Cumhuriyet Tıp Derg 2013; 35: 166-171
Cumhuriyet Med J 2013; 35: 166-171

Orijinal araştırma-Original research *http://dx.doi.org/10.7197/1305-0028.1968*

Asetil L-karnitin ve doksorubisinin rat çizgili kası üzerine etkilerinin araştırılması

Investigation of the effects of Acetyl L-carnitine and doxorubicin on rats' striated muscle

Hülya Tosun Yıldırım, Gülden Diniz*, Safiye Aktaş, Nur Olgun

Patoloji Laboratuvarı (Dr. H. T. Yıldırım, Doç. Dr. G. Diniz), İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastanesi, TR-35210 İzmir, Onkoloji Enstitüsü (Prof. Dr. S. Aktaş, Prof. Dr. N. Olgun) Dokuz Eylül Üniversitesi, TR-35210 İzmir

Özet

Amaç. Doksorubisin, ilacın birikmiş dozuna bağlı olarak öngörülemeyen kardiotoksisiteye yol açan, yaygın olarak kullanılan bir kanser ilacıdır. Önceki çalışmalar doxorubicinin bu yan etkisinin L-karnitin ile azaldığını göstermiştir. Ancak sadece az sayıda çalışmada doksorubisinin iskelet kası üzerine toksik etkisi ayrıntılı olarak irdelenmiştir. Bu çalışmanın amacı, doksorubisin ve asetil L-karnitinin sıçan çizgili kasındaki etkilerinin araştırılmasıdır. **Yöntem.** Çalışma, ağırlıkları 200-300 g arasında değişen erişkin erkek Wistar- Albino şıçanlar üzerinde gerçekleştirildi. Sıçanlar kontrol, doksorubisin, ALKAR ve doksorubisin + ALKAR olmak üzere 4 gruba ayrıldı. İlk grup (n=7) kontrol grubuydu. İkinci ve dördüncü gruba (n=6/ n=6) intraperitoneal doksorubusin verildi (kümülatif doz 15mg/kg). Üçüncü ve dördüncü gruba (n=7/ n=6) 10 gün süreyle intraperitoneal ALKAR verildi (300 mg/kg/gün). Tüm hayvanlar çalışmanın 10. günü sakrifiye edildi ve kuadriseps kasından kas biyopsi örnekleri alındı. Tüm örnekler dondurulduu ve kriyostatla 8-mikronluk kesitler yapıldı. Tüm preparatlar rutin hematoksilen eozin boyasıyla, kombine COX-SDH enzim boyalarıyla ve histokimyasal modifiye Gomori trikrom, PAS ve oil red O boyalarıyla boyandı. Myofiber tip ayrımı için fast myozin antikoru kullanıldı. **Bulgular.** Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, kas fiber tip dağılımı, lipit ve glikojen depolanması ile mitokondrial fonksiyonlar açısından doksorubisin veya ALKAR grubunda anlamlı fark bulunmadı. **Tartışma.** Bu çalışma doksorubisin veya ALKAR tedavisinin kalp-dışı çizgili kas dokusunda önemli incinmeye etken olmadığını göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Doksorubisin, ALKAR, iskelet kası, sıçan

Abstract

Aim. Doxorubicin is a widely used anticancer agent which can cause an unpredictable cardiac toxicity increases with its cumulative dose. Previous studies demonstrated that side effects of doxorubicin can be reduced by L-carnitine. However in only a few studies, toxic effects of doxorubicin on skeletal muscles was investigated widely. The objective of present study was to investigate the effects of doxorubicin and Acetyl L-carnitine on skeletal muscles in rats. **Method.** The study was performed on adult male Wistar-Albino rats which are 200-300 gr in weight. Rats were divided to four groups as control, doxorubicine, ALCAR and ALCAR + doxorubicine. The first group (n=7) was the control. The second and forth groups (n=6/n=6) received intraperitoneal doxorubicine (cumulative dose 15 mg/kg). Third and forth groups (n=7/n=6) received intraperitoneal ALCAR (300 mg/kg/day) and it was continued 10 days. All animals in each group were sacrificed on tenth day of the study and muscle biopsy samples were taken from quadriceps muscles. All samples were frozen and 8-micron sections were cut using cryostat. Slides were stained with routine hematoxylin eosin, enzyme histochemically combined COX and SDH, histochemically with modified Gomori's trichrome, PAS and oil red O. Fast myosin antibody was used for discriminating myofiber type. **Results.** No significant differences were found in muscle fiber type distribution, lipid and glucogen accumulation, or mitocondrial function in Doxorubicine or ALCAR groups compared with control group. **Conclusion.** This study indicated that treatment with doxorubicine or ALCAR cannot produce significant injury to non-cardiac striated muscle tissue.

Keywords: Doxorubicin, ALCAR, skeletal muscle, rat

Geliş tarihi/Received: 30 Ocak 2013; **Kabul tarihi/Accepted:** 05 Haziran 2013

***İletişim adresi:**

Dr.Gülden Diniz, Patoloji Laboratuvarı, İzmir Dr.Behçet Uz Çocuk Hastanesi, TR-35210 İzmir. E-posta: agdiniz@gmail.com

Giriş

Antrasiklinler antineoplastik antibiyotik grubundadır ve klinik olarak kullanılan anti-tümör kinonların en büyük sınıfını oluşturmaktadır [1-3]. Doksorubisin, ilk tedaviye giren ve grubun halen en yaygın kullanılan üyesidir [4]. Antrasiklinler, topoizomerazlar ile etkileşerek DNA zincir kırılmalarına neden olmakta, DNA ve RNA polimerazların fonksiyonlarını bozmakta, böylece DNA, RNA ve protein sentezlerini engelleyerek apopitotik hücre ölümüne neden olmaktadır [5, 6]. Ayrıca antrasiklinler demir ve özellikle kalpte oksimiyoglobin ile etkileşerek serbest radikaller oluşturabilmektedirler [7]. Sonuçta bu etki mekanizmaları, aynı zamanda ilacın toksisitesine yol açmaktadır. Kardiotoksisite, doksorubisinin doz sınırlayıcı en önemli yan etkisidir ve anti-tümöral etki ile kardiotoksik etkinin patogenezi farklıdır. Anti-tümöral etkide hedef yapı DNA iken, kardiyotoksisiteden sorumlu mekanizma serbest radikal oluşumunun neden olduğu hücresel hasardır [1-3, 8, 9].

L-karnitin lizin ve metiyonin amino asitlerinden sentezlenen; mitokondri fonksiyonlarında önemli rol oynayan ve nöroprotektif, antioksidan, serbest radikal bağlayıcı etkileri olan vitamin benzeri bir maddedir. Ayrıca L-karnitinin oksidatif stres ve reaktif oksijen radikalleri üzerinde de önemli etkileri olduğu bilinmektedir [10, 11]. Kalp, iskelet kası, karaciğer, böbrekler ve epididimiste spesifik transport sistemleri bulunan karnitin bu dokular içinde yoğunlaşır ve özellikle kalp ve iskelet kasında depolanır [12]. Asetil L-karnitin (ALKAR), L-karnitinin kısa zincirli ester türevi olup vücutta en çok bulunan açil karnitin türüdür [13]. ALKAR, yağ asidi oksidasyonu sırasında asetil KoA'nın mitokondriye geçişini hızlandırır, asetilkolin üretimine katkıda bulunur ve protein ile fosfolipid sentezini uyarır [14].

Antrasiklinlerin en iyi bilinen ve en çok araştırılmış olan yan etkisi akut ve kronik kardiyotoksik etkidir. Ancak, doksorubisinin çizgili kas üzerine etkilerini araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır [14-16]. Bu çalışmada; mutlak kardiyotoksik dozda intraperitoneal doksorubisinle birlikte ALKAR uygulanan sıçanlarda; doksorubisinin çizgili kas üzerine ışık mikroskopik düzeyde incitici etkisi olup olmadığı ve olası etkisine karşı ALKAR'ın koruyucu rol oynayıp oynamayacağının histopatolojik olarak değerlendirilmesi amaçlandı.

Gereç ve yöntem

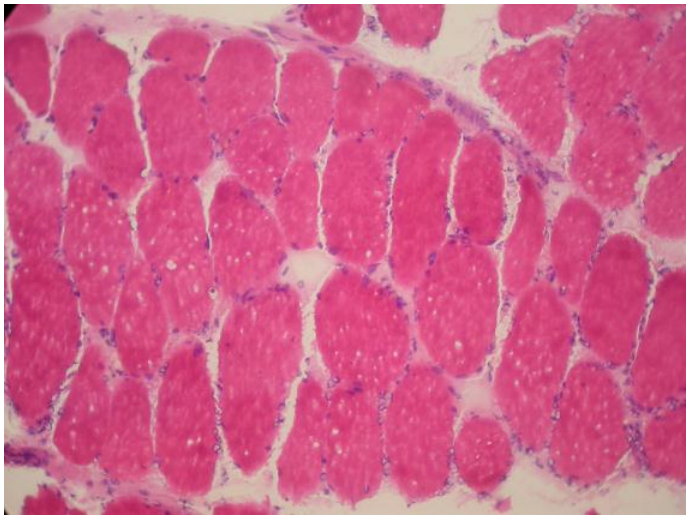
Her biri altı-sekiz haftalık, ortalama ağırlıkları 200-300 g olan, iç besleme yetiştirilen, 26 adet Wistar türü Albino suşu erkek sıçan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından elde edildi. Çalışma için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 02.04.2010 tarihinde etik kurul onayı alındı. Sıçanlar rastgele seçilerek her biri altı veya yedi sıçan içeren dört grup oluşturuldu. Grup I (n=7) serum fizyolojik uygulanan sıçan grubu, Grup II (n=6) doksorubisin uygulanan sıçan grubu, Grup III (n=7) ALKAR uygulanan sıçan grubu, Grup IV (n=6) ALKAR + doksorubisin uygulanan sıçan grubu olarak belirlendi.

Doxorubisin (10mg/5m, IV solusyon, Farmar ilaç), kardiotoksik etki oluşturacak dozda (2mg/ml konsantrasyonunda 15mg/kg), toz halindeki ALKAR (Sigma) serum fizyolojik içinde çözülerek (140 mg/mL konsantrasyonda) 300mg/kg/dozda intraperitoneal uygulandı. Kontrol grubuna eşit hacimde serum fizyolojik solüsyonu yine intraperitoneal yolla verildi.

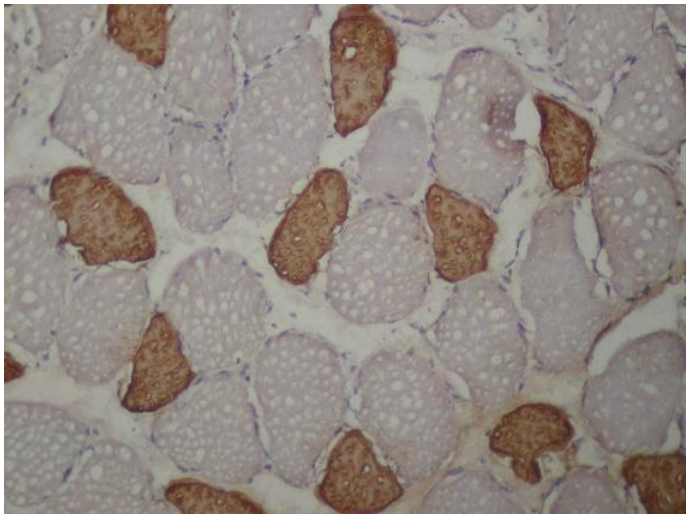
Doksorubisin, ALKAR veya eşdeğer hacimde serum fizyolojik uygulamalarından sonra, izlemin onuncu gününde sıçanlar feda edildi. Bilateral kuadriseps kasları örneklendi. Çıkartılan iskelet kası örnekleri sıvı nitrojende dondurularak kriyostat yardımıyla 8 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitlere Hematoksilen Eozin (HE), Modifiye Gomori trikrom, Periodik asit shiff (PAS), Oil Red O özel boyaları ile kombine Sitokrom C oksidaz (COX) - Süksinat dehidrogenaz (SDH) enzim boyaları uygulandı. Myofiber tip ayrımı yapabilmek için immunohistokimyasal Fast Myozin boyaması (Novo Castra, Anti -Myosin Heavy Chain Fast antikoru) uygulandı. Preperatlar, ışık mikroskobu ile grupları bilmeyen 2 ayrı patolog tarafından incelendi. Işık mikroskopu ile myofiber morfolojisi, kas fiber tip dağılımı, fibrozis, lipid ve glikojen birikimi yanısıra mitokondrial fonksiyonlar değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirmeler Windows için olan SPSS 9.05 istatistik programı ile yapıldı. Grupların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı, $p< 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

HE ile boyanan kesitlerde kontrol grubunda kuadriseps kasları histolojik olarak normal bulundu. Aynı zamanda doksorubisin uygulanan sıçan grubu, ALKAR uygulanan sıçan grubu ve ALKAR + doksorubisin uygulanan gruplarda da miyofibrillerin morfolojisi benzer görünümdeydi (Resim 1). Gomori trikrom, PAS ve Oil Red O özel boyalarında kontrol grubuyla kıyaslandığında diğer 3 grupta fibrozis, lipid ve glikojen birikimi tespit edilmedi. Miyofiber tip dağılımını göstermek amacıyla uygulanan fast myozin immunohistokimyasal çalışmasında sıçan kaslarında hem kontrol grubunda hem de diğer 3 grupta tip1/tip 2 dağılımı tip 1 lehine olmakla birlikte (Resim 2) gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark tespit edilmedi ($p=0,781$). Aynı zamanda gruplar arasında uygulanan enzim boyamalarında mitokondrial fonksiyonlarda istatistiksel anlamlı fark saptanmadı.



Resim 1. Kontrol grubunda olağan görünümde myofiberler (HE X400).



Resim 2. Fast myozinle tip 1 myofiber hakimiyeti (DABX400).

Tartışma

Hücre içinde birkaç farklı yolakla sitotoksik etki oluşturan doksorubisin, birçok malignitede etkili bir antineoplastik ajan olmasına rağmen kümülatif doza bağlı olarak gelişen kardiyotoksik yan etkisi, kullanımını kısıtlar [2, 4-6]. Doksorubisine bağlı olarak meydana gelen kardiyotoksisitenin patogenezi tam açıklanamamakla birlikte, bu toksik yan etkiden serbest oksijen radikallerinin hücrelerde yol açtığı hasarın sorumlu olduğu bilinmektedir [17-18]. Bazı çalışmalarda doksorubisine bağlı olarak oluşan oksidatif stresin vitamin E, aspirin, melatonin, triptofan, pentoksifilin, N-asetil sistein, deferipion gibi antioksidanlarla ve desferroksamin, yeni demir şelatörleri gibi maddelerle azaltılabileceği bildirilmektedir [19-21]. Zeidan ve ark. [22] ratlarda doksorubisin ile kalpte ve karaciğerde ortaya çıkan hasarı elektron mikroskopisiyle incelemişler; miyokardiyal hücre kaybı, parçalanma, mitokondriyal şişme ve yoğunlaşma tespit etmişlerdir. Bu çalışmada yine bir antioksidan olan L-karnitinin koruyucu etkisini de sınanmıştır. Doksorubisin verilen grupta ortaya çıkan bu bulguların, "L-karnitin+doksorubisin" grubunda olmadığını, dolayısıyla L-karnitinin ağır kardiyomiyopati bulgularını gerilettiğini göstermişlerdir [22]. Ancak yazarlar kalp kası dışı çizgili kas bulgularını göz ardı etmişlerdir. Salt bu çalışmada değil literatürdeki bir çok araştırma kalp kası ile sınırlı olup; doksorubisin kümülatif doz uygulamalarında çizgili kas üzerine etkisi araştıran çalışma sayısı sınırlıdır [14-16]. Çalışmamızda mutlak toksik dozda doksorubisin uygulanan sıçanlarda, kalp kasının aksine çizgili kasda belirgin kas incinme bulgusu saptanmamıştır. Bu sonucun, çizgili kas ve kalp kasının hücre düzeyinde metabolik farklılıklarına bağlanabileceği düşünülmüştür.

Doksorubisine bağlı kardiak dokudaki hasarlanma; myofibriller, nükleus, mitokondri, T-tubul membran sistemi, sarkoplazmik retikulum ve intersellüler bağlantıları içeren kompleks bir durumdur [23]. Temelde serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına bağlı oluşan doksorubisin toksisitesinde, kalp kasında ışık mikroskopu ile tespit edilebilen morfolojik bulgular; miyokardiyal fibrillerde hipertrofi, ödem, vakuolizasyon, interstisyel ödem, hemoraji, myofibriler düzensizlik ve nekrozdur [15, 16, 24]. Sonuçta, doksorubisin uygulanan ratlarda, hem myokardial kalsiyum transport hem de mitokondrial elektron transport zincirinin kontrolündeki değişikliklerin histolojik yansıması olarak sarkoplazmik retikulumda vakuoler dejenerasyon, kardiak mitokondrilerde şişme, interstisyel ödem ve fokal myoliz görülmektedir [15, 16]. Kalp kasındaki bulgularla kıyaslandığında, kalp dışı çizgili kas dokusunda bulgular daha hafif seyredebilmektedir [15]. Çalışmamızda incelenen kuadriseps kas dokularında, kalp kasında bildirilen vakuoler değişiklikler, ödem ve myoliz gözlenmediği gibi, enzim

histokimyasal incelemelerde mitokondrial fonksiyon kaybı da yoktur. Benzer şekilde çalışmamızda doksorubisinin iskelet kası myofiber tiplerine özel toksik etkisinin de bulunmadığı gözlenmiştir.

Doksorubisinin toksik etkisinin hedef dokuda ulaştığı konsantrasyona bağlı olduğu bildirilmektedir. Doroshow ve ark. [15] doksorubisin ilişkili kalp kası hasarlanmasında ilacın dokudaki konsantrasyonunun önemli olduğunu vurgulamışlardır. Kalp, diyafram ve gastreknemius çizgili kas dokusu üzerinde doksorubisinin etkisinin araştırıldığı çalışmalarında, intraperitoneal uygulamada direk ilaç dozu seviyesi ile ilişkili olarak sırasıyla diyafram, kalp kası ve çizgili kas dokusunda dozla paralel yapısal bozukluklar görüldüğü belirtilmiştir. Sonuçta da doksorubisin gastreknemius kasındaki konsantrasyonunun, kalp kasındakinin sadece %17'sine ulaştığını saptamışlardır [15]. Bu çalışmada mutlak kardiyotoksik dozda doksorubisin verilen sıçanlarda çizgili kas hasarının olmaması, ilacın kuadriseps kasında da gastroknemius kası benzeri toksik konsantrasyona ulaşmamış olmasına bağlanabilir [15].

Çalışmamızda; mutlak kardiyotoksik dozda intraperitoneal doksorubisinle birlikte ALKAR uygulanan sıçanlarda; doksorubisinin kalp kası dışı çizgili kas üzerine ışık mikroskopik düzeyde incitici etkisi olmadığı ve antioksidan ALKAR verilen sıçan kaslarının histopatolojik incelemelerinde de farklılık bulunmadığı gözlendi. Söz konusu bulguların iskelet kası ve kalp kasının yapısal ve fizyopatolojik farklılığına veya ilacın iki dokudaki farklı konsantrasyonda bağlı olabileceği düşünülmekle birlikte, bu sonucun geniş serilerle desteklenmesi gerekir.

Kaynaklar

1. Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. Mol Cell Biochem 2000; 207: 77-86.
2. Kaldır HT, Tatlı E, Turgut B, Vural Ö. Doxorubicin induced cardiotoxicity. Türkiye Klinikleri J Cardiol 2002; 15: 416-21.
3. Yavaşoğlu İ, Kadıköylü G, Bolaman Z. Antrasiklinler ve Bradikardi. Türkiye Klinikleri J Cardiovasc Sci 2008; 20: 30-1.
4. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. Pharmacol Rev 2004; 56: 185-229.
5. Müller I, Niethammer D, Bruchelt G. Anthracycline-derived chemotherapeutics in apoptosis and free radical cytotoxicity (Review).Int J Mol Med 1998; 1: 491-4.
6. Cutts SM, Nudelman A, Rephaeli A, Phillips DR. The Power and Potential of Doxorubicin-DNA Adducts. IUBMB Life 2005; 57: 73-81.
7. Mordente A, Meucci E, Martorana GE, Giardina B, Minotti G. Human Heart Cytosolic Reductases and Anthracycline Cardiotoxicity. IUBMB Life 2001; 52: 83-8.
8. Menna P, Salvatorelli E, Minotti G. Cardiotoxicity of Antitumor Drugs. Chem Res Toxicol 2008; 21: 978-89.
9. Hale JP, Lewis IJ. Anthracyclines: cardiotoxicity and its prevention. Arch Dis Child 1994; 71: 457-62.
10. Monograph. L-carnitine. Altern Med Rev 2005; 10: 42-50.
11. Chao HH, Liu JC, Hong HJ, Lin JW, Chen CH, Cheng TH. L-Carnitine reduces doxorubicin-induced apoptosis through a prostacyclin-mediated pathway in neonatal rat cardiomyocytes. Int J Cardiol 2011; 146: 145-52.
12. Acetyl-L-Carnitine. Altern Med Rev 1999; 4: 438-41.
13. Calabrese V, Giuffrida Stella AM, Calvani M, Butterfield DA.Acetylcarnitine and cellular stress response: roles in nutritional redox homeostasis and regulation of longevity genes. J Nutr Biochem 2006; 17: 73-88.
14. Smuder AJ, Kavazis AN, Min K, Powers SK. Exercise protects against doxorubicin-induced oxidative stress and proteolysis in skeletal muscle. J Appl Physiol 2011; 110: 935-42.

15. Doroshow JH, Tallent C, Schechter JE. Ultrastructural Features of Adriamycin-Induced Skeletal and Cardiac Muscle Toxicity. Am J Pathol 1985; 118: 288-97.
16. Çullu E, Özkan I, Çulhacı N, Alparslan B, Dikicioğlu E, Şavk SÖ. Doksorubisinin sıçan iskelet kasında kemomiyektomi etkisi. Acta Orthop Traumatol Turc 2003; 37: 323-9.
17. Deng S, Wojnowski L. Genotyping the risk of anthracycline-induced cardiotoxicity. Cardiovasc Toxicol 2007; 7: 129-34.
18. Berthiaume JM, Wallace KB. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. Cell Biol Toxicol 2007; 23: 15-25.
19. Bryant J, Picot J, Levitt G, Sullivan I, Baxter L, Clegg A. Cardioprotection against the toxic effects of anthracyclines given to children with cancer: a systematic review. Health Technol Assess 2007; 11: iii, ix-x.
20. Bast A, Haenen GR, Bruynzeel AM, Van der Vijgh WJ. Protection by flavonoids against anthracycline cardiotoxicity: from chemistry to clinical trials. Cardiovasc Toxicol 2007; 7: 154-9.
21. Kaiserová H, Simunek T, Sterba M, den Hartog GJ, Schröterová L, Popelová O, Gersl V, Kvasnicková E, Bast A. New iron chelators in anthracycline-induced cardiotoxicity. Cardiovasc Toxicol 2007; 7: 145-50.
22. Zeidán Q, Strauss M, Porras N, Anselmi G. Differential long-term subcellular responses in heart and liver to adriamycin stress. Exogenous L-carnitine cardiac and hepatic protection. J Submicrosc Cytol Pathol 2002; 34; 315-21.
23. Ferrans VJ. Overview of cardiac pathology in relation to anthracycline cardiotoxicity. Cancer Treat Rep 1978; 62: 955-61.
24. Hirano S, Wakazono K, Agata N, Iguchi H, Tone H. Comparison of cardiotoxicity of pirarubicin, epirubicin and doxorubicin in the rat. Drugs Exp Clin Res 1994; 20: 153-60.