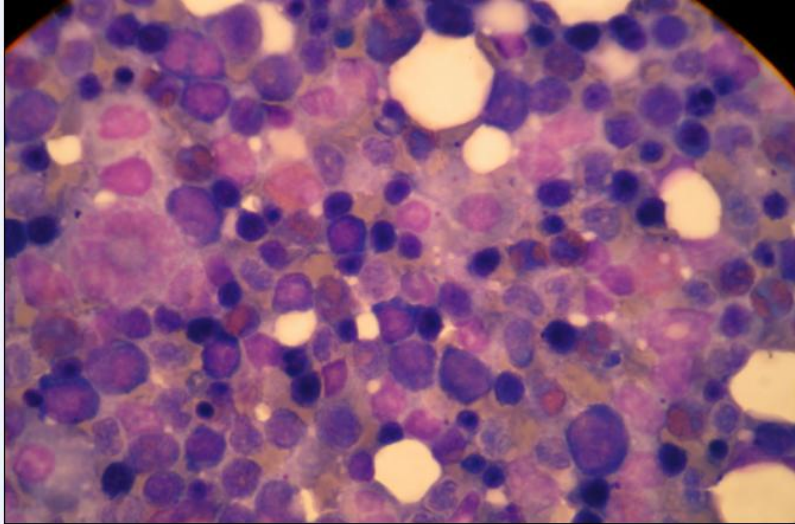
Resim 13: Grup 2'ye (ALCAR) ait bir sıçanın kemik iliği değerlendirmesi: (H.Ex100) Her üç seri elemanları da yeterli oranda görülmekte.



Resim 14: Grup 3'e (Sisplatin) ait bir sıçanın kemik iliği değerlendirmesi: (H.Ex100) Rölatif olarak yüksek oranda eritroid seri.



Resim 15: Grup 4'e (ALCAR + Sisplatin grubu) ait bir sıçanın kemik iliği değerlendirmesi, (H.Ex100) Kontrol ve ALCAR gruplarına göre rölatif eritroid seri hakimiyeti



4.2.3 Kemik iliği örneklerinde kemoterapiye bağlı hücresel değişikliklerin değerlendirilmesinin sonuçları

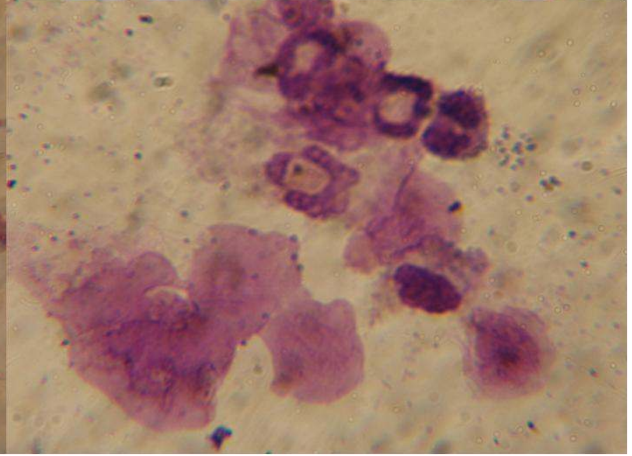
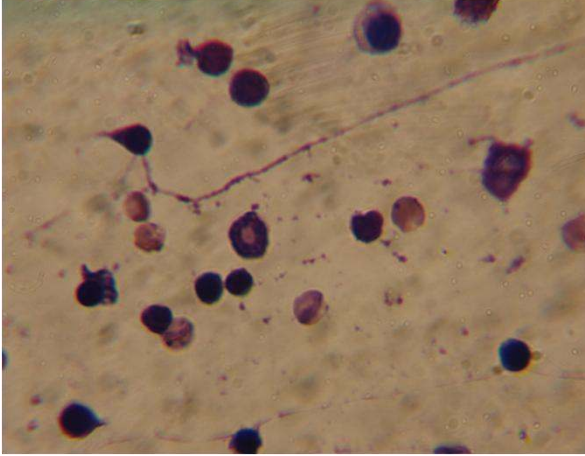
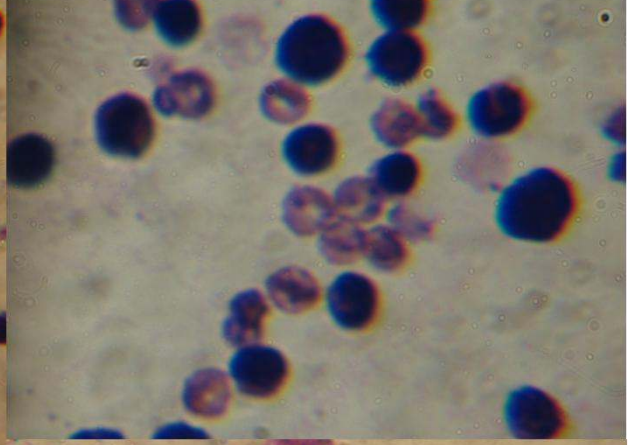
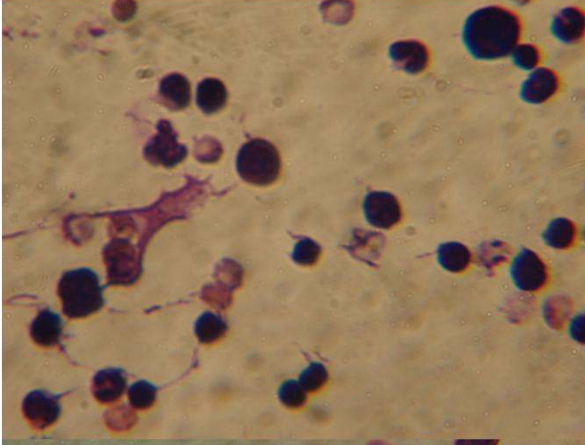
Kemoterapiye bağlı akut hücresel değişiklikler Wright boyalı imprint preparatlarda büyük büyütmede değerlendirildi. Hücrelerde kontür ve boyut düzensizlikleri, sitoplazmik çıkıntılar, nükleer vakualizasyon, nükleer membranda bozulma, şiddet ve etkilediği hücre sayısına göre değerlendirildi. Söz konusu değişiklikler gözlenmezse yok, hafif ve az hücrede ise az, artan derecelerde orta ve çok olarak derecelendirildi. Sadece sisplatin uygulanan grupta orta ve çok derecelerde akut hücresel değişiklikler görülürken; ALCAR sonrası sisplatin uygulanan grupta daha ağırlıklı olarak az derecede hücresel etkilenme saptandı (Resim 16).

Femurlar 24 saat formalinde fikse edilip, 24 saat %5 asetik asitte dekalsifikasyon işlemi uygulandıktan sonra doku takibi işlemi sonrası parafine gömüldü. Parafin bloktan hazırlanan 5 mikrometre kalınlıkta kesitler hematoksilin eozin ile boyanıp ışık mikroskopunda sellülerite, kemik iliği elemanlarının kompozisyonları, matürasyon, fibrosis, nekroz, kanama, adipoz doku oranı yönünden değerlendirildi. Yine sadece sisplatin uygulanan grupta matürasyon duraklaması, fibrosis ve nekroz; ALCAR sonrası sisplatin uygulanan gruba göre daha yoğun olarak görülmüştür (Resim 17).

Resim 16: Wright boyalı imprint preparatlarda kemoterapiye bağlı akut hücresel değişiklikler

Yok

Az

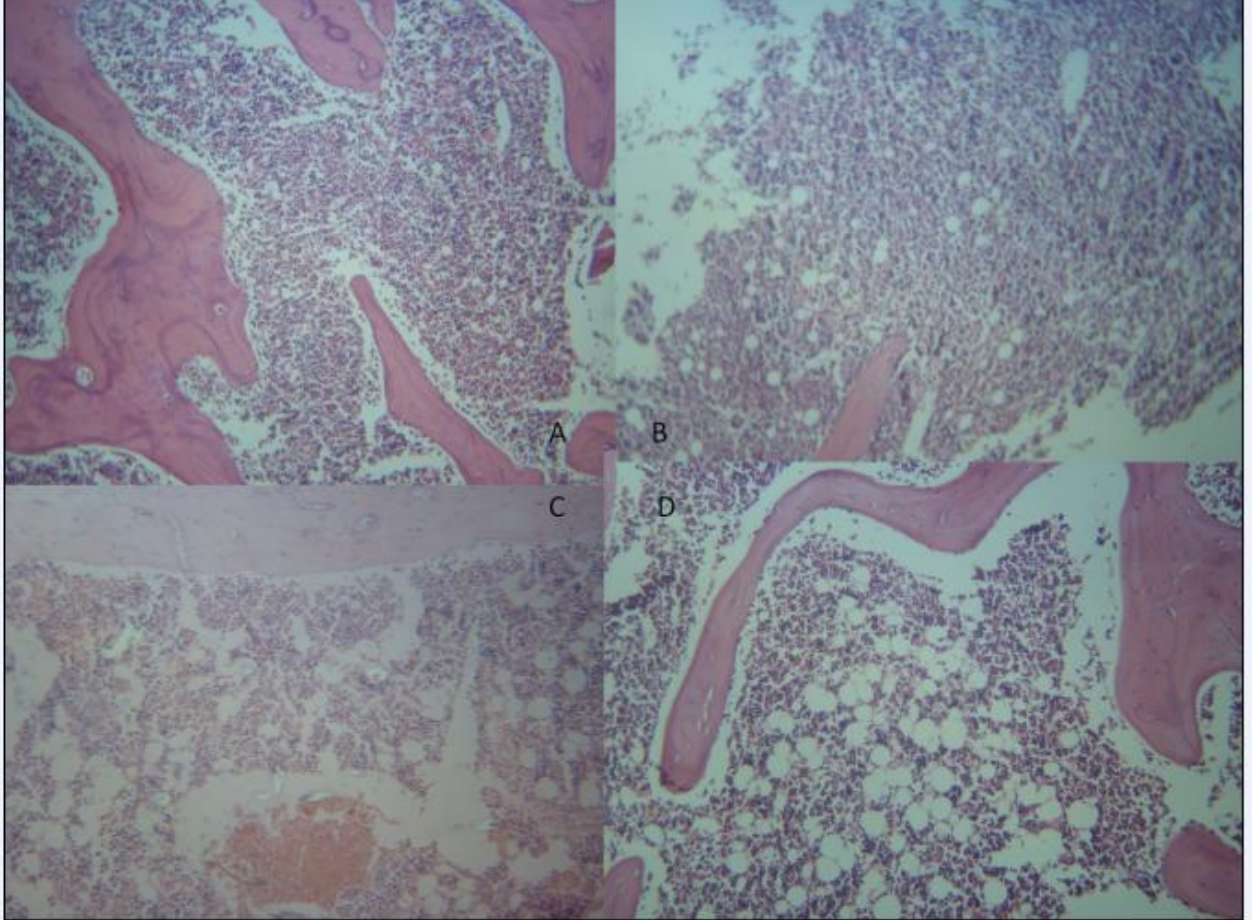


Orta

Çok

Resim 17: Hematoksilen eozin boyalı kemik iliği biyopsi örnekleri

(**A:**Grup 1, **B:** Grup 2, **C:** Grup 3, **D:** Grup 4)



5. TARTIŞMA:

Sisplatin, erişkin çağda görülen pek çok kanserin tedavi protokollerinde yer aldığı gibi, çocukluk çağı kanserlerinden beyin tümörleri, nöroblastom, Wilms tümörü, hepatoblastom, germ hücreli tümörler, osteosarkom, nazofarinks karsinomu gibi tümörlerin tedavisinde de kemoterapi şemalarında yer almaktadır. (1-3). Sisplatin uygulamasına bağlı en önemli doz sınırlayıcı yan etkiler nefrotoksisite ve ototoksisitedir. Daha önce bilim dalımızda yapılan bir araştırmada sisplatin içeren kemoterapi şeması uygulanan çocuk onkoloji hastalarında %56 oranında, sisplatin ve karboplatin içeren kemoterapi şeması uygulanan çocuk onkoloji hastalarında %47 oranında ototoksisite geliştiği saptanmıştır (47). Ototoksisite ve nefrotoksisitenin yanısıra, sisplatinin orta-ağır dereceli bulantı-kusma, iştahsızlık, anoreksi ve diyare yapıcı gastrointestinal yan etkileri; miyelosupresyon (lökopeni, trombositopeni, anemi) gibi hematolojik yan etkileri; nörotoksisite, periferik nöropati, konvülzyon, konuşma bozukluğu, tad kaybı, hafıza kaybı gibi nörolojik yan etkileri; hafif ürtiker veya ağır anaflaktoid reaksiyon izlenebilen aşırı duyarlılık reaksiyonları, optik nörit, papilödem, serebral körlük gibi oküler yan etkileri, bradikardi, sol dal bloğu, konjestif kalp yetmezliği, postural hipotansiyon, hipertansiyon gibi kardiyovasküler yan etkileri; karaciğer enzimlerinde yükselmeye neden olan karaciğer toksisitesi gibi yan etkileri de vardır (4,6,51,53).

Sisplatinin sitotoksik özelliklerini nükleer DNA'ya bağlanıp transkripsiyon ve DNA replikasyonunu bozarak ve çeşitli sinyal iletim yollarını aktive ederek sağladığı düşünülmektedir (4,5,9,10). Sisplatin DNA'yı etkileyerek, mitokondri fonksiyonlarını bozmakta ve apoptoz sürecini başlatmaktadır (11). Sisplatin miyelosupresyona bu mekanizmalar ile neden olabilir. Sisplatinin toksisite mekanizmaları göz önünde bulundurularak yan etkilerini azaltmak amacı ile pek çok farklı strateji geliştirme çabaları sürmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda oksidatif hasarın önemli bir role sahip olduğu anlaşılmış ve antioksidan ajanlarla yapılan çalışmalar artmıştır (17,18). Masuda ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, sisplatine bağlı miyelosupresyonu önlemede Grifora frondosa isimli bir mantarın beta gluklan içeren kısmını (MD-fraction) kullanmışlardır. Bu maddenin, hematopoetik sitokinlerin azalmasını önleyerek, yani antiinflamatuvar etki ile, sisplatine bağlı miyelosupresyonu, pansitopeniyi engellediği gösterilmiştir (116).

Dokuz Eylül Üniversitesi Pediatrik Onkoloji bölümünde daha önce yapılmış olan çalışmalarda ALCAR'ın sisplatin nefrotoksisite, ototoksisite ve nörotoksisitesini önleyici bir ajan olduğu elektron mikroskopik olarak gösterilmiştir (43,113). Karnitin hücrenin enerji üretimi için beta oksidasyona gidebilmek üzere uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondri

matriksine geçişinde görev alan, asetillenmiş koenzim A (CoA) miktarını düzenleyen ve diğer hücre metabolik olaylarda yer alan, antioksidan özelliği kanıtlanmış vitamin benzeri bir bileşiktir. Farklı hücre tiplerinde yapılan çalışmalar karnitinin hücre membran geçirgenliğindeki değişiklikleri, apoptozu, mitokondriyal disfonksiyonu ve lipid peroksidasyonunu güçlü bir şekilde engellediğini göstermiştir (80, 84, 85). L-karnitin oksidatif stresi engeller, nitrik oksidi ve oksidatif hasardan korunmaya yönelik enzimlerin aktivitesini düzenler, bir çok mitokondriyal toksik ajana karşı koruyucu etki sağlar (28-30). Asetil L-karnitin, L-karnitinin kısa zincirli bir ester türevi olup L-karnitine ait özelliklerin yanı sıra nöroprotektif ve antiapoptotik özellikler taşımaktadır (19-33). L-karnitin ve türevlerinin oksidatif stresi engellediği, mitokondriyal toksik ajanlara karşı koruyucu etki sağladığı, süksinat dehidrogenaz gibi mitokondriyal enzimlerin yanı sıra katalaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde de koruyucu rol oynayarak güçlü bir antioksidan ve serbest radikal yakalayıcısı olduğu yapılan birçok çalışmada kanıtlanmıştır (28-32). 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 (80,84,85).

Bilim dalımızda daha önce yapılan araştırmalar da dikkate alınarak, bu araştırmada ALCAR' nin sisplatin ilişkili kemik iliği baskılanmasını önleyici rolü olup olmadığının değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Sisplatin uygulamasından sonra doza bağlı olarak ortalama 5-10 gün içerisinde nötropeni gelişebilmektedir (1). Daha önce bilim dalımızda sıçanlarda yapılmış nefrotoksisite, ototoksisite ve nörotoksisite çalışmalarından farklı olarak burada sıçanlara sisplatin verildikten sonra miyelosupresif etkinin ortaya çıkması için sıçanların 10 gün yaşatılması gerekliliği doğmuştur. Literatürde sisplatinin 10 mg/kg, 13 mg/kg, 16 mg/kg gibi dozlarda uygulanmasıyla nefrotoksisite ve ototoksisite modelleri oluşturulduğu bildirilmektedir (13,15,114,115). Daha önce bilim dalımızda yapılmış araştırmalarda sisplatin 16 mg/kg dozda verilerek, 3 günlük izlemin sonunda sıçanlar feda edilmiş ve organ toksisiteleri değerlendirilmiştir. İngilizce literatürde sisplatinin miyelosupresif etkisi için bir doz model bulunamamıştır ve bu nedenle bizim araştırmamızda miyelosupresyon yapıcı etkin sisplatin dozunu belirlemek üzere ön çalışmalar yapılması gerekmiştir. Yaptığımız ilk ön araştırmalarda 5mg/kg sisplatin uygulaması sonrası 10. günde kemik iliğinde miyelosupresyon oluşturulamamış, sisplatin dozu yetersiz kalmıştır. İkinci bir ön çalışmada eş

zamanlı iki sıçana 8 ve 10 mg/kg dozlarında sisplatin uygulanmıştır. Miyelosupresif etkiyi görmek üzere 10 mg/kg dozda verildiğinde sıçan 10 gün süreyle yaşatılamamış daha erken dönemde ağır diyare ve dehidratasyon ile kaybedilmiştir. Verilen 8 mg/kg dozda sıçan 10 gün yaşatılabilmiş ve kemik iliğinde miyelosupresyon izlenmiştir. Bu ön çalışmalar sonucunda araştırmamızda miyelosupresyon yapıcı sisplatin dozu 8 mg/kg olarak belirlenmiştir.

Bu araştırmada sıçanlarda sisplatin uygulanarak oluşturulmuş miyelosupresyon modellerinde, güçlü bir antioksidan olduğu bilinen asetil L-karnitin, sisplatin ilişkili kemik iliği toksisitesini önleyici, azaltıcı rolü olup olmadığı araştırılmıştır.

Kemik iliği sellülarite yüzdelere baktığımızda serum fizyolojik uygulanan kontrol grubu ile ALCAR uygulanan grup arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu da tek başına ALCAR uygulamasının kemik iliği sellülaritesini azaltıcı herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir. Kemik iliğinde miyeloid, lenfositler ve eritroid seri elemanlarını mikroskopik olarak incelediğimizde, kontrol grubu ve ALCAR uygulanan iki grubu karşılaştırmalı olarak değerlendirdiğimizde; miyeloid, lenfositler ve eritroid seri elemanlarının yüzde oranları arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Kontrol grubu ve ALCAR uygulanan iki grupta da miyelosupresyon görülmemiştir, megakaryositler yeterli oranda görülmüştür. Yine bu bulgu da tek başına ALCAR uygulamasının kemik iliğinde miyelosupresyona neden olmadığını göstermiştir. Asetil L-karnitin miyelosupresyona neden olmaması literatürle uyumlu bulunmuştur (20, 21, 33). Bilim dalımızda daha önce ALCAR ile yapılmış nefrotoksisite, ototoksisite ve nörotoksisite araştırmalarında da yine ALCAR' nin tek başına uygulanmasının böbrek, iç kulak ve nöronlar üzerinde toksik bir etki yapmadığı elektron mikroskopik olarak gösterilmiştir (43, 113).

Tek başına sisplatin uygulanan grup ve ALCAR+Sisplatin uygulanan grubun kemik iliği sellülariteleri kontrol ve ALCAR gruplarına göre belirgin derecede azalmış bulunmuştur. Ayrıca ALCAR+Sisplatin grubunda kemik iliği sellülaritesindeki azalmanın, tek başına sisplatin uygulanan gruba göre daha ılımlı olduğu görülmüş ve aradaki fark anlamlı bulunmuştur. Bu bulgular ALCAR uygulamasıyla sisplatine bağlı kemik iliği baskılanmasının azaldığına, kemik iliğinin sisplatin ilişkili toksisiteden korunduğuna işaret etmektedir.

Kemik iliğinde miyeloid, lenfositler ve eritroid seri elemanlarını mikroskopik olarak incelediğimizde; tek başına sisplatin uygulanan ve ALCAR+Sisplatin uygulanan gruplarda miyelosupresyon, megakaryositlerde azalma dikkati çekmiştir. Miyelosupresyona bağlı olarak miyeloid ve lenfositler seride azalma ve eritroid seri yüzdesinde rölatif olarak olarak yükseklik saptanmıştır. Sisplatin uygulanan grupla ALCAR+Sisplatin uygulanan grubu

karşılaştırdığımızda bu etkilenmenin ALCAR+Sisplatin grubunda, tek başına sisplatin uygulanan gruba göre daha az olduğu dikkatimizi çekmiştir. Yüzde oranları olarak yine miyeloid serinin rölatif yüksekliği söz konusudur fakat sisplatin uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür. Yine ALCAR+Sisplatin uygulanan grupta megakaryositlerin azaldığı fakat sisplatin uygulanan gruba göre daha az oranda azaldığı görülmüştür. Kemik iliği imprint örneklerinde kemoterapiye bağlı hücresel değişiklikler değerlendirildiğinde sadece sisplatin uygulanan grupta hücrede kontür ve boyut düzensizlikleri, sitoplazmik çıkıntılar, nükleer vakualizasyon, nükleer membranda bozulmayı içeren orta ve çok derecelerde akut hücresel değişiklikler görülürken; ALCAR sonrası sisplatin uygulanan grupta daha ağırlıklı olarak az derecede hücresel etkilenme saptanmıştır. Hematoksilen eozin ile boyalı kemik iliği biyopsi örnekleri; sellülarite, kemik iliği elemanlarının kompozisyonları, matürasyon, fibrosis, nekroz, kanama, adipoz doku oranı yönünden değerlendirildiğinde yine sadece sisplatin uygulanan grupta maturasyon duraklaması, fibrozis ve nekroz; ALCAR sonrası sisplatin uygulanan gruba göre daha yoğun olarak görülmüştür. Bütün bu bulgular sisplatin beraberinde ALCAR uygulanmasıyla sıçanlarda sisplatin ilişkili miyelosupresyonun azaldığını göstermiştir. İngilizce literatürde benzer bir sıçan modelinde sisplatin ve ALCAR ile yapılmış bir başka araştırma bulunmaması dolayısıyla bizim araştırmamız özelliklidir.

Çalışmamızda ALCAR, sisplatinden 2 gün önce başlanarak tam üç gün uygulanmıştır; son, yani 3. doz, sisplatin infüzyonundan 30 dakika önce verilmiştir. Bu şekilde ALCAR'ın miyelotoksitesiteyi azalttığı görüldü. Sisplatin uygulaması sonrası günlerde yani daha uzun süre (3 gün ya da 10 gün boyunca, sakrifikasyona dek) verilseydi belki miyelosupresyonu azaltıcı etkisi daha da belirgin olabilirdi.

Bizim araştırmamızda ALCAR kullanımının sisplatin ilişkili miyelosupresyonu azalttığı saptanmıştır. Ancak bu etkiyi hangi mekanizma ile yaptığı bilinmemektedir. Sisplatin nefrotoksitesinde ALCAR'ın koruyucu etkisi ile ilgili bilim dalımızda yapılan çalışmada ALCAR'ın etkisini antiinflamatuvar ve antioksidatif özellikleri ile ortaya çıkardığı gösterilmiştir (43). Sisplatine bağlı nefrotoksitede apoptozun önemli rolü vardır, özellikle intrinsik/mitokondriyal yolak önemlidir. Bu yolakta mitokondriden sitokrom c salınır, kaspaz 8 ve 9'un aktivasyonuna yol açar ve bunların etkisi ile en önemli role sahip olan kaspaz 3 aktive olur. Asetil L-karnitin apoptotik yollarda kaspaz 3 ve 9'u engelleyerek apoptozu etkin bir şekilde önlediği gösterilmiştir. Bilim dalımızda yapılan araştırmada sisplatin uygulanan grupta görülen, etkilenmiş tübül etrafındaki makrofaj ve lenfosit infiltrasyonu,

asetil L-karnitin+Sisplatin grubunda görülmemiştir. Bu bulgu ALCAR'ın sisplatin nefrotoksisitesindeki antiinflamatuvar etkisini göstermektedir (43). Yine bilim dalımızda yapılan bir diğer çalışmada ALCAR'ın sisplatine bağlı ototoksisite ve nörotoksisiteyi, nefrotoksisitedeki aynı mekanizma ile, yani antiapoptotik etki ile önlediği gösterilmiştir (113). Bizim araştırmamızda kemik iliğinde apoptozun hücresel düzeyde değerlendirilmesi mümkün olmamıştır, ancak daha ileri teknoloji ve uygun yöntemlerle antiapoptotik mekanizmayı aydınlatmaya yönelik yeni çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Abd-Allah ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada karboplatinin miyelosupresif etkisini ve apoptozu L-karnitinin durdurduğu sıçan kemik iliği hücre kültürlerinde gösterilmiştir. Bu çalışmada, sıçanların femurları disseke edilerek kemik iliklerine salın eklenerek hücre süspansiyonu hazırlanıp santrifüj edilmiştir. Bir kısım sadece karboplatin ile inkübe edilirken diğer kısım L-karnitin ve karboplatin ile inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı ve apoptoz değerlendirilmiştir. L-karnitin eklenildiği hücre kültürlerinde apoptozun ve hücre ölümünün istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada L-karnitin, antioksidan ve serbest radikal temizleyici etkileri ile oksidatif stresi önleyerek miyelotoksisiteyi azalttığı gösterilmiştir (46).

Üçüncü ve arkadaşları yaptıkları çalışmada deneysel sıçan modelinde L-karnitin radyoterapiye bağlı miyelosupresyonu önlediğini göstermişlerdir. L-karnitin, MDA düzeylerini azaltıp SOD ve katalaz (CAT) enzim aktivitelerini arttırarak, yani antioksidan özelliği ile bu etkiyi oluşturdu gösterilmiştir (112).

Bu çalışmaların sonuçlarını da dikkate alırsak ALCAR'ın sisplatin miyelosupresyonunu azaltıcı etkisi; antioksidan, antiapoptotik ve antiinflamatuvar özellikleriyle ilişkili olabilir.

Sisplatin ilişkili toksik etkileri azaltmak ve önlemek üzere ALCAR kullanımı gündeme geldiğinde akla gelen bir diğer soru da ALCAR'nin sisplatin toksisitelerini azaltırken, sisplatinin antitümöral etkisini değiştirip değiştirmediği olmuştur. Yine bilim dalımızda daha önce yapılan bir araştırmada nöroblastom hücre dizilerinde ALCAR'nin, sisplatin ilişkili sitotoksik etkiyi önlediği ve bu etkiyi gösterirken antitümöral etkiyi değiştirmediği gösterilmiştir. ALCAR'ın nöroblastom hücrelerinde, sisplatinin indüklediği lipid peroksidasyon düzeylerini azaltarak bunu gerçekleştirdiği öne sürülmüştür (42). Bu açıdan literatüre bakıldığında bu konuda başka bir sonuca rastlanmamıştır. Ancak ALCAR koruyucu bir ajan olarak önerilmeden önce farklı tümörlerde asetil L karnitin, sisplatin ilişkili antitümöral etkiyi değiştirip değiştirmediğini gösterir başka çalışmalara ihtiyaç vardır.

YORUM:

Bu araştırmada sıçanlarda sisplatin verilerek oluşturulan deneysel miyelosupresyon modellerinde, asetil L-karnitinin sisplatin ilişkili kemik iliği toksisitesini azalttığı gösterilmiştir. Asetil L-karnitinin bu koruyucu etkisinin molekülün antiapoptotik, antioksidan, antiinflamatuvar özellikleriyle ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Ancak ALCAR'nin kemik iliği baskılanmasını önleyici etki mekanizmalarını göstermek üzere daha ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR:

1- Serum fizyolojik ve asetil L-karnitin uygulanan iki grup karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde; gerek kemik iliği sellülariteleri gerekse kemik iliğinin mikroskobik değerlendirmesinde miyeloid, eritroid ve lenfositler seri elemanlarının yüzde oranları arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bu da sıçanlarda tek başına asetil L-karnitin uygulamasının kemik iliği üzerine mielosupresif etkisinin olmadığını göstermiştir.

2- Tek başına sisplatin uygulanan grupta ve ALCAR+ Sisplatin uygulanan grupta, kontrol ve ALCAR gruplarına göre kemik iliği sellülaritesi belirgin derecede azalmış bulunmuştur. Bu bulgu sıçanlarda 8mg/kg dozda sisplatin uygulamasının 10. gününde mielosupresif etkinin ortaya çıktığını göstermiştir.

3- Tek başına sisplatin uygulanan grup ile ALCAR+Sisplatin uygulanan grup karşılaştırıldığında; ALCAR+Sisplatin uygulanan grupta kemik iliği sellüaritesinin anlamlı olarak daha az derecede azaldığı görülmüştür. Bu bulgu sisplatinin kemik iliği toksisitesini ALCAR' nin azalttığını, koruyucu etki yaptığını göstermiştir.

4- Tek başına sisplatin uygulanan grup ile ALCAR+Sisplatin uygulanan gruplarda mielosupresyon; yani her üç seriye ait hücrelerde ve megakaryositlerde azalma dikkati çekmiştir. Mielosupresyona bağlı olarak miyeloid ve lenfosit serilerde yüzde olarak düşüklük ve rölatif olarak eritroid seride yüzde olarak yükseklik saptanmıştır. Tek başına sisplatin uygulanan grup ile ALCAR+Sisplatin uygulanan grup karşılaştırıldığında kemik iliğinde her üç serideki etkilenmenin ALCAR+Sisplatin grubunda, sisplatin uygulanan gruba göre anlamlı olarak daha az olduğu gösterilmiştir. Bu bulgu sisplatinin kemik iliği toksisitesini ALCAR' nin azalttığını, koruyucu etki yaptığını göstermiştir.

5- Kemik iliği imprint örneklerinde kemoterapiye bağlı hücresel değişiklikler değerlendirildiğinde sadece sisplatin uygulanan grupta orta ve çok derecelerde akut hücresel değişiklikler görülürken; ALCAR sonrası sisplatin uygulanan grupta daha ağırlıklı olarak az derecede hücresel etkilenme saptanmıştır. Hematoksilen eozin ile boyalı kemik iliği biyopsisi doku blokları; sellülarite, kemik iliği elemanlarının kompozisyonları, matürasyon, fibrosis, nekroz, kanama, adipoz doku oranı yönünden değerlendirildiğinde yine sadece sisplatin uygulanan grupta maturasyon duraklaması, fibrozis ve nekroz; ALCAR sonrası sisplatin uygulanan gruba göre daha yoğun olarak görülmüştür. Yine bu bulgular da ALCAR'ın sisplatin toksisitesindeki koruyucu etkisini desteklemektedir.

7. KAYNAKLAR:

1. Pizzo PA, Poplack DG. Principles and Practice of Pediatric Oncology. Fifth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 2006.
2. Vincent T. Devita, Jr. Samuel Heilman, Steven A. Rosenberg. Cancer. Principles and Practice of Oncology. 6 th edition, 2001.
3. Alp Özkan. Pediatrik Onkoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul; 2009.
4. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. Cancer Treat Rev 2007; 33: 9-23.
5. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. Oncogene 2003; 22: 7265-7279.
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. Kelland L. The resurgence of platinum based cancer chemotherapy. Nat Rev Cancer 2007; 7: 573-584.
10. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. Nat Rev Drug Discov 2005; 4: 307-320.
11. Nishikawa M, Nagatomi H, Chang BJ, Sato E, Inoue M. Targeting superoxide dismutase to renal proximal tubule cells inhibits mitochondrial injury and renal dysfunction induced by cisplatin. Arch Biochem Biophys 2001 Mar; 387 (1): 78–84.
12. Rosenberg B. Cisplatin: its history and possible mechanism of action . Cisplatin – Current status and new developments, in Prestayko AW, Crooke ST, Carter SK (eds) : New York , Academic,1980; p 9-20.
13. Somani SM, Husain K, Whitworth C et al. Dose dependent protection by lipoic acid against cisplatin induced nephrotoxicity in rats: antioxidant defense system. Pharmacol Toxicol 2000; 86: 234-241.
14. Hartman JT, Knop S, Fels LM et al. The use of reduced doses of amifostine to ameliorate nephrotoxicity of cisplatin ifosfamide based chemotherapy in patients with solid tumors. Anticancer Drugs 2000; 11: 1-6.

15. Santos NAG, Catao CS, Martins NM et al. Cisplatin induced neprotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Arch Toxicol.* 2007 Jul; 81(7): 495-504.
16. Sayed-Ahmed MM, Eissa MA, Kenawy SA et al. Progression of cisplatin-induced nephrotoxicity in a carnitine depleted rat model. *Chemotherapy* 2004; 50(4): 162-170.
17. 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.
18. Şener G, Satiroğlu H, Kabasakal L, et al. The protective effect of melatonin on cisplatin nephrotoxicity. *Fundam Clin Pharmacol* 2000; 14: 553-560.
19. Monograph. L-carnitine. *Altern Med Rev* 2005;10: 42-50.
20. 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.
21. Bremer J. Carnitine-metabolism and functions. *Physiol Rev* 1983; 63: 1420-1480.
22. Stieger B, O'Neil B, Krähenbühl S. Characterization of L-carnitine transport by rat kidney brush-border-membrane vesicles. *Biochem J* 1995; 309: 643-647.
23. 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.
24. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Principles of biochemistry*. 2nd ed. New York; Worth Publishers; 1993.
25. Chen W, Huang YC, Shultz TD, et al. Urinary, plasma, and erythrocyte carnitine concentrations during transition to a lactoovovegetarian diet with vitamin B-6 depletion and repletion in young adult women. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 221-230.
26. Arockia Rani PJ, Panneerselvam C. Carnitine as a free radical scavenger in aging. *Exp Gerontol* 2001; 36: 1713-1726.
27. 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.
28. Brown GC. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 351-369.

29. Kremser K, Stangl H, Pahan K, et al. Nitric oxide regulates peroxisomal enzyme activities. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 763-774.
30. Arrigoni-Martelli E, Caso V. Carnitine protects mitochondria and removes toxic acyls from xenobiotics. *Drugs Exp Clin Res* 2001; 27: 27-49.
31. Binienda ZK, Ali SF. Neuroprotective role of L-carnitine in the 3-nitropropionic acid induced neurotoxicity. *Toxicol Lett* 2001; 125: 67-73.
32. Gülçin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* 2006; 217: 213-220.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Arafa HM. Carnitine deficiency aggravates carboplatin nephropathy through deterioration of energy status, oxidant/anti-oxidant balance, and inflammatory endocoids. *Toxicology* 2008; 254: 51-60.
38. Al-Majed AA. Carnitine deficiency provokes cisplatin-induced hepatotoxicity in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007;100: 145-150.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. Altun ZS, Güneş D, Aktaş S, Erbayraktar Z, Olgun N. Protective Effects of Acetyl-L-Carnitine on Cisplatin Cytotoxicity and Oxidative Stress in Neuroblastoma. *Neurochem Res* 2010; 35: 437-443.

43. Tufekci O, Gunes D, Ozoğul C, Kolatan E, Altun Z, Yilmaz O, Aktaş S, Erbayraktar Z, Kirkim G, Mutafoğlu K, Soylu A, Serbetçioğlu B, Güneri EA, Olgun N. Evaluation of the effect of acetyl L-carnitine on experimental cisplatin nephrotoxicity. *Chemotherapy*. 2009;55(6):451-459.
44. Bianchi G, Vitali G, Caraceni A et al. Symptomatic and neurophysiological responses of paclitaxel or cisplatin-induced neuropathy to oral acetyl-L-carnitine. *European Journal of Cancer* 2005; 41: 1746–1750.
45. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Nov 8;91(23): 10771-10778.
46. Abd-Allah AR, Al-Majed AA, Al-Yahya AA, et al. L-Carnitine halts apoptosis and myelosuppression induced by carboplatin in rat bone marrow cell cultures. *Arch Toxicol* 2005; 79: 406-413.
47. Gunes D, Kırkım G, Demiral P, Mutafoğlu K, Serbetcioglu B, Olgun N. Platinum-induced ototoxicity in children and adolescents with cancer. *Int Adu Otol* 2009; 5: (3) 345-355.
48. Pasetto LM, D'Andrea MR, Brandes AA, Rossi E, Monfardini S. The development of platinum compounds and their possible combination. *Clinical Reviews in Oncology Hematology* 2006; 60: 59-75.
49. Lippert B. *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, WileyVCH, Zurich 1999; 3-183.
50. 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.
51. <http://www.cancercare.on.ca/pdfdrugs/CISPLATI.pdf>.
52. Chabner BA, Ryan DP, Paz-Ares L, Carbonero RG, Calabresi P. Antineoplastic Agents. In: Hardman JG, Limbird LE (Eds.). *The Pharmacological basis of therapeutics*. 10 th ed. New York: Mc Graw Hill Co; 2001. p1432-1434.
53. Kirkwood JM, Lotze MT, Yasko JM. *Current cancer therapeutics*. Second edition, 1996.
54. Kuhn JG. Chemotherapy-associated hematopoietic toxicity. *Am J Health Syst Pharm*. 2002; 59(15 Suppl 4): 4-7.

55. Bodey GP, Buckley M, Sathe YS, Freireich EJ. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med* 1966; 64(2): 328-340.
56. Gaur AH, Flynn PM, Shenep JL. Optimum management of pediatric patients with fever and neutropenia. *Indian J Pediatr.* 2004 Sep; 71(9): 825-835.
57. Sung L. Preventing Invasive Bacterial Infection in Neutropenic Patients with Cancer. In Agarwal BR, Perilongo G, Wacker P, Eden T, eds. *SIOP Educational Book 2006*, 38th Congress of the International Society of Pediatric Oncology, Geneva, Switzerland, September 17-21, 2006. p.113-118.
58. Schwartzberg LS. Neutropenia: Etiology and Pathogenesis. *Clinical Cornerstone.* 2006; 8 [Suppl 5]: p. 5–11.
59. Schwartzberg LS. Neutropenia: Etiology and Pathogenesis. *Clinical Cornerstone.* 2006; 8 [Suppl 5]: p. 5–11.
60. Salama A, Schutz B, Kiefel V, et al. Immune mediated agranulocytosis related to drugs and their metabolites: Mode of sensitization and heterogeneity of antibodies. *Br J Haematol.* 1989; 72: 127–132.
61. Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP, Bow EJ, Brown AE, Calandra T, Feld R, Pizzo PA, Rolston KV, Shenep JL, Young LS. 2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis* 2002; 34(6): 730-751.
62. Yazıcı N, Kutluk T. Kanserli Çocukta Nötropenik Ateş. *Onkolojide Destek Tedaviler, Katkı Pediatri Dergisi* 2005 27: (1); 65-85.
63. Garelli S, Schieppati G, Banfi L, Meroni P. Neutrophil function during cyclic chemotherapy for cancer disease. *Tumori.* 1983 Oct 31; 69(5): 409-415.
64. Gandossini M, Souhami RL, Babbage J, Addison IE, Johnson AL, Berenbaum MC. Neutrophil function during chemotherapy for Hodgkin's disease. *Br J Cancer.* 1981; 44(6): 863-871.
65. Mendonca MA, Cunha FQ, Murta EF, Tavares-Murta BM. Failure of neutrophil chemotactic function in breast cancer patients treated with chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006 May; 57(5): 663-670.
66. Aapro MS, Cameron DA, Pettengell R, Bohlius J, Crawford J, Ellis M, Kearney N, Lyman GH, Tjan-Heijnen VC, Walewski J, Weber DC, Zielinski C. EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphomas and solid tumours. *Eur J Cancer* 2006; 42(15): 2433-2453.

67. Furukawa S, Saito H, Fukatsu K, Hashiguchi Y, Inaba T. Glutamine- Enhanced Bacterial Killing by Neutrophils From Postoperative Patients. *Nutrition* 1997; 13(10): 863-869.
68. Klastersky J, Zinner SH, Calandra T, Gaya H, Glauser MP, Meunier F, Rossi M, Schimpff SC, Tattersall M, Viscoli C. Empiric antimicrobial therapy for febrile granulocytopenic cancer patients: lessons from four EORTC trials. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1988;24 Suppl 1: p.35-45.
69. Uysal KM. Çocuk onkoloji hastalarında febril nötropenin antimikrobiyal tedavisinde ilkeler. Çetingül N, Kansoy S, editörler. Çocukluk Çağında Onkolojik Aciller ve Destek Sağaltımı. Bornova, İzmir; 2003. p.49-65.
70. Sarah W. Alexander, Thomas J. Walsh, Alison G. Freifeld, and Philip A. Pizzo Pizzo. Infectious Complications in Pediatric Cancer Patients. In: Philip A. Pizzo, David G. Poplack, eds. *Principles & Practice of Pediatric Oncology 4th Edition*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 2001 s. 1239-1285.
71. Riikonen P, Rahiala J, Salonvaara M, Perkkio M. Prophylactic administration of granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) after conventional chemotherapy in children with cancer. *Stem cells* 1995; 13: 289-294.
72. Kalmanti M, Lydaki E, Dimitriou H. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on chemotherapy-induced neutropenia in children with cancer. *Pediatr Hematol Oncol* 1994; 11: 147-155.
73. van Pelt LJ, de Craen AJ, Langeveld NE, Weening RS. Granulocyte-stimulating factor (GM-CSF) ameliorates chemotherapy-induced neutropenia in children with solid tumors. *Pediatr Hematol Oncol* 1997; 14: 539-545.
74. Wexler LH, Weaver-McClure L, Steinberg SM, et al. Randomized trial of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pediatric patients receiving intensive myelosuppressive chemotherapy. *J Clin Oncol* 1996; 14: 901-910.
75. Burdach SE, Muschenich M, Josephs W, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for prevention of neutropenia and infections in children and adolescents with solid tumors. Results of a prospective randomized study. *Cancer* 1995; 76: 510-516.
76. Saarinen UM, Hovi L, Riikonen P, Pihkala J, Juvonen E. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in children with chemotherapy-induced neutropenia. *Med Pediatr Oncol* 1992; 20: 489-496.

77. Pacifici EH, McLeod LL, Sevanian A. Lipid hydroperoxide-induced peroxidation and turnover of endothelial cell phospholipids. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 297-309.
78. Madesh M, Balasubramanian KA. Activation of liver mitochondrial phospholipase A2 by superoxide. *Arch Biochem Biophys* 1997; 15: 187-192.
79. Sultan A, Sokolove PM. Free fatty acid effects on mitochondrial permeability: an overview. *Arch Biochem Biophys* 2001; 386: 52-61.
80. 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.
81. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1312.
82. 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: 2124-2132.
83. Schönfeld P, Bohnensack R. Fatty acid-promoted mitochondrial permeability transition by membrane depolarization and binding to the ADP/ATP carrier. *FEBS Lett* 1997; 420: 167-170.
84. 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.
85. 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.
86. Izgüt-Uysal VN, Ağaç A, Derin N. Effect of L-carnitine on carrageenan-induced inflammation in aged rats. *Gerontology* 2003; 49: 287-292.
87. 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.
88. 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.
89. 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.
90. 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.

91. 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.
92. Ahmad S. L-carnitine in dialysis patients. *Semin Dial* 2000; 14: 209-217.
93. 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.
94. 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.
95. Kavukcu S, Turkmen M, Salman S, Onvural B, Oktay G, Karaman O, Cevik NT. The effects of L-carnitine on respiratory function tests in children undergoing chronic hemodialysis. *Turk J Pediatr* 1998 Jan-Mar; 40 (1): 79-84.
96. Furlong JH. Acetyl-L-carnitine: metabolism and applications in clinical practice. *Altern Med Rev* 1996; 1: 85-93.
97. Hathcock JN, Shao A. Risk assessment for carnitine. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2006; 46: 23-28.
98. 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.
99. Graziano F, Bissoni 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.
100. 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.
101. 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.
102. Malik B, Stillman M. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Curr Pain Headache Rep* 2008; 12: 165-174.
103. Peluso G, Barbarisi A, Savica V, et al. Carnitine: an osmolyte that plays a metabolic role. *J Cell Biochem* 2000; 80: 1-10.
104. 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.

105. 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.
106. Abd-Allah AR, Al-Majed AA, Al-Yahya AA, et al. L-Carnitine halts apoptosis and myelosuppression induced by carboplatin in rat bone marrow cell cultures. *Arch Toxicol* 2005; 79: 406-413.
107. Hagen TM, Liu J, Lykkesfeldt T, Wehrt CM, Ingersoll R, Vinarsky V, Bartholomew JC, Ames BN (2002) Feeding acetyl-L-carnitine and lipoic acid to old rats significantly improves metabolic function while decreasing oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(4): 1870–1875.
108. Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, Utsumi K (2003) Cross talk of nitric oxide, oxygen radicals, and superoxide dismutase regulates the energy metabolism and cell death and determines the fates of aerobic life. *Antioxid Redox Signal* 5(4): 475–484.
109. Mosca L, Marcellini S, Perluigi M, Mastroiacovo P, Moretti S, Famularo G, Peluso I, Santini G, De Simone C (2002) Modulation of apoptosis and improved redox metabolism with the use of a new antioxidant formula. *Biochem Pharmacol* 63(7): 1305–1314.
110. Athanassakis I, Mouratidou M, Sakka P, Evangeliou A, Spilioti M, Vassiliadis S (2001) L-carnitine modifies the humoral immune response in mice after in vitro or in vivo treatment. *Int Immunopharmacol* 1(9–10): 1813–1822.
111. Karlic H, Lohninger A, Laschan C, Alexander L, Bohmer F, Huemer M, Guthann E, Rapdold E, Pfeilstocher M (2003) Down regulation of carnitine acyltransferase and organic cation transport OCTN2 in mononuclear cells in healthy elderly and patients with myelodysplastic syndrome. *J Mol Med* 81(7): 435–442.
112. Uçüncü H, Ertekin MV, Yörük O, Sezen O, Ozkan A, Erdoğan F, Kiziltunç A, Gündoğdu C. Vitamin E and L-carnitine, separately or in combination, in the prevention of radiation-induced oral mucositis and myelosuppression: a controlled study in a rat model. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2006 Mar;47(1): 91-102.
113. Gunes D, Kirkim G, , Kolatan E, Güneri EA, Ozoğul C, Altun Z, Serbetçioğlu B, Yilmaz O, Aktaş S, Mutafoğlu K, Tufekci O, Erbayraktar Z, Olgun N. Evaluation of the effect of acetyl L-carnitine on experimental cisplatin ototoxicity and neurotoxicity. *Chemotherapy* 2011; 57: 186-194.
114. Huang X, Whitworth C, Rybak LP. Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects against cisplatin-induced ototoxicity in rats. *Otol. Neurotol* 2007 Sep; 28(6): 828-833.

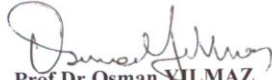
115. Rybak LP, Husain K, Whitworth C, Somani SM. Dose dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced ototoxicity in rats: antioxidant defense system. *Toxicol Sci* 1999 Feb; 47(2): 195-232.
116. Masuda Y, Inoue M, Miyata A, Mizuno S, Nanba H. Maitake β -glucan enhances therapeutic effect and reduces myelosuppression and nephrotoxicity of cisplatin in mice. *International Immunopharmacology* 9 (2009): 620-626.
117. Antunes LM, Araújo MC, Darin JD, Bianchi ML. Effects of antioxidants curcumin and vitamin C on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rat bone marrow cells. *Mutat Res* 2000; 465: 131-137.
118. Patrick E, Sharp, Maiec. *The laboratuar rat*. La Regina 1998, p.16.

Toplantı No : 12/05/2010
Toplantı Tarihi : 05 Mart 2010

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

66/2009 Protokol No'lu; Çocuk sağlığı ve Hast. Anabilim Dalı Başkanlığı doktorlarından Dr.Deniz ÇAKIR'ın yürütücüsü olduğu " Asetil L-karnetinin sisplatin myelosupresif etkisini değiştirici rolünün değerlendirilmesi" isimli projede; araştırmacının talebi uygun bulunmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.


Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik
Kurul Başkanı

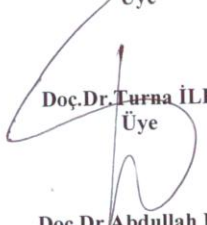
Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN
Başkan Yardımcısı

Prof.Dr.Alper SOYLU
Üye (top.katılmadı)


Prof.Dr.Ayşe GELAL
Üye

Prof.Dr.Selman SÖKMEN
Üye

Prof.Dr.O.Nejat SARIOSMANOĞLU
Üye


Doç.Dr.Turna İLKUNUR
Üye

Doç.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK
Üye

Doç.Dr.Abdullah KUMRAL
Üye (top.katılmadı)

Doç.Dr.A.Hüseyin BASKIN
Üye (top.katılmadı)

Doç.Dr.Tonay İNCEBOZ
Üye

Vtr.Hekim Adnan SERPEN
Üye


Ayşe Nur BALIN
Üye

Doç.Dr.Şermin GENC
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.