

E ve C Vitaminlerinin Cisplatin Hepatotoksitesini Önlemedeki Etkilerinin Histolojik Olarak İncelenmesi

Histologic Examination of the Protective Effect of Vitamin E and C in Cisplatin-Induced Hepatotoxicity

Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR, Müberra UYGUN, Meryem AKPOLAT, Yesim Hülya UZ

Amaç: Bu çalışmada, bir antineoplastik ajan olan cisplatinin kronik uygulandığında yol açtığı karaciğer hasarı ve bu hasara karşı E ve C vitaminlerinin ne ölçüde koruma sağlayacağı histolojik olarak incelendi.

Çalışma Planı: Çalışmada, 24 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan altışarlı dört gruba ayrıldı. Kontrol grubu dışındaki (grup 1) deneklere üç ay boyunca, ayda bir kez 5 mg/kg cisplatin intravenöz yolla verildi. Grup 3 ve 4'teki deneklere ise ayrıca, her gün intramusküler yolla sırasıyla 5 mg/kg E vitamini ve 8 mg/kg C vitamini verildi. Deney süresinin sonunda, tüm deneklerin karaciğer materyalleri alınarak ışık ve elektron mikroskobisi ile incelendi.

Bulgular: Kontrol grubu deneklerde normal yapıda karaciğer dokusu gözlandı. İkinci grupta Remak kordonlarında düzensizleşme, V. centrolobularis'e yakın sinüzoidlerde genişleme ile birlikte bazal membranlarda kalınlaşma, portal sahalarda ise lenfosit infiltrasyonu görüldü. Üçüncü grupta morfolojik hasarın büyük oranda azaldığı, çoğu portal sahadada lenfosit infiltrasyonunun ortadan kalktığı; dördüncü grupta ise düzelmenin daha da belirginleşerek portal saha infiltrasyon bölge sayısının hem seyreldiği hem de infiltrasyon hücre sayısının çok azaldığı görüldü.

Sonuç: Farklı özelliklere sahip antioksidanların cisplatinin hepatotoksitesinin azalmasına yardımcı olarak klinik uygulamaya katkıda bulunacağı sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Antineoplastik ajan; cisplatin/toksiste/yan etki; karaciğer/ilaç etkisi; sıçan; vitamin C/terapötik kullanım; vitamin E/terapötik kullanım.

Objectives: We investigated the morphologic changes showing hepatocellular damage caused by the chronic use of cisplatin, an antineoplastic agent, and the protective effect of vitamins E and C.

Study Design: Twenty-four Wistar albino male rats were randomly assigned to four groups, equal in number, to receive intravenous 5 mg/kg of cisplatin once a month for three months except for the control rats (group 1). The rats in group 3 and 4 also received daily intramuscular injections of 5 mg/kg of vitamin E and 8 mg/kg of vitamin C, respectively. At the end of three months, the livers were removed for light and electron microscopic examinations.

Results: Control rats showed a normal liver tissue structure. Group 2 rats exhibited disorganization of the Remak's fibers, thickening of the basement membrane together with dilatation of the sinusoids near the centrolobular vein, and lymphocyte infiltration in the portal areas. In vitamin E-treated rats, there was a significant decrease in morphological damage, with disappearance of lymphocyte infiltration in the portal areas. Vitamin C-treated rats manifested the least morphological damage, with a rare infiltration to portal areas and decreased number of infiltration cells.

Conclusion: Our findings suggest that the use of antioxidants of different properties may help reduce cisplatin hepatotoxicity, thus contributing to clinical applications.

Key Words: Antineoplastic agents; cisplatin/toxicity/adverse effects; liver/drug effects; rats; vitamin C/therapeutic use; vitamin E/therapeutic use.

Trakya Üniv Tip Fak Derg 2005;22(3):124-131

*VII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur (18-21 Mayıs 2004, Mersin).

Trakya Üniversitesi Tip Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, (Tarladaçalışır, Akpolat, Araş. Gör.; Uygun, Prof. Dr.; Uz, Yrd. Doç. Dr.).

İletişim adresi: Araştırma Gör. Yeter Topcu Tarladaçalışır. Trakya Üniversitesi Tip Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 22030 Edirne.

Tel: 0284 - 235 76 41 / 1406 Faks: 0284 - 235 76 52 e-posta: yeter_topcu@yahoo.com

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum (II), cis-platinum (II) veya cis-DDP); üretilmeye başlandığı 70'li yillardan beri, klinikte en yaygın şekilde kullanılan antineoplastik ilaçlardan biridir. Yüksek antitümöral etkisinin yanı sıra, klinik kullanımını sınırlayan önemli yan etkileri de bulunmaktadır, bunlar; renal disfonksiyon, bulantı-kusma, miyelosüpresyon, ototoksitesi ve nörotoksitesidir.^[1-3] Ayrıca metabolizması esnasında karaciğerde birikim yapması nedeniyle, doza bağlı hepatotoksitesi gelişirdiği de bildirilmiştir.^[4-6] Hepatotoksitesi, cisplatin için doz sınırlayıcı bir faktör olarak kabul edilmediğinden, fazla dikkate alınmamış ve bu yönde çok az çalışma yayınlanmıştır. Hepatotoksitesi, ilaçın yüksek dozlarda uygulanmasından sonra gözlenir ve hastanın klinik durumunda önemli değişiklikler meydana getirebilir.^[7]

Cisplatinin antineoplastik etki mekanizması, ilaçın Deoksiribo nükleik asit (DNA) adduktlarını oluşturarak hücre siklusunu G₂ fazında durdurması ve apoptozisi tetiklemesi şeklinde açıklanmıştır.^[8] Cisplatinin hepatotoksitesi mekanizması hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. Bununla birlikte cisplatin sitotoksitesinden, bu DNA adduktlarının sorumlu olduğuna inanılır.^[9] Ayrıca, cisplatin hepatotoksitesinin patofizyolojisinde, oksidatif stresin önemli rol oynadığı bildirilmiştir.^[1,10,11] Cisplatin süperoksit iyonu, hidroksil radikal gibi aktif oksijen türlerini üretебilir ve normal dokuda aktif antioksidan enzimlerini inhibe edebilir.^[1,2,12] Bu nedenle cisplatin hepatotoksitesinin önlenmesine yönelik çalışmalarda çeşitli antioksidanlar denenmiştir.^[11-13]

E vitamini, plazma ve hücresel membranlarda yer alan, yağda eriyen bir vitamindir. Bu membranlarda süperoksit ve hidroksil radikalini, singlet oksijeni ve lipid peroksitlerini daha az aktif formlara dönüştürerek, membranları lipid peroksidasyonuna karşı korur. Bu esnada açığa çıkan oksidasyon ürünü, karaciğerde glukuronik asit ile konjugasyona uğrayarak glukuronidasyon yoluyla metabolize olur ve büyük oranda safra ile atılır.^[14,15]

İnsan ve kobayların vücutlarında sentez edilmediği için diyetle alınması gereken C vitamini suda çözünen vitaminlerdir. Organizmada

hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Sitosol, plazma ve ekstraselüler sıvı gibi suda eriyebilir bölgelerde süperoksit anyonunu, hidrojen peroksiti, hidroksil ve peroksil radikallerini, reaktif nitrojen türlerini ve singlet oksijeni bağlayarak inaktive eder, lipid peroksidasyonunu başlatıcı radikalleri temizler ve protein karbonil oluşumunu azaltır. Bu suretle DNA, lipidler ve proteinler gibi önemli moleküller oksidan hasara karşı korur.^[16,17]

Bu çalışmada, günümüzde kemoterapide kullanımına devam edilen cisplatinin, kronik uygulanarak açığa çıkardığı karaciğer hasarının ve bu hasara karşı E ve C vitaminlerinin morfolojik açıdan ne ölçüde koruma sağlayacağının histolojik olarak incelenmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada, optimum laboratuvar koşulları (ısı; 21 °C, bağıl nem oranı; %40-60, ışık periyodu; 12/12 saat aydınlatma/karanlık, uygun havalandırma sistemi) altında, günlük içme suyu ve %21 ham protein içeren pelet yemlerle (Purina) beslenen, ağırlıkları 200-300 gr arasında değişen üç aylık, 24 adet Wistar albino cinsi erkek sincan kullanıldı. Her grupta altı adet denek olacak şekilde dört deney grubu oluşturuldu. Birinci grup denekler kontrol grubunu oluşturdu. İkinci, üçüncü ve dördüncü grup deneklere ayda bir kez olmak üzere üç ay süre ile 5 mg/kg cisplatin (Cisplatin DBL, Orna) 24 numara katater yardımıyla kuyruk veninden girilerek intravenöz (iv) yoldan verildi. İlk cisplatin enjeksiyonunu takiben her gün intramuskuüler (im) olarak III. grup deneklere 5 mg/kg E vitamini (Evigen®, Aksu) 0.16 mg/kg olacak şekilde saf zeytin yağı ile dilüe edilerek, IV. grup deneklere ise 8 mg/kg C vitamini (Redoxon®, Roche) 0.32 mg/kg olacak şekilde distile su ile dilüe edilerek verildi.

Kontrol grubu dışındaki tüm deneklere cisplatin enjeksiyonundan 24 saat önce, kemoterapiye bağlı olarak ortaya çıkabilecek çeşitli alerjik reaksiyonlara karşı altı saat ara ile iki kez, im 0.13 mg/kg deksametazon (Dekort®, Deva) uygulandı.

Üç aylık deney süresinin sonunda, tüm deneklerden 10 mg/kg, im Ketalar (Ketamin hid-

rochlorür 50 mg/kg Eczacıbaşı) anestezisi altında alınan karaciğer materyallerinin bir kısmı ışık mikroskopik incelemeler için Bouin fiksatöründe fikse edilip parafin inklüzyonu yapıldıktan sonra bloklama işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen bloklardan 5 μm kalınlığında alınan kesitlere Hematoksilin+Eozin (H+E), Periodic Acid Schiff+Hemalum (PAS+HL) ve Masson boyaları uygulandı.^[18,19]

Elektron mikroskopik incelemeler için alınan diğer karaciğer örnekleri ise, fosfat tamponuya hazırlanmış pH'sı 7.3 olan %2.5'lik glutaraldehit (Merck) solüsyonunda 1.5 saatlik prefiksasyona ve aynı fosfat tamponunda 24 saat yıkandıktan sonra, yine bu tamponla hazırlanmış %1'lik OsO₄ (Merck) solüsyonunda bir saatlik postfiksasyona tabi tutuldu. Bu aşamadan sonra doku örneklerine rutin elektron mikroskopik takip yöntemleri uygulandı ve araldit inklüzyonu yaparak, kapsüllere gömüldü. Aralditin polimerizasyonu için iki gün 45 °C, üç gün de 60 °C'lik etüvde bekletildi. Alınan 750-1000 nm kalınlığındaki yarı ince kesitler toluidin mavisi ile boyanarak, kesim bölgeleri belirlenen bloklardan 40-60 nm kalınlığında ince kesitler alındı. Bunlar uranil asetat ve Reynold'un kurşun sitrat boyaları uygulandı.^[20] Jeol Jem-1010 elektron mikroskopunda incelenerek, fotoğrafları çekildi.

BULGULAR

Kontrol grubu

İşık mikroskopik incelemede; kontrol grubuna ait kesitlerde karaciğer parankim hücreleri, V. centrolobularis çevresinde işinsal olarak düzenli bir şekilde yerleşerek Remak kordonlarını oluşturdu ve sinüzoidlere paralel bir yerleşim gösterdi. Hepatositler tek veya çift, merkezi yerleşimli, yuvarlak nükleuslar ile hücreye granüler görünümlü veren dağılmış glikojen tanecikleri içermekte idi. Portal sahalarda rastlanan V. porta ile A. hepatica'nın dalları ve safra kanalları normal görünümde idi (Şekil 1a).

Hepatositlerin ultrastrüktürel incelemesinde; gevşek kromatin materyalinin nükleolemma üzerinde yer yer kümelendiği yuvarlak nükleus sitoplazmasında homojen dağılmış, oval şekilli ve lamellar kristal mitokondriyonlar, çok sayı-

da glikojen tanecikleri ile iyi gelişmiş granüllü (GER) ve düz endoplazmik retikulum (DER) görüldü (Şekil 2a).

Cisplatin grubu

Cisplatin grubuna ait sicanların karaciğer dokularının işık mikroskopik incelemesinde; genel yapıda önemli ölçüde bozukluklar gözlandı. Hepatositlerin oluşturduğu Remak kordonlarının düzensizleştiği, V. centrolobularis'e yakın basal membranları kalınlaşmış sinüzoidlerde genişlemelerin olduğu görüldü. Ayrıca gerek V. centrolobularis, gerekse portal saha çevresindeki hepatositlerin poligonal şekillerini kaybettikleri, hücreler arasında boyut farklılıklarının olduğu ve interselüler mesafede yer yer genişlemelerin ortaya çıktığı gözlandı. Yine bu sahalardaki hepatositlerin sitoplazma yoğunluğunda azalma ve bazlarının farklı çaplıarda nükleuslara sahip olduğu saptandı (Şekil 1b, c). Bazı portal sahalarda lenfosit infiltrasyonu gözlandı (Şekil 1c).

Ultrastrüktürel incelemede; bazı hepatositlerde heterokromatin yapıdaki nükleusların çaplarının küçüldüğü, çoğu hepatosit sitoplazma matriksinde yoğunluk azalmasının yanı sıra, glikojen miktarında azalma, mitokondriyonların matriks yoğunluğunda ve kristalarında kayıp olduğu saptandı (Şekil 2b, c).

Vasküler yüzdeki Dissé aralıklarının genişlediği, bu sahada yer alan hepatosit sitoplazmik çinkitilerinin yapısında kalınlaşmaların, yer yer de silinmelerin ortaya çıktığı gözlandı (Şekil 2b, c).

Cisplatin + E vitamini grubu

Üçüncü grup deneklerin işık mikroskopik incelemesinde; Remak kordon düzeninin büyük oranda korunduğu, sinüzoidlerdeki genişleme ve basal membran kalınlaşmalarının gerilemesiyle birlikte bazı bölgelerde devam ettiği saptandı. Coğu portal sahada lenfosit infiltrasyon odaklarının ortadan kalktığı, bazı bölgelerde de azlığı gözlandı. Bu bölgelerde yer alan V. porta ile A. hepatica'nın dalları ve safra kanallarının normal görünümü olduğu saptandı (Şekil 1d).

Ultrastrüktürel incelemede; hepatositlerde nükleus çaplarının birbirine yakın olduğu, hücre organelleri ve sitoplazma yoğunluğu bakımından kısmi bir iyileşmenin görüldüğü ve

cisplatin grubuna kıyasla, bu grup hücrelerin glikojen granüllerinden daha zengin bir yapıya sahip olduğu gözlandı. Hepatositlerin interselüler mesafe ve Dissé aralıklarında belirgin bir düzlemenin olduğu saptandı (Şekil 2d).

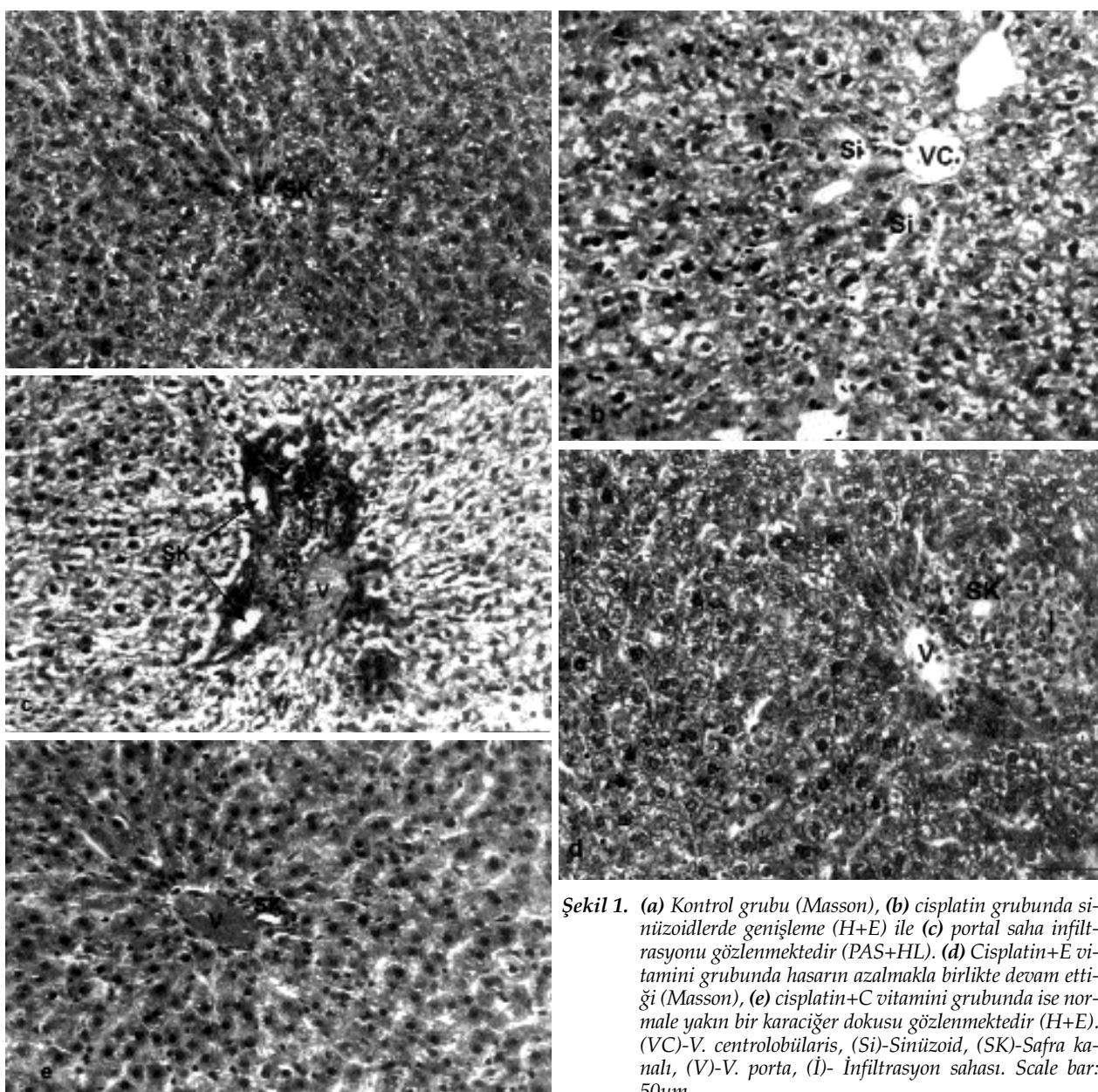
Cisplatin + C vitamini grubu

Dördüncü grup deneklerin gerek ışık, gereksiz elektron mikroskopik bulgularının kontrol grubuya paralellik gösterdiği saptandı. Hepatosit kordonları ve sinüzoid yapısının normal ol-

duğu, dokuda infiltrasyonlu sahaların belirgin derecede azaldığı gözlandı (Şekil 1e). Hepatosit ultrastrukturünün ve Dissé aralıklarının normal görünümeye sahip olduğu saptandı (Şekil 2e).

TARTIŞMA

Geniş kullanım alanı ve yüksek antitümöral etkinliğinde sahip olan cisplatinin nefrotoksik etkisi, kanser kemoterapisinde doz sınırlayıcı bir faktördür. Ancak, ilacın standart dozlarda hepatotoksitesi oluşturmaması nadirdir. Bu nedenle, ila-



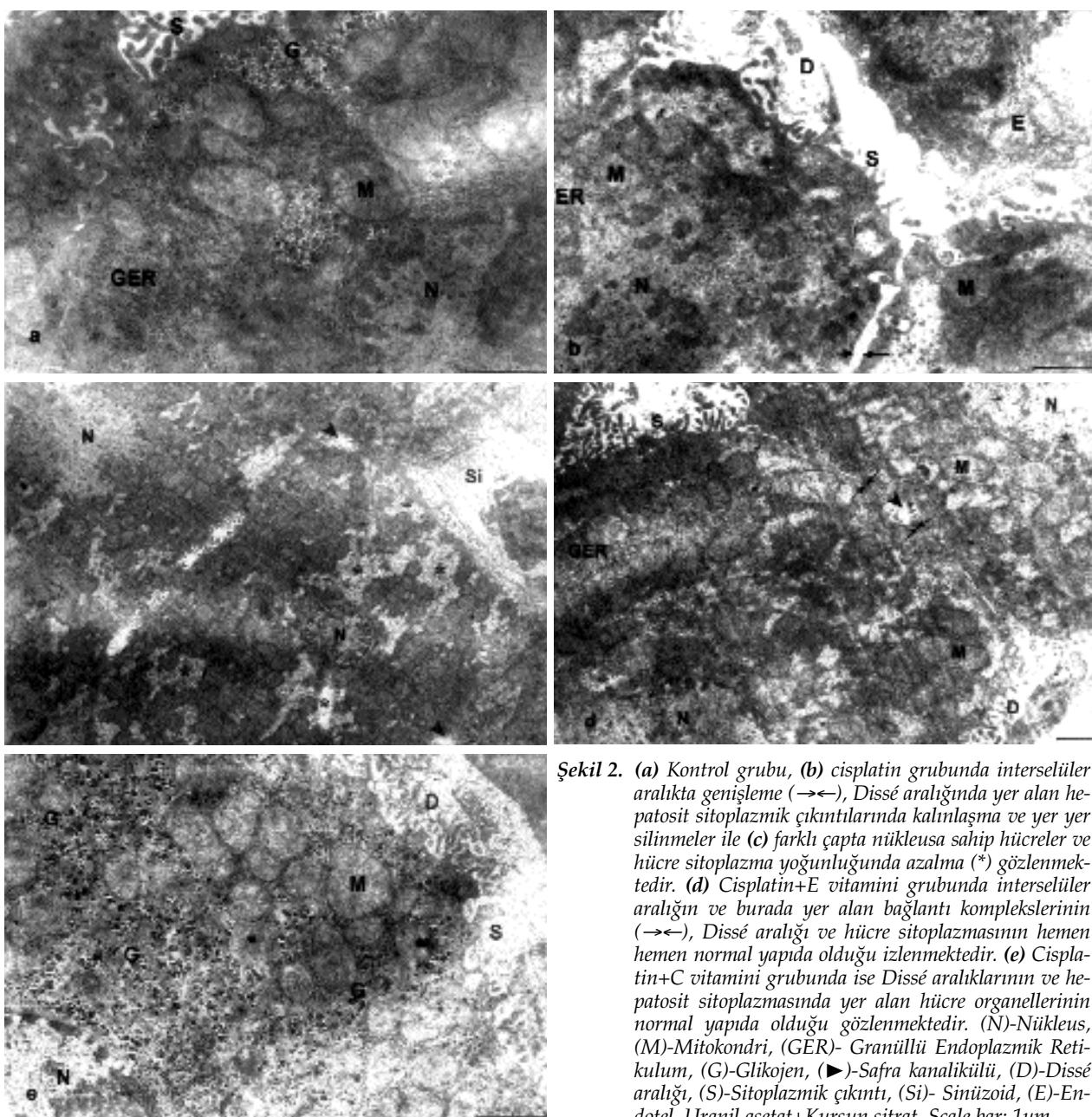
Şekil 1. (a) Kontrol grubu (Masson), (b) cisplatin grubunda sinüzoidlerde genişleme (H+E) ile (c) portal saha infiltrasyonu gözlenmektedir (PAS+HL). (d) Cisplatin+E vitamini grubunda hasarın azalmakla birlikte devam ettiği (Masson), (e) cisplatin+C vitamini grubunda ise normale yakın bir karaciğer dokusu gözlenmektedir (H+E). (VC)-V. centrolobularis, (Si)-Sinüzoid, (SK)-Safra kanali, (V)-V. porta, (I)-İnfiltrasyon sahası. Scale bar: 50 μ m.

cin karaciğer üzerine olan toksik etkisi çok dik-kate alınmaz.^[4,7]

Karaciğer; toksik kimyasal maddelerin ve di-ğer materyallerin atılım ve detoksifikasyonunda önemli rolü olan bir organdır ve aynı zamanda toksinlerin ilk hedefidir.^[21-23] Cisplatin ve metabolitlerinin vücuttan atılmasında, hepatobilier sistem ile böbrekler birlikte çalışır.^[24,25] Cisplatin böbreklerden sonra en fazla karaciğerde biriği-

ğinden, yüksek doz uygulanmasıyla hepatotoksisite gelişir.^[4,26,27] Cisplatinin neden olduğu karaciğer hasarı ve hepatotoksitesi mekanizması hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır.

Hücrelere basit difüzyon yoluyla giren cisplatinin klorid atomları hidrolize olur ve bileşığın reaktif formlarını oluşturmak üzere klorid iyonları yer değiştirir. Klorid iyonunun konstantrasyonu cisplatinin reaktivitesini etkiler.



Sekil 2. (a) Kontrol grubu, (b) cisplatin grubunda interselüler aralıktaki genişleme (↔), Dissé aralığında yer alan hepatosit sitoplazmik çıkışlarında kalınlaşma ve yer yer silinmeler ile (c) farklı çapta nükleusa sahip hücreler ve hücre sitoplazma yoğunlığında azalma (*) gözlenmektedir. (d) Cisplatin+E vitamini grubunda interselüler aralığın ve burada yer alan bağlantı komplekslerinin (↔), Dissé aralığı ve hücre sitoplazmasının hemen hemen normal yapıda olduğu izlenmemektedir. (e) Cisplatin+C vitamini grubunda ise Dissé aralıklarının ve hepatosit sitoplazmasında yer alan hücre organellerinin normal yapida olduğu gözlenmektedir. (N)-Nükleus, (M)-Mitokondri, (GER)- Granüllü Endoplazmik Retikulum, (G)-Glikojen, (►)-Safra kanaliküllü, (D)-Dissé aralığı, (S)-Sitoplazmik çıkışlı, (Si)- Sinüzoid, (E)-Endotel. Uranil asetat+Kurşun sitrat. Scale bar: 1 μ m.

İntravenöz uygulamadan sonra cisplatin, az reaktif olduğu ve klorid konsantrasyonunun yaklaşık 100 mM olduğu ekstraselüler alandan, konsantrasyonun aniden yaklaşık 3 mM'ye düştüğü intraselüler sahaya geçince aktive olur. Aktive olmuş cisplatinin platin molekülü, protein, nükleik asit, glutatyon (GSH) ve metallotioninin tiyol (-SH) grupları gibi, sülfür içeren gruplara yüksek afinite gösterir. Cisplatin, yapısındaki platin molekülünün, nükleik asitlerin -SH gruplarına bağlanması nedeniyle DNA'ya da bağlanır, bu durum ise hücre siklusunun G₂ fazında durmasına yol açan DNA adduktlarını oluşturarak sitotoksik etki yapar.^[8,9,26,28]

Cisplatinin organ spesifik etkisi üzerinde çalışmalar yapılarak, ilacın etki mekanizması anlaşılmaya çalışılmıştır. Tamura ve ark.^[28] farklı antineoplastik ilaçların karaciğer rejenerasyonu üzerindeki etkilerini araştırmak üzere yaptıkları çalışmalarında, parsiyel hepatotektomiden sonra karaciğer rejenerasyonu üzerinde en fazla cisplatinin inhibitör etkisinin olduğunu proliferen hepatositlerde ve hücre siklusu üzerinde cisplatinin etkisinin polifazik olduğunu bildirmiştir.

Bazı araştırmacılar, cisplatin hepatotoksitesinin mitokondriyonlarda meydana gelen hasarlardan kaynaklandığını bildirmiştir. Zicca ve ark.^[7] cisplatin nefrotoksitesinde ilk aşamada mitokondriyal hasarın ortaya çıktığını, hepatositlerin de renal tübül hücreleri gibi yüksek sayıda mitokondriyon içerdiğini vurgulamışlardır. Maniccia-Bozzo ve ark.^[26] ise hepatositte mitokondriyon ile nükleer bölgedeki platin konsantrasyonu karşılaşıldığında mitokondriyonda daha yüksek bulunduğuunu bildirmiştir. Böbrekler üzerindeki toksitesinin karaciğerden yüksek olmasını, mitokondriyal DNA hasarının böbreklerde daha ileri seviyede olmasına ve böbreklerin hasarlı DNA'yı kompanse etmede karaciğerden daha başarısız olmasına bağlamışlardır. Çalışmamızda cisplatine bağlı olarak hepatosit mitokondriyonlarında gözlediğimiz bulgular, yukarıdaki araştırmacıların bulguları ile benzerlik göstermektedir.

Sitokrom oksidaz ve ATPaz gibi bazı kritik mitokondriyal iç membran proteinleri için kod

oluşturan mitokondriyal DNA'nın, cisplatin ile hasarlanması dolayısıyla mitokondriyal protein sentezi yapılamaz, bu ise organelin degredasyonuna neden olduğu gibi, mitokondriyal enzim aktivitelerini de bozarak, oksidatif fosforilasyonu inhibe eder. Bunun sonucu ATP üretimi azalır.^[29,30] Cisplatin hepatotoksitesinde oksidatif stresin rolü yapılan birçok çalışma ile tartışılmıştır.^[12,31-33] Naziroğlu ve ark.^[11] cisplatin toksitesinde gözlenen reaktif oksijen türlerindeki artışa, gerek koruyucu enzim kapasitesindeki gerekse nötral antioksidan vitamin seviyesindeki azalmanın neden olabileceği öne sürülmüşlerdir. Yapılan bu çalışmada cisplatine bağlı karaciğerde oluşan hasarın dışarıdan antioksidan olarak verilen E ve C vitaminleri tarafından önlenildiğini gösteren bulgularımız, Naziroğlu ve ark.nın^[11] bulgularıyla paralellik göstermektedir. Yine bizim bulgularımıza benzer olarak el-Shazly ve ark.^[34] ile Guinee ve ark.^[35] cisplatin kemoterapisinde ortaya çıkan hücre infiltrasyon sahalarının çoğunlukla lenfositler tarafından oluşturulduğunu bildirmiştirler.

Safra asitleri, enterohepatik sirkülasyon esnasında biyolojik olarak değişim geçiren asidik strollerdir. Gerek hepatositin sinüzoidal gerekse ileal enterositlerin fırçamsı kenar membranlarında Na⁺– safra asit transport sistemlerinin varlığı, safra asitlerinin, hem ilaçların karaciğere yönlendirilmesinde hem de ince bağırsak ve karaciğer arasındaki enterohepatik siklusta rol oynadığını gösterir.^[36,37] Bengochea ve ark.^[38] safra akımının hücre içi Ca²⁺ denge değişikliklerinden, ATP eksikliğinden ve mitokondriyal hasardan etkilenebileceğini bildirmiştirler. Blasiak ve Kowalik^[39] C vitamininin antioksidan etkisinin yanı sıra, direkt DNA adduktlarının oluşumunu inhibe etme özelliğinin olduğunu vurgulamışlardır. Bu çalışmada cisplatine bağlı oluşan karaciğer hasarını önlemede C vitamininin, ince bağırsaklardan emilimi için safraya gereksinim duyan ve safra akımında meydana gelen bozukluklar nedeniyle emiliminde azalma olan E vitaminine göre daha etkili olduğu kanaatine varıldı.

Sonuç olarak; bu çalışmada farklı özelliklere sahip antioksidan kullanımı ile elde edilen sonuçların, cisplatinin hepatotoksitesi mekanizmasının anlaşılmasına ışık tutacağı ve hepat-

toksisitenin azalmasına yardımcı olarak, klinik uygulamaya katkıda bulunacağı düşünüldü.

KAYNAKLAR

1. Naziroglu M, Karaoglu A, Aksoy AO. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology* 2004;195:221-30.
2. Antunes LM, Darin JD, Bianchi Nde L. Effects of the antioxidants curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rats. *Pharmacol Res* 2001;43:145-50.
3. Cersosimo RJ. Hepatotoxicity associated with cisplatin chemotherapy. *Ann Pharmacother* 1993;27:438-41.
4. Liu J, Liu Y, Habeebu SS, Klaassen CD. Metallothionein (MT)-null mice are sensitive to cisplatin-induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;149:24-31.
5. Imamura Y, Hirata M, Takada H, Otagiri M. Acetohexamide reductase activities in liver microsomes and cytosol of cisplatin-treated male rats: cisplatin indirectly modulates the microsomal enzyme activity. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1996;94:203-10.
6. Stewart DJ, Mikhael NZ, Nanji AA, Nair RC, Kacew S, Howard K, et al. Renal and hepatic concentrations of platinum: relationship to cisplatin time, dose, and nephrotoxicity. *J Clin Oncol* 1985;3:1251-6.
7. Zicca A, Cafaggi S, Mariggio MA, Vannozzi MO, Ottone M, Bocchini V, et al. Reduction of cisplatin hepatotoxicity by procainamide hydrochloride in rats. *Eur J Pharmacol* 2002;442:265-72.
8. Welters MJ, Fichtinger-Schepman AM, Baan RA, Jacobs-Bergmans AJ, Kegel A, van der Vijgh WJ, et al. Pharmacodynamics of cisplatin in human head and neck cancer: correlation between platinum content, DNA adduct levels and drug sensitivity in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 1999;79:82-8.
9. Chu G. Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *J Biol Chem* 1994;269:787-90.
10. Capel ID, Leach D, Dorrell HM. Vitamin E retards the lipoperoxidation resulting from anticancer drug administration. *Anticancer Res* 1983;3:59-62.
11. el Daly ES. Protective effect of cysteine and vitamin E, Crocus sativus and Nigella sativa extracts on cisplatin-induced toxicity in rats. *J Pharm Belg* 1998;53:87-93; discussion 93-5.
12. Sadzuka Y, Shoji T, Takino Y. Effect of cisplatin on the activities of enzymes which protect against lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1992;43:1872-5.
13. Ramanathan K, Shila S, Kumaran S, Panneerselvam C. Ascorbic acid and alpha-tocopherol as potent modulators on arsenic induced toxicity in mitochondria. *J Nutr Biochem* 2003;14:416-20.
14. Senyelli B. İntraperitoneal mitomisin C ile geliştirilen deneysel kolitte antioksidanların etkisi. [Uzmanlık Tezi]. Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı; 1999.
15. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, editors. Yağda çözünen vitaminlerin yapı ve fonksiyonu. In: Harper'in biyokimyası (Harper's biochemistry. 22nd ed. Norwalk, CT: Appleton and Lange; 1990.) Çeviri editörü: Menteş G, Ersöz B. İstanbul: Barış Kitabevi; 1993. s. 711-2.
16. Padh H. Vitamin C: newer insights into its biochemical functions. *Nutr Rev* 1991;49:65-70.
17. Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J* 1999;13:1007-24.
18. Demir R, editör. Histolojik boyama teknikleri başvuru kitabı. Ankara: Palme yayincılık; 2001.
19. Gabe M. Les principes généraux de la technique histologique. Paris: Masson et Cie; 1968. p. 10-30.
20. Hayat MA. Principles and techniques of electron microscopy: biological applications. 1st ed. USA: Van Nostrand Reinhold Company; 1970.
21. Wang K, Shindoh H, Inoue T, Horii I. Advantages of in vitro cytotoxicity testing by using primary rat hepatocytes in comparison with established cell lines. *J Toxicol Sci* 2002;27:229-37.
22. Poklis A. Toxic responses of the liver. In: Klaassen CD, editor. Casarett & doull's toxicology. Fifth ed: New York: The McGraw Hill Co; 1996. p. 403-15.
23. Briz O, Serrano MA, Rebollo N, Hagenbuch B, Meier PJ, Koepsell H, et al. Carriers involved in targeting the cytostatic bile acid-cisplatin derivatives cis-diammine-chloro-cholylglycinate-platinum(II) and cis-diammine-bisursodeoxycholate-platinum(II) toward liver cells. *Mol Pharmacol* 2002;61:853-60.
24. Villanueva GR, Mendoza ME, el-Mir MY, Monte MJ, Herrera MC, Marin JJ. Effect of bile acids on hepatobiliary transport of cisplatin by perfused rat liver. *Pharmacol Toxicol* 1997;80:111-7.
25. van Montfoort JE, Hagenbuch B, Groothuis GM, Koepsell H, Meier PJ, Meijer DK. Drug uptake systems in liver and kidney. *Curr Drug Metab* 2003;4:185-211.
26. Maniccia-Bozzo E, Espiritu MB, Singh G. Differential effects of cisplatin on mouse hepatic and renal mitochondrial DNA. *Mol Cell Biochem* 1990;94:83-8.
27. Stewart DJ, Benjamin RS, Luna M, Feun L, Caprioli R, Seifert W, et al. Human tissue distribution of platinum after cis-diamminedichloroplatinum. *Cancer Chemother Pharmacol* 1982;10:51-4.
28. Tamura J, Tanaka J, Fujita K, Yoshida M, Kasamatsu T, Arii S, et al. Effect of anticancer agents on cell cycle of regenerating hepatocytes in rats. *J Surg Res* 1992;53:218-26.
29. Singh G. A possible cellular mechanism of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicology* 1989;58:71-80.
30. Brady HR, Zeidel ML, Kone BC, Giebisch G, Gullans SR. Differential actions of cisplatin on renal proximal tubule and inner medullary collecting duct cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;265:1421-8.
31. Kharbangar A, Khynriam D, Prasad SB. Effect of cisplatin on mitochondrial protein, glutathione, and succinate dehydrogenase in Dalton lymphoma-bearing mice. *Cell Biol Toxicol* 2000;16:363-73.
32. Khynriam D, Prasad SB. Changes in glutathione-

- related enzymes in tumor-bearing mice after cisplatin treatment. *Cell Biol Toxicol* 2002;18:349-58.
- 33. Farber JL, Gerson RJ. Mechanisms of cell injury with hepatotoxic chemicals. *Pharmacol Rev* 1984;36(2 Suppl):71S-75S.
 - 34. el-Shazly MO, Afify MM, el-Dieb MK. Histopathological study into side-effect toxicity of some drugs used in treatment of cancer. *Arch Exp Veterinarmed* 1989;43:319-26.
 - 35. Guinee DG Jr, van Zee B, Houghton DC. Clinically silent progressive renal tubulointerstitial disease during cisplatin chemotherapy. *Cancer* 1993;71:4050-4.
 - 36. Marin JJ, Herrera MC, Palomero MF, Macias RI, Monte MJ, El-Mir MY, et al. Rat liver transport and biotransformation of a cytostatic complex of bis-cholylglycinate and platinum (II). *J Hepatol* 1998;28:417-25.
 - 37. Kramer W, Wess G, Schubert G, Bickel M, Girbig F, Gutjahr U, et al. Liver-specific drug targeting by coupling to bile acids. *J Biol Chem* 1992;267:18598-604.
 - 38. Bengochea L, Ghanem C, Perazzo JC, Ghisolfi C, Marabotto L, Acevedo C, et al. Drug glucuronidation and hepatic lipid microsomal membrane profile in cholestatic rats followed paracetamol intoxication. *Pharmacol Res* 1999;40:369-76.
 - 39. Blasiak J, Kowalik J. Protective action of vitamin C against DNA damage induced by selenium-cisplatin conjugate. *Acta Biochim Pol* 2001;48:233-40.