

## 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 kardiyotoksisiteye yol açan, yaygın olarak kullanılan bir kanser ilacıdır. Önceki çalışmalar doksorubisinin 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-karnitinın sıçan çizgili kasındaki etkilerinin araştırılmasıdır. **Yöntem.** Çalışma, ağırlıkları 200-300 g arasında değişen erişkin erkek Wistar- Albino sıçanlar 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 doksorubisin 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 donduruldu 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 antikoruna kullanıldı. **Bulgular.** Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, kas fiber tip dağılımı, lipid 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 mitochondrial 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.Gül den 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 apoptotik hücre ölümüne neden olmaktadır [5, 6]. Ayrıca antrasiklinler demir ve özellikle kalpte oksimiyogloblin ile etkileşerek serbest radikaller oluşturabilmektedirler [7]. Sonuçta bu etki mekanizmaları, aynı zamanda ilacın toksisitesine yol açmaktadır. Kardiyotoksikite, doksorubisinin doz sınırlayıcı en önemli yan etkisidir ve anti-tümöral etki ile kardiyotoksik etkinin patogenezi farklıdır. Anti-tümöral etkide hedef yapı DNA iken, kardiyotoksikiteden sorumlu mekanizma serbest radikal oluşumunun neden olduğu hücre 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-karnitin 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-karnitin kısa zincirli ester türevi olup vücutta en çok bulunan açıl 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

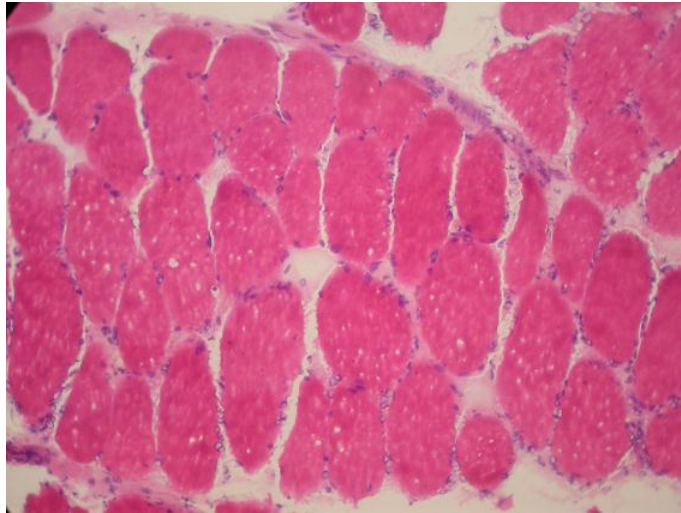
Her biri altı-sekiz haftalık, ortalama ağırlıkları 200-300 g olan, iç besleme yetiştirilen, 26 adet Wistar türü Albino suşu erkek sıçan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından elde edildi. Çalışma için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar 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), kardiyotoksik 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.

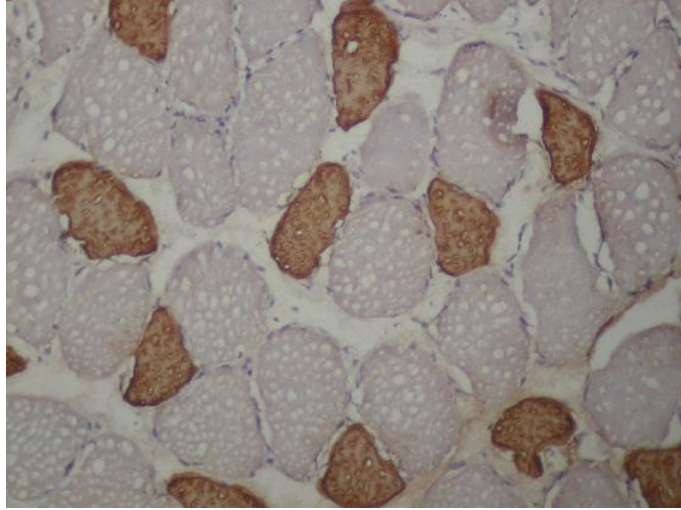
Dokso rubisin, ALKAR veya eşdeğer hacimde serum fizyolojik uygulamalarından sonra, izlemin onuncu gününde sıçanlar feda edildi. Bilateral kuadriseps kasları örneklendi. Çıkartılan iskelet kası örnekleri sıvı nitrojende dondurularak kriyostat yardımıyla 8 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitlere Hematoksilen 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 antikor) uygulandı. Preperatlar, ışık mikroskobu ile grupları bilmeyen 2 ayrı patolog tarafından incelendi. Işık mikroskobu 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 dokso rubisin uygulanan sıçan grubu, ALKAR uygulanan sıçan grubu ve ALKAR + dokso rubisin 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 kardiyotoksitenin 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 kardiyomyopati bulgularını geriletmediğini 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 araştırılan 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 kardiyak 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 miyokardiyal kalsiyum transport hem de mitokondriyal elektron transport zincirinin kontrolündeki değişikliklerin histolojik yansıması olarak sarkoplazmik retikulumda vakuoler dejenerasyon, kardiyak mitokondriyalarda şişme, interstisyel ödem ve fokal myoliz görülmektedir [15, 16]. Kalp kasındaki bulgularla kıyaslandığında, kalp dışı çizgili kas dokusunda bulgular daha hafif seyrebilmektedir [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 gastrekneumus 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 gastrekneumus kasındaki konsantrasyonunun, kalp kasındaki sadece %17'sine ulaştığını saptamışlardır [15]. Bu çalışmada mutlak kardiyotoksik dozda doksorubisin verilen sıçanlarda çizgili kas hasarının olmaması, ilacın kuadriseps kasında da gastrokneumus 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 düşünülmele 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, Porrás 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.