



**T. C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTESİ GELİŞTİRİLEN
RATLARDA N-ASETİLSİSTEİN (NAC) KULLANIMININ,
KALP DOKUSU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Bilal YÜCEL

KAYSERİ-2016



**T. C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTESİ GELİŞTİRİLEN
RATLARDA N-ASETİLSİSTEİN (NAC) KULLANIMININ,
KALP DOKUSU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. BİLAL YÜCEL

Danışman

Prof. Dr. CEVAT YAZICI

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TTU-2015-6134 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

KAYSERİ 2016

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimime başladığım andan itibaren, tezimin tamamlanmasına kadar geçen süre içinde, benden desteğini hiç esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Cevat Yazıcı'ya teşekkür ederim.

Eğitimim süresince bilgilerinden istifade ettiğim ve zorluklarla karşılaştığım her an mesleki ve manevi desteğini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Sabahattin Muhtaroglu'na ve birlikte çalıştığım diğer tüm hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim. İhtisasım boyunca yardımlarını benden hiç esirgemeyen Uzman Dr. Didem Barlak Ketici ve değerli arkadaşım İlayda Tatlımısırlı Güntürk'e teşekkür ederim.

Çalışmalarına katkı sağlayan Sayın Doç. Dr. Arzu Yay'a ve DEKAM çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

İhtisasım süresince Merkez ve Araştırma Biyokimya laboratuvarlarında birlikte çalıştığım teknisyen arkadaşlarıma yardımlarından dolayı teşekkür ederim. İhtisasım süresince benden manevi desteklerini esirgemeyen değerli aileme ve doktorluk mesleğine yeni katılan çok kıymetli eşim Hilal'e teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sisplatin	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. Kimyasal Yapı ve Özellikleri	4
2.1.3. Farmokokinetik ve Metabolizma	5
2.1.4. Etki Mekanizması	5
2.1.5. Kullanım Alanları	6
2.1.6. Yan etki ve Toksisite	6
2.2. Kardiyotoksisite	7
2.2.1. Sisplatin Kardiyotoksitesi	7
2.2.2. Kardiyak Markerlar	9
2.2.2.1. Kardiyak Troponin I (cTnI)	9
2.2.2.2. Cardiac Myosin Light Chain-1 (CMLC-1)	10
2.2.2.3. İskemi Modifiye Albümin (İMA)	10
2.3. Serbest Radikaller	11
2.3.1. Serbest Oksijen Radikalleri	12
2.3.2. Serbest Nitrojen Radikalleri	13

2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri	14
2.4.1. N-asetilsistein	14
2.4.1.1. Kimyasal Yapı ve Özellikleri.....	14
2.4.1.2. Farmokokinetik ve Metabolizma	15
2.4.1.3. Etki Mekanizması	15
2.4.1.4. Kullanım Alanları	16
2.4.1.5. Yan Etki ve Toksisite.....	17
2.4.2. Tiyol.....	17
2.4.3. Total Antioksidan Kapasite	18
2.5. Oksidatif Stres	19
2.5.1.Total Oksidan Kapasite.....	19
2.5.2. Lipid Peroksidasyonu	20
2.5.2.1. 4-Hidroksi nonenal (4-HNE)	21
2.5.2.2.Total Lipid Hidroperoksit	22
2.5.3. Protein Oksidasyonu.....	22
2.5.3.1. NO [•] ve Peroksinitrit Aracılı Protein Oksidasyonu	23
2.5.3.2. 3-Nitrotirozin (3-NT)	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. GEREÇ	26
3.2. YÖNTEM.....	28
3.2.1. Rutin Biyokimya Analizleri.....	28
3.2.2. Biyokimyasal Çalışma	28
3.2.2.1.Doku Protein Tayini.....	29
3.2.2.2.Tiyol Tayini	31
3.2.2.3. İskemi Modifiye Albümin Tayini	33
3.2.2.4.Total Lipid Hidroperoksit Tayini	34

3.2.2.5. Total Oksidan Kapasite Tayini	35
3.2.2.6. Total Antioksidan Kapasite Tayini	37
3.2.2.7. Oksidatif stres indeksi.....	38
3.2.2.8. CMLC-1 Tayini	39
3.2.2.9. cTnI Tayini.....	41
3.2.2.10. 3-Nitrotirozin Tayini.....	43
3.2.2.11. 4-HNE Tayini.....	45
3.2.3. Histopatolojik Çalışma	47
3.3. İstatistiksel Değerlendirme.....	48
4. BULGULAR.....	49
4.1. Rutin Analiz Bulguları	50
4.2. Biyokimyasal Çalışma Bulguları.....	51
4.3. Histopatolojik Bulgular	53
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇLAR	81
7. KAYNAKLAR	83
EKLER.....	95
Ek Tablo 1. Biyokimya Tüm Sonuçlar.....	95
Ek Tablo 2. Histolojik Skorelama Sonuçları	96
8. TEZ ONAY SAYFASI.....	97

KISALTMALAR

CAT	: Katalaz
CK	: Kreatin kinaz
CK-MB	: Kreatin kinaz muscle brain
CMLC-1	: Cardiac miyosin light chain-1 (Kardiyak hafif zincir 1)
CP	: Sisplatin
CV	: Değişim katsayısı
cTnI	: Kardiyak troponin I
DEKAM	: Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi
DOX	: Doksorubisin
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	: U.S. Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
GSH	: Redükte glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutatyon
HO [·]	: Hidroksil radikali
HO ₂ [·]	: Hidroperoksi radikali
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
ip	: İntraperitoneal
iv	: İntravenöz
İMA	: İskemi modifiye albümin
LDH	: Laktat dehidrogenaz
MDA	: Malondialdehit
MHZ	: Miyozin hafif zincir
MAZ	: Miyozin ağır zincir
NAC	: N-Asetilsistein
NO [·]	: Nitrik oksit
NO ₃ [·]	: Nitrat
O ₂ [·]	: Süperoksit
OD	: Optik dansite
ONOO ⁻	: Peroksinitrit
OSİ	: Oksidatif stres indeksi
RO [·]	: Alkoksi
ROO [·]	: Peroksi
ROOH	: Lipid hidroperoksit
SH	: Serbest tiyol
SNR	: Serbest nitrojen radikalleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
S-S	: Disülfid
TAK	: Total antioksidan kapasite
TOK	: Total oksidan kapasite
3-NT	: 3-nitrotirozin
4-HNE	: 4-hidroksi nonenal

TABLO LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1. Serbest Oksijen Radikalleri.....	13
Tablo 2. Lipid Peroksidasyon Ürünleri	21
Tablo 3. Kalp Dokusu Tanımlama ve Skolama	48
Tablo 4. Çalışma Gruplarının Rutin Analiz Sonuçları	50
Tablo 5. Çalışma Gruplarının Kardiyak parametreleri.....	51
Tablo 6. Çalışma Gruplarının Oksidatif stress/Antioksidan parametreleri.....	52
Tablo 7. Çalışma Gruplarının Histolojik Skolama Sonuçları.....	57

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. Sisplatin Biyokimyasal Formülü	4
Şekil 2. Albümin Kobalt Bağlama Testi	11
Şekil 3. 3-Nitrotirozin oluşumu.....	25
Şekil 4. Human Serum Albümin Standart Grafiği.....	30
Şekil 5. Glutasyon Standart grafiği	32
Şekil 6. CMLC-1 Standart Grafiği.....	41
Şekil 7. cTnI Standart Grafiği	43
Şekil 8. 3-NT Standart Grafiği.....	45
Şekil 9. 4-HNE Standart Grafiği.....	47
Şekil 10. Kontrol grubu kalp dokusunun histolojik görünümü (HEx200)	54
Şekil 11. Kontrol grubu kalp dokusunun histolojik görünümü (HEx400)	54
Şekil 12. CP grubu kalp dokusunun histolojik görünümü (HEx200).....	55
Şekil 13. CP grubu kalp dokusunun histolojik görünümü (HEx400).....	55
Şekil 14. NAC grubu kalp dokusunun histolojik görünümü (HEx200)	56
Şekil 15. NAC grubu kalp dokusunun histolojik görünümü (HEx400)	56
Şekil 16. CP-NAC grubu kalp dokusunun histolojik görünümü (HEx200)	57
Şekil 17. CP-NAC grubu kalp dokusunun histolojik görünümü (HEx400)	57

**SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTESİ GELİŞTİRİLEN
RATLARDA N-ASETİLSİSTEİN (NAC) KULLANIMININ,
KALP DOKUSU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

ÖZET

Amaç: Sisplatin (cis-diamindikloroplatinum (II), CP) nefrotoksitesisi geliştirilen ratlara uygulanan N-asetilsistein (NAC)'in kalp dokusu üzerine koruyucu etkilerinin, çeşitli biyokimyasal ve histopatolojik belirteçlerle gösterilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışma CP kardiyotoksitesisinin patogenezinde oksidatif ve nitrozatif stresin ortaya konulması, NAC'ın olası yan etkiler üzerine etkilerini ve sisplatin kardiyotoksitesisinin belirlenmesinde yeni biyomarkerların kullanılabilirliğini değerlendirmek amacıyla planlandı.

Gereç ve yöntem: Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nden temin edilen 32 adet 300-400 gr ağırlığında Wistar albino erkek rat dört gruba ayrıldı. Tüm uygulamalar kg rat ağırlığı/gün, *ip* olacak şekilde: Kontrol grubuna SF (1 ml); CP, (10 mg) tek doz; NAC, (250 mg) üç doz; CP-NAC (tek doz 10 mg CP ve ardışık 3 doz 250 mg NAC, CP uygulamasından 4 saat sonra) verildi. Son uygulamayı izleyen 72. saatte, anesteziye ratların heparinize kanları ve kalpleri alındı. Kalp dokuları nötral formalinle tespit edildi, histopatolojik olarak değerlendirildi. cTnI (kardiyak troponin I), kardiyak miyozin hafif zincir-1 (CMLC-1) ve iskemi modifiye albumin (İMA) plazmada; total lipid hidroperoksit (ROOH), 4-hidroksinoneal (4-HNE), 3-Nitrotirozin (3-NT), tiyol, total antioksidan (TAK) ve total oksidan (TOK) kapasite kalp dokusunda ölçüldü.

Bulgular: Plazma, cTnI, CMLC-1, İMA ve doku ROOH, 4-HNE, 3-NT, TOK, düzeylerinin Kontrole göre CP grubunda arttığı; doku tiyol ve TAK düzeylerinin ise azaldığı belirlendi. Histolojik olarak CP grubunda hemoraji, interstisyel ödem ve vakuolizasyon gözlemlendi. CP grubuyla kıyaslandığında CP-NAC grubunda TAK ve tiyol değerlerinin arttığı belirlendi. Azalan cTnI, CMLC-1, İMA ve doku ROOH, 4-HNE, 3-NT, TOK düzeyleri ve histopatolojik skorlar istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı.

Sonuç: CP kardiyotoksisitesi gelişiminde lipid peroksidasyonun (yüksek 4-HNE, ROOH düzeyleri) ve protein oksidasyonun (yüksek 3-NT düzeyleri) rol oynadığı söylenebilir. Düşük TAK ve tiyol ve yüksek TOK düzeyleri de bu görüşü desteklemektedir. CP kardiyotoksisitesini önlemede, bu doz ve sürede uygulanan NAC'ın antioksidan kapasiteyi artırmasına rağmen (yüksek tiyol ve TAK); gerek plazma gerekse doku düzeyinde başarısız olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Sisplatin, N-Asetilsistein, Kardiyotoksisite, Oksidatif Stres, Rat



THE EFFECT OF N-ACETYLCYSTEINE (NAC) ON HEART TISSUE IN CISPLATIN INDUCED NEPHROTOXICITY IN RATS

ABSTRACT

Aim: Objective is to demonstrate the protective effects of N-acetylcysteine (NAC) on heart tissue, which is applied to rats which developed cisplatin (cis-diaminedichloroplatinum (II), CP) induced nephrotoxicity, through various biochemical and histopathological indicators.

The study thereof has been planned in order to evaluate the usability of new biomarkers in determining CP cardiotoxicity, and to evaluate the effects of NAC on possible side effects, and to demonstrate the oxidative and nitrosative stress regarding the CP cardiotoxicity's pathogenesis.

Material and method: 32 male Wistar albino rats, each one weighing 300-400 grams and which are procured from Experimental and Clinical Research Center, have been separated into 4 groups. All applications being kg rat weight/day, *ip*: Control group has been applied: saline (1 ml); CP, (10 mg) single dose; NAC, (250 mg) three doses; CP-NAC (single dose 10 mg CP and successive 3 doses 250 mg NAC, 4 hours after CP application). In the 72.hour following the last practice, heparinized bloods and hearts of the rats have been taken. Heart tissues have been fixed by neutral formalin, and have been evaluated histopathologically. cTnI (cardiac troponin I), cardiac myosin light chain-1 (CMLC-1) and ischemia modified albumin(IMA) in plasma; total lipid hydroperoxide(ROOH), 4-hydroxynonenal (4-HNE), 3-Nitrotyrosine(3-NT), thiol, total antioxidant (TAC) and total (TOC) capacity has been measured on heart tissue.

Results: Plasma, cTnI, CMLC-1, IMA and tissue ROOH, 4-HNE, 3-NT, TOC, levels are found to have increased in CP group; tissue thiol and TAC levels are found to have reduced. Histologically on CP group; haemorrhage, interstitial oedema and vacuolization have been observed. When compared to CP group; CP-NAC group is found to have increased in TAC and thiol values. Reduced cTnI, CMLC-1, IMA and

tissue ROOH, 4-HNE, 3-NT, TOC levels and histopathological scores did not yield any histopathologically meaningful results.

Conclusion: In development of CP cardiotoxicity; lipid peroxidation (high 4-HNE, ROOH levels) and protein oxidation (high 3-NT levels) can be said to have been effective. Low TAC and thiol and high TOC levels as well support this opinion. In preventing CP cardiotoxicity, despite the NAC which was applied at specified dose and duration increasing the antioxidant capacity (high thiol and TAC); it can be said to have failed.

Key words: Cisplatin, N-Acetylcysteine, Cardiotoxicity, Oxidative Stress, Rat



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sisplatin (CP), mesane, baş-boyun, akciğer, testis ve over kanserleri dâhil olmak üzere çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılan, platin içeren kemoterapötik bir ajandır (1). Ototoksisite, nörotoksisite, nefrotoksisite gibi yan etkiler, ilacın klinik olarak kullanımını kısıtlayan nedenlerdir. Bunlar arasında en sık rastlanılan nefrotoksisite (2) olsa da son yıllarda yapılan çalışmalarda kardiyotoksisite de önemli bir sorunu teşkil etmektedir (3,4).

Kardiyotoksisite potansiyeli olan ilaçların kullanımında kardiyotoksisiteyi olabildiğince erken belirlemek önemlidir. CP tedavisinde akut kardiyotoksisite sorun oluşturmaya rağmen, kemoterapi tedavisi sırasında oluşan ancak klinik bulgu vermeyen toksik kardiyak etkilerin sonuçları, yıllar sonra ortaya çıkabilmektedir (5). CP tedavisinden 20 yıl sonra bile, hasta kanında hala tespit edilebilir düzeyde CP bulunması; bu geç komplikasyonun sorumlusu olarak kabul edilmiştir (6). Bu yüzden kardiyologlarla birlikte onkologların; sadece kanseri ortadan kaldırmak için değil, aynı zamanda kemoterapötiklerin hastalarda oluşturduğu kardiyotoksisiteyi azaltmak için bir takım olarak tedavi etmesi gerektiği önerilmektedir (5).

Literatürde CP kardiyotoksisitesi geliştirilen ratlarla yapılan çalışmalarda; kalp dokusuna yüksek spesifikite gösterip, kalp hasarı esnasında salınan cTnI (7), ‘düzeylerini değerlendiren kısıtlı ve metodolojik yönden de hatalı çalışmalar (8,9)

vardır. Bir kardiyak marker olan CMLC-1 (10) ve kardiyak iskemi markerı olan iskemi modifiye albumin (İMA) düzeylerini değerlendiren çalışmalara rastlanılmamıştır. Kardiyak markerların özellikle birlikte değerlendirilmesi, tanıda hatalı negatif sonuçların önüne geçilebilmesi bakımından çok önemlidir (11).

CP kardiyotoksisitesi patogenezinde oksidatif stresin (4) yanı sıra nitrozatif stresin de rol oynadığını gösteren çalışmalar son yıllarda öne çıkmaktadır (3). Literatürde nitrozatif stres markerlarından olan 3-nitrotirozin (3-NT), lipid peroksidasyon markerlarından olan 4-hidroksi nonenal (4-HNE) ve total lipid hidroperoksit düzeyleri ile TOK düzeylerini değerlendiren herhangi bir CP kardiyotoksisitesi çalışmasına rastlanılmadı.

Antioksidan özellikli farklı ajanlarla yapılan çeşitli hayvan çalışmalarında antioksidan özelliği olan bazı ajanların CP kardiyotoksisitesini önlediği gösterilmiştir (5).

Serbest tiyol grubu içeren bir amino asit olan sistenin, N-asetil türevi olan N-asetilsistein (NAC) uzun süredir klinikte solunum sistemi hastalıklarında kullanılmaktadır(12). Klinik (13,14) ve deneysel (15-17) çalışmalarla güçlü bir antioksidan olduğu gösterilen NAC'ın bu etkisi, redükte glutatyon (GSH) prekürsörü olmasına ve aynı zamanda direkt olarak serbest radikalleri toplayabilmesine bağlanmaktadır (12). NAC'ın dilate kardiyomiyopati, diyabetik kardiyomiyopati, iskemik repüfüzyon kardiyak hasarı, kardiyak inflamasyon gibi birçok kalp hasarında faydalı bir ajan olduğu farklı çalışmalarla gösterilmiş olmasına rağmen (18); literatürde doksorubisin (DOX) kaynaklı kardiyotoksisite (19) haricinde, CP kardiyotoksisitesinde NAC uygulayan sadece iki yayın mevcuttur (20-21). Literatürde antioksidan kapasite göstergerinden olan tiyol'a (22) ait kısıtlı çalışma olmasına rağmen, TAK düzeyi çalışmasına rastlanılmamıştır.

Bu çalışma, CP kardiyotoksisitesinde oksidatif/nitrozatif stresin varlığını, lipid peroksidasyonu/protein oksidasyonu ürünleri ve antioksidan kapasite üzerinden değerlendirmek ve CP ile birlikte uygulanan NAC'ın bu parametreler üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla planlandı. Bu nedenle CP, NAC, CP-NAC ve Kontrol gruplarına ait plazma örneklerinde cTnI, CMLC-1, İMA, CK-MB, LDH, BUN, kreatinin ile kalp dokularında 4-HNE, ROOH, 3-NT, TAK, TOK ve tiyol düzeyleri tayin edilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sisplatin

2.1.1. Tarihçe

İlk kez 1845 yılında Michele Peyrone tarafından sentezlenen sisplatinin kimyasal yapısı ancak 1893’de Alfred Werner tarafından açıklanmıştır (1).

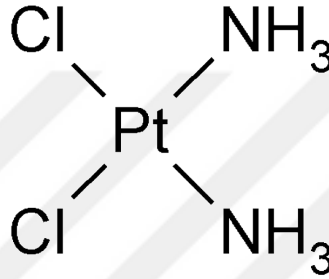
CP’nin antikanser ajan olduğunun farkına 1960’lı yıllara kadar varılamamıştır. Rosenberg et al (23) sıvı ortamda platin elektrotlarından ortama geçen platin türevlerinin, E. Coli bakterileri üzerine antibakteriyel ve antineoplastik etki gösterdiklerini fark ettiler. Bu platin türevleri arasında yer alan CP, antiproliferatif etkinliği en yüksek form olarak tespit edilmiştir (24).

CP 1971 yılında faz 1 klinik çalışmalarına girdi ve 1978 yılında over ve testiküler kanserlerin tedavisi için FDA (U.S Food and drug Administration) onayı aldı (2,25). CP’nin klinik kullanıma girdiği 1978’den bu yana 25 platin bileşiği klinik denemelere tabi tutulmuştur (26). Dünya genelinde CP haricinde, sadece oksaliplatin ve karboplatin kullanımı geniş çaplı kabul görmüştür (27).

2.1.2. Kimyasal Yapı ve Özellikleri

Molekül ağırlığı 301.1 g/mol, yoğunluğu 3.74 g/cm³, erime sıcaklığı 270°C olan CP (cis-diamindikloroplatinum (II)), dimethylprimanide ve N,N-dimethylformamid içinde iyi çözünür. Sudaki çözünürlüğü azdır (25°C’de 2.53 g/L). Normal sıcaklık ve basınç altında stabil kalan CP, zamanla transizomerizasyon geçirebilir (1).

Klinik kullanımdaki CP nötral; dört koordine ligandı ile kare düzlemsel platin bileşikleridir, metal merkezde cis konfigürasyona sahiptir. İki amin grubu ve klorid anyonları içerir (Şekil 1).



Şekil 1. Cis- diamindikloroplatinum (25)

CP’nin aktif hale gelebilmesi için hücre içine girmesi gerekir. Hücre içine girdikten sonra sitoplazmada hidrolize uğrar ve CP’nin klorid atomları su ile yer değiştirir. Hidrolize uğramış bu ürün nükleik asitlerle ve sülfidil grubu içeren proteinlerle reaksiyona girebilen güçlü elektrofillerdir (1).

CP’nin proteinlere, DNA ve RNA’ya bağlanabilmesi için hidrolize uğraması gerekir. Ligand değişim hızı kritik öneme sahiptir, çünkü hızlı hidroliz daha reaktif platin türlerine yol açar ki kandaki biyomoleküllere daha fazla bağlanmayla ve daha ciddi sistemik toksisiteyle sonuçlanır. Yavaş hidroliz daha düşük toksisite, daha düşük plazma yarı ömrü, bütün ilacın böbrekler yoluyla daha etkili ekskresyonunu sağlar (25).

Biyolojik sıvılarda hidroliz hızı, solüsyonlardaki klorid iyonu konsantrasyonuna bağlıdır. Klorid konsantrasyonunun yoğun olduğu kanda, CP’nin hidrolizi gerçekleşmez ve bütün halde kalır (25).

2.1.3. Farmokokinetik ve Metabolizma

CP, mide-bağırsak kanalından absorbe edilmez; sadece intravenöz (iv) uygulanır. Dokulara, plazma proteinlerine %90 oranında ve kısmen geri-dönüşümsüz bağlanır. Verilişinden yaklaşık 4 ay sonra böbrek dokusunda CP saptanabilir. Eliminasyon yarılanma ömrü 60 saat kadardır (27).

CP'nin iv uygulamasından sonra, 1 saat içinde maksimum plazma değerlerine ulaşılır. Terapötik kullanımında eliminasyon yarılanma ömrü 24 saatten fazladır. Doz aşımında bu 28 güne kadar uzayabilir. CP ağırlıklı olarak (%90) böbrekler tarafından elimine edilir. Yaklaşık olarak % 15'i idrarla hiçbir değişikliğe uğramadan atılır. Normal böbrek fonksiyonlarına sahip bir hastada, standart dozda iv uygulanan CP'nin yaklaşık %25'i ilk 24 saat içinde, % 50'ye yakını, 5 gün içinde elimine edilir (28). Safranin ve bağırsakların atılım üzerine etkisi minimaldir (2). CP'nin bilinen aktif bir metaboliti yoktur. Hem hücre içinde hem de kan dolaşımında enzimatik olmayan yolla sülfidril gruplarına bağlanarak inaktif metabolitlerine dönüşür (28).

CP'nin hücreler arası transfer mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır ve farklı hücre gruplarında değişiklik gösterebilir. İlk çalışmalar sonunda CP'nin yaklaşık %50'sinin hücreye alımının plazma membranları ile pasif difüzyon; diğer yarısının ise bilinmeyen bir taşıyıcı ile gerçekleştiği kanısına varılmıştır (29). Yüksek afiniteli bakır taşıyıcı proteinin (CTR1) delesyonu maya hücrelerinde hücre içi CP birikimini azalttığından, CTR1'in CP toksisitesine dirençle ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (2). Bunu destekler şekilde, aktif bir bakır taşıyıcısı olan ATP7B'nin CP dirençli kanser hücrelerinde fazlaca sentez edildiği gösterilmiştir. Bütün bu çalışmalar bakır taşıyıcı sistemlerin, CP'nin hücreler arasındaki transferinde merkezi bir rola sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca renal sistem içinde, organik katyon taşıyıcılar'ı (OKT), CP uptake ile ilişkilendirilmiştir. Renal proksimal tubül hücrelerinde 3 tane OKT izoformu olduğu gösterilmiş (29), böbreklere CP alınımından esas sorumlu olan taşıyıcının OKT2 olduğu gösterilmiştir (2).

2.1.4. Etki Mekanizması

CP'nin kansere karşı etki mekanizması tam olarak anlaşılmamakla birlikte yaygın görüş, DNA'ya bağlandığı ve zincir içi ve zincirler arası çapraz bağların oluşumuna yol açtığıdır. (29) CP çoğunlukla sarmal içi bağlar oluşturur ve bunlar bazlar arasında

kovalent bağlar şeklindedir. CP, pürin bazında N7 reaktif merkezine bağlanarak kanserli hücrelerin DNA'sına hasar verir, hücre bölünmesini durdurup apoptotik hücre ölümüne neden olur (1). CP'yle pürin bazları arasında en dikkat çeken değişim 1,2-zincir içi çapraz bağlarıdır. Bunlar zincir içi 1,2-d(GpG) ve d(ApG) çapraz bağlarını içerir ve sırasıyla %90 ve % 10 oranındadır. 1.3 zincir içi d(GpXpG) bağı ve zincir arası çapraz bağları gibi diğer bağlar herhangi bir fonksiyona sahip olmayan bağlardır (1). Çapraz bağlanma; defektli DNA kalıplarının oluşumu ve DNA sentezinin ve replikasyonun çöküşüyle sonuçlanır. Kanserde olduğu gibi hızlı bölünen hücrelerde de çapraz bağlanma ileri DNA hasarını indükleyebilir. Orta hasarlı DNA tamir edilebilir fakat ileri DNA hasarı geri dönüşümsüz hasardır ve hücre ölümüyle sonuçlanır (29).

Özetle; CP iki şekilde hücreyi ölüme sürükler: nekroz ve apoptoz. Nekroz plazma membran bütünlüğünün kaybı ve sitoplazmik şişme ile karakterizedir. Buna karşılık apoptoza uğrayan hücrelerde ise; hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonu görülür (30).

2.1.5. Kullanım Alanları

CP, FDA onayı aldıktan sonra, tek başına ve diğer kemoterapötik ajanlarla beraber, farklı kanser tiplerinde kullanılmaya başlamıştır. CP, bütün bu tedavi rejimlerinde; birinci basamak ilaç, adjuvan ilaç ve cerrahi ya da radyoterapi uygulamalarında neoadjuvan ajan olarak kullanılmaktadır (2).

CP; mesane, baş-boyun, akciğer, over, testis gibi birçok insan kanserinde kullanılmaktadır. Ayrıca rekürrens gösteren çocukluk çağı beyin tümörleri, gastrik kanser, anal kanser ve lösemi de kullanım alanları içindedir (1). Testiküler kanserde genel olarak % 90'ın üzerinde kür sağlar (30). Küçük hücreli akciğer kanserinde platin temelli tedaviler en etkili rejimlerdir (1).

2.1.6. Yan etki ve Toksisite

Tümör hücre direnci, ototoksisite, nörotoksisite, kardiyotoksisite, nefrotoksisite gibi yan etkiler, ilacın klinik olarak kullanımını kısıtlayan nedenlerdir. Bunlar arasında en sık rastlanılan ve bu nedenle de klinik kullanımı en sık engelleyen yan etki, nefrotoksisitedir (2). Klinik olarak CP nefrotoksitesi genellikle uygulanmasından 10

gün sonra görülmektedir ve glomerüler filtrasyonun düşmesi, yüksek serum kreatinin ve düşük magnezyum ve potasyum düzeyleri ile kendini gösterir (29).

CP için minimum letal doz belli olmasa da, iv 180-480 mg/m² dozlarında verilen CP'nin ciddi yan etkilere neden olduğu gösterilmiştir . 4 gün boyunca totalde 640 mg/m² (iv) olacak şekilde veya tek seferde 750 mg/m² (iv) CP'nin ölümlere neden olduğu raporlanmıştır. CP'nin dozaşımı için bilinen spesifik bir antidot yoktur (28).

2.2. Kardiyotoksisite

Genel anlamda "kalbi etkileyen toksisite" olarak tanımlanan "kardiyotoksisite" (31) kanser kemoterapisinin çok iyi bilinen bir sonucudur (4). Kanser bilgisinde ve tedavisindeki ilerlemeler; kardiyo-onkoloji başlığının açılmasına neden olmuştur (34). Kardiyotoksisite oluşturma potansiyeli olduğunu bilinmesine rağmen, birçok kemoterapötik ilaç halen kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Söz konusu ilaçların hastaları tamamen iyileştirmeleri ya da sağkalım sürelerini uzatabilmeleri gibi olumlu etkiler, bu komplikasyonlara rağmen kullanımlarının sürdürülmesine neden olmaktadır (5).

2.2.1.Sisplatin Kardiyotoksisitesi

Kemoterapi ilişkili kardiyak olaylar zaman açısından değerlendirildiğinde akut, (tedavi esnasında ya da kısa bir süre sonra), subakut (kemoterapi tamamlandıktan sonrası günler içinde ya da haftalar sonra) ya da kronik (ilaç uygulamasından aylar sonra) olabilir (32).

CP kemoterapisi boyunca, vasküler endotelial hasara sekonder endotel hücrelerinden salınan Von Willebrand faktörün artması; akut CP kardiyovasküler toksisitesinin direkt vasküler endotel hasar kaynaklı olduğunu düşündürmüştür (4). CP'nin gecikmiş kardiyovasküler toksisitesinde ise direkt diffüz endotelial hasar ve kardiyovasküler risk faktörlerinin artışı tanımlanmıştır. Bu gecikme uzun yıllar sonra koroner arter hastalığına yol açar ve sistolik ya da diyastolik disfonksiyonundan, ciddi konjestif kardiyomiyopati tablosuna kadar çeşitli patolojilere neden olabilir (4).

CP kardiyotoksisitesinin insanlarda doz ile ilişkili olmadığı, kardiyotoksik etkilerin tedavi bitiminden sonraki 18. aya kadar uzadığı rapor edilse de (32); ratlarda CP

kaynaklı kardiyotoksik etkilerin erken dönemlerde görüldüğü öne sürülmüştür (9,33).

CP, hipomagnezemi, hipokalsemi, hiponatremi, hipokalemi, hipofosfatemi gibi elektrolit düzensizlikleri meydana getirebilir. Özellikle hipomagnezemi, koroner arter vasospazmın tetiklenmesinden ve iskemik olaylardan sorumlu tutulmuştur (34).

CP kemoterapisine sekonder gözlenebilen kardiyak patolojiler kalp yetmezliği, anjina, akut miyokart enfarktüsü (AMI), tromboembolik olaylar, hipertansiyon, hipotansiyon, miyokardit, perikardit, konjestif kardiyomiyopati olarak sayılabilir (4). Bu patolojilerin nedeni olarak; vasküler endotel hasarı, koroner vasospazm, oksidatif ve nitroztatif stres, platelet fonksiyonlarında bozulma, platelet apoptozu, platelet agregasyonu, sıvı elektrolit dengesizliği, ventriküler repolarizasyon, mitokondriyel anormallikler ve artmış endoplazmik retikulum stresi gösterilmektedir (4). Bütün bu faktörler içerisinde oksidatif ve nitroztatif stres bariz bir şekilde ön plana çıkmaktadır (3).

CP'yle oluşturulan deneysel kardiyotoksisite çalışmalarında, kardiyak kas lifi hücrelerinde dejenerasyon, nekroz, fibrozis, sitoplazma vakuolizasyonu tespit edilmiştir (9).

Akut kalp yetmezliğinin ve kardiyotoksisitenin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılamasa da son yıllarda klinik ve temel çalışmalarla kardiyotoksisiteye neden olabilecek çeşitli varsayımlar ortaya atılmıştır. Serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonu bu mekanizmalardan biridir ve kardiyotoksisite üzerine çok önemli rolleri vardır (35). Serbest radikallere karşı savunmada önemli görevleri olan antioksidan enzimler, karaciğer ve böbreğin aksine kalp dokusunda oldukça düşük düzeyde bulunur bu yüzden kalp serbest radikal hasarına karşın savunmasızdır ve miyokard hücrelerine verilen hasar sonucunda geri dönüşümsüz kalp yetmezliği gelişebilir (35).

Kemoterapötik ajanların meydana getirdiği kardiyotoksisite; miyosit ve sarkolemmal bütünlük kaybına neden olabilir. Bu ajanlar biyoaktif *marker* enzimlerin hücre dışına (doku ve dolaşım) çıkmasına neden olur. Kemoterapötik ajanlar sonunda miyositlerde nekroz meydana getirebilir. Nekroz seviyesi ve ciddiyeti *biyomarker* enzimlerin ölçümü ile izlenebilir (36).

Kardiyak hasarı saptamak için benimsenen tanısal yaklaşım ekokardiyografi (EKO) ile sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunun hesaplanmasıdır. Fakat bu tanısal test özellikle erken dönemlerde kardiyak hasarı tespit etmek için düşük duyarlılık gösterir (35).

2.2.2. Kardiyak Markerlar

Kardiyospesifik *biyomarkerların* ölçümü, kardiyotoksisitenin erken tanısında, değerlendirilmesinde ve izlenmesinde geçerli bir tanı aracıdır. Bu yaklaşım minimal invazif, EKO'ya ve özellikle de nükleer tekniklere göre daha hesaplıdır ve ayrıca hastalara radyasyon verilmeden kolaylıkla tekrar edilebilen bir yöntemdir. Ayrıca sonuçların yorumlanması operatörün uzmanlığına bağlı değildir. Bu yüzden gözlemler arası değişkenlikten etkilenmez (37). Geçmişte miyogloblin ve CK-MB (Kreatin Kinaz-MB) izoformu sınırlı kardiyak spesifik ve göreceli olarak kısa serum yarılanma ömrüne sahip olmalarına rağmen miyokardiyal belirteçler olarak çalışılmıştır (7).

2.2.2.1. Kardiyak Troponin I (cTnI)

Kardiyak troponinlerden olan cTnI ve cTnT kardiyotoksisite ve kardiyak iskemik nekrozun tespitinde, hem yüksek yarılanma ömürlerine sahip olmaları, hem de yüksek kardiyak spesifik olmaları sebebiyle ideal kardiyak biyomarkerlar olmuşlardır (7).

2000 yılından beri miyokardiyal hasarı değerlendirmek için biyobelirteç olarak tanımlanan kardiyak troponinler, AMI tanısındaki kriterlerden biri olarak standart bir *marker* olarak kullanılmaktadır (37).

Kardiyak dokuya en spesifik biyobelirteç olan troponinler, miyokard içinde düzenleyici görevleri olan proteinlerdir ve miyositlerin hasarlanması durumunda dolaşıma katılırlar. Troponin kompleksi üç subüniteden oluşmaktadır. Troponin C kalsiyuma bağlanır. Troponin I aktin-miyozin etkileşimini inhibe eder. Troponin T ise tropomiyozine bağlanır ve kasılmaya yardımcı olur. Troponin C hem kalp hem de iskelet kasından salındığından kalbe özgü değilken; Troponin T ve Troponin I kardiyak kasa özgüdür. Troponin değerleri serumda miyokard nekrozu sonrası yaklaşık 2-4 saat sonra yükselmeye başlar. Troponin I yaklaşık olarak 4-7 gün, troponin T ise yaklaşık olarak 10-14 gün yüksek seyreder (38).

Kalbin primer patolojilerinde *biyobelirteç* olarak kullanılan troponinler, kalbi sekonder olarak etkileyen, kardiyak hasarla karakterize olan sol ventrikül hipertrofisi, konjestif kalp yetmezliği, pulmoner embolizm, künt travma, sepsis, orta dereceli böbrek yetmezliği, diyabetes mellitus, ve kemoterapi ilişkili kardiyotoksosite gibi çeşitli patolojilerde de *marker* olarak kullanılmaktadır (37).

2.2.2.2. Cardiac Myosin Light Chain-1 (CMLC-1)

İskelet ve kardiyak kas hücrelerindeki kontraktıl yapının temel yapıtaşı sarkomerdir. Sarkomerdeki kalın filamanların başlıca bileşeni miyosin mokelülleridir. Miyosin molekülü hem kardiyak hem de iskelet kasında bulunan iki ağır zincir (Miyosin ağır zincir; MAZ, herbirininin molekül kütlesi yaklaşık olarak 220 kDa) ve iki çift hafif zincirden (Miyosin hafif zincir; MHZ) oluşan heteropolimer komplekstir. MHZ'ler kendine has fonsiyonel ve kimyasal özelliklerine göre ayırt edilebilir. “esansiyel ya da Miyosin hafif zincir-1 (MHZ-1; molekül kütlesi yaklaşık olarak 27 kDa), “düzenleyici” ya da Miyosin hafif zincir-2 (MHZ-2; molekül kütlesi yaklaşık olarak 20 kDa) (10).

MHZ-2, MHZ-1'e göre daha kardiyospesifik olmasına ragmen MHZ-1 daha stabil olduğundan daha sık kullanılmaktadır (10).

Yapılan birçok çalışma, sağlıklı insanların serumlarında ölçülen MHZ düzeylerinin düşük olduğunu göstermektedir (10).

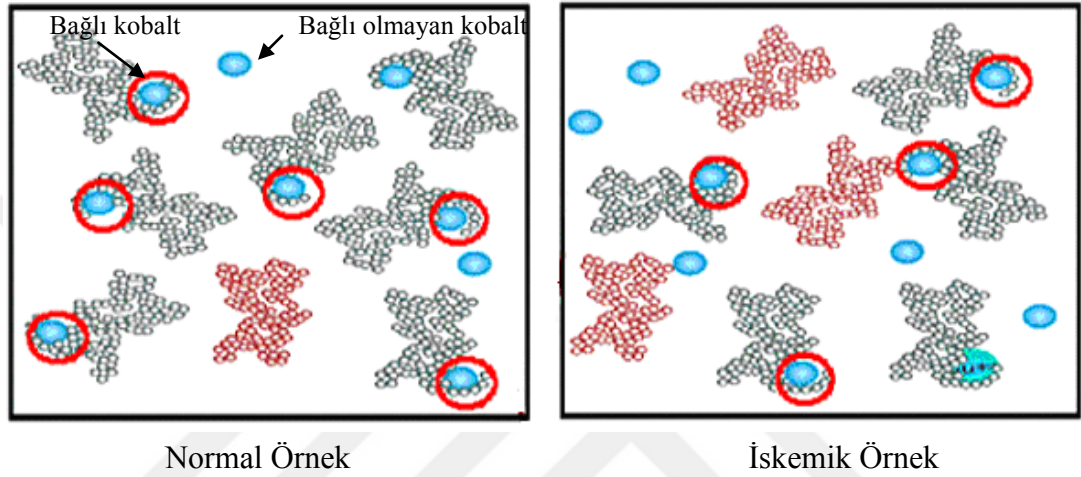
AMI geçiren hastalarda yapılan çalışmalardan elde edilen bulgulara göre, MHZ'lerin kardiyak hasar sonrasında, sürekli salındığı, bu yüzden de AMI tanısında ve miyokardiyal nekrozun derecesini belirlemede çok sensitif bir serum belirteci olabileceği belirtilmektedir. Serum MHZ konsantrasyonlarını ölçümü, kalp transplantasyonunun postoperatif dönemdeki izlenmesinde ve kalp greft hasarının değerlendirilmesinde ayrıca yararlıdır (10).

Serum kardiyak MHZ'leri, sadece kardiyak hasarda değil aynı zamanda akut ya da kronik kas hasarı ve renal yetmezlik gibi kalp dışı patolojilerde de yükselmiştir (10).

2.2.2.3. İskemi Modifiye Albümin (İMA)

Albümin suda yüksek oranda çözünen, molekül ağırlığı 65 kDa olan monomerik bir proteindir. Karaciğerde sentezlenen albümin kolloid osmotik basıncın

sağlanmasından sorumludur. Ayrıca serbest yağ asitleri, bazı metabolitler, bilirubin, ilaçlar ve hormonların taşınmasında görev alır (39). Albümin, dolaşımdaki endojen ve eksojen toksik maddeler için tampon görevi yapmaktadır. Albüminin N-terminal ucundaki aspartat-alanin-histidin-lizin sekansı; bakır, kobalt, nikel gibi geçiş metallerini bağlayabilmektedir. İskemi durumunda albüminin N-terminal ucunun geçiş metallerini bağlama kapasitesinin azalması iskemi modifiye albümin (İMA) olarak adlandırılır (40-41).



Şekil 2. Albümin Kobalt Bağlama Testi (41)

Albüminin N-terminalinde görülen yapısal değişikliğin SOR (Serbest oksijen radikalleri) oluşumu ile ilişkili olduğu ifade edilmektedir (42). İskemi sonucu görülen asidoz; Cu ve Fe gibi iyonların plazmada bağlı bulundukları proteinlerden ayrılmasına neden olmakta ve bu aktif redoks iyonları varlığında Fenton reaksiyonuyla oluşan $OH^\cdot$, albüminde görülen değişikliklerden sorumlu tutulmaktadır (43).

Serum albüminin İMA'ya dönüşümünde pek çok sebebin olabileceği ortaya konulmuştur. Bu sebeplerin başlıcaları hipoksi, asidoz, oksidatif stres ve iskemi-reperfüzyon hasarıdır (40, 44).

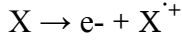
2.3. Serbest Radikaller

Serbest radikaller; dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküllerdir. Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler (45).

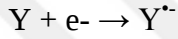
Yarı ömürleri çok kısa olan serbest radikaller, normal metabolik olaylar sırasında oluşabilecekleri gibi, çok çeşitli etkenlere bağlı olarak da oluşabilirler. Serbest radikaller, proteinler, amino asitler, lipidler, serbest yağ asitleri, karbonhidratlar ve nükleotidler gibi tüm hücre bileşenleriyle etkileşebilirler (46).

Serbest radikaller başlıca üç yolla oluşur;

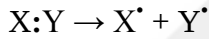
Radikal özelliği olmayan bir atom veya molekülün, bir elektron kaybetmesi ile,



Radikal özelliği olmayan bir atom veya molekül yapısına tek bir elektron transferi ile,



Kovalent bağın kırılması sonucunda, bağ yapısındaki eşlenmiş elektronlardan her birinin molekülün her bir parçasında kalması ile (homolitik fisyon), (47):



2.3.1. Serbest Oksijen Radikalleri

Oksijen havada yer alan (O_2), dioksijen ya da moleküler oksijen diye de adlandırılan bir moleküldür. Nitrojenden (%78) sonra atmosferde, %21 ile en çok bulunan elementtir. Aerobik organizmalar yaşam için gerekli enerjiyi sağlamak amacıyla karbon ve hidrojen zengin molekülleri okside etmek için oksijene mutlak gereksinim duyar. Hücre kendisi için enerji sağlarken, oksijen hücrede bir dizi reaksiyon ile indirgenerek suya dönüşür. Fakat bu süreçte oksijenin % 2-3 kadarı suya dönüşmeyip, oksijene kaynaklı radikaller oluşur. (48).

Hücresinin tüm fraksiyonlarında oluşabilen SOR, oksijenin radikal olan ve olmayan türevlerini kapsamaktadır (46).

Oksijene ardışık elektron eklenmesi sırasında SOR'un ara ürünleri elde edilir ve ayrıca elektron kaçağı da SOR oluşumuna katkıda bulunur. Moleküler oksijene tek bir elektronun eklenmesi ile süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikali oluşur. İkinci bir elektronun eklenmesi ile peroksit elde edilir, bu molekülün protonasyonu ile hidrojen peroksit (H_2O_2) meydana gelir. Fenton reaksiyonu gibi reaksiyonla 3. elektron eklenmesi

sonucunda son derece reaktif olan hidroksil ($\text{HO}^\cdot$) radikali meydana gelir. Son olarak 4. Elektronun eklenmesi sonucu su meydana gelir (49).

SOR; $\text{O}_2^\cdot$ anyonu, $\text{HO}^\cdot$ radikali ve H_2O_2 gibi farklı kimyasal türleri içermektedir. $\text{O}_2^\cdot$ ve $\text{HO}^\cdot$ radikali gibi bazı türler son derece kararsız iken H_2O_2 dokularda serbest dağılabilir ve diğerlerine göre daha uzun ömürlüdür. Bu radikaller hem ekzojen oluşabildiği gibi, çeşitli kaynaklarla hücre içinde üretilir. Birçok çalışma SOR'un hücre içindeki üretim yerinin mitokondri olduğunu söylemektedir (50).

Kalpte SOR oluşumu hem sitokinlerle, hem de büyüme faktörleriyle indüklenebilir. Örneğin; Anjiyotensin II (ATII), PDGF, ve $\text{TNF}\alpha$, NAD(P)H oksidaz aktivasyonu ile H_2O_2 ve $\text{O}_2^\cdot$ oluşumunu sağlar (49).

Tablo 1. Serbest Oksijen Radikalleri (46)

Serbest Oksijen Radikalleri	
Radikal Türevler	Radikal olmayan türevler
Süperoksit ($\text{O}_2^\cdot$)	Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)
Hidroksil ($\text{HO}^\cdot$)	Ozon (O_3)
Hidroperoksi ($\text{HO}_2^\cdot$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Peroksi ($\text{ROO}^\cdot$)	Lipid hidroperoksit (ROOH)
Alkoksi ($\text{RO}^\cdot$)	Hipoklorik asit (HOCl)
Nitrik oksit ($\text{NO}^\cdot$)	Peroksinitrit (ONOO^-)

2.3.2. Serbest Nitrojen Radikalleri

Serbest nitrojen radikalleri (SNR), $\text{NO}^\cdot$, $\text{NO}_2^\cdot$, $\text{NO}_3^\cdot$ gibi radikal olan türevler ile N_2O_4 (dinitrojen tetroksit), N_2O_3 (dinitrojen trioksit), ONOO^- gibi radikal olmayan türevleri kapsamaktadır (51). $\text{NO}^\cdot$, argininden NO sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenir. $\text{NO}^\cdot$ 'dan köken alan SNR'nin aşırı üretilmesi nitrozatif stres olarak adlandırılır (52). Bu aşırı üretim, miyokard fonksiyon bozukluğu, dolaşım yetmezliği, inflamasyon farklı organ disfonksiyonları ile sonlanan birçok hastalıkta rol oynamaktadır (53).

2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Organizmalar, SOR üretimini ve/veya SOR kaynaklı hücre hasarını önlemek için, antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak da adlandırılan birçok savunma mekanizması geliştirmişlerdir. Antioksidanlar etki gösterdikleri bölgeye göre hücre içi ve hücre dışı şeklinde sınıflanabileceği gibi; yapılarına göre de enzimatik ve non-enzimatik biçiminde de incelenebilir. Hangi sınıflandırmaya ait olursa olsun, hem endojen ve hem de eksojen kaynaklı olabilen antioksidan savunma sistemleri; SOR'un neden olduğu hasarları ortadan kaldırarak, organizmayı zararlı etkilere korumayı amaçlamaktadır. SOR üretiminde artma ve/veya antioksidan savunma sistemlerinde azalmaya sekonder oluşan oksidatif stres hasarının, ya SOR üretimini azaltarak ya da antioksidan sistemleri destekleyerek önlenmesi mümkündür (54).

SOR üretimini dengelemek için enzimatik ya da nonenzimatik yollar dâhil birçok hücre mekanizması vardır. Bütün bu enzimatik yolların içerisinde en karakterize olanlar $O_2^{\cdot-}$ 'i H_2O_2 'ye dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), ve H_2O_2 'i ise suya indirgeyen glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalazdır (CAT) (49).

Nonenzimatik mekanizmalar vitamin E, C ve karoten, ubikinon, lipoik asit ve ürat gibi hücre içi antioksidanları içerir. Ayrıca glutatyon peroksidazın enzimatik aktivitesi için indirgeyici substrat olarak görev yapan glutatyon da bu mekanizma arasında yer alır (49).

2.4.1. N-asetilsistein

N-asetilsistein (NAC) hem mukolitik bir ajan olarak hem de sayısız hastalığın tedavisinde uzun yıllardır klinik pratikte yer almaktadır (19).

2.4.1.1. Kimyasal Yapı ve Özellikleri

NAC, sistein amino asidinin asetillenmiş türevidir. Kimyasal formülü $C_5H_9NO_3S$ ve moleküler ağırlığı 163,2 g/mol'dür. NAC sekresyonların viskozitesini azaltan bir mukolitikdir(55). Mukolitik etki; NAC'ın sahip olduğu serbest tiyol grubu ile balgamın mukoprotein yapısındaki disülfid köprülerini kırmasına ve böylece balgamın viskozitesini azaltmasına bağlanmaktadır (56).

NAC'ın öncelikli görevi GSH sentezi ve depolanması için gerekli olan sisteini bulundurmasıdır. Kimyasal olarak NAC sisteine çok benzer fakat NAC'taki asetil varlığı; onu tiyole reaktivitesini düşürür. Böylece sisteinle karşılaştırıldığında asetil varlığı; NAC'ı daha az toksik, oksidasyona ve dimerizasyona daha az duyarlı, suda daha iyi çözünen bir bileşik yapar (57).

2.4.1.2. Farmokokinetik ve Metabolizma

NAC; *oral, iv, ya da topikal* (örneğin aerosol) yollarla uygulanabilir. Topikal uygulama sonrasında sistemik dolaşımda NAC, sistein ya da GSH düzeyi artışı gösterilememiştir (57). Oral uygulama sonrasında, NAC maksimum plazma konsantrasyonuna 1 saatten daha az bir sürede ulaşır. NAC'ın plazma yarılanma ömrü yaklaşık olarak 2,15 saattir ve uygulama sonrası 10-12 saat içinde tespit edilemeyecek düzeye gelir. Oral alımı takiben, düşük mide pH'sında nötr hale gelen NAC'ın hemen hemen tamamı bağırsaklar tarafından hızla emilir. Radyoaktif işaretlenmiş oral NAC'ın feçesle sadece %3'ü atılmıştır. Bu NAC ve metabolitlerinin tamamına yakının emildiğini göstermektedir. Radyoaktif işaretlenmiş NAC'ın oral alımından sonra, %13-38'i 24 saat içinde idrardan geri emilir. Uygulama sonrasında sadece çok az miktarda intakt NAC molekülü önce plazmaya sonrasında ise dokulara ulaşır (12). NAC'ın biyoyaralanımının düşük oluşu (% 5'den az), intestinal mukozada deasetilasyona uğraması ve karaciğerde ilk geçiş etkisine maruz kalmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (19).

Tek doz iv NAC uygulamasından sonra ilacın yarılanma ömrü, 5,6 saattir ve ilacın % 30'u renal atılımla temizlenir (19). İntravenöz uygulama sonrasında NAC geçici olarak plazmada çok yüksek düzeylere (uygulama esnasında) ulaşır ve bunun da yan etkilere neden olduğu bilinir. Bazı klinik durumlarda NAC'ın iv uygulaması gerekliken, çoğunlukla oral kullanımı yeterlidir (57).

2.4.1.3. Etki Mekanizması

NAC muhtemelen proteinlerdeki disülfid bağlarını indirgeyerek yapılarını değiştirmesi böylece liganda bağlanmasını bozması, ulaşılması daha az olan alanlarda kendisinden daha büyük indirgeyici moleküllerle yarışmaya girmesi ve GSH sentezi için sistein sağlayıcısı olması ile etki gösterir (19). NAC'ın vücutta birçok işlevi vardır; elektrofilik ksenebiyotiklerin detoksifikasyonu, sinyal iletiminin

modülasyonu, immün cevabın regülasyonu, prostaglandin ve lökotrien metabolizması, antioksidan defans, nörotransmitter iletimi ve hücre proliferasyonun modülasyonudur (19). NAC'ın antioksidan özellikte olması onun spesifik yapısından kaynaklanmaktadır. NAC, L- sistein, asetil (CO-CH_3) ve amino (NH_2) grubu içermektedir. L-sistein içeren aminoasitler antioksidan özelliğe sahiptir (58). Oral alınan NAC'ın yararlı etkilerininin çoğu ekstrasellüler sistin ve sistein düzeylerini artırması ve SH (tiyol) grupları için kaynak olmasına bağlanmaktadır. SH kaynağı olan NAC, GSH sentezini stimüle eder. Glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitesini artırır, detoksifikasyonu sağlar, SOR'a karşı doğrudan etkileri vardır (12). Bu doğrudan etki O_2^- , H_2O_2 ve $\text{HO}^\cdot$ gibi SOR'a karşı toplayıcı etkisidir (58).

NAC'ın aynı zamanda antiinflamatuvar etkileri vardır. NAC'ın antiinflamatuvar etkisi interlökin 8(IL-8), IL-6 ve tümör nekroz faktör α (TNF- α) gibi proinflamatuvar sitokinlerin aktivitelerini inhibe etmesine bağlıdır. Ayrıca kollajen sentezi ve fibroblast proliferasyonu da NAC tarafından baskılanır (58).

2.4.1.4. Kullanım Alanları

NAC mukolitik ajan olarak kullanılmasının yanısıra, sayısız hastalıkta kullanılmaktadır. Bunlar; asetaminofen intoksikasyonu, doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisite, stabil anjina pectoris, iskemi-reperfüzyon kardiyak hasarı, ARDS (akut solunumsal distress sendromu), bronşit, kemoterapi kaynaklı toksisite, HIV/AIDS, ağır metal toksisitesi, şizofreni ve bipolar duygudurum bozukluğu gibi bazı psikiyatrik hastalıklar bunlardan birkaçıdır (19). CP'yle ilişkili toksisite çalışmalarında NAC'ın oldukça yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir (15, 16, 20, 21). NAC en çok karaciğer hasarıyla ilişkili asetaminofen (parasetamol) toksisitesinde kullanılmıştır. Asetaminofen aracılı karaciğer toksisitesi, hepatik sitokrom p450 enzimleriyle ile düzenlenen reaksiyonlar sonrası meydana gelen N-asetil-pbenzoquinoneimine metaboliti ile alakalıdır. Bu metabolitin detoksifikasyonu yüksek GSH gerektirmektedir. Bu yüzden GSH eksikliğine neden olan asetaminofen dozaşımı karaciğer hasarına neden olabilir ve tedavide GSH eksikliğini gidermek için sistein deposu olan NAC uygulaması gerekmektedir (57).

2.4.1.5. Yan Etki ve Toksisite

Günlük 8000 mg'a kadar oral NAC tedavisinin klinik önemli yan etkilere neden olmadığı bilinmektedir (57).

Parasetamol zehirlenmelerinde yüksek dozlarda (20 saat boyunca total doz 300 mg/kg olacak şekilde) kullanılan iv NAC'ın yan etki sayısı ve şiddeti yok denilebilecek kadar azdır. Bununla beraber, nadir de olsa hastalarda bulantı, kusma, döküntü, kaşıntı, anjioödem, bronkospazm, taşikardi, hipotansiyon/hipertansiyon ve yaşamı tehdit edebilen anafilaksi görülebilir (12).

NAC'ın oral letal dozu, fareler için 7888 mg/kg ve ratlar için 6000 mg/kg üzerindedir. Hayvanlarda yapılan fertilité çalışmalarında, 250 mg/kg dozda herhangi bir yan etkiye rastlanmamış ve hatta 2000 mg/kg dozlarda bile teratojenik etki gözlenmemiştir. Aynı durum, doğum, fiziksel gelişme laktasyon dönemi için de geçerlidir. Gebelik ilaç sınıflandırmasında "B" grubunda kodlanan NAC ile ilgili yeterli sayıda klinik çalışma olmadığı için, gebe kadınlarda NAC kullanımı henüz netlik kazanmamıştır (12).

2.4.2. Tiyol

Sülfidril grubu içeren organik bileşikler olan tiyoller, antioksidan özelliklerinin yanı sıra; çoğu enzim ve koenzimlerin aktif merkezinde bulunmaları, disülfid köprüleri (S-S) ile proteinlerin tersiyer ve quartern yapılarını oluşturmaları, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, intra- ve ekstrasellüler ortamda redoks tamponu olmaları, sinyal iletimi ve apoptozis gibi birçok yapısal ve metabolik fonksiyona sahiptirler (59).

Glutasyon ve tiyoredoksin, intraselüler olarak en önemli tiyollerdir. Glutasyon, intraselüler ortamda birçok non-enzimatik fonksiyonu olan bir antioksidandır; redükte formu "GSH" ve okside formu (glutasyon disülfid) "GSSG" şeklinde gösterilir (60).

Organizmanın total tiyol havuzu, ya redükte/okside glutasyon (GSH/GSSG) gibi serbest formlarda ya da proteinlere bağlı formlarda bulunan intra- ve ekstrasellüler tiyollerden oluşur. İntraselüler tiyol bileşikleri içerisinde en önemlisi, GSH olmakla beraber; dokular, tiyol içeren proteinlerden zengindir ve bu protein-tiyollerin redoks

durumu, selüler lokasyonlarına bağlıdır. Sitoplazmada redükte formları ağır basan GSH/GSSG çifti, protein-tiyol gruplarını oksidasyondan korur (59).

Hücrelerden kan dolaşımına salınan GSH'ın büyük kısmı eritrositlerde toplandığından; plazma GSH düzeyleri nispeten düşüktür. Buna karşılık, disülfid formu ağır basan sistein/sistin havuzu, kantitatif olarak plazma ve ekstraselüler ortamın en büyük tiyol ve disülfid kaynağını oluşturur. Plazmada redükte formda bulunan serbest tiyoller arasında, GSH'ın yanı sıra homosistein, sisteinilglisin ve sistein sayılabilir; Homosistin, sistinilglisin, sistin ve GSSG ise okside formda bulunan serbest tiyollerdir. Protein-bağlı tiyoller, protein-SH grupları ve bunların diğer tiyol bileşikleriyle yaptıkları karma disülfidlerden oluşurlar (59)

Tiyol bileşiklerinin seçici olarak hipokloröz asit (HOCl) ve kloraminleri yakaladığı bilinmektedir. Bu nedenle plazmada HOCl'yi yakalayan en önemli antioksidanın tiyol olduğu söylenebilir (61).

Serbest tiyol grubu içeren bileşikler, radikallerle direkt veya indirekt reaksiyona girerek ya da protein üzerindeki serbest tiyol gruplarıyla reversibl bağlar oluşturarak, proteinlerin oksidatif hasara uğramalarını önleyebilmektedirler. Protein yapısındaki amino asitlerin çoğu, H₂O₂ varlığında, küçük değişiklikler geçirirken; tiyol grupları tüketilmekte ve protein üzerinde sülfid türevleri oluşmakta; böylece proteinde yapısal değişiklikler meydana gelmektedir (62).

Tiyol düzeylerinin tayini, proteinlerin SOR aracılı oksidasyondan ne denli etkilendiklerini göstermesi bakımından önem taşımaktadır (62).

Diyabet, KVH, kronik böbrek yetmezliği, siroz, felç ve diğer nörolojik bozukluklar gibi birçok hastalıkta, tiyol düzeylerinin düştüğü gösterilmiştir (59).

2.4.3. Total Antioksidan Kapasite

Organizma normal koşullar altında, endojen veya eksojen nedenlerle oluşan serbest radikaller ve bunlara sekonder meydana gelen oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan defans sistemine sahiptir. Oksidan durumlara karşı dengenin sürmesinde kan dolaşımı büyük öneme sahiptir. Çünkü antioksidanların vücutta taşınımı ve dağılımını yapmaktadır (63).

Albümin, ürik asit, askorbik asit insan plazmasındaki total antioksidan kapasitenin %85'inden fazlasını oluşturmaktadır. Bunun nedeni, kanda bilirubin, glutatyon, flavinoidler, alfa tokoferol ve beta karoten gibi antioksidan sistemin komponentlerine nazaran albümin, ürik asit ve askorbik asitin seviyelerinin fazla olmasına bağlıdır (63-65).

Plazmada bir etkileşim içinde bulunan antioksidanlar sinerjist olarak çalışmaktadır. Bu sinerjizme örnek olarak; glutatyonun askorbatı, askorbatında tokoferolun yeniden aktifleşmesini sağlaması gösterilebilir. Bu etkileşimlerinden dolayı, bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki oluşmaktadır. Ayrıca bir antioksidandaki azalma diğer bir antioksidanın artışı ile kompanse edilmektedir. Bu yüzden TAK'ın ölçümü antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler vermektedir. (63,64).

2.5. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, antioksidan savunma sistemi ile prooksidan maddeler arasındaki dengenin, prooksidan maddelerin lehine kaymasıyla ortaya çıkan durumdur (66).

SOR ile etkileşen nükleik asit, polisakkarit, lipid ve proteinler gibi temel hücre bileşenlerinden oluşan toksik bileşikler, hücre ve dokularda birikmekte ve bunun sonucunda hem yapısal hem de fonksiyonel hasar meydana gelmekte; hatta oksidatif hücre hasarı, nekroz ya da apopitoz ile sonuçlanabilmektedir (67).

Oksidatif stresle oluşan başlıca doku hasarları arasında lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, membran fonksiyonlarının bozulması, mukopolisakkaritlerin yıkımı, monosit ve makrofajlardan proenflamatuvar sitokinlerin salınımı ve DNA yapısının bozulması gibi oksidatif modifikasyonlar sayılabilir (60,68).

2.5.1.Total Oksidan Kapasite

Serum plazma veya dokuda bulunan oksidan moleküllerin konsantrasyonları bilinen pek çok metotla ayrı ayrı ölçülebilmektedir. Oksidatif stres varlığında, artan bu moleküllerin oksidan etkileri birbiri üzerine eklenebilir. Bu oksidan moleküllerin tek tek ölçümden ziyade, total ölçümü hem daha pratik hem de daha anlamlı olacağı düşünüldükçe, tüm oksidanların durumunu yansıtabilecek bir yöntem geliştirilmiştir. Bu metotla *in vitro* TOS ölçümü yapılabilmektedir (69).

2.5.2. Lipid Peroksidasyonu

Lipidler hücrelerin yapısının korunmasında ve fonksiyonlarının kontrolü için hücre membranının esansiyel bileşikleridir. SOR'un primer hedefinde de olan ve oksidasyona uğrayan lipidler çeşitli patolojik durumlarla ilişkilidir (70). Lipid peroksidasyonu hücre membranlarında bulunan lipoprotein ya da lipid içeren diğer bileşiklerin oksidatif hasarı olarak bilinir. Doymamış fosfolipidler, glikolipidler ve kolesterolün peroksidatif modifikasyonu; oksil, peroksil ve hidrojen peroksitin demir aracılı indirgenme ürünü olan HO[•] radikali gibi serbest radikal ürünlerinin ya da single oksijen, ozon, O₂^{•-} ve NO[•]'nun reaksiyonuyla oluşan ONOO⁻ gibi non radikal ürünlerle tetiklenen reaksiyonlarda oluşabilir (68)

Ardışık olarak, başlama, yayılma ve sonlanma şeklinde gerçekleşen peroksidasyon reaksiyonları; başladıktan sonra, otokatalitik olarak yayılır ve yüzlerce yağ asidi zinciri, lipid hidroperoksitlerine çevrilebilir (70).

Başlama aşamasında; başta HO[•] olmak üzere, serbest radikallerin doymamış yağ asidi (RH) zincirinden bir hidrojen atomu ayırmasıyla oluşan karbon merkezli lipid radikali (R[•]); O₂ varlığında lipid peroksi radikaline dönüşür. ROO[•]'nun doymamış başka bir yağ asidinden H atomunu uzaklaştırması, ROOH ve yeni bir R[•] oluşturur ki, zincirleme reaksiyonlar devam eder (70). Hidroperoksitler, lipid alkoksi radikaline dönüşebilir ve zincirleme reaksiyonlar sonucunda, tek bir radikalden birçok RO[•] ve ROOH meydana gelebilir. Bu zincir reaksiyonları, iki radikal üründen nonradikal bir ürün oluşuncaya veya bu radikaller antioksidanlarla ortadan kaldırılincaya kadar devam eder (70).

Peroksidasyon sırasında oluşan ürünler, “*primer*” ve “*sekonder*” olarak iki grupta toplanabilirler (71).

TABLO 2. Lipid Peroksidasyon Ürünleri (71)

Primer	Sekonder
• Konjuge dienler • Lipid peroksitler • Lipid hidroperoksitler	• Alkanlar • Aldehitler ✓ Malondialdehit (MDA) ✓ n-aldehitler ✓ α,β-doymamış aldehitler: ➤ 4-hidroksi nonenal (4-HNE) ➤ 4-okso-2-nonenal (4-ONE) ➤ 4,5-epoksi-2-alkenal • F2-izoprostanlar (8-izoprostan) • H2-izoprostanlar (izolevuglandin)

Lipid peroksidasyonu; ateroskleroz, kanser, diyabet, kronik alkol hasarı ve akut akciğer hasarının yanı sıra Alzheimer ve parkinsonu hastalığını da içeren nörodejenartaif bozukluklar la ilişkili bulunmuştur (71).

2.5.2.1. 4-Hidroksi nonenal (4-HNE)

4 hidroksi-2-nonenal (4-HNE) karaciğer mikrosomal lipid hücrelerinde, omega 6 yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan sitotoksik bir üründür (72). 4-HNE serbest radikallerin ikinci toksik mesajcısı olarak kabul edilir. Ayrıca;

- Fizyolojik olarak en aktif lipid peroksit,
- Oksidatif stresin önemli bir parçası,
- Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan kemotaktik bir aldehit,
- Lipid peroksidasyonun temel ürünü,
- Lipid peroksidasyon ürünlerinin en toksik olanıdır (72).

Bütün bunlar göz önüne alındığında bugünlerde, 4-HNE'nin lipid peroksidasyonunda en biyoaktif *marker* olduğunun düşünülmesi sürpriz değildir (72).

2.5.2.2.Total Lipid Hidroperoksit

Organizmada üretilen hidroperoksitler, lipid ya da protein kaynaklı olabilirler. Oksidatif stres şartlarında; fosfolipidler, glikolipidler ve ester kolesterolde bulunan doymamış yağ asitlerinden peroksidatif reaksiyonlarla oluşan lipid hidroperoksitler, oksidatif stres *markeri* olarak yaygın kullanıma sahiptirler (68, 74).

Genelde, $HO\cdot$, lipid oksi veya peroksi radikalleri, singlet oksijen ve $ONOO^-$ gibi aktif SOR türleriyle başlatılan reaksiyonlarda açığa çıkan hidroperoksitler, lipid peroksidasyonunun radikal olmayan ara ürünleridirler (6).

Türedikleri radikallerden daha polar ve daha uzun ömürlü olan lipid hidroperoksitler; aynı hücre içinde, hücreler arasında ya da lipoproteinler ile hücreler arasında membrandan membrana geçebilirler ve bu yolla, membran yapı ve fonksiyonlarının bozulmasına, akışkanlığın artmasına ve sitozolik solütlerin membran dışına sızmasına neden olabilirler. Dokularda biriken peroksitler, dokusal ve hücresel fonksiyon bozukluklarına yol açmakta ve bu durum, yaşlanmada veya yaşlılık ve oksidatif stresle ilişkili diyabet, ateroskleroz ve nörodejeneratif hastalıklarda önemli olmaktadır (68, 71).

2.5.3. Protein Oksidasyonu

Protein oksidasyonu, proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanır ve SOR veya sekonder oksidatif stres ürünleri ile tetiklenebilir. Lipid peroksidasyonuna benzer şekilde gerçekleşen protein-radikal zincir reaksiyonları, proteinlerin oksidatif modifikasyonuna neden olmaktadır. H_2O_2 ve $HOCl$ gibi reaktifler, Fe^{2+} ve Cu^+ gibi geçiş metalleri, paraquat, karbontetraklorür, asetaminofen gibi ksenobiyotikler, aktif nötrofiller, *UV* radyasyon, ozon, ile lipid ve serbest amino asit oksidasyon ürünleri protein oksidasyonuna yol açabilmektedir (75).

Protein oksidasyonu esas olarak $HO\cdot$ radikali ile başlar. Diğer taraftan oksidasyon sürecinde O_2 ile birlikte, $O_2\cdot$ radikalive $HO_2\cdot$ 'nin varlığı da gereklidir. Adı geçen bu serbest oksijen türevleri; amino asitlerin yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna ve protein omurgasının oksidasyonu yolu ile peptid bağlarının ayrılmasına neden olur (76). Protein oksidasyonu; protein

iskeletin oksidasyonu, peptid bağlarının kırılması, amino asit yan zincirlerinin oksidasyonu ve kovalent çapraz bağlanma reaksiyonları şeklinde dört farklı mekanizma ile gerçekleşebilir (76).

Okside proteinlerin birikimi, yalnızca protein oksidasyon oranını yansıtmaz aynı zamanda okside protein yıkımını da yansıtır. Bu yol, okside proteinleri tercihen yıkan proteazların konsantrasyonlarının ve proteolitik aktivitelerini etkileyen pek çok faktörün (metal iyonları, inhibitörler, aktivatörler ve düzenleyici proteinler), yer aldığı bir sistemi içerir (76).

Oksidatif hasar gören proteinlerin onarımı mümkün olmadığından; katepsin C, kalpain ve 20 S proteozom gibi endojen proteazlarla yıkılmaları gerekir. Ancak oksidatif hasarın derecesi, proteinlerin metabolik sonlarını belirlemekte ve kısmi oksidasyon, proteinlerin hidrofilik özelliğini artırırken; ileri derecede oksidasyon, proteinlere hidrofobik özellik kazandırmaktadır. Şöyle ki, kısmen denature ya da hafif derecede okside olan proteinler, proteolitik atağa daha duyarlı; ileri derecede okside olanlar ise, kovalent çapraz bağlar, disülfid köprüleri veya hidrofobik etkileşimler yüzünden, daha dirençlidirler. Bu nedenle, hücrelerdeki okside protein düzeylerinin, protein oksidasyon hızı ile proteolitik yıkım hızı arasındaki dengeye bağlı olduğu ve dengenin bozulmasıyla, okside proteinlerin organizmada birikmeye başladığı ve böylece tüm hücre fonksiyonlarının bozulabileceği söylenebilir (77).

2.5.3.1. NO[•] ve Peroksinitrit Aracılı Protein Oksidasyonu

NOS'un (nitrik oksit sentaz) endotelial formu olan eNOS tarafından fizyolojik düzeylerde üretilen NO[•] (nitrik oksit), endotelium bağımlı relaksasyon ve vasküler tonusta temel belirleyicidir. Öte yandan NO[•] platelet agregasyonunu ve adeziv molekül ekspresyonunu inhibe eder. Hücre proliferasyonunu ve vasküler duvar farklılaşmasını düzenler. NO[•]'nun *in vivo* lokal düzeylerinin azalması atheromatosis, kalp yetmezliği, sepsis, koroner arter hastalığı (KAH) da dahil olmak üzere sayısız kardiyovasküler hastalıkla ilişkilidir (78).

Ne, NO[•] ne de O₂^{•-} *in vivo* şartlarda sanıldıkları kadar toksik değildir çünkü etkileri bir dizi reaksiyonla minimize edilir. O₂^{•-} süpürücü bir enzim olan ve de farklı tipte farklı lokalizasyonlarda (mitokondri, sitoplazma, ekstrasellüler kompartman) farklı izoenzimleri olan SOD tarafından uzaklaştırılır. Benzer şekilde NO[•] da dokularda

bulunan kırmızı kan hücrelerinde, oksihemoglobinin katalize ettiği reaksiyonla nitrate dönüştürülür (53).

$\text{NO}^\cdot$ eşlenmemiş bir elektron içerir ve uygun koşullar altında $\text{O}_2^\cdot$ ile reaksiyonu sonucunda güçlü bir oksidan olan peroksintrit meydana gelir (ONOO^-) (49).

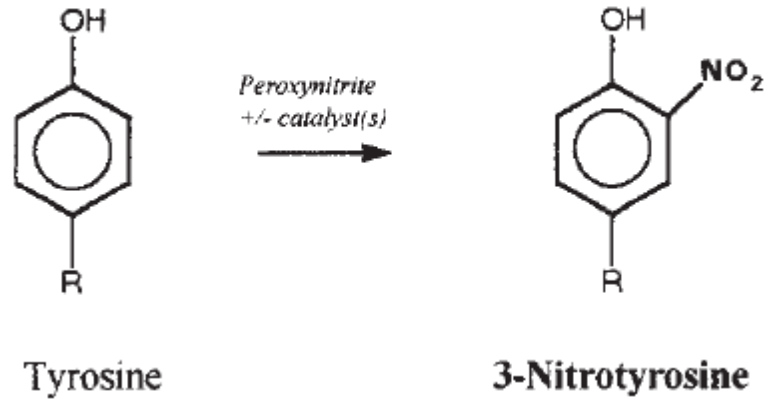
ONOO^- bir ya da iki elektronun oksidasyon mekanizmasıyla, tiyoller ve metal merkezli ürünlere zarar verebilen kısa yaşamlı (*in vivo* 10 ms) bir ara üründür. ONOO^- , DNA, protein ve lipidlerle direk olarak oksidatif reaksiyonlarla ya da radikal aracılı mekanizmalarla indirek etkileşime girer (53).

In vivo ONOO^- üretimi, stroke, MI, kronik kalp yetmezliği, şok, diyabet, kronik inflamatuvar hastalıklar, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çok önemli patojenik mekanizmalarla ilişkili bulunmuştur (53).

2.5.3.2. 3-Nitrotirozin (3-NT)

Protein tirozin artıklarının nitrasyonu, tirozinin aromatik halkasındaki hidroksil grubunun bitişiğine bir nitro grubunun eklenmesi ile oluşan kovalent bir protein modifikasyondur. Nitrasyon, proteinin yapısını ve fonksiyonlarını etkiler, antijenik epitop üretimine neden olur, enzimlerin katalitik aktivitesi değiştirir, hücre iskeletinin yapısı bozar ve bozulmuş hücre sinyal iletimi meydana getirir. Bu yüzden nitrotirozin ONOO^- aracılı sitotoksitenin merkezinde kabul edilmektedir. (53).

Tirozin direk olarak ONOO^- 'le reaksiyona girmez. Tirozinin direk nitrasyona uğraması yerine, tirozine bir hidrojen atomu eklenmesi ile tirozil radikali meydana gelir bu da hızlıca $\text{NO}_2^\cdot$ ile birleşerek 3-NT'yi meydana getirir (79).



Şekil 3. 3-Nitrotirozin oluşumu (79)

3-NT, NO[•] dan köken alan oksidanlar için stabil bir belirteçtir (80). Nitrotirozin formasyonu, hem sağlıklı bireylerde hem de kardiyovasküler hastalığa sahip hastaların her ikisinde birden vasküler dolaşımda ve miyokardiyal dokularda gözlemlenmiştir (81). Protein tirozin nitrasyonu, yüksek oksidatif strese maruz kalınan durumlarda posttranslasyonel modifikasyonu gösterir (82).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen (Proje no: TTU-2015-6134) ve Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunca onaylanan (10/12/2014 tarih, karar no:14/168) bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM) ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı.

3.1. GEREÇ

Biyokimyasal ölçümlerde, analitik saflıkta ve/veya HPLC kalitesinde, Sigma-Aldrich(St Louis. MO. USA), Merck (Darmstad. Germany), Acros ve Fluka marka kimyasal maddeler kullanıldı.

Çalışma sırasında; spektrofotometre (Shimadzu UV-1601), otoanalizörler (Roche Cobas C701, Roche Cobas E601), mikro ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) okuyucusu (BioTek ELx800), mikro ELISA yıkayıcısı (BioTekELx50), derin dondurucu (Haier, Beko), saf su cihazları (Rentro 16000, Rentro immu), etüv (Memmert), soğutmalı santrifüj (Sigma 3K 30), pH metre (WTW-330İ/SET), hassas terazi (Sartorius, AND GR-200), su banyosu (Köttermann), manyetik karıştırıcı (Nüve, Labor Brand Hotplate Stirrer), buzdolabı (Arçelik), vorteks (Velp scientifica 2x³), sonikatör (Virtis), kronometre, otomatik pipetler (Socorex, Axygen, Brand), polipropilen tüpler ile balon joje, beher, mezür, pipet ve tüp gibi cam malzemeler kullanıldı.

Çalışmada kullanılan tüm cam malzeme ve polipropilen tüpler, % 20'lik nitrik asit çözeltisinde bir gün boyunca bekletildikten sonra, Tip II ve ardından Tip I kalitesinde saf su ile üç kez yıkanarak demineralize edildi. Tip I su kullanılarak hazırlanan tampon ve çözeltiler, çalışma süresince soğuk odada saklandı. Dayanıklılık süresi kısa olan çözeltiler, çalışma günü hazırlandı.

Çalışma Grubu: Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya DEKAM'da üretilen, 6-7 aylık, 350-450 g ağırlığında, 32 erkek rat çalışma grubunu oluşturdu. Çalışma süresince, 12 saat karanlık/aydınlık döngüsünde, normal oda sıcaklığı ($22\pm1^{\circ}\text{C}$) ve neminde tutulan ratlar, standart pellet yem ve musluk suyu ile beslendi. Çevreye adapte olmalarını sağlamak amacıyla, çalışmaya başlamadan en az bir hafta önce, ratlar aynı deney ortamına alındı.

Çalışma Planı: Ratlar; Kontrol, NAC, CP ve CP-NAC grubu olmak üzere, her biri 8 rat içeren dört gruba ayrıldı.

Preparat uygulamalarına başlamadan önce (0. gün), çalışma grubunu oluşturan ratlar, tartıldıktan sonra, 24 saat boyunca metabolik kafeslere yerleştirildi. Bir gece aç bırakılan ratların, ertesi sabah metabolik kafeste toplanan 24 saatlik idrar hacimleri ölçüldü.

Nefrotoksisite oluşumunu sağlayan CP dozunu belirlemek amacıyla, toplam 6 ratla bir ön çalışma yapıldı: her biri 2 rat içeren üç gruba, sırasıyla tek doz 5, 7,5 ve 10 mg/kg CP *ip* olarak uygulandı. Ön çalışma sonucuna dayanarak, CP 10 mg/kg tek doz, ve NAC 250 mg/kg ardışık üç doza karar verildi. Deney planı aşağıda belirtildiği üzere uygulandı.

Deney Modeli

GRUP	NAC	CP	Açıklama	Yöntem	Doz sayısı
Kontrol	-	-	SF 1mL/kg	<i>ip</i>	3 doz
NAC	250 mg/kg	-		<i>ip</i>	3 doz
CP		10 mg/kg		<i>ip</i>	Tek doz
CP-NAC	250 mg/kg	10 mg/kg	CP'den 4 saat sonra NAC	<i>ip</i>	CP tek NAC 3 doz

Kontrol grubu: 1mL/kg *ip* SF uygulandı.

NAC grubu: Ardışık 3 gün boyunca 250 mg/kg *ip* NAC uygulandı.

CP grubu: 10mg/kg tek doz CP uygulandı.

CP-NAC grubu: İlk gün 10mg/kg tek doz CP uygulandıktan 4 saat sonra NAC uygulandı. Muldoon et al. yapmış olduğu (83) çalışma baz alınarak, CP uygulandıktan 4 saat sonra NAC uygulaması yapıldı. NAC uygulama zamanından 24 saat sonra olmak üzere, ardışık iki gün daha 250 mg/kg NAC uygulandı.

Son enjeksiyonu takiben, metabolik kafeslere alınan ratlar bir gece aç bırakıldı. Ertesi sabah, 24 saatlik idrar örnekleri alındıktan sonra, ratlar tartıldı ve kg rat ağırlığı başına 80 mg ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer, 50 mg/ml'lik solüsyon) + 10 mg ksilazin hidroklorür (Rompun, Bayer, %2'lik solüsyon) anestezisi altında abdominal aortadan heparinize enjektörlere ve EDTA'lı tüplere kanları (5-7 ml) alındı. Son kan örnekleri alındıktan hemen sonra, anestezi altında kurban edilen ratların kalp ve diğer tüm organları çıkartıldı ve kandan temizleninceye kadar, soğuk SF ile 3-4 kez yıkandı. Kurutma kâğıtları ile fazla suyu alınan kalp'ler tartıldı.

Heparinli kan örnekleri, +4°C'de 2000 g'de 10 dk santrifüj edilerek plazmaları elde edildi ve alikotlar halinde, kalp dokularıyla birlikte çalışma gününe kadar, -40 °C'de saklandı.

3.2. YÖNTEM

Ratlardan elde edilen plazma, idrar ve kalp dokusunda yapılan çalışmalar,

- Rutin biyokimya
- Doku ve plazma örneklerinde biyokimyasal çalışma
- Histopatolojik çalışma

şeklinde üç başlık altında toplandı.

3.2.1. Rutin Biyokimya Analizleri

Ratlardan alındığı gün,

Plazma örneklerinde: BUN, kreatinin, kreatin kinaz (CK), CK-MB, albümin, laktat dehidrogenaz (LDH) ölçümleri Roche Cobas 702 ve Roche Cobas 501 otoanalizöründe, uygun ticari kitler kullanılarak ölçüldü.

3.2.2. Biyokimyasal Çalışma

Çalışma gününe kadar alikotlar halinde dondurularak saklanan;

Plazma örneklerinde; cTnI, CMLC-1 ve İMA düzeyleri,

Doku örneklerinde; Lipid hidroperoksit, TAK, TOK, 3-NT, 4-HNE, tiyol düzeyleri çalışıldı.

Kalp doku örneklerinin biyokimyasal ölçümlere hazırlanması: Çalışma gününe kadar -40°C’de saklanan kalp parçalarından homojenatların hazırlanması sırasında yapılan tüm işlemler, buz üzerinde ve 4°C’de yürütüldü. Homojenizasyon işlemi, teflon uçlu homojenizatör ile gerçekleştirildi.

Çalışılan yöntemlere göre, kalp dokularına uygulanan işlemler aşağıda verildi:

- Buzu çözündürülen kalp parçaları, 3 kez daha soğuk SF ile yıkandı ve süzgeç kağıdıyla kurulandı. Hassas terazide 0,1 gram ağırlığında tartılan yaş doku örnekleri, 2,0 mL 0.02 M EDTA ile homojenize edildi ve doğrudan aynı gün doku tiyol tayininde kullanıldı .

- Buzu çözündürülen kalp parçaları, 0.015 M fosfat tamponlu salin (PBS; pH 7.4) ile yıkandı ve süzgeç kağıdıyla kurulandı. Hassas terazide tartılan yaş doku örnekleri, 1/10 (w/v) oranında PBS ile homojenize edildi. Alikotlar halinde dondurularak saklandı. Çalışma günü çözündürülen bu alikotlar vorteksle karıştırıldı,, 20.000 g’ de 15 dk santrifüjlendi. Elde edilen süpernatantlar; TOK ve TAK ölçümlerinde kullanıldı.

1/10 (w/v) doku homojenatlarının alikotlarının bi kısmı ise 3000 rpm de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar 3-NT ve 4-HNE tayininde kullanıldı.

Ölçümlerde kullanılan yöntemlerin tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla; kontrol grubu ratlarından kalp dokuları ve plazma örnekleri alınarak numune havuzları oluşturuldu. Bu havuzlarda, her yöntem için ayrı ayrı, en az 10-15 ölçüm yapıldı ve değişim katsayısı (coefficient of variation; CV) değerleri hesaplandı.

3.2.2.1.Doku Protein Tayini

Ratların kalp dokularında doku protein seviyeleri, spektrofotometrik yöntemle tayin edildi

Metodun prensibi, alkali ortamda bakır iyonu (Cu^{2+}), proteinlerdeki peptid bağları ile bir kompleks oluşturur ve Cu^{1+} ’e indirgenir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan Tyr, Trp ve Cys aminoasitleri Folin-Fenol reaktifini indirgeyerek renk oluşumuna neden olur olur. Oluşan rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve 660 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür (84).

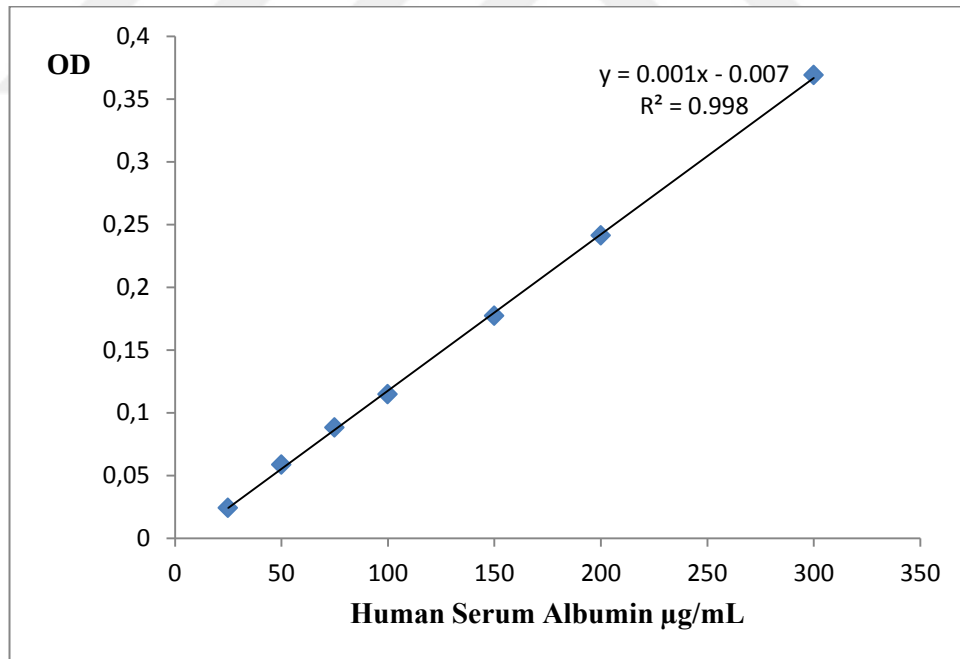
Çözeltiler:

- A Reaktifi: %2 Na_2CO_3 (0.1N NaOH içinde)
- B Reaktifi: % 1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + % 2 NaK tartarat. $4\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v)
- C Reaktifi: 50 ml A reaktifi ile 1 ml B reaktifi (v/v)
- 2 N Folin ciocalteu-fenol reaktifi:1.1 (v/v oranında tip 1 su ile dilüe)

Doku protein çalışma planı (84)

	Numune	Kör
Doku homejanatı	0.3 mL	-
Tip 1 su	-	0.3 mL
C reaktifi	3 mL	3 mL
İyice karıştırılan tüpler oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.		
Tüpler vorteklenirken Folin ciocalteu-fenol reaktifi eklendi.		
Folin ciocalteu-fenol	0.3 mL	0.3 mL
Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.		
Absorbansla 660 nm’de köre karşı okundu.		

Standart serinin hazırlanması: Stok HSA (300µg/mL) çözeltisi, doku protein tayini için, 25; 50; 75; 100; 150; 200 ve 300 µg/mL konsantrasyonlarında Tip I su ile dilüe edildi ve her standart, numune gibi çalışıldı. HSA konsantrasyonlarına karşılık gelen OD değerleriyle standart grafikler çizildi (Şekil 4).



Şekil 4. Human Serum Albumin Standart Grafiği

Dilüsyon faktörüyle çarpılarak hesaplanan homojenat örneklerinin doku protein düzeyleri mg/mL olarak verildi. Hesaplanan doku protein düzeyleri (mg/mL) bu parametreyi kullanan diğer doku parametrelerin hesaplanmasında kullanıldı.

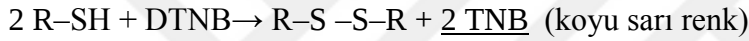
Doku protein tayininde kullanılan yöntemin metodu CV değeri, % 3.88 olarak bulundu.

	Ölçüm sayısı	$\bar{X} \pm SD$	CV (%)
Doku protein (mg/ mL)	14	20.74 $\pm$ 0.77	3.88

3.2.2.2. Tiyol Tayini

Ratların kalp dokularında tiyol seviyeleri, spektrofotometrik yöntemle tayin edildi .

Metodun prensibi, serbest tiyol grupları tarafından, Ellman reaktifi [5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit); DTNB]'nin redüklenmesiyle açığa çıkan, koyu sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB)'in renk şiddetinin 412 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanır (85).



Çözeltiler

- 0.1 M Tris-HCl tamponu, pH 8.2 (10 mM EDTA içerir)
- 0.2 M Tris-HCl tamponu, pH 8.2
- 0.02 M EDTA
- 10 mM DTNB (metanolde hazırlanır)
- 3.0 mM GSH (stok standart)

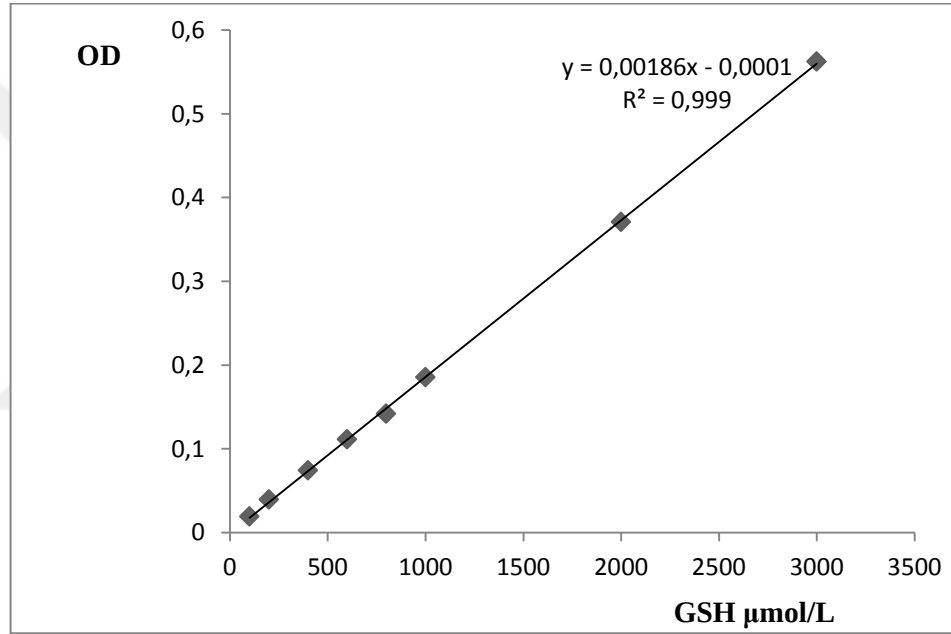
Reaksiyon ortamına DTNB ilavesiyle inkubasyon süresi başlatılarak; kör, kontrol ve numune tüpleri, 25°C'de tam 15 dk inkube edildi. Daha sonra, kör tüpüne karşı, kontrol ve numune tüplerinin absorbansı 412 nm dalga boyunda ölçüldü ve ΔOD değerleri hesaplandı. Değerlendirme standart grafik üzerinden yapıldı.

Doku tiyol çalışma yöntemi (85)

	Kör	Kontrol	Numune
0.2 M Tris-HCl	0.300 mL	0.300 mL	0.300 mL
Metanol	1.60 mL	1.58 mL	1.58 mL
Doku homojenatı	-	0.02 ml	0.02 ml
0.02 M EDTA	0.100 mL	0.08 mL	0.08 mL
DTNB	0.02 mL	-	0.02 mL

Reaksiyon ortamına DTNB ilavesiyle inkubasyon süresi başlatıldı. Kör, kontrol ve numune tüpleri, 30°C’de çalkalamalı su banyosunda tam 15 dk inkübe edildikten sonra, 10.000 g’de 10 dk santrifüj edildi. Kontrol ve numune tüplerinden elde edilen süpernatantların absorbansı, kör tüpüne karşı, 412 nm’de ölçüldü ve ΔOD değerleri hesaplandı. Değerlendirme standart grafik üzerinden yapıldı.

Standart serinin hazırlanması: Stok GSH (3.0 mM) çözeltisi, doku tiyol tayini için, 100; 200; 400; 600; 800; 1000; 2000 ve 3000 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonlarında standart seri oluşturacak şekilde Tip I su ile dilüe edildi ve her standart, numune gibi çalışıldı. GSH konsantrasyonlarına karşılık gelen OD değerleriyle standart grafikler çizildi (Şekil5).



Şekil 5. Glutatyon Standart Grafiği

Standart grafikten bulunan doku tiyol seviyeleri ($\mu\text{mol/L}$), aynı dokuda tayin edilen protein (mg/mL) değerlerine bölünerek, nmol/mg protein olarak verildi.

Doku tiyol tayininde kullanılan yöntemin metodunun CV değeri, % 3.80 olarak bulundu.

	Ölçüm sayısı	$\bar{X} \pm SD$	CV (%)
Doku tiyol (nmol/mg)	14	39.77 ± 1.51	3.80

3.2.2.3. İskemi Modifiye Albümin Tayini

Serum İMA tayininde kullanılan ACB testinin prensibi; albüminin metal bağlama kapasitesinin, Co^{2+} iyonlarının albümine bağlanma derecesi üzerinden gösterilmesine dayanır (40).

Ekzojen Co^{2+} iyonlarıyla inkübe edilen serum örneklerinde, albümin tarafından bağlanmayan kobaltın, ditiyotireitol (DTT) ile verdiği kırmızı kahve renkli kompleksin renk şiddeti, spektrofotometrede 470 nm dalga boyunda ölçülür.

Albüminin Co^{2+} iyonlarını bağlama kapasitesi ne kadar düşükse, kompleksin renk şiddeti o kadar büyük olacak; düşük kobalt düzeyleri ise kapasitenin yüksek olduğunu gösterecektir.

Çözeltiler

- 9.72 mM DTT
- 4.2 mM Kobalt klorür ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- 0.154 M NaCl
- 50 mM Tris-barbital tamponu, pH 8.6
- İnsan serum albümini (HSA) (60 g/L)

İMA Çalışma Planı

	Numune	Numune Körü
Serum	40 μL	40 μL
4.2 mM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10 μL	10 μL
50 mM Tris-barbital tamponu	40 μL	40 μL
Karıştırılan plate oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.		
9.72 mM DTT	10 μL	-
Tip I su	-	10 μL
Karıştırılan plate, oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi.		
0.154 M NaCl	0.160 mL	0.160 mL
Numune ve kör örneklerinin OD'leri, 470 nm'de mikropate okuyucuda okundu		

Hesaplama

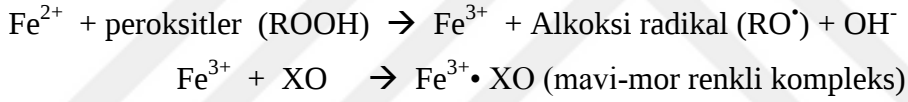
Numune ve numune körlerinin absorbanları kullanılarak ΔOD değerleri bulundu. İMA birimi, absorban ünitesi (ABS Ü) olarak tanımlandı. $ABS \ddot{U} > 0.400$, iskemi için pozitif ve $ABS \ddot{U} < 0.400$, negatif olarak değerlendirildi (40).

Çalışma gruplarında ölçülen İMA, plazma örneklerinin OD değerleri (ABS Ü) ve İMA tayininde kullanılan metodun CV değerleri, birimlerine göre aşağıda gösterildi:

	Ölçüm sayısı	$\bar{X} \pm SD$	CV (%)
İMA (ABS Ü)	16	0.30 ± 0.006	1.93

3.2.2.4.Total Lipid Hidroperoksit Tayini

Plazmada total lipid hidroperoksit tayininde kullanılan FOX yönteminin prensibi; peroksitlerin asidik ortamda oluşturduğu ferrik (Fe^{3+}) iyonun, XO ile yaptığı mavi-mor renkli kompleksin renk şiddetinin, spektrofotometrik olarak 560 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanır (86).



Çözeltiler

- FOX Reaktifi
 - 250 μM $Fe(NH_4)_2SO_4$
 - 100 μM XO
 - 25 mM H_2SO_4
 - 4 mM Butillenmiş hidroksi-toluen (BHT)
 - % 90 (v/v) Metanol
- 10 mM Tris-karboksietil-fosfin (TCEP)

Total Lipid Hidroperoksit Çalışma Planı (86)

	Numune	Numune Körü
Homojenat	90 µL	90 µL
10 mM TCEP	-	10 µL
Tip I su	10 µL	-
Ağız kapatılan tüpler, 20-25°C’de çalkalamalı su banyosunda 30 dk inkübe edildi.		
FOX Reaktifi	900 µL	900 µL
Ağız kapatılan tüpler, iyice karıştırıldıktan sonra, 20-25°C’de 60 dk inkübe edildi. Tüplerin 10.000 g’de 10 dk santrifüjlenmesiyle elde edilen süpernatantların OD’si, 560 nm dalga boyunda, Tip I su körüne karşı okundu		

Hesaplama:

Numune OD: Total peroksitlerin oluşturduğu rengin şiddetine karşılık gelir.

Numune körü OD: Lipid peroksit dışındaki peroksitler ve Fe^{3+} iyonu gibi diğer interferans maddelerin verdiği rengin şiddetini gösterir.

Numune ve kör tüplerinin OD farklarından bulunan ΔOD ’ler, $Fe^{3+} \cdot XO$ kompleksine ait molar ekstinksiyon katsayısı (ϵ : $4.31 \times 10^4 M^{-1}cm^{-1}$) yardımıyla, total lipid peroksit değerlerine dönüştürüldü. Dilüsyon faktörüyle çarpılarak hesaplanan homojenat örneklerinin total lipid peroksit düzeyleri ($\mu mol/L$), doku protein düzeylerine (mg/mL) bölünerek gram doku protein başına nanomol olarak verildi ($nmol/g$ doku). Total lipid peroksit tayininde kullanılan metodun CV değeri, % 3.97 olarak bulundu.

	Ölçüm sayısı	$\bar{X} \pm SD$	CV (%)
Lipid peroksit ($nmol/g$ doku)	13	92.41 ± 3.67	3.97

3.2.2.5. Total Oksidan Kapasite Tayini

Doku süpernatantlarının TOK değerleri, Rel Assay Diagnostics (RL0024; Gaziantep-Türkiye) marka kit ile ölçüldü.

Ölçümün prensibi, doku örneklerinde bulunan oksidanların ferröz iyon – orto-dianisidin kompleksini ferrik iyonla oksitlemesi ve ferrik iyonun asidik ortamda kromojen ile mavi-yeşilrenkli kompleks oluşturması esasına dayanır (69). Örneklerde bulunan toplam oksidan miktarı ile orantılı olan kompleksin renk şiddeti, spektrofotometrik olarak 530 nm dalga boyunda ölçülür.

Yöntemin kalibrasyonunda hidrojen peroksit çözeltisi, standart olarak kullanılır.

Çözeltiler

- Çalışma tamponu (Reaktif 1)
- Prokromojen çözeltisi (Reaktif 2)
- Stabilize standart çözeltisi (10 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ekivalanı/L) çözeltisi
- Kontrol level 1 (5.0 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ekivalanı/L) çözeltisi
- Kontrol level 2 (20.0 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ekivalanı/L) çözeltisi

TOK Çalışma Planı (69)

	Numune	Standart
Çalışma standardı	-	75 μL
Numune	75 μL	-
Çalışma tamponu	500 μL	500 μL
• Tüplerin OD ₁ değerleri, 530 nm dalga boyunda okundu.		
30 saniye sonrasında;		
Prokromojen çözeltisi	25 μL	25 μL

- Standart ve numune tüplerinin OD₂ değerleri, 37°C’de 5 dk inkübasyonu takiben Tip I su körüne karşı, 530 nm dalga boyunda okundu.

Hesaplama

$$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ ekivalanı/ L} = \frac{(\Delta\text{OD numune}) * \text{Standart konsantrasyonu}}{(\Delta\text{OD standart})}$$

Doku örneklerinde tayin edilen TOK, yukarıda verilen formüle göre hesaplandı. Doku TOK değerleri, doku protein düzeyleri (mg/mL)'ne bölünerek, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ekivalanı/g doku protein olarak verildi.

3.2.2.6. Total Antioksidan Kapasite Tayini

Doku süpernatantlarında TAK ölçümleri, Rel Assay Diagnostics (RL0017; Gaziantep-Türkiye) marka kit kullanılarak yapıldı.

Ölçümün prensibi, doku örneklerinde bulunan antioksidanlar tarafından, koyu mavi-yeşil renkli 2,2'-azinobis 3-etil benztiazolin-6-sülfonat radikalinin renksiz ABTS formuna redüklenmesi esasına dayanır (63). Antioksidanların miktarlarına ve kapasitelerine bağlı olan ABTS redüksiyonunun derecesi, spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda renk farkından kaynaklanan absorbans değişikliği ile tayin edilir.

Yöntem, "Trolox ekivalanı" olarak adlandırılan ve vitamin E analogu olan stabil bir antioksidan standart çözelti ile kalibre edilir.

Çözeltiler

- Çalışma tamponu (Reaktif 1)
- Prokromojen ABTS radikal solüsyonu (Reaktif 2)
- Standart (1.0 mmol Trolox Ekivalanı/L)
- Kontrol level 1 (0.5 mmol Trolox Ekivalanı/L)
- Kontrol level 2 (2.0 mmol Trolox Ekivalanı/L)

TAK çalışma planı

	Numune	Standart 1	H ₂ O	Kontrol
Numune	30 µL	-	-	-
Standart	-	30 µl	-	-
Tip 1 su	-	-	30 µL	-
Kontrol	-	-	-	30 µL
Çalışma tamponu	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

- Tüplerin OD₁ değerleri, 660 nm dalga boyunda okundu.

Prokromojen Çözeltisi	75 µL	75 µL	75 µL	75 µL
-----------------------	-------	-------	-------	-------

- Standart numune ve kontrol tüplerinin OD₂ değerleri, 37°C’de 5 dk inkübasyonu takiben Tip I su körüne karşı, 660 nm dalga boyunda okundu.

Hesaplama

$$\text{mmol Trolox Ekvivalanı/L} = \frac{(\Delta\text{OD H}_2\text{O}) - (\Delta\text{OD Numune})}{(\Delta\text{OD H}_2\text{O}) - (\Delta\text{OD Standart})}$$

Doku örneklerinde tayin edilen TAK, yukarda verilen formüle göre hesaplandı (mmol/L). Doku TAK değerleri, doku protein düzeyleri (mg/mL)’ne bölünerek mmol Trolox ekivalanı/g doku protein olarak verildi.

3.2.2.7. Oksidatif stres indeksi

Ratların kalp dokularında tayin edilen TOK ve TAK değerlerinin % oranı olarak kabul edilen oksidatif stres indeksi, aşağıda verilen formüller ile hesaplandı:

$$\text{Doku OSİ (\%)} = \frac{\text{TOK } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ ekivalanı/g doku}) \times 100}{\text{TAK}(\mu\text{mol Trolox ekivalanı/g doku})}$$

Doku (mmol Trolox ekivalanı/g doku) TAK değerleri, µmol Trolox ekivalanı/g doku birimlerine çevrildikten sonra formülde kullanıldı.

3.2.2.8. CMLC-1 Tayini

Plazma CMLC-1 düzeyleri, Mybiosource marka (Katalog No: MBS266939) ELISA kiti kullanılarak ölçüldü.

Plazma CMLC-1 düzeylerinin ölçümünde kullanılan ELISA yönteminin prensibi; yarışmasız antijen–antikor komplekslerinin oluşumuna dayanmaktadır plazmada bulunan CMLC-1 (antijen), resistin antikoru ile kaplı kuyucuklara bağlanır. Yıkama işlemiyle bağlanmayan antijen ve diğer plazma bileşenleri ortamdan uzaklaştırılır. Daha sonra, deney ortamına biyotinlenmiş antikor ilavesiyle “*antikor–antijen–işaretli antikor*” kompleksleri (sandwich ELISA) oluşturulur. Bağlanmayan biyotinlenmiş antikor yıkama işlemiyle ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, kompleksin içinde yer alan biyotinlenmiş antikora yüksek bir afiniteyle bağlananan, avidin peroksidaz konjugatı eklenir. Enzim substratıyla inkübasyonu takiben, plazma CMLC-1 konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak, enzimatik reaksiyonla oluşan rengin şiddeti, 450-630 nm’de ölçülür.

Reaktifler ve Materyaller:

- 1-96 adet CMLC-1 antikoru ile kaplanmış kuyucuk
- 2- Rat CMLC-1 standardı
- 3- Biyotin antikoru
- 4- Enzim konjugatı
- 5- Enzim konjugat dilüenti
- 6- Antikor dilüenti
- 7- Standart dilüenti
- 8- Numune dilüenti
- 9- Yıkama tamponu (1:25)
- 10- Renk reaktifi A
- 11- Renk reaktifi B
- 12- Renk reaktifi C

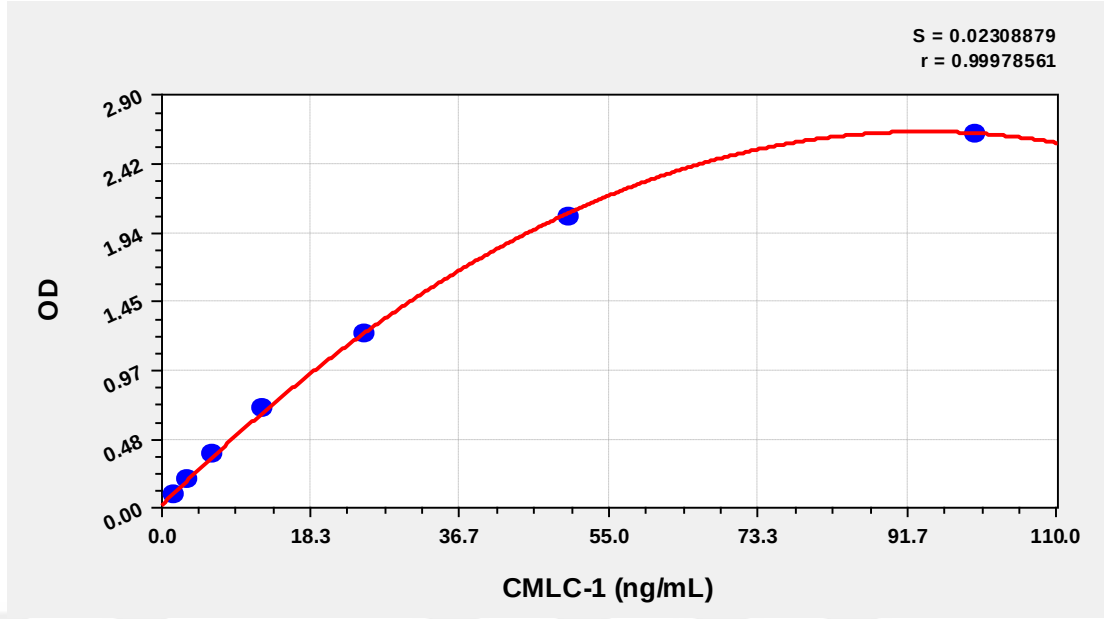
Çalışma Prosedürü

Kullanılacak reaktifler ve plazmalar öncelikle oda ısısına getirildi. Plazmalar vorteks ile iyice karıştırıldı. Stok standart, birbiri ardına seri dölüsyonlar ile yedi adet çalışma

standardı elde edildi (100, 50, 25, 125, 6.25, 3.12, 1,56 ng/mL). 8. Tüpe sadece numune dilüenti eklendi ve negatif kontrol olarak kabul edildi (0 ng/mL). ,

- 1- Standartlar ve numunelerden, önceden belirlenmiş plate planına göre, uygun kuyucuklara 100'er µL konuldu.
- 2- Plate, yapışkan bant ile kapatılarak 37 °C'de 90 dakika inkübe edildi.
- 3- 2. işlemin bitmesine 30 dakika kala, rat biyotin antikoru(100X), antikor dilüenti ile 1:100 oranında dilüe edilerek hazırlandı.
- 4- İnkübasyonu takiben her kuyucuk 350 µL yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı.
- 5- Her bir kuyucuğa rat biyotin antikorundan (1X) 100'er µL konuldu.
- 6- Plate, yapışkan bant ile kapatılarak 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
- 7- 6. İşlemin bitmesine 30 dakika kala enzim konjugatı, enzim konjugat dilüenti kullanılarak 1:100 oranında dilüe edildi.
- 8- İnkübasyonu takiben her kuyucuk 350 µL yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı.
- 9- Kör tüpü haricindeki her bir kuyucuğa enzim konjugatı (1X) 100'er µL konuldu.
- 10- Plate, yapışkan bant ile kapatılarak 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.
- 11- Renk reaktifi A ile Renk reaktifi B 1:9 oranında karıştırılarak renk reaktifi hazırlandı.
- 12- İnkübasyonu takiben her kuyucuk 350 µL yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
- 13- Kör tüpü dahil herbir kuyucuğa renk reaktifi 100'er µL konuldu.
- 14- Plate, yapışkan bant ile kapatılarak 37 °C'de kontrollü bir şekilde 30 dakika inkübe edildi.
- 15- İnkübasyonu takiben her kuyucuğa 100'er µL renk reaktifi C eklendi.
- 16- Enzimatik reaksiyonla kuyucuklarda oluşan rengin şiddeti, 10 dakika içinde 450 ve 630 nm'de okundu.

630 nm'de okunan absorbens değerleri, 450nm'de okunan numune ve standart absorbens değerlerinden çıkarıldı; Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen OD değerleri kullanılarak, CMLC-1 standart grafiği CURVE EXPERT programı kullanılarak çizildi (Şekil 6).



Şekil 6. CMLC-1 Standart Grafiği

Grafik yardımıyla hesaplanan plazma CMLC-1 konsantrasyonları mL plazma başına nanogram cinsinden verildi (ng/mL).

3.2.2.9. cTnI Tayini

Plazma cTnI düzeyleri, CUSABİO marka (Katalog No: CSB-E08594r) ELISA kiti kullanılarak ölçüldü.

Plazma cTnI düzeylerinin ölçümünde kullanılan ELISA yönteminin prensibi kantitatif sandwich ELISA'dır. Plazmada bulunan cTnI (antijen), cTnI antikoru ile kaplı kuyucuklara bağlanır. Yıkama işlemiyle bağlanmayan antijen ve diğer plazma bileşenleri ortamdaki uzaklaştırılır. Deney ortamına biyotinlenmiş antikor ilavesiyle “antikor–antijen–işaretli antikor” kompleksleri (sandwich ELISA) oluşturulur. Bağlanmayan biyotinlenmiş antikor yıkama işlemiyle ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra, kompleksin içinde yer alan biyotinlenmiş antikora yüksek bir afiniteyle bağlanan, avidin conjugated Horseradish Peroxidase (HRP) eklenir. Enzim substratıyla inkübasyonu takiben, plazma cTnI konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak, enzimatik reaksiyonla oluşan rengin şiddeti, 450-630 nm’de ölçülür.

Reaktifler ve Materyaller:

1. 96 adet rat cTnI antikoru ile kaplanmış kuyucuk
2. Stok Standart (2000 pg/mL)
3. Biyotinlenmiş rat cTnI antikoru (100x konsantrasyonunda)
4. HRP-avidin (100x konsantrasyonda)

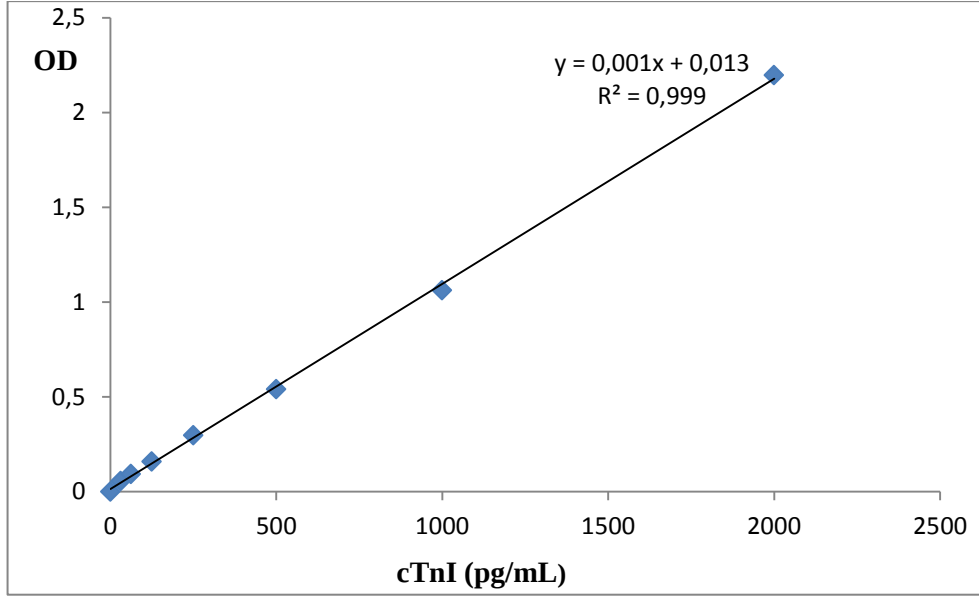
5. Biotinlenmiş antikor dilüenti
6. HRP-avidin dilüenti
7. Numune dilüenti
8. Yıkama tampnu (25x konsantrasyonda)
9. TMB substrat çözeltisi
10. Stop çözeltisi

Çalışma Prosedürü:

Kullanılacak reaktifler ve plazmalar öncelikle oda ısısına getirildi. Plazmalar vorteks ile iyice karıştırıldı. Stok standart(2000 pg/mL), ardışık seri dölüsyonlarla 7 adet (2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 pg/mL) çalışma standartı haline getirildi. Numune dilüenti sıfır standart olarak çalışıldı (0 ng/mL).

1. Standartlar ve numuneler önceden belirlenmiş plate planına göre uygun kuyucuklara 100'er µL konuldu.
2. Yapışkan bant ile kapatılarak 37 °C'de 2 saat inkübe edildi.
3. Tüm kuyucuklardaki sıvı alındı. Herhangi bir yıkama işlemi yapılmadı.
4. Bütün kuyucuklara 100'er µL biyotinlenmiş antikor eklendi. Yapışkan bant ile kapatılarak 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.
5. İnkübasyonu takiben her kuyucuk 200 µL yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı.
6. Bütün kuyucuklara 100'er µL HRP konjugatı eklendi. Yapışkan bant ile kapatılarak 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.
7. İnkübasyonu takiben her kuyucuk 200 µL yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı.
8. Bütün kuyucuklara 100'er µL TMB substrat çözeltisi eklendi. Yapışkan bant ile kapatılarak 37 °C'de 15-30 dakika inkübe edildi. Işıktan korundu.
9. Bütün kuyucuklara 50'şer µL stop çözeltisi eklendi. Nazikçe dokunularak karışması sağlandı.
10. Enzimatik reaksiyonla kuyucuklarda oluşan rengin şiddeti, 450 ve 570 nm'de okundu.

570 nm'de okunan absorbans değerleri, 450nm'de okunan numune ve standart absorbans değerlerinden çıkarıldı; Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen OD değerleri kullanılarak, cTnI standart grafiği excel programı kullanılarak çizildi (Şekil 7).



Şekil 7. cTnI Standart Grafiği

Grafik yardımıyla hesaplanan cTnI plazma konsantrasyonları mL plazma başına pikogram cinsinden verildi (pg/mL).

3.2.2.10. 3-Nitrotirozin Tayini

Doku süpernatantlarında 3-NT tayini, Yehua marka (Katalog No:YHB0011Ra) ELISA kiti kullanılarak yapıldı.

Doku homojenatı 3-NT düzeylerinin ölçümünde kullanılan ELISA yönteminin prensibi; sandwich ELISA'dır. Homojenatta bulunan 3-NT (antijen), 3-NT antikoru ile kaplı kuyucuklara bağlanır. İnkübasyon sonrasında, deney ortamına biyotinlenmiş antikor ilavesiyle “*antikor–antijen–işaretle antikor*” kompleksleri oluşturulur. Bağlanmayan biyotinlenmiş antikor yıkama işlemiyle ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, kompleksin içinde yer alan biyotinlenmiş antikora yüksek bir afiniteyle bağlanan, streptavidin-HRP konjugatı eklenir. Enzim substratıyla inkübasyonu takiben, homojenat 3-NT konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak, enzimatik reaksiyonla oluşan rengin şiddeti, 450nm’de ölçüldü.

Reaktifler ve Materyaller:

1. Antikor kaplı ELİSA PLATE (96 kuyucuklu)
2. Standart çözeltisi (2400nmol/L)
3. Streptavidin-HRP konjugatı
4. Stop çözeltisi

5. Kromojen reaktif A
6. Kromojen reaktif B
7. Biotinle işaretlenmiş Anti 3-NT
8. Standart dilüsyonu
9. Yıkama tamponu

Çalışma Prosedürü

Çalışma günü pH'ı 7.4 olan PBS ile homojenize edilip dondurulmuş $1/10$ PBS ile homojenize edilip dondurulmuş olan $1/10$ (w/v) doku homojenatları oda ısısında çözündürülüp, 3000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Elde edilen doku süpernatantlarında 3-NT çalışıldı. Kullanılacak reaktifler öncelikle oda ısısına getirildi. Süpernatantlar vorteks ile iyice karıştırıldı. Stok standarttan (2400nmol/L), Seri dilüsyonlar ile 6 adet çalışma standardı elde edildi (2400, 1200, 600, 300, 150, 75 nmol/mL). Kör okumalarında numune olarak distile su kullanıldı.

3-NT Çalışma Planı

	Numune	Kör	Standart
Süpernatant	40 μ L	-	-
Distile su	-	100 μ L	-
Standart seri	-	-	50 μ L
Enzim konjugatı	50 μ L	-	50 μ L
Biotinlenmiş antikor	10 μ L	-	-

Yapışkan bant ile kaplanan plate, hafifçe karıştırıldıktan sonra 37 °C'de inkübe edildikten sonra, her kuyucuk 350 μ L yıkama tamponu ile beş kez yıkandı.

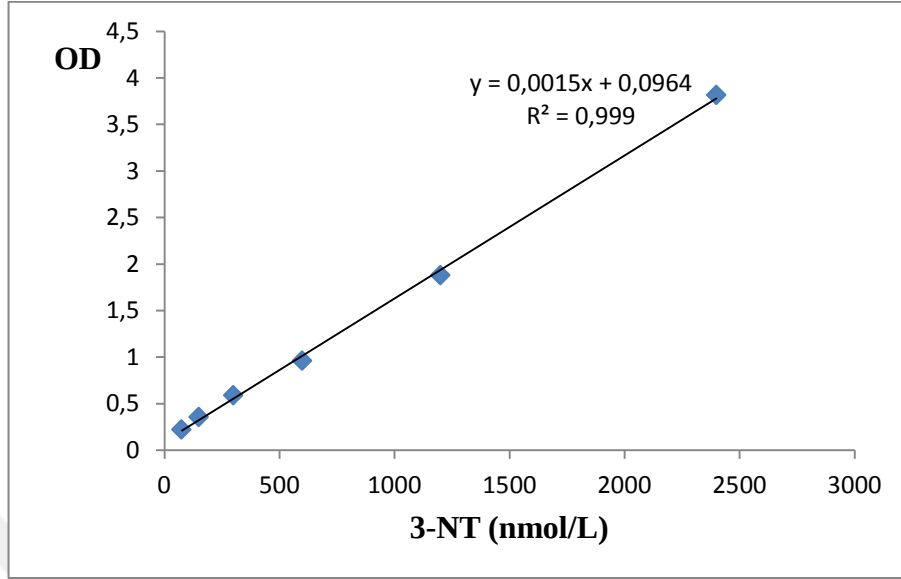
Kromojen çözeltisi A	50 μ L	50 μ L	50 μ L
Kromojen çözeltisi B	50 μ L	50 μ L	50 μ L

Yapışkan bant ile kaplanan plate, hafifçe karıştırıldıktan sonra 37 °C'de ışıktan uzakta 10 dakika inkübe edildi.

Stop çözeltisi	50 μ L	50 μ L	50 μ L
----------------	------------	------------	------------

Enzimatik reaksiyonla kuyucuklarda oluşan rengin şiddeti, 450 nm'de okundu.

450 nm’de okunan standart ve numune absorbans değerlerinden kör değerleri çıkarıldı. Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen OD değerleri kullanılarak, 3-NT standart grafiği excelde çizildi (Şekil 8).



Şekil 8. 3-NT Standart Grafiği

Grafik yardımıyla hesaplanan 3-NT süpernatant konsantrasyonları dilüsyon faktörü ile çarpılarak (nmol/L) olarak verildi.

Doku 3-NT’nin konsantrasyonu (nmol/L), aynı süpernatanda ölçülen protein (mg/mL) değerlerine bölünerek nmol/gram protein başına verildi.

3.2.2.11. 4-HNE Tayini

Doku süpernatantlarında 4-HNE tayini, Yehua marka (Katalog No:YHB0012Ra) ELISA kiti kullanılarak yapıldı.

Doku homojenatı 4-HNE düzeylerinin ölçümünde kullanılan ELISA yönteminin prensibi; sandwich ELISA’dır. Homojenatta bulunan 4-HNE (antijen), 4-HNE antikoruna ile kaplı kuyucuklara bağlanır. İnkübasyon sonrasında, deney ortamına biyotinlenmiş antikor ilavesiyle “*antikor–antijen–işaretli antikor*” kompleksleri oluşturulur. Bağlanmayan biyotinlenmiş antikor yıkama işlemiyle ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, kompleksin içinde yer alan biyotinlenmiş antikora yüksek bir afiniteyle bağlanan streptavidin-HRP konjugatı eklenir. Enzim substratıyla inkübasyonu takiben, homojenat 4-HNE konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak, enzimatik reaksiyonla oluşan rengin şiddeti, 450nm’de ölçüldü.

Reaktifler ve Materyaller:

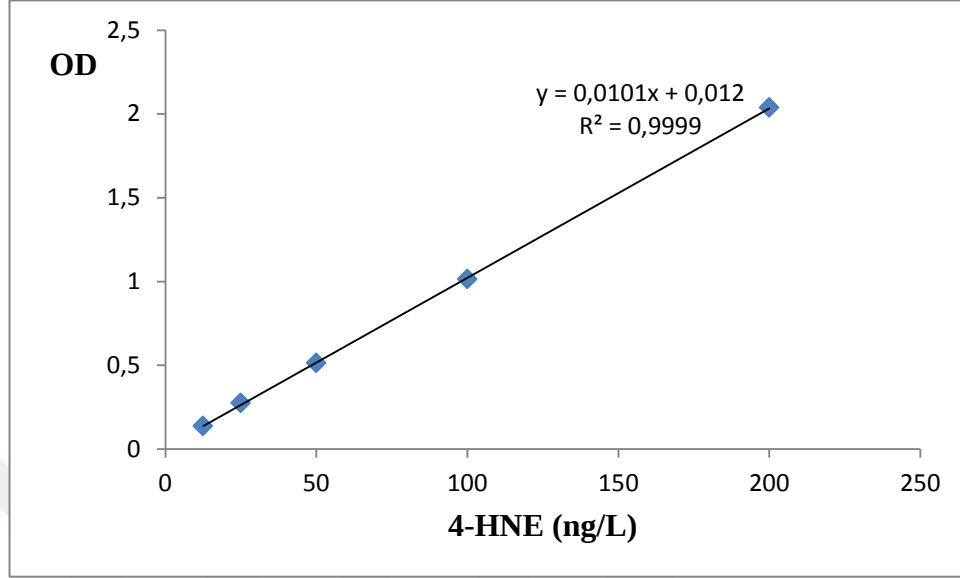
1. Antikor kaplı ELİSA PLATE (96 kuyucuklu)
2. Standart çözeltisi (400ng/L)
3. Streptavidin-HRP konjugatı
4. Stop çözeltisi
5. Kromojen reaktif A
6. Kromojen reaktif B
7. Biyotinle işaretlenmiş Anti- 4-HNE
8. Standart dilüsyonu
9. Yıkama tamponu

Çalışma günü çözdürülen ph'ı 7.4 olan PBS ile homojenize edilip dondurulmuş $1/10$ (w/v) doku homojenatları, oda ısısında getirilip 3000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Elde edilen doku süpernatanlarıyla birlikte kullanılacak reaktifler öncelikle oda ısısına getirildi. Süpernatanın, vorteks kullanılarak iyice karışması sağlandı. Stok standart(400 ng/L), birbiri ardına seri dilüsyonlar yapılarak yarı yarıya azalan 6 adet standart elde edildi (200, 100, 50, 25, 12.5 ng/L) Distile su kör olarak çalışıldı (0 ng/mL).

4-HNE Çalışma Planı

	Numune	Kör	Standart seri
Süpernatan	40 µL	-	-
Distile su	-	100 µL	-
Standart seri	-	-	50 µL
Enzim konjugatı	50 µL	-	50 µL
Biyotinlenmiş antikor	10 µL	-	-
Yapışkan bant ile kaplanan plate, hafifçe karıştırıldıktan sonra 37 °C'de inkübe edildikten sonra, her kuyucuk 350 µL yıkama tamponu ile beş kez yıkandı.			
Kromojen çözeltisi A	50 µL	50 µL	50 µL
Kromojen çözeltisi B	50 µL	50 µL	50 µL
Yapışkan bant ile kaplanan plate, hafifçe karıştırıldıktan sonra 37 °C'de ışıktan uzakta 10 dakika inkübe edildi.			
Stop çözeltisi	50 µL	50 µL	50 µL
Enzimatik reaksiyonla kuyucuklarda oluşan rengin şiddeti, 450 nm'de okundu.			

450 nm’de okunan standart ve numune absorbans değerlerinden kör değerleri çıkarıldı. Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen OD değerleri kullanılarak, standart grafiği excelde çizildi (Şekil 9).



Şekil 9. 4-HNE Standart Grafiği

Grafik yardımıyla hesaplanan 4-HNE süpernatant konsantrasyonları dilüsyon faktörü (10) ile çarpılarak (ng/L) olarak verildi.

Doku 4-HNE’nin konsantrasyonu (ng/L), aynı süpernatanda ölçülen protein (mg/mL) değerlerine bölünerek, ng/gram protein başına verildi.

3.2.3. Histopatolojik Çalışma

Alınan kalp doku örnekleri ışık mikroskopik inceleme için % 10’luk formaldehit solüsyonu içine konuldu ve 48 saat süreyle tespit edildi. Tespitten sonra doku örnekleri, artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi, ksilen ile şeffaflandırıldıktan sonra 60°C’de eriyik parafinde bir gece bekletildi.

Parafin bloklara yerleştirilen kalp dokularından 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitler genel histolojik yapı değerlendirilmesi için hematoksilen ve eozin ile boyandı (Tablo 6) ve Olympus BX51 (Tokyo, Japan) mikroskopunda incelendi.

Doku örnekleri Tablo 3’de verilen tanımlama ve skorelama tablosu doğrultusunda değerlendirildi.

Tablo 3. Kalp Dokusu Tanımlama ve Skorlama Tablosu

Kalp	Yok	Hafif	Orta	Şiddetli
Hemoraji	0	1	2	3
İnterstisyel ödem	0	1	2	3
Vakuolizasyon	0	1	2	3

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışma gruplarından elde edilen verilerin değerlendirilmesinde, "IBM SPSS Statistics 22" ve "R. Studio" paket programları kullanıldı. Sayısal değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu *Shapiro-Wilk* testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren sayısal değişkenlerin özet istatistikleri aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma ($\bar{X} \pm SD$) olarak verildi. Normal dağılıma uymayan sayısal değişkenlerin özet istatistikleri için, ortanca (% 25. – % 75. persentil) değerleri kullanıldı.

Normal dağılım gösteren değişkenlerin gruplara göre karşılaştırılması, “Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA)” ve fark çıkan grupların çoklu karşılaştırılması da post ANOVA (*Student-Newman-Keuls*) ile yapıldı.

Normal dağılım göstermeyen değişkenlerin gruplara göre karşılaştırılmasında, *Kruskal-Wallis* analizi kullanıldı.

Aynı çalışmada iki nicel değişkenin korelasyonunu *Spearman* korelasyon analiziyle değerlendirildi.

Tüm istatistikî karşılaştırmalarda, anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde bulunan Wistar albino, 150–180 günlük, 300–400 g ağırlığında 32 erkek rat kullanıldı.

Her biri 8 rat içeren dört çalışma grubu, sırasıyla Kontrol, CP, NAC, CP-NAC; grupları olarak belirlendi. CP verilen gruplardaki ratlara, kg rat ağırlığı başına 10 mg CP olacak şekilde tek doz halinde *ip* uygulama yapıldı. NAC, 250 mg/kg rat ağırlığı/gün dozunda *ip* olarak, kendilerine karşılık gelen gruplardaki ratlara, üç gün süreyle, ardışık olarak verildi. CP-NAC grubuna 10 mg/kg CP olacak şekilde tek doz halinde *ip* olarak uygulamanın ardından ilk uygulaması 4 saat sonra olacak şekilde, 250 mg/kg rat ağırlığı/gün dozunda *ip* olarak 3 gün süre ile NAC, ardışık olarak uygulandı. Kontrol grubu ratlarına da, SF’de kg rat ağırlığı başına 1 mL olacak şekilde, tek doz halinde *ip* uygulandı. Ayrıca, nefrotoksisite oluşturacak CP dozunu belirlemek amacıyla, 6 rata biyokimyasal ve histopatolojik ön-çalışma yapıldı.

Çalışma sonunda, kanları alındıktan hemen sonra sakrifiye edilen ratların kalpleri çıkartıldı. Kalp dokusunun bir kısmı histolojik inceleme için Histoloji A. D.’nda değerlendirildi. Plazma örneklerinin bir kısmı, aynı gün rutin analizlerde kullanıldı. Kalbin geri kalanı ile plazma örnekleri, alikotlar halinde, çalışma gününe kadar -40°C’de dondurularak saklandı.

Plazma ve kalp dokusunda yapılan çalışmalara ait bulgular; rutin analiz bulguları, biyokimyasal ve histopatolojik bulgular şeklinde üç başlık altında toplandı.

Çalışma gruplarına ait tüm veriler, Ek Tablo 1 ve 2’de gösterildi. Bu verilerden elde edilen grup ortalama değerleri, Tablo 4, 5 ve 6’da, aritmetik ortalama ve standart sapma ($X \pm SD$) ile medyan 25p-75p persentil değerleri kullanılarak değerlendirildi. İstatistiki karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edildi.

4.1. Rutin Analiz Bulguları

Ratların plazma örneklerinde tayin edilen CK, CK-MB, LDH aktiviteleri, CK-MB/CK oranı ile BUN Kreatinin düzeyleri, Tablo 5’de sunuldu.

Tablo 4. Çalışma Gruplarının Rutin Analiz Sonuçları

Parametre	Kontrol	CP	NAC	CP-NAC
BUN (mg/dL)	18.4 (17.9-20.6)	140.6 (97.4-168.4)*	15.3 (14.9-18) ^a	98.9 (86.8-107.2) ^b
Kreatinin (mg/dL)	0.42 (0.38-0.52)	3.22 (2.34-4.06)*	0.39 (0.33-0.42) ^a	1.83 (1.70-2.05) ^b
CK (U/L)	642 (435-809)	777 (669-1780)	392(297-486) ^a	1201 (870-1544) ^b
CK-MB (U/L)	154 (101-211)	412 (392-582)*	109 (103-118) ^a	212 (198-223)
LDH (U/L)	157 (145-260)	751 (578-794)*	119.5 (103-158) ^a	445.5 (422-473) ^b

İstatistiki karşılaştırma: Tüm çalışma grupları arasında *Kruskal Wallis* test yapıldı.

Anlamlı bulgular: *Kontrol grubu, ^a:CP grubu, ^b NAC grubu ve diğer grupların karşılaştırılması sırasında elde edildi.

Tablo 4’e göre; Plazma BUN, kreatinin ve LDH değerleri bakımından; Kontrol grubu ile NAC ve CP-NAC grupları arasında farklılık olmadığı belirlendi ($p > 0.05$). NAC grubu ile CP-NAC grubu arasında farklılık belirlendi ($p < 0.05$), NAC ve Kontrol grubu, CP grubu ile kıyaslandığında aralarında farklılık belirlendi ($p < 0.05$), CP grubunda BUN düzeyinin anlamlı arttığı gösterildi. CP grubu ile CP-NAC grupları arasında fark olmadığı gözlemlendi ($p > 0.05$).

Tablo 4’e göre; Plazma CK düzeylerine bakıldığında; Kontrol grubu ile hiçbir grup arasında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlendi ($p > 0.05$). NAC grubu ile hem CP grubu hem de CP-NAC grubu arasında anlamlı bir farklılık belirlendi ($p < 0.05$). CP grubu ile CP-NAC grubu arasında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlendi ($p > 0.05$).

Plazma CK-MB düzeylerine bakıldığında; Kontrol grubu ile NAC ve Kontrol grubu ile CP-NAC grubu arasında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlendi ($p > 0.05$). Tam

tersi şekilde hem Kontrol grubu ile CP grubu arasında hem de NAC GRUBU ile CP grubu arasında anlamlı bir farklılık belirlendi ($p<0.05$). CP grubunda CK-MB düzeyleri anlamlı oranda arttığı gözlemlendi. NAC grubu ile CP-NAC grubu arasında ve CP-NAC grubu ile CP grubu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$).

4.2. Biyokimyasal Çalışma Bulguları

Ratlardan elde edilen plazma örneklerinde cTnI, CMLC-1 ve tiyol düzeyleri ve İMA; doku örneklerinde ise 3-NT, 4-HNE, TAK, TOK, tiyol ve total lipid hidroperoksit düzeyleri tayin edildi.

Tablo 5. Çalışma Gruplarının Kardiyak Parametreleri

Parametre	Kontrol	CP	NAC	CP-NAC
cTnI (pg/mL)	6.5 (0.75-11.75)	305.5 (298-350) *	13.5 (13-15.5) ^a	154.5 (132.2-179.7)*
CMLC-1 (ng/ mL)	0.76 (0.46-0.88)	15.45 (13.34-23.22)*	0.77 (0.67-1.02) ^a	5.82 (4.95-6.32)*
İMA (% ABS)	0.322 (0.296-0.340)	0.495 (0.461-0.529)*	0.266 (0.252-0.291) ^a	0.333 (0.289-0.355)

İstatistiki karşılaştırma: Tüm çalışma grupları arasında *Kruskal Wallis* test yapıldı.

Anlamlı bulgular: *Kontrol grubu, ^a:CP grubu, ^b NAC grubu ve diğer grupların karşılaştırılması sırasında elde edildi

Tablo 5'e göre; Plazma cTnI ve CMLC-1 düzeylerine bakıldığında; Kontrol grubu ile NAC grubu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$). Hem cTnI hem de CMLC-1 düzeyleri CP grubunda ciddi anlamda yükselmiştir. Kontrol grubu ile CP-NAC ve CP grubu ve CP grubu ile NAC grubu arasında bir farklılık tespit edildi ($p<0.05$). Aksi yönde CP grubu ile CP-NAC grubu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$).

Tablo 5'e göre; Plazma İMA düzeyine bakıldığında; Kontrol grubu ile NAC grubu arasından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$). İMA düzeyleri CP grubunda ciddi anlamda yükselmiştir. Kontrol grubu ile CP grubu ve CP grubu ile NAC grubu arasında bir farklılık tespit edildi ($p<0.05$). Aksi yönde Kontrol grubu ile CP-NAC grubu ve CP grubu ile CP-NAC grubu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$).

Tablo 6. Çalışma Gruplarının Oksidatif Stres/Antioksidan Kapasite Parametreleri

Parametre	Kontrol	CP	NAC	CP-NAC
TAK mmol/g	0.741 ± 0.063	0.217 ± 0.098*	1.0 ± 0.140 ^a	0.599 ± 0.056 ^{a, b}
TİYOL nmol/mg	42.95± 3.57	32.6 3±.92*	43.43± 4.23 ^a	37.66 ±2.21 ^{a, b}
TOK µmol/g	1.82 (1.62-1.91)	3.31 (3.09- 3.56)*	1.83 (1.46-2.04) ^a	2.19 (2.03-2.36)
OSİ (%)	0.24 (0.22-0.26)	1.42 (1.1- 3.8)*	0.169 (0.15-0.225) ^a	0.37 (0.33-0.41) ^b
4-HNE ng/g	47.8 (42.5-53.7)	87.9 (83.1-97.2)*	58.6 (57.0-63.1) ^a	69.5 (68.3-74.1)*
ROOH nmol/g	0.56 (0.41-0.74)	1.16 (1.0-1.31)*	0.62 (0.53-0.64) ^a	0.82 (0.76-0.89)
3-NT nmol/g	360(339-423)	702 (664-755)*	363.1 (312- 465) ^a	457(428-508)

İstatistiki karşılaştırma: Çalışma grupları arasında *Kruskal Wallis* ve *One Way Anova* (gri satırlar) testleri yapıldı.

Anlamli bulgular: *Kontrol grubu, ^a:CP grubu, ^b NAC grubu ve diğ er grupların karşılaştırılması sırasında elde edildi.

Tablo 6'ya göre; doku TAK düzeyine bakıldığında, tüm gruplar arasında bir farklılık tespit edildi ($p < 0.05$).

Doku tiyol düzeyleri incelendiğinde; Kontrol grubu ile NAC grubu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p > 0.05$). Tersine Kontrol grubu ile CP grubu ve Kontrol grubu ile CP-NAC grubu arasında anlamlı bir farklılık tespit edildi ($p < 0.05$). CP grubu ile diğ er tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edildi ($p < 0.05$). Yine benzer şekilde NAC grubu ile CP-NAC grubu arasında anlamlı bir farklılık tespit edildi ($p < 0.05$).

Tablo 6'ya göre; Doku TOK düzeyine değ erlendirildiğinde; Kontrol grubu ile NAC grubu arasından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p > 0.05$). TOK düzeyleri CP grubunda ciddi anlamda yükselmiştir. Kontrol grubu ile CP grubu ve CP grubu ile NAC grubu arasında bir farklılık tespit edildi ($p < 0.05$). Aksi yönde Kontrol grubu ile CP-NAC grubu ve CP grubu ile CP-NAC grubu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p > 0.05$). OSİ yüzdesine gö zatıldığında; Kontrol grubu ile NAC grubu arasından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p > 0.05$). OSİ düzeyleri CP grubunda ciddi anlamda yükselmiştir. Kontrol grubu ile CP-NAC grubu, Kontrol grubu ile CP

grubu ve CP grubu ile NAC grubu arasında bir farklılık tespit edildi ($p<0.05$). Aksi yönde CP grubu ile CP-NAC grubu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$).

Tablo 6'ya göre; Doku 4-HNE düzeyine bakıldığında; Kontrol grubu ile NAC grubu arasından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$). 4-HNE düzeyleri CP grubunda ciddi anlamda yükselmiştir. Kontrol grubu ile CP-NAC grubu, Kontrol grubu ile CP grubu ve CP grubu ile NAC grubu arasında bir farklılık tespit edildi ($p<0.05$). Aksi yönde CP grubu ile CP-NAC grubu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$).

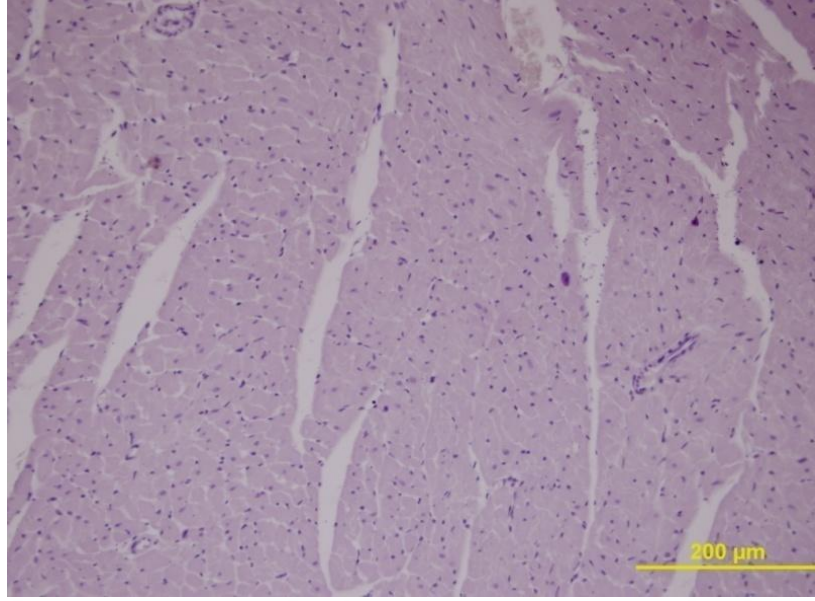
Tablo 6'ya göre; Doku ROOH düzeyi değerlendirildiğinde; Kontrol grubu ile NAC grubu arasından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$). ROOH düzeyleri CP grubunda ciddi anlamda yükselmiştir. Kontrol grubu ile CP grubu ve CP grubu ile NAC grubu arasında bir farklılık tespit edildi ($p<0.05$). Aksi yönde Kontrol grubu ile CP-NAC grubu ve CP grubu ile CP-NAC grubu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$).

Tablo 6'ya göre; Doku 3-NT düzeyine bakıldığında; Kontrol grubu ile NAC grubu arasından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$). 3-NT düzeyleri CP grubunda ciddi anlamda yükselmiştir. Kontrol grubu ile CP grubu ve CP grubu ile NAC grubu arasında bir farklılık tespit edildi ($p<0.05$). Aksi yönde Kontrol grubu ile CP-NAC grubu ve CP grubu ile CP-NAC grubu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$).

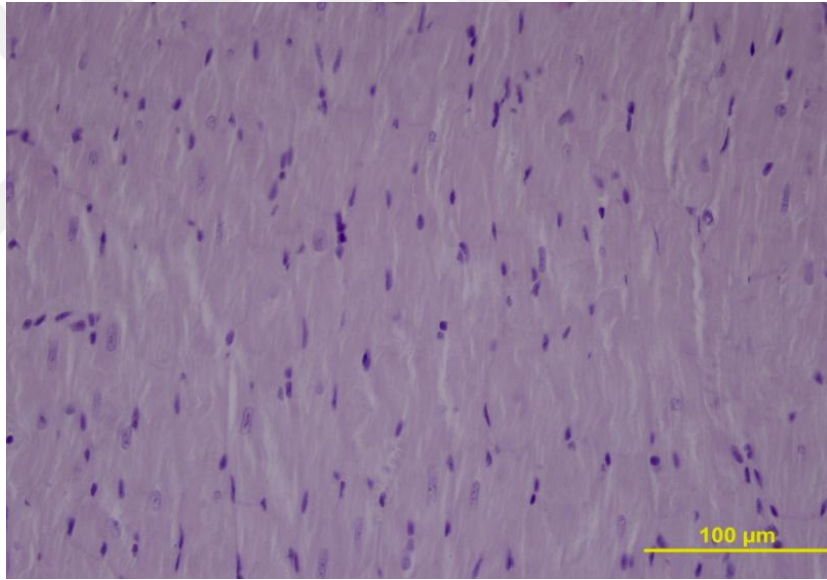
4.3. Histopatolojik Bulgular

Preparat uygulamalarını takiben ratlardan elde edilen kalp dokuları histolojik olarak değerlendirildi. Çalışma gruplarına ait histolojik bulgular aşağıda verildi:

Kontrol Grubu: Kalp kesitlerinde; hemoraji, interstisyel ödem, vakuolizasyon gibi mikroskopik değişiklikler gözlenmedi. Kalp kası enine çizgilenme gösterirken nükleus hücre merkezindeydi ve tamamen normal olarak değerlendirildi (Şekil 10-11).

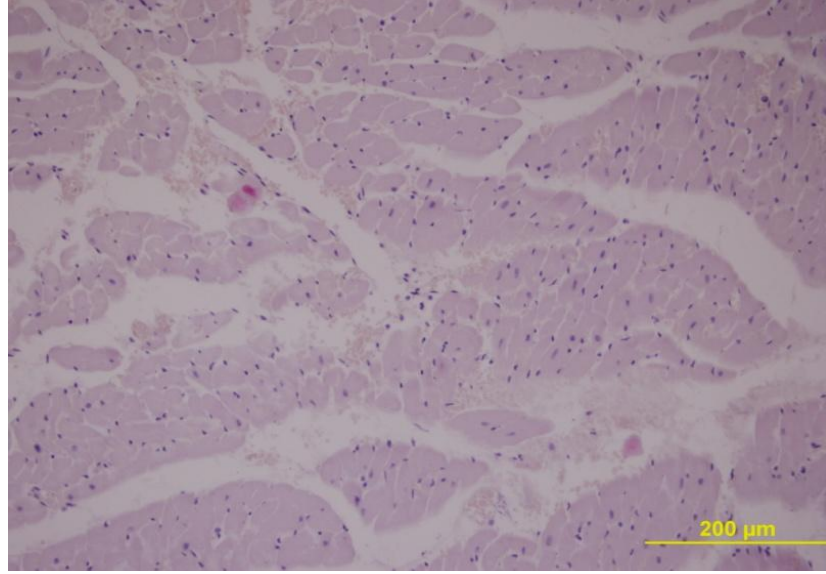


Şekil 10. Kontrol Grubu Kalp Dokusunun Histolojik Görünümü (HEx200)

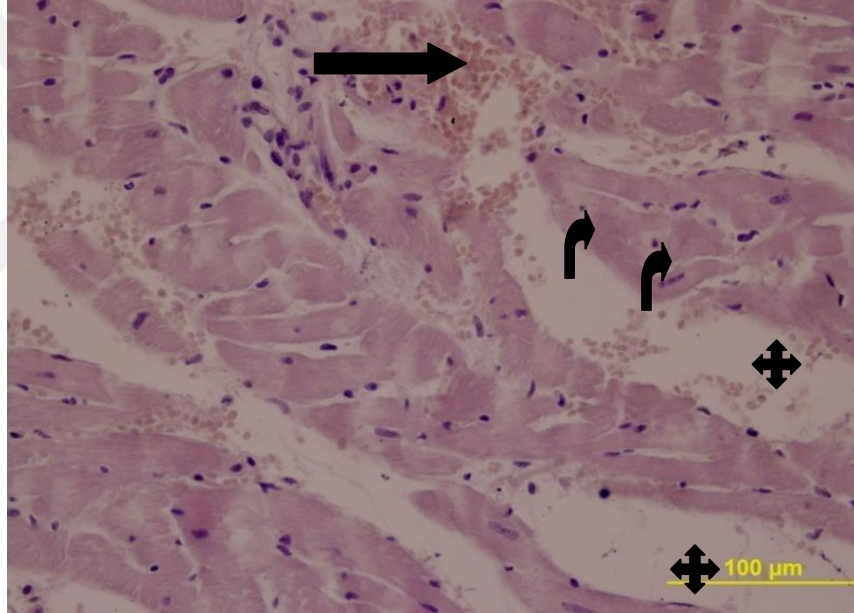


Şekil 11. Kontrol Grubu Kalp Dokusunun Histolojik Görünümü (HEx400)

CP Grubu: Bu grupta, Kontrol grubuyla kıyaslandığında, anormal kalp dokusu histolojik bulguları gözlemlendi. Belirgin hemoraji, interstisyel ödem ve kalp kası hücrelerinde vakuolizasyon mevcuttu (Şekil 12–13).



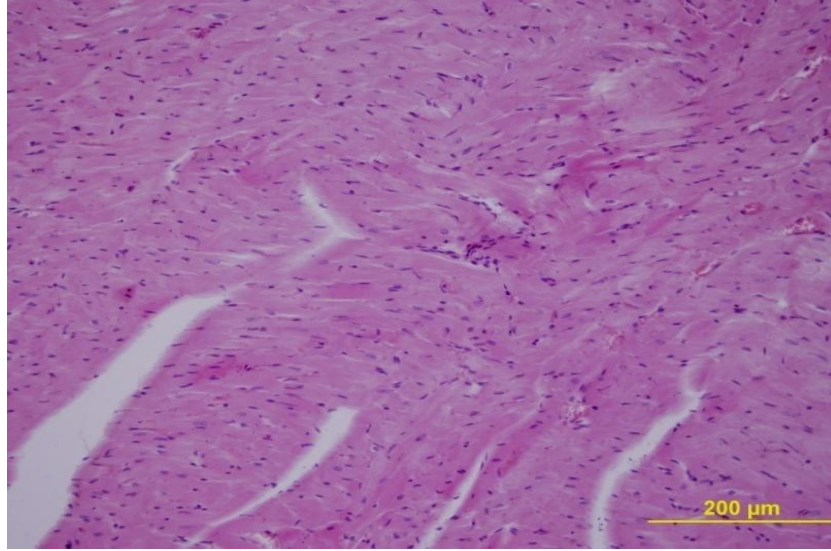
Şekil 12. CP Grubu Kalp Dokusunun Histolojik Görünümü (HEx200)



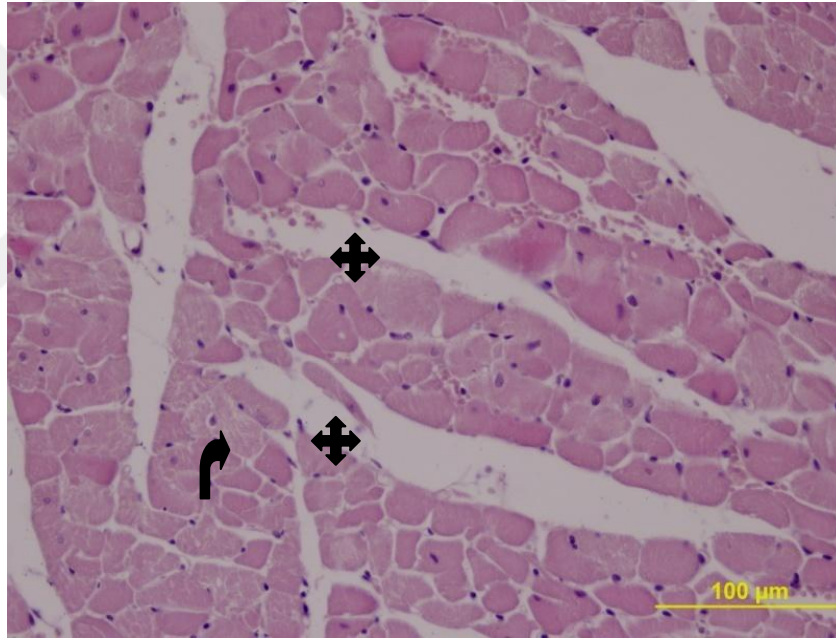
Şekil 13. CP Grubu Kalp Dokusunun Histolojik Görünümü (HEx400)

Hemoraji () **İnterstisyel ödem** () **Vakuolizasyon** ()

NAC Grubu: Kalp kesitlerinde; hemoraji gözlemlenmedi ancak interstisyel ödem, vakuolizasyon gibi değişiklikler gözlemlendi (Şekil 14-15).



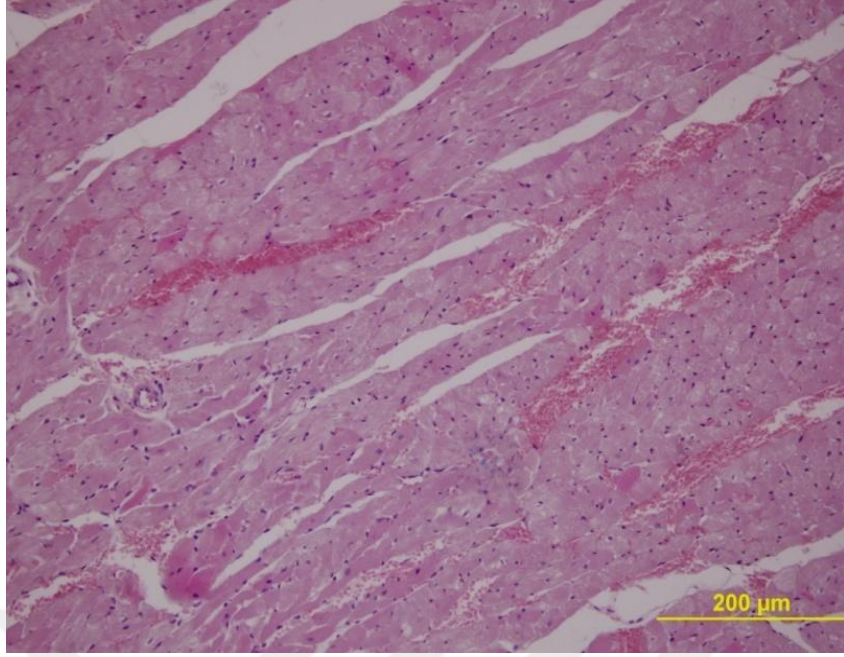
Şekil 14. NAC Grubu Kalp Dokusunun Histolojik Görünümü (HEx200)



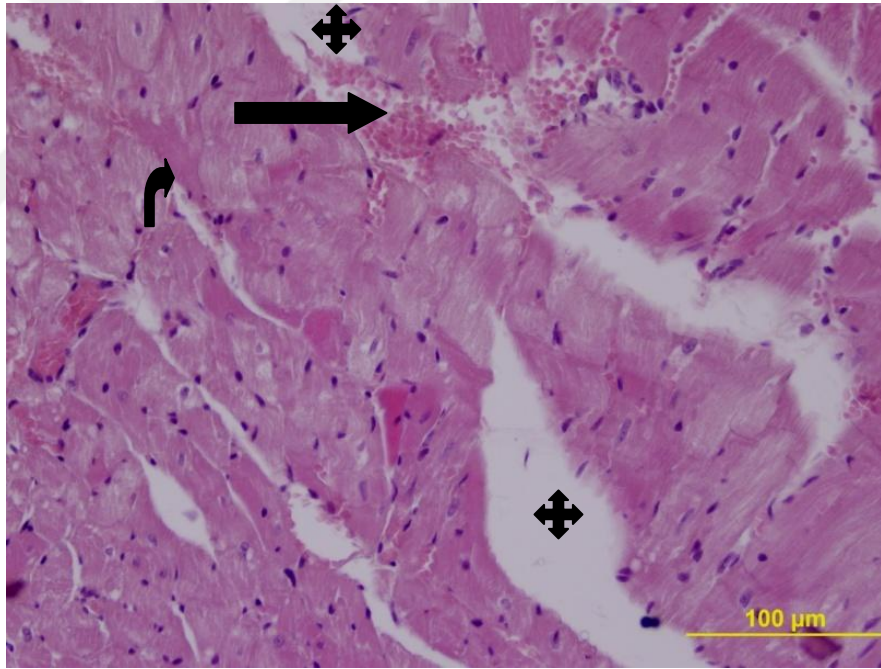
Şekil 15. NAC Grubu Kalp Dokusunun Histolojik Görünümü (HEx400)

İnterstisyel ödem (↕) **Vakuolizasyon** (↗)

CP-NAC Grubu: Bu grupta, Kontrol grubuyla kıyaslandığında, farklı histolojik bulgular gözlemlendi. CP grubuna kıyasla kısmen daha az hemoraji, interstisyel ödem ve kalp kası hücrelerinde vakuolizasyon gözlemlendi (Şekil 16–17).



Şekil 16. CP-NAC Grubu Kalp Dokusunun Histolojik Görünümü (HEx200)



Şekil 17. CP-NAC Grubu Kalp Dokusunun Histolojik Görünümü (HEx400)

Hemoraji () İnterstisyel ödem () Vakuolizasyon ()

Tablo 7. Çalışma gruplarının Histolojik Skorlama Sonuçları

Parametre	Kontrol	CP	NAC	CP-NAC
Histoloji Skoru	0 (0-0)	7.5 (7-8)*	1.5 (1-3) ^a	3.5 (2.25-4)*

İstatistiki karşılaştırma: Tüm çalışma grupları arasında *Kruskal Wallis* testi yapıldı.

Anlamli bulgular: *Kontrol grubu, ^a:CP grubu, ^b NAC grubu ve diğér grupların karşılaştırılması sırasında elde edildi.

Tablo 7'ye göre; Kalp dokusu histolojik skorlamaları değérlendirildiğinde; Kontrol grubu ile hem CP grubu hem de CP-NAC grubu arasında istatistiksel olarak anlamli fark olduğu tespit edildi ($p<0.05$). CP grubu ile NAC grubu arasında anlamli bir farklılık gözlendi ($p<0.05$). CP-NAC grubu ile CP grubu kıyaslandığında CP-NAC grubunda yaklaşık %50'lik bir skor azalması gözlenirse de, anlamli düzeylere ulaşamadığı belirlendi. Kontrol grubuyla NAC grubu arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$).

5. TARTIŞMA

Kanser, ABD’de KVH’ın ardından en sık ölüme yol açan ikinci nedendir. Yapılan çalışmalar ilerleyen yıllarda kanser insidansının giderek artacağını göstermektedir (6). Türkiyede yapılan istatistiklere göre kanser insidansı dünya ortalamasının üzerindedir (87).

Kanser tedavisinde son yıllarda önemli gelişmeler kaydedilmiş; çoklu ilaç rejimleri ve birden çok farklı yöntemler, hastaların mortalite oranları azaltmış ve hastalarda yaklaşık 5 yıllık yaşam süresi oranları artmıştır (6).

CP çeşitli kanser türlerinde ilk akla gelen ve birçoğunda alternatifsiz bir kemoterapötiktir (1). Kullanımında meydana gelen farklı yan etkiler farklı tedavi seçeneklerinin ortaya atılmasına ve farklı platin grubu ilaçların geliştirilmesine neden olmuştur (26). Daha az toksik ve klinik kullanımı daha kolay alternatif platin bileşiklerinin geliştirilmesi için gösterilen yoğun klinik ve deneysel araştırmalara rağmen; CP halen yaygın bir şekilde reçete edilmektedir ve değişik solid organ tümörleri tedavi rejimlerinin standart bir bileşeni olmaya devam etmektedir (88).

Kemoterapinin birçok kanser türünde çok etkili olduğunun bilinmesine rağmen, birçok kemoterapötüğün kardiyotoksisiteye neden olması, tedavinin kesintilere uğramasına neden olmaktadır (35). Antikanser ajanlara bağlı olarak meydana gelen kardiyotoksisite, son dönemde kardiyologlar tarafından sıkça karşılaşılan klinik bir sorun haline gelmiştir. Sol ventrikül sistolik disfonksiyonu ve kalp yetmezliği meydana getirdikleri en önemli problemler olsa da, neden olan ajana

bağlı olarak, klinik tablo ve prognoz çok farklı karakterde olabilir (89).

Siklofosamid, adriamisin ve CP gibi birçok kemoterapötüğün oksidatif stres nedeniyle kardiyotoksisiteye neden olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bu ilaçlar SOR üretimini artırabildiği gibi, SOR'a karşı savaşta vucutta üretilen ya da dışarıdan alınan antioksidan seviyelerinin hem plazma hem de doku düzeylerinde kemoterapi esnasında düşmelerine neden olmaktadır (3, 89, 90).

CP kardiyotoksisitesine temelde oksidatif stres neden olsa da nitrozatif stresin bunda önemli bir payı olduğunu farklı çalışmalarla gösterilmiştir (9, 33, 91).

Literatürde deneysel CP kardiyotoksiste modellerinde rat (8, 33, 92) ve fare (91) gibi çeşitli hayvan türlerinin kullanıldığı görülmektedir.

İnsanlarla deneysel çalışmalarda kullanılan hayvan türü metabolizmaları arasındaki benzerlikler, uygulama kolaylığı ve maliyet gibi faktörler; çalışmaların planlanması, sürdürülmesi ve değerlendirilmesi açısından önem arz etmektedir. Bu açıdan ratların bu çalışmada kullanılması uygun görülmüştür.

Literatürde CP'nin, deneysel kardiyotoksisite modellerinde; tek doz (9, 91), haftada bir olmak üzere 4 hafta (8) haftada bir olmak üzere 5 hafta (20, 21) aralık ve total uygulama dozunda da totalde 6 mg/kg (94) -25 mg/kg (20, 21)'a kadar geniş bir aralığa sahiptir.

Literatürde CP'nin kardiyotoksisite ve nefrotoksisite modellerinde farklı uygulama yöntemleri kullanılmıştır. Nefrotoksisite modellerinde *ip* (15, 16, 17, 93) *iv* (83), kardiyotoksisite modellerinde ise sadece *ip* (8, 9, 92) yolları kullanılmıştır.

Kardiyotoksisite oluşturan CP dozu ile ilgili literatür bilgileri kısıtlı olsa da birbirine yakınlık göstermektedir. CP (tümü Wistar rat olmak üzere), *ip* yoldan kg vücut ağırlığı başına; 6 mg (94), 7mg (33), 10mg (91) gibi farklı dozlarda uygulandığında kardiyotoksisite oluşturulduğu gösterilmiştir. CP nefrotoksisitesi olduğu gözlenen ratlara, tümü *ip* yoldan kg rat ağırlığı/gün olmak üzere 10mg (15, 16)'a benzer dozajlarda kardiyotoksisiteninde gelişiyor olması, CP nefrotoksisite modeli geliştirilen ratların kardiyotoksisite modelinde uygun olduğunu bize göstermektedir. Bu çalışma da da CP dozunun hem nefrotoksisite de hemde kardiyotoksisitede birçok çalışma da ortak olan doz *ip* 10mg/kg seçildi.

Literatürde deneysel olarak geliştirilen CP kardiyotoksisitesinde, adjuvan bir ajan olarak verilen farklı ajanlar bulunmaktadır; NAC (20, 21), aposinin (33), resvaratrol

(95), ellajik asit (96), propionyl-l-carnitin(9), human eritropoetin (94) gibi ajanları kullanan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır.

CP kardiyotoksisitesinden sorumlu pek çok farklı mekanizma öne sürüldüğünden; toksisiteyi önlemek adına kullanılacak ajanın birden fazla mekanizma üzerine olumlu etki göstermesi tercih nedeni olacaktır. Diğer bir ifade ile kullanılacak “kardiyotoksisiteyi önleyici ajan”ın, CP ile ortaya çıkmış birden fazla patolojiyi düzeltebilmesi, klinik faydanın artmasını sağlayacaktır. Preklinik çalışmalarda çok başarılı sonuç alınan adjuvanın “kardiyotoksisite temelinde organotoksisiteyi önleyici ajan” olduğu için aşağıdaki riskler göz önüne alındığında;

*Ajanın uzun dönemde ortaya çıkabilecek komplikasyonları

*Ajanın klinik kullanıma sunulabilmesi için gereken sürenin uzun yıllar alması

*Ciddi yatırım yapılan ajanın çeşitli nedenlerle, zorunlu olarak araştırmadan çekilmesinin ARGE maliyetini artırması

gibi faktörler nedeniyle; yıllardır klinikte değişik endikasyonlarda kullanılagelen bir ilacın, farklı endikasyonlarda kullanılması; daha güvenli, daha çabuk ve daha ucuz bir yöntem olacağı düşünüldüğünden, bu koşulları sağlamak üzere, doğrudan ve dolaylı antioksidan olan ve aynı zamanda antienflamatuvar etki de gösterdiği bilinen NAC’ın (97) bu endikasyonda kullanımı, ideal bir girişim olarak düşünüldü.

Litetürde nefrotoksisite modellerinde uygulanan NAC uygulaması *sc* (93), *ip* (15, 17), *iv* (83, 15), *po* (15), *ia* (15), kardiyotoksisite modellerinde sadece *ip* (20, 21) yola rastlanırken, nefrotoksisite uygulama dozunda da 50mg/kg *ia* (15)–4500mg/kg *ip* (17) gibi geniş bir aralığa sahiptir.

Bu çalışmada, literatür bilgileri ve ön çalışmaların verilerine dayanılarak, erkek Wistar ratlarda, nefrotoksisite oluşturmak amacıyla, *ip* 10mg/kg CP tek doz ve NAC dozu *ip* 250 mg/kg olarak belirlendi.

Bu çalışmada nefrotoksisite oluşturmak üzere *ip* olarak tek doz uygulanan CP’in tek başına ve Muldoon et al.(83) yaptığı çalışmaya paralel olacak şekilde NAC ile (CP’den 4 saat sonra) beraber verildiğinde, kalp dokusu üzerinde oksidan-antioksidan sistem üzerindeki etkileri, rat modeli üzerinde araştırıldı.

CP’yle yapılan çalışmalarda kardiyotoksisite erken dönemde görülebileceği gibi geç döneme kadar sarkabilir (9). Geç döneme sarkan kardiyotoksisitenin nedeni yapılan bir çalışmada 20 yıl sonra bile kanda CP’ye rastlanması olabilir (98). Küçük hücreli kanserle tedavide CP alan hastalarda yapılan çalışmada, CP tedavisinin kronik

kardiyotoksositeye neden olduğunu raporlanmıştır (99). CP'yle yakın zamanda yapılan 5 hafta süren iki farklı çalışmada da; 5mg/kg/hafta *ip* CP'nin kronik kardiyotoksositeye neden olduğunu gösterilmiştir (20, 21).

CP kardiyotoksitesinden oksidatif stres (3, 20) ve nitroztatif stres (3)'in haricinde inflamatuvar yolak (33)'ın da etkili olduğunu söyleyen bunuda proinflamatuvar sitokinlerin (TNF α) artmasına bağlayan çalışma da vardır.

Kalbin zorunlu aerobik bir organ olması, dinlenim halindeyken dakikada 100 gram doku başına 8-15 ml O₂ kullanıyor olması hatta zorlu egzersiz durumlarında O₂ kullanımının 70 ml'e kadar çıkarması kalp için O₂'nin çok önemli olduğunu göstermektedir (49). İşte bu Kalp kası anaerobik koşullar/kardiyak hasara neden olan durumlarda, hücrel süreçleri korumak için yeterli enerjiyi üretemez bu yüzden O₂, kardiyak fonksiyonların ve canlılığın sürdürülebilmesi için vazgeçilmezdir. Kalbin oksijenle olan ilişkisi enerji metabolizması ötesinde bir komplekstir. SOR oluşumunda merkezi bir rola sahip olan oksijen; hücrel iletimde yararlı bir molekül ya da geri dönüşümsüz hücrel hasar ve ölüme neden olan bir molekül olabilir. Bu yüzden hem yararlı hem de zararlıdır (49).

CP'nin kroner kan akımını %30-40 azalttığı, kalp atım hızını düşürdüğü gösterilmiştir (20). Farklı bir çalışmada da paralel olacak şekilde kalp atım hızını ve ortalama kan basınçlarını düşürdüğü gösterilmiş ayrıca CP'nin vücut ağırlığını azalttığı, hatta bazı hayvanlarda ölüme neden olduğu raporlanmıştır (33). Bu çalışma da daha önceki çalışmalara benzer şekilde vücut ağırlıklarının ciddi oranda azaldığını ancak ölümlere neden olmadığını gözlemlendi. CP-NAC grunda da NAC'ın CP'nin meydana getirdiği bu kilo kaybını önleyemediği gözlenmiştir. Hatta tek başına NAC uygulanan grupta da anlamlı kilo kaybı gözlenmiştir.

Literatürde CP uygulaması ile oluşan hasarın derecesine bağlı olarak, böbrek fonksiyonlarını ortaya koyan BUN ve kreatinin(8); kardiyak fonksiyonları ortaya koyan CK, CK-MB, LDH, troponin gibi işlevsel enzimlerin plazmadaki düzeylerinin yükseldiği bildirilmektedir (8, 9, 33, 92).

Hepsi *ip* ve *tek doz* olmak üzere, 5 mg/kg (17), 6mg/kg (93), 10 mg/kg (16) dozlarında uygulanan CP'nin BUN ve kreatinin düzeyleri, CP grubunda anlamlı oranda artmıştır. Bir çalışmada haftada bir olmak üzere 4mg/kg dozunda 4 hafta uygulanan CP'nin benzer şekilde nefrotoksositeye neden olduğu raporlanmıştır (8). Dickey et al. (15) *ip* yoldan tek doz (10mg/kg) ve günde iki defa olmak üzere 4 gün

düşük ancak multipl dozda CP'yi iki farklı gruba uyguladılar. Hem tek doz grubunda hem de multipl CP uygulaması yapılan grupta, BUN ve kreatinin konsantrasyonlarının yükseldiğini ve farklı iki metotla uygulanan CP'nin renal toksisiteye neden olduğunu bildirdiler (15). Muldon et al.(83)'da 4 mg/kg dozda *iv* uygulanan CP'nin minimal da olsa nefrotoksisiteye neden olduğunu gösterdiler (83). Bu çalışma da da CP, BUN ve kreatinin konsantrasyonları, CP grubunda kontrol grubuna kıyasla ciddi düzeyde yükselmiştir. 10 mg/kg dozda uygulanan CP'nin erken dönemde nefrotoksisiteye neden olduğu gösterilmiştir. CP'nin erken dönemde nefrotoksisiteye neden olduğu gösteren çalışmalarla kıyaslandığında, benzerlik göstermektedir (15).

L-sistein amino asitin asetillenmiş varyantı, sülfhidril (SH) gruplarının mükemmel bir kaynağı olan NAC, vücutta glutatyon sentezini stimüle etme yeteneğine sahip metabolitlerine dönüştürülür, detoksifikasyonda ve serbest radikal temizleme direkt rol oynar (12). Bugüne kadar çok farklı endikasyonlarda görev alan NAC, kemoterapötik yan etkilerine karşı da oldukça etkilidir. CP kardiyotoksitesisi (20, 21), nefrotoksitesisinde (15) kullanılmış olup olumlu birçok etkisi gösterilmiştir.

Dickey et al. (15) tek doz ve multipl olmak üzere CP nefrotoksitesisi geliştirdikleri çalışmada, *ip* uygulanan NAC'ın yeterli etkinlik göstermediği, *iv* ve *ia* uygulamalarda ise *ia*'da daha belirgin olmak üzere olumlu etkiler gözlemişlerdir (15). Tek doz CP verilen nefrotoksite modelinde, 400 mg/kg NAC dozunun hem *ip* hem de *po* yoldan renoprotektif olmadığı ancak *iv* yoldan uygulanan NAC'ın renoprotektif olduğunu raporladılar. 50 mg *ia* NAC'ın, *iv* yoldan daha iyi koruma sağladığını gösterdiler. Tekrarlanan dozdaki CP nefrotoksite modelinde ise 800 mg/kg *iv* NAC'ın koruyucu olduğu ancak *ip* yoldan yine bir koruma sağlamadığını raporladılar. Dickey et al. (15) NAC'ın CP nefrotoksitesindeki koruyucu etkisinin doz ve uygulanan yola bağlı olduğunu belirttiler. *İp* ve *p.o* uygulama yollarındaki etkisizliği NAC'ın karaciğerde ilk geçiş etkisine maruz kalmasına bağladılar.

Abdelrahman et al. (17) CP nefrotoksitesisi geliştirilmiş olduğu ratlarda totalde 4500mg/kg olmak üzere, 9 ardışık gün 500mg/kg uygulamış ve NAC'ın CP nefrotoksitesisinde çok etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışma da ise CP nefrotoksitesisi geliştirilen ratlara ardışık 3 gün 250 mg/kg NAC uygulanmış olup CP'nin BUN ve kreatinin düzeylerinde hafif bir azalmaya neden olduğu gösterilse de nefroprotektif olmadığı gösterildi. Bu çalışma Dickey et

al. (15) yaptığı çalışmaya *ip* yoldan etki olmaması bakımından benzerlik göstermektedir. Abdelrahman et al. (17) yaptığı çalışmada totalde kullanılan doz bu çalışmada kullanılan NAC'ın 6 katı olduğu düşünüldüğünde, Abdelrahman et al. (17)'in yaptığı çalışmasına benzer nefroprotektif etkinin gösterilmesi için yüksek doz kullanılması gerektiği söylenebilir. Çalışmanın başarılı olabilmesi, yani CP nefrotoksisitesinde nefroprotektif etkinin gözlenebilmesi için çok düşük doz kullanılacaksa *i.a* düşük doz kullanılacaksa *iv*, yüksek doz kullanılacaksa *ip* ya da *p.o* verilmesi gerektiği söylenebilir. Bu bakımdan uygulama değişikliği doz süresi ya da dozaj artımı faydalı olabilir.

Muldoon et al. (83) pediatrik beyin tümör modeli geliştirdikleri ratlara CP'den sırasıyla 30 dakika ve 4 saat sonra yapılan NAC'ın, CP'nin antimöral etkisini engelleyip engellemediğini karşılaştırmıştır. 30 dakika sonra yapılan NAC tedavisinin, CP'nin antitümör etkinliğini hem medullablastom hem de nöroblastom modelinde önemli derecede azaltırken, 4 saat sonra verilen NAC'ın ise CP'nin antitümöral etkisini etkilemediğini raporladılar. CP'in antitümöral etkinliğini düşmesinin, CP ile NAC'ın beraber verilmesine bunun da şelasyona neden olarak ilacın etkinliğinin yok etmesine bağlamışlardır (83). Bu modelde CP minimal düzeyde nefrotoksik olarak değerlendirilmiş ve NAC'ın BUN düzeylerinde düşüşe yol açtığı raporlandı. Muldoon et al. (83) eğer NAC tedavisi 4 saat ertelenirse CP efikatisinin etkilenmeyeceğini belirtmişlerdir.

Wu et al'da (100) yapmış oldukları çalışmada CP'yle eş zamanlı ya da 2 saat sonrasına kadar uygulanan NAC'ın CP'nin meydana getirdiği sitotoksik ve apopitotik etkisini önlediğini ancak NAC tedavisi 8 saate kadar uzaması durumunda bu etkinliğin minimal olduğunu raporladılar. Wu et al. (100) bunu ilk 1-2 saatlik periyodun CP'nin apopitotik etkinliğini engellemek için kritik olduğunu, 8 saat gibi bir sürede hücrelerin apopitozda kararlı hale geldiklerine bağladılar.

Bu çalışma da uygulanan NAC Muldoon et al.'(83) ın yapmış olduğu çalışmaya benzer doğrultuda yapıldı. 4 saat sonra uygulanan NAC nefroprotektif etki göstermemiştir. Bu çalışma NAC'ın bu doz ve uygulama yoluyla nefroprotektif olmadığını gösterse de, Muldoon et al.'in çalışmasına paralel olacak şekilde, NAC'ın CP'den 4 saat sonra verilmesinin CP'nin antitümöral etkisini düşürmediği görüşüyle örtüşmektedir.

Daha önce insanlarda (3) ve ratlarda (9, 92) yapılan çalışmalarda CP tedavisi zemininde gelişen kardiyotoksistede CK-MB, CK, LDH gibi miyokardiyal hasarda

yükselen biyomarkerlar raporlanmıştır. Literatür bilgisi CP'nin in *ip* 7 mg/kg (9) düzeylerinde CK-MB ve LDH *ip* 10 mg/kg (92) LDH, CK, CK-MB, *ip* 16 mg/kg (8) düzeylerinde önemli artışa yol açtığını göstermektedir.

Bu kardiyak biyomarkerler kardiyak hasarın varlığını ve kapsamını kullanılabileği gibi miyokard hasar riski altında olan hastaları belirlemede yardımcı olabilir. Kemoterapötik ajanlar hücre membranlarında bozulmaya neden olduğu için, LDH CK-MB, cTnI, cTnT gibi intrasellüler proteinlerin dolaşımına çıkmasına sebep olabilir (99, 101).

El-Sawalhi et al. (33) yaptığı çalışmada da, CP *ip* 7 mg dozda kardiyotoksik etki yapıp CK-MB düzeylerini yükseltmiştir. Bu etkinin kardiyak membranlarda meydana gelen lipid peroksidasyonu ikincil olarak ortaya çıktığını bunun sonucunda da membranda irreversible modifikasyonlara ve hasara yol açıp, kardiyak enzimlerin dolaşıma karıştığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada da CP 10 mg/kg dozunda hem LDH hemde CK-MB düzeyini anlamlı oranda artırmıştır. Plazma CK düzeylerine bakıldığında, CK düzeylerinin gruplar arasında anlamlı bir yükseklik düşüklük gözlemlenmemiştir. Plazma CK-MB ve LDH düzeylerine bakarak bu etkinin daha önceki çalışmalarla benzer etki gösterdiği ve lipid peroksidasyonuna sekonder geliştiği söylenebilir. CP kardiyotoksitesi ile yapılan çalışmalarda CK'da kardiyotoksite açısından anlamlı olarak değerlendirilmiş olup bizim çalışmamız da tam aksini göstermektedir (91, 102). Rosic et al' (21) ın yapmış olduğu çalışmada preiskemik (bazal) durumlarda NAC uygulaması, CK seviyelerini düşürmesine rağmen hala Kontrol seviyelerinin üzerinde seyrettiğini benzer şekilde LDH seviyelerinin de CP grubunda Kontrol grubuna göre çok da fazla anlamlı bir etkiye neden olmadığını ancak CP grubuna göre anlamlı düşüş sergilediğini gösterdiler.

Plazma CK-MB düzeylerinde anlamlı bir etki gözlemlenirken, CK'nın daha önce yapılan çalışmalar paralelinde seyretmemesinin nedeni CK düzeylerinin sadece AMİ gibi sadece kalp kası hasarında değil, aynı zamanda enjeksiyon, cerrahi gibi nedenlerle iskelet kası hasarında da salınmasına bağlanabilir (103). Akut iskemik kalp rahatsızlığı olmayan kronik diyaliz hastalarında yapılan bir çalışmada serumlarında CK-MB ve cTnT düzeylerinin yükselirken cTnI düzeylerinin etkilendiği gösterilmiştir. cTnT diyaliz hastalarında iskelet kasından da eksprese edilmektedir. cTnI bu açıdan böbrek yetmezliğine sahip olupta kardiyak hasarın

tespitinde en spesifik biyomarker olduğu söylenmektedir (104). Tüm bu açıdan baktığımızda plazma CK düzeylerinden ziyade CK-MB ve çok daha kardiyospesifik olan cTnI ve diğerk kardiyospesifik markerlari değerdendirmek, kardiyotoksisitenin tespiti için gereklidir.

cTnI, kompleks klinik durumlarda bile miyokardiyal nekrozu saptamak için uygun bir markerdir. Miyokardiyuma spesifitesi oldukça yüksektir kronik kas hasarı böbrek yetmezliğı gibi durumlarda eğer kardiyak bir hasar söz konusu değilse yükselmesi söz konusu değildir (101). Kardiyak nekroz tespit etmede vazgeçilmez bir marker olan cTnI, AMI, kalp yetmezliğı gibi birçok koroner hastalıkta yükselir (101). DOX ve trastuzumab gibi birçok kemoterapötikte kardiyotoksisiteyi erken dönemde tespit etiğı gösterilmiştir (105, 106).

Literatürde CP kardiyotoksisitesinde cTnI düzeyine bakan çalışma sayısı oldukça azdır. (8, 92, 102, 107).

Saleh et al. (8) haftada bir olmak üzere toplamde 4 defa uyguladığı 4mg/kg *ip* CP uygulamasından sonra 1. Haftadan itibaren 4. Haftaya kadar olan ayrı ayrı çalışılan cTnI düzeylerinin istatiksel olarak giderek arttığını raporlamışlardır. Ancak yaptıkları çalışmada kullandıkları kitin rat spesifik olmaması çalışmalarına gölge düşürdüğünü söyleyebiliriz. Rat spesifik olmayan kitlerin sonuçlar anlamlı çıksa dahi doğru sonuç olmayacaktır. Benzer şekilde farklı çalışmalarda da (8, 92, 102, 107). cTnI düzeyleri yüksek bulunmuş ancak bu çalışmalarda da kullanmış olduğı kitlerin ratlarda kullanılmasının doğru sonuç vermeme olasılığı oldukça yüksektir. Önceki yıllarda yapılan bir çalışmada saflaştırılmış rat cTnI'nın saflaştırılmış insan cTnI'dan %50 daha reaktif olduğunu, yani ölçülen değerdlerin olması gerekenden %50 yüksek değerdlendirdiğı gösterilmiştir (108). Ammar et al.'(109) ın yaptığı bir çalışmada tek doz 10 mg/kg CP uygulamasından sonra hem CK-MB hem de cTnI düzeylerinde anlamlı bir artış olmadığını; tam tersine yine aynı dozda ancak 2 günde bir olmak üzere 4 farklı seferde verilen CP'nin ise hem CK-MB hemde cTnI seviyelerinin istatiksel yüksek bulmuşlardır. Ammar et al. (109) düşük dozlarda ancak daha sık uygulanan CP'nin yüksek ancak tek dozda uygulanan CP uygulamasından daha kardiyotoksik olduğunu bildirmişlerdir.

Her ne kadar kardiyotoksisite tespitinde çok yararlı bir marker olduğı farklı çalışmalar gösterilse de (8, 92, 102, 107, 109). Polena et al (110)'ın DOX tedavisi gören 38 hastada yapmış oldukları çalışmada, sadece bir hastada cTnI seviyelerini yüksek raporlamışlar. DOX kardiyotoksisitesinde cTnI'nin yararlı bir marker

olmadığını belirtmişlerdir (110). Bu çalışmada rat spesifik ELISA kiti kullanıldı ve 10mg/kg dozda uygulanan CP'nin cTnI'nın seviyesini bariz biçimde yükselttiği gözlemlendi. Kullandığımız kitin rat spesifik kiti de olduğu düşünüldüğünde CP'nin erken dönemde kardiyotoksositeye neden olduğu gösterilmiştir. Polena et al. (110) çalışmasını tam tersine cTnI'nın yararlı olduğunu gösterilmesi, cTnI'nın kardiyotoksositeyi erken dönemde belirleyebildiğini, uzun süreli tedavilerin sonundaki ölçümlerde bu özelliğini kaybettiği söylenebilir.

Kardiyak troponinlere ek başka kardiyospesifik parametrelerin bulunması kardiyotoksosite başta olmak üzere kalp hasarının önceden tespitinde daha spesifik bir yaklaşım olabilir. Bu kardiyak markerlerin birlikte kullanımı ile kardiyak hasarın kaçırılmasının önüne geçebilir (11). Kalp hasarının tespitinde geçmiş yıllardan beri kullanılan CMLC-1 (111) bu ideal marker adayı olabilir. Miyokardiyal kontraktıl protein olan CMLC-1 izoformu miyosit nekrozu sırasında dolaşıma salınmaktadır (111). Özellikle kalp yetmezliği olan hastalarda düşük dereceli myokard hasarında dolaşıma salınan CMLC-1'in kötü prognoz belirteci olabileceği belirtilmektedir (111). Literatür taramalarında CP kardiyotoksosite modelinde CMLC-1 düzeylerinin çalışıldığı bir yayına rastlanılmamıştır. Berna et al. (112) kardiyotoksik olduğu bilinen isoprotrenol ile ratlarda yaptığı çalışmada, CMLC-1'in isoprotrenol kardiyotoksitesinin teptinde kuvvetli bir marker olduğunu ortaya koydular. İsoptroterenolun, CMLC-1 konsantrasyonlarının, hesaplanamayacağı düzeyden yaklaşık 25 kat yükseğe çıkardığını gösterdikleri gibi bu yüksek seviyelerde 24 saatten fazla bu düzeylerde kaldığını gösterdiler. Ayrıca sağlıklı ratlarda da CMLC-1 konsantrasyonlarının düşük ve ölçüm sınırından daha aşağıda olduğunu ve böylelikle CMLC-1'in iyi bir kardiyak marker olduğunu kanıtladığını raporladılar (112).

Mair et al. (113) yaptığı prospektif çalışmada ilk kez AMI geçiren sonrasında trombolitik tedavi gören ve kardiyolog tarafından WHO kriterlerine göre MI geçirdiği gösterilen 17 hastada sintigrafi, CMLC-1 ve CK-MB çalışmış, CMLC-1 AUC (Area under the curve, eğri altında kalan alan) ve CMLC-1 pik düzeylerinin sintigrafiyle korele bulmuşlardır (113) .

CMLC-1 'nin kardiyak hasarı tespit etmede yararlı olmadığını bildiren çalışmada vardır. Hillis et al. (114) AMI için %7 riske sahip ancak EKG'lerinde yeni ST elavasyonu olmayan ve göğüs ağrısı ile acile başvuran 208 hastada yapmış oldukları çalışma da 0. 4. 8. 16. ve 24. Saatte cTnI CK-MB kütle, MLC-1 ve miyogloblin konsantrasyonları ayrı ayrı değerlendirildiğinde tüm parametrelerin kardiyak hasarın

tespitinde zayıf tahmin gücünün olduğunu ancak zamanla arttıklarını, cTnI ve CK-MB kütlenin ise en faydalı parametre olduğunu raporladılar. MLC-1'in kayda değer artış sergilemediğini göstermişlerdir (114).

Luo et al. (115) DOX ile deneysel kardiyotoksisite geliştirilen ratlarda CMLC-1 düzeylerini değerlendirmiş ve kümülatif dozda ve son doz DOX'dan sonra ölçülen CMLC-1 düzeylerinin, tek doz verilen DOX'a göre önemli artış sergilediğini raporlamıştır. Tek doz verilen DOX'un, kontrol grubuna göre CMLC-1 seviyelerini yükseltsede, anlamlı bir yükseklik seğilemediğini göstermişlerdir. Ayrıca kümülatif dozda verilen ancak son doz DOX'dan 3 hafta sonra ölçülen CMLC-1 düzeylerinin ölçüldüğü grupta da CMLC-1 kontrol düzeylerine yakın gelmiş bu da CMLC-1 seviyelerinin 3 haftadan uzun sürede yüksek kalmadığını göstermektedir. CMLC-1 seviyelerinin yükselmesinin doz bağımlı olduğu ve ve SOR'un kalpte meydana getirdiği lipid perosidasyonuna ve andisoksidan savunma sistemin yetersizliğine bağlamışlardır (115). Bu araştırmacılar ayrıca ekokardiyografi çalışmasıyla biyokimyasal parametreleri birbirbiriye korele bulmamışlar; bunu da önemli bir hasar olmadan ekokardiyografide değişiklik olmadığını ancak CMLC-1 düzeylerinin DOX tedavisi hemen sonrası meydana gelen aldehitlerin akabinde salınmasına bağlamışlardır (115). Bu çalışmada CMLC-1 düzeyleri CP grubunda kontrol grubuyla kıyaslandığında cTnI'a benzer şekilde bariz bir biçimde arttığı gözlemlendi. Kontrol grubunda CMLC-1 düzeyleri ölçülebilmek düzeylerde olsa da önemli oranda düşük bulunmuştur. CMLC-1 düzeyleri bu çalışmada değerlendirilen cTnI ile yüksek korelasyon göstermektedir. Bu yüksek korelasyon CMLC-1 düzeylerinin kardiyak hasarı tespit etmede cTnI'lara ciddi anlamda destek vereceğini göstermektedir. CMLC-1 de bu yüksek korelasyon onun da cTnI gibi lipid peroksidasyonundan kaynaklanabileceğini göstermektedir. Luo et al' (115) da benzer şekilde bu yüksek düzeyleri lipid peroksidasyonuna ve antioksidan düzeylerinin düşüklüğüne bağlamışlardır .

Son yıllarda miyokardiyal iskemi tanısında İMA denilen yeni bir parametre araştırılmaktadır (116). Günümüzde, geri dönüşümsüz kalp hasarının başlamasından önce, kardiyak iskeminin tanısındaki en yararlı biyomarkeri İMA'dır (117).

Literatürde deneysel CP kardiyotoksisitesi çalışmalarında İMA çalışmasına rastlanılmamıştır. Sadece CP değil, kardiyotoksisite başlığı altında İMA çalışmasına ait literatür bilgileri sınırlıdır.

Göğüs kanseri nedeniyle DOX tedavisi alan 158 hastada yapılan çalışmada kemoterapi siklusleri sonrasında, miyokardiyal hasar gelişen hastalarla, gelişmeyen hastalar kıyaslandığında İMA düzeyleri arasında anlamlı farklılık olduğu gözlemlendi (11). Ellidağ ve ark. (118) kalp yapmış olduğu çalışmada kalp yetmezliği ile takip eden hastalarda serum İMA, düzeylerini sağlıklı olduğu tespit edilen hastalarda karşılaştırdığında anlamlı yüksek bulmuş bu sonucunda İMA'nın akut iske miyle takip edilen hastalarda iyi bir biyomarker olduğunu tespit etmiştir. İMA'nın belikde albumin bağımlı bir oksidatif stres markeri olabileceğini raporlamıştır .

Bu çalışmada da plazma İMA değerleri CP grubunda sağlıklı ratlarla kıyaslandığında anlamlı yüksek bulunmuştur.

Oksidatif stresin arttığı durumlarda arttığı gösterilen İMA'nın, miyokard dokusuna has olmadığı diyabet gibi iske miye neden olan hastalıklarda arttığını gösteren çalışmalarda vardır (119).

Bu çalışmalar da göstermektedir ki İMA iyi bir iske mi markerıdır. İMA'nın kardiyotoksisiteyi tespit etmesinde yararlı bir marker olabilmesi, diğer kardiyak parametrelerle birlikte kullanımı ile mümkün olabilir. Akut MI'lı 538 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada troponinin ve İMA'nın birlikte kullanımında sensitivitenin %100 olduğu gösterilmiştir (120). Bir çalışmada son 3 saat içinde göğüs ağrısı ile acile servise başvurup standart triaj ve tedavi işlemleri yapılan 208 hastada cTnT, İMA düzeyleri ve EKG değerlendirildi. Son tanıları konulan hastalarda iskemik ve noniske mik olduğu belirlenen bu hastalardan, iskemik hastaları ayırt etmede, İMA'nın sensitiveisi % 82, EKG'nın %42 cTnT'in ise % 20 bulundu. İMA, cTnT ve EKG ile birlikte değerlendirildiğindeyse sırasıyla % 90 ve 92 olarak gösterildi. 3ü birlikte değerlendiriliğinde iskemik kalp hastalığını tahmin etme gücü % 95 e kadar çıktı. İMA'nın göğüs ağrısıyla başvuran hastalarda miyokaridayeral iske mi tanısında yüksek sensitif bulunduğu gösterildi (121).

Başka bir çalışma da İMA, troponin T ve CK-MB nin birlikte bakılmasıyla, DOX kaynaklı miyokardiyal hasarı belirleme açısından sensitivitesinin % 92 spesifitesinin ise % 83 olduğu gösterilmiştir (11). Bu çalışmada da İMA, cTnI ve CMLC-1 ile korelasyonlar yapılmış olup her iki düzeylede kuvvetli korelasyon göstermektedir. Bu bakımdan iske mi markerı olan İMA düzeylerinin hesaplanması, onun diğer kardiyak markerlarla birlikte değerlendirilmesi kardiyak hasarlı bireylerde tanıda sensitive ve spesivitesinin artmasına neden olabilir.

Kardiyak hasarın gösterilmesinde kardiyak biyomarkerlar oldukça yararlı olduğu bu çalışmada İMA CMLC-1 cTnI ile hem tek başına hemde birdiğiyle anlamlı olduğu gösterilse de bu markerların histopatolojik çalışmayla pekiştirilmesi kardiyotoksisite tanısını koymada daha yardımcı olacaktır.

CP kardiyotoksisitesinde histolojik çalışmalar çok kısıtlıdır. Yapılan kısıtlı çalışmalarda da CP'nin kardiyotoksik etki ettiği gösterilmiştir (8, 9, 91).

Al-Majed et al.(9)'ın yaptığı tek doz *ip* CP 7 mg/kg sonrasında yapılan histokimyasal çalışmada I.M'da kalp dokusunda dejeneratif değişiklikler gözlemlendi. Birçok kas hücresinin sitoplazmasında vakulizasyon ve kan damarlarında aşırı hemoraji izlendi.

Hussein et al. (91) 10 mg/kg CP sonrasında elde edilen böbrek doku histolojisinde, I.M ile yapılan çalışmada 24 saat sonra böbrek kesitlerinde geniş dejenerasyon alanları, bazı proksima ve distal tübül hücrelerinde ağır hasar ile birlikte hücre mimarisinde büyük kayıp gözlemlendi öte yandan böbrek tübül hücreleri arasında interstisyel hemoraji izlendi Yine aynı çalışmada kalp dokusunun incelemesinde ise miyofibrillerin kesintisiyle birlikte, kardiyak kas hücrelerinin birbirinden ayrıldığı ve ciddi derecede hemorajiler izlendi (91).

Saleh et al (8). haftada bir 4 mg/kg olmak üzere kümülatif ve totalde 16 mg/kg CP uygulamasının ardından yaptığı histopatolojik çalışmada ratlarda 7. ve 14. günlerde küçük intramusküler arteriyollerde perivasküler ödem, fokal muskuler hiyalinizasyon tanımlandı. Koroner arteriyoller ve intramusküler arteriyollerde medial kas kalınlığı, proturde olan arteriyel endotelyum, düzensiz intimal tabaka, perivasküler luminal infiltrasyon sonucu lümen darlığı gözlemlendi. 30. günde intramusküler arteriyollerde kas lifleri arasında konjesyon, ödem ve hemoraji gözlemlendi. Öte yandan kardiyak miyofibriller tamamen düzensizdi. Kontrol grubu ise normaldi.

Rjiba-Touati et al. (94) Bu verilerin aksine 6 mg/kg *ip* CP uygulanan ratlarda Kontrol grubuna kıyasla DNA hasarı olmasına rağmen, anlamlı doku hasarı bulgularına rastlanılmadığını gösterdiler. CP grubundaki histolojik görüntü Kontrol grubuna benzer histolojik bir görüntü raporladı.

Bu çalışmada CP verilen grupta ciddi hemoraji, interstisyel ödem, ve sitoplazmada vakuolizasyon gözlemlendi. Bu çalışma daha önce yapılan çalışmaların büyük kısmıyla benzerlik göstermektedir (9). Tüm bu histopatolojik kanıt kardiyak biyomarkerlarla birlikte düşünüldüğünde, CP 10mg/kg dozunda erken dönemde kardiyotoksikite neden olmuştur.

NAC, kardiyotoksisite ve nefrotoksisite modellerinde nefroprotektif ve kardiyoprotektif etki ettiği gösterilmiştir (15, 16, 20, 21).

NAC birçok kalp sorununda kullanılmaktadır; Dilate Kardiyomiyopati, diyabetik kardiyomiyopati, iskemik rep rf zyon kardiyak hasarı, kardiyak inflamasyon gibi kardiyak problemler bunlardan bir kaçıdır (18). NAC, CP ilişkili kardiyotoksisite(20, 21) nefrotoksisite (15, 16) ve ototoksisite (122) gibi CP organotoksisitlerinde ve kemoter tik harici diğer ilaç ilişkili kardiyotoksisitelerdede kendisine yer bulmuştur (123). En kardiyotoksik kemoterapötiklerin başında gelen DOX (90) ve beta adrenerjik bir ajan olan isoprotrenol (123) bunlardan bir kaçıdır. CP ilişkili kardiyotoksisitede nadir de olsa kullanılmış (20, 21) olan NAC, tüm bu adı geçen çalışmacıların raporlarında kardiyotoksisitede kullanımı faydalı görülmüştür (20, 21, 90, 123).

Eksojen antioksidanlardan biri olan NAC'ın oksidatif doku hasarına karşı savunmada çok etkili olması ilacın direk kendisinden kaynaklanabileceği gibi ( rneğin HOŞ radikallerin inaktivasyonunu sağlar), ayrıca glutatyon üretimini artırmasından kaynaklanabilir (55).

Rosic et al. yapmış oldukları iki farklı çalışmada da CP'nin kardiyotoksik etkisini 5 hafta haftada bir 500mg/kg ip uygulamış oldukları NAC'la önlemişlerdir (20, 21). Bu alışmalarda CK ve LDH düzeyleri anlamlı bir düşüş gözlememişlerdir. Rosic et al (20), CK ve LDH düzeylerinin istenildiği kadar düşmemesini, ancak hücre membranlarındaki hasarın çok önemli düzeye geldiğinde, NAC'ın kardiyak enzim düzeylerinde düşüşe yol açabileceğine bağlamışlardır (20).

Sikolofosfamid kardiyotoksisite modelinde 5 gün boyunca ip 200mg/kg uygulanan NAC tüm biyokimyasal parametrelerce kardiyoprotektif olduğunu gösterdiler. Bu sonucuda NAC'ın oksidatif ve nitrozatif stresi önleyerek antioksidan aktiviteyi artırmasına bağlamışlarıdır (124).

DOX kaynaklı kardiyotoksisitede de 40 mg/kg dozda ip uygulanan NAC ve histidinin kardiyoprotektif etkisini araştırılmış olup, hem biyokimyasal yönden hem de görüntüleme metodlarıyla NAC'ın kardiyoprotektif olduklarını gözlemlemişlerdir. NAC'ın tek başına histidinden daha etkin olduğunu ancak NAC ile birlikte histidin verilmesinin NAC'a göre daha etkin olduğunu raporlamışlardır (125).

Bu alışma da ise 250 mg/kg dozunda 3 ardışık gün uygulanmış olup, LDH, CK-MB, cTnI, CMLC-1 ve İMA düzeylerinde kısmi bir düşüş olmasına rağmen anlamlı bir

etkiye rastlanılmamıştır. Kardiyak parametrelerin paralelinde histopatolojik çalışmada da NAC'ın kısmi düzelme gösterdiği görülsede kardiyoprotektif olmadığı aşıkardır. Bunun nedeni kardiyotoksisite modellerine neden olan mekanizmalarından kaynaklabileceği gibi aynı şekilde nefrotoksisite modelinde söylendiği üzere uygulama süresi yöntemi ve dozu etkili diğer parametreler olabilir. Çalışmaya eklenecek ekstra bir kardiyoprotektif ajanın kardiyoproteksiyonda etkili olabileceği söylenebilir (farshid F5). Özetle NAC bu çalışmada yeterli kardiyoprotektif etkiyi gösterememiştir.

SOR'un üretimi ile temizlenmesi arasındaki dengenin bozulması, oksidatif stres olarak adlandırılır. Bu durum ya SOR'un arşırı üretiminden ya da antioksidan defans sisteminin yetersizliğinden kaynaklanır (126). SOR, serbest radikallerle birlikte, radikal olmayıp radikale dönüşebilen oksidize edici ajanlara verilen bir ortak bir tanımdır (126). Ömürleri milisaniyelerle belirtilen SOR türevlerinin ölçümü çok teknik olduğundan; bu reaktif türlerin major hedefleri olan membran lipidleri, proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi biyolojik moleküllerde oluşturduğu hasarın ölçümü, dolaylı da olsa kullanabilir bir metoddur (81). Bu nedenle oksidatif stresi varlığı 4-HNE (127) ve ROOH (123) gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin 3-NT (127) gibi protein oksidasyon ürünleri nin yükselmiş düzeyleriyle gösterilebilir. Benzer şekilde non-enzimatik [redükte glutatyon-GSH, serbest sülfidril grupları-SH, albumin, vitaminler (E, A, C)] ve enzimatik [glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSH-Rd), katalaz, süperoksit dismutaz (SOD)] antioksidan savunma sistemi bileşenlerinin azalmış seviyeleri ile de oksidatif stres hakkında fikir sahibi olunabilmektedir (81,128). Bundan önce yapılan birçok çalışma insanlarda ve deneysel modellerde, CP'nin oksidatif strese neden olarak kardiyotoksisite ile birlikte diğer organotoksisitelere neden olduğunu gösterdi (15, 99). Çeşitli hayvan çalışmalarında antioksidan özellikleri olan bileşiklerin CP kardiyotoksisitesini önüyor olması; oksidatif stresin CP kardiyotoksisisinde temel nedenlerinden birisi olduğunun ayrı bir kanıtıdır (9, 20, 21). Her ne kadar SOR türevlerini ölçmek zor olsa da Rosic et al' (21) in yapmış olduğu çalışmada 5 hafta boyunca haftada bir olmak üzere verdiği 5mg/kg CP'nin H₂O₂ düzeylerini arttırdığını ancak O₂⁻ düzeylerinin artmasına rağmen anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını göstermişlerdir. tam tersine GSH ve SOD düzeylerinin ciddi derecede düştüğünü raporladılar (21).

TOK, TAK ve OSİ düzeyleri Oksidatif stresin genel olarak değerlendirilmesinde kullanılan çok yararlı parametrelerdir (63, 69).

Literatürde CP kardiyotoksisitesinde TOK ve TAK çalışmalarına rastlanılmamıştır. Sadece kardiyotoksisite değil diğer organ toksisiteleri ve kardiyovasküler hastalıklar ile literatür bilgileri sınırlıdır.

Salisilik asitin CP nörotoksisitesine etkisinin araştırıldığı in vitro bir çalışma da CP ile tedavi edilen nöron kültür hücresinde TOK düzeylerinin Kontrol grubuna göre yüksek geldiği yine aynı çalışmada TAK kapasitenin düşük geldiği raporlandı. CP'nin, ratların primer nöron hücrelerinde ciddi nörotoksisteye neden olduğu gösterildi (129).

Bu çalışma da TOK ve OSİ, CP grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı bulundu. Bu çalışma CP'nin kardiyotoksiste gelişmesinde temelde oksidatif stresin etkili olduğunu göstermektedir.

Atakısı ve ark. (130) tavşanlarda yaptığı bir çalışmada 100mg/kg *im* uygulanan NAC uygulamasının hemen sonrasında, 3. 6.ve 9. Saat olmak üzere 3 farklı zamanda kan alındı. Uygulmanın 6. ve 9. Saatlerinde TAK düzeyleri başlangıç periyoduna göre yüksek bulundu. TOK düzeylerini ise 3. 6. Ve 9. Saatlerin hepsinde başlangıç düzeyine göre anlamlı düşük gözlemlendi. NO⁻ seviyeleri ise 6. 9. Saatte başlangıç düzeylerine göre düşük olduğu gözlemlendi. NAC'ın çok kısa bir zamanda antioksidan özellik gösterdiği raporlandı .

Bu çalışmada TOK düzeyleri, NAC uygulaması sonrasında düşüş gözlemlenirken anlamlı bir düşüşe neden olmadığı gözlemlendi. Bu da NAC dozunun yetersizliği ya da uygulama metoduna bağlanabilir. Farklı uygulama (*iv*, *ia*) yolları ile istenilen sonuç alınabilir.

Oksidatif stresin etki ettiği proteinler ve DNA gibi biyomoleküllere nazaran lipidlerin daha az etkilendikleri bilinmektedir. Lipid peroksidasyonu aynı zamanda daha geç meydana gelir (131). Bununla birlikte; oksidatif hasar sonucu meydana gelen hastalıklarda, lipid peroksidasyonun güvenilir bir biçimde değerlendirilmesi çok önemlidir. (132).

CP'nin lipid peroksidasyonuna neden olarak, doku hasarına neden olduğu kardiyotoksisite ve nefrotoksisite gibi çeşitli organotoksisitelere neden olduğu farklı çalışmalarla gösterilmiştir (8, 92). CP kardiyotoksisite çalışmaların çoğunda lipid oksidasyon göstergesi olarak MDA düzeylerini, TBARS (Tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri) ile çalışmış olup, MDA lipidlerin primer ve sekonder yollarla parçalanması

sonucu meydana gelen düşük molük ağırlıklı, lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biridir (132). Rosic et al. (21) CP kardiyotoksitesinde lipid oksidasyon parametresi olarak TBARS çalışmış olup CP grubunda TBARS konsantrasyonlarını yüksek bulmuşlardır. Benzeri çalışmalarda da CP kardiyotoksitesinde TBARS düzeylerini yüksek bulunduğu gösterilmiştir (9, 20). Saleh et al. (8) hem kardiyak dokuda hem de plazmada MDA düzeylerini değerlendirmiş olup, Her iki örnekte de CP'nin, MDA düzeylerini artırarak lipid peroksidasyonuna neden olduğu göstermiştir.

CP'nin, kardiyak dokuda MDA düzeylerini oldukça yükselttiğini, akabinde verilen α lipiki asit, ellajik asit gibi adjuvanlarla, kardiyak membranlarda meydana gelen lipid peroksidasyonun engellendiğini gösterilmiştir (91, 96).

Literatürde CP kardiyotoksiste çalışmalarında lipid peroksidasyon göstergesi olarak 4-HNE çalışmasına rastlanılmadı.

Noori S et al. (133) yaptığı bir çalışmada birbirini izleyen 5 gün 3 mg/kg ip CP'in plazma BUN, kreatinin ile birlikte böbrek dokusunda ve plazmada ölçülen 4-HNE ve MDA ve nitrat düzeylerini yükselttiğini, doku GSH, SOD, CAT düzeylerinin düşürdüğünü gösterdiler (133). Luo et al. (115) DOX ile geliştirdikleri deneysel kardiyotoksiste modelinde; total aldehit, hexenal, 4-HNE ve MDA düzeylerini çalışmışlar; tüm lipid peroksidasyon parametrelerinin serum ve kalp doku düzeylerinin ikisinde de, tek doz DOX sonrası ciddi biçimde yükseldiğini, kümülatif dozda verilen DOX'un aldehit konsantrasyonalarını en yükseğe çıkardığını, karnitin ilavesiyle birlikte lipid peroksidasyon markerlerinin Kontrol düzeyine kadar gerilediğini raporladılar. Ayrıca aldehit seviyelerinin 3 haftadan uzun bir süre yüksek seyrettiğini, Bunun da aldehitlerin sadece bir hasar markeri olmayıp, aynı zamanda ilerde meydana gelecek hasarlarda bir duyarlık endeksi olduğunu raporladılar (115). 4-HNE son yıllarda CP nefrotoksiste modellerinde immünohistokimyasal düzeyde çalışılmaktadır (127, 134). Bu çalışmalar 4-HNE'nin CP'in renal hasarı göstermede çok yararlı olduğunu göstermektedir.

Hidroperoksitler yağ asiti ve kolesterol gibi doymamış lipidlerin peroksidasyonu başlangıcında oluşan kararlı ürünlerdir (86). Kolesterol esteri gibi çoklu doymamış yağ asitlerini yüksek miktarda içeren biyolojik sistemlerde ROOH'un miktarının tayini, oksidatif durumun göstergesinin doğrudan ve faydalı bir göstergesidir (74).

Literatürde deneysel CP kardiyotoksitesi çalışmalarında ROOH çalışmasına rastlanılmadığı gibi CP çalışmalarında da literatürde rastlanılmamıştır.

İsoprotrenol kardiyotoksisite modelinde (123) lipid hidroperoksit düzeyleri çalışılmış ve anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. İsoprotrenol ile birlikte 14 gün boyunca oral 100 mg /kg NAC verilmiş lipid hidroperoksit düzeylerinin anlamlı oranda azaldığı gösterilmiştir. Bu bulguyu histolojiyle de korele olduğunu NAC'ın kardiyak dokuda anlamlı bir düzelmeye neden olduğunu bildirmişlerdir (123).

Bu çalışmada CP grubunda Kontrol grubuna kıyasla hem total lipid hidroperoksit düzeyleri hem de 4-HNE düzeyleri anlamlı derecede yükselmiştir. Bu CP'nin kalpte lipid peroksidasyonuna yol açtığının açık bir göstergesidir. Bu çalışmada CP'yle birlikte NAC verilen grupta 4-HNE ve ROOH düzeyleri yeterli düşüş sergileyememiştir. Bunun olası nedeni kalp dokusuna antioksidan sistemlerin yeterli oranda nüfus edememesi olabilir (135). Ayrıca verilen NAC'ın uygulanış biçiminin değişikliğe gidilmesi ya da NAC dozunun artırılması ile istenilen sonuçlar alınabilir. Özetle, SOR'u son derece yüksek miktarda üreten ve antioksidan sistemin yetersiz olduğu kalp dokusunda (135), NAC uygulaması tahmin edildiği kadar koruyucu etkinlik göstermemiştir.

İleri çalışmalarda CP'nin kalpte kümülatif etkiyle daha fazla etkiye yol açıp açmayacağını gösterilmesi, ayrıca kalp dokusunda lipid peroksidasyonunu immünohistokimyasal yöntemlerle de gösterilmesi CP kardiyotoksitesi başlığı altındaki literatürü bir adım ileriye taşıyabilir.

Proteinler SOR'un primer hedeflerindendir. CP'nin kardiyotoksitesinde önemli bir yer tutan protein oksidasyonu farklı çalışmalarla gösterilmiştir (3, 94). Touati et al. (94) CP'nin, protein oksidasyonun önemli markerlerinden biri olan protein karbonil düzeylerini hem kalp hemde karaciğer dokusunda çalışmış olup her ikisinde de anlamlı olarak yükseldiğini göstermiştir (94). Aynı çalışmada CP, nonprotein bir tiyol olan glutatyon düzeylerinin de anlamlı düşürmüştür. PCC düzeylerinin sadece CP değil, kuvvetli bir kardiyotoksik ajan olan DOX modellerinde de arttığı gösterilmiştir (105).

CP'nin nitrozatif stres aracılığıyla kardiyotoksisiteye neden olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (99). NO' ilişkili CP kardiyotoksisiteyle ilgili yeterli bilgiler olmasa da NO'un peroksinitrit dahil metabolitlerinin toksik olduğu bilmektedir (3, 126). Nitrit plazmadaki NO' seviyesini gösteren birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol alan NO' varyantı bir serbest nitrojen radikalidir (3). Demkow et al. (99) yapmış oldukları çalışmada kemoterapi tedavisi esnasında 12 hastadan 7'sinin nitrit seviyelerinin arttığını gösterdiler. Al-Majed et al (9). yaptığı bir

çalışmada 7mg CP ip tek doz verilen ratlarda kardiyak dokuda serbest nitrojen radikallerinden olan total NO_2^- , NO_3^- düzeylerini yüksek bulmuşlardır (9). Benzer şekilde Hussein et al. (91) 10 mg CP uygulamasından hemen 24 saat sonra kardiyak dokuda NO^- seviyelerini anlamlı yüksek bulmuşlardır. Tüm bu çalışmaların aksine, Colakogullari ve ark. (136) ilk defa CP bazlı kemoterapi kuru ala hastalarda 24 ve 48 saat sonra serum nitrit/nitrat seviyelerinde anlamlı bir değişiklik olmadığını bildirdiler (136) Saleh et al.(8) yaptığı çalışmada ise serum NO^- kalp ve böbrek doku homojenatı NO^- seviyelerini CP grubunda anlamlı oranda düşük bulmuşlardır. Saleh et al. bu durumu NO^- 'nun potent bir vazodilatör olduğunu endotelial fonksiyon kayıp durumunda NO^- düzeyleri azalmasına bağlamışlardır.

Rosic et al. (21) yapmış olduğu kronik CP kardiyotoksitesinde CP grubunda NO_2^- düzeylerinin preiskemik (BAZAL) durumda anlamlı değişmediği 30 saniye den 2 dakikaya kadar süren 3 farklı iskemik reperfüzyon hasarında NO_3^- düzeylerinin düştüğünü raporladılar. Bunun sebebinin NO^- ve O_2^- üretimimin fazla olması durumunda yüksek toksik ONOO^- 'i meydana getirdiği bunda bu üründen dolayı NO^- düzeylerinin anlamlı değişmediği kanısına varmışlardır. Aynı kişiler gruplara ayrı ayrı 500 mg/kg NAC ilavesinde ise hem preiskemik (bazal) hemde iskemik durumlarda hem Kontrol hem de CP grubuna göre NO_2^- düzeylerinin anlamlı oranda arttığını gösterdiler (21). Bunun sebebi NAC'ın yararlı etkileri de olduğu gösterilen NO^- salınımı olabilir. Serbest radikal süpürücüsü olan NAC, O_2^- oluşumunu dolaylı olarak da peroksinitrit oluşumunu engellemiş olabilir.

O_2^- varlığında, NO^- spontan olarak ONOO^- 'e dönüşebilir. ONOO^- kendisini oluşturan hem süperoksit hemde NO^- 'dan daha reaktif bir bileşiktir ve direk olarak oksidatif modifikasyonlara neden olabilir (3). ONOO^- aracılı oksidatif modifikasyonun bir ürünü olan 3-nitrotirozin (3-NT) oluşumu da nitrozatif stres belirteci olarak kabul edilir (126). Tirozin amino asidiyle NO^- türevi oksidanların reaksiyonu sonucu meydana gelir ve radikallerin neden olduğu protein hasarında kararlı bir marker olarak işlev görür (74).

CP kardiyotoksitesi ilgili literatür çalışmalarında 3-NT düzeylerini ölçen bir çalışmaya rastlanılmadı. Literatürde sadece böbrek dokusunda ve immünohistokimyasal çalışmalar gözlemlendi.

Chirino et al. (127) yapmış olduğu bir çalışmada İnos aktivasyonunun CP ilişkili renal hasarda, oksidatif ve nitrozatif strese önemli rol oynadığını raporlamışlardır. Bu kişiler CP nefrotoksitesinde immünohistokimyasal olarak renal korteks ve

medullada 3-NT (nitrozatif stres) ve 4-HNE(oksidatif stres) güçlü boyandıklarını gözlemlemişlerdir. Benzer şekilde İnos inhibitörü ile tedavi edilen grupta bu markerlerin önemli oranda boyanma özelliklerini kaybettiklerini gözlemlemişlerdir. Chirino et al. NO[•] ve derivelerinin CP nefrotoksisitesine katkıda bulunduğunu raporlamışlardır (127).

Chirino et al. (137) yaptığı farklı bir çalışmada CP tedavisi alan ratlarda böbrek korteksin iç kısmında yer alan proksimal tübüllerde kuvvetli 3-NT immün boyama gözlemlendi. (137). Bu çalışmada ratlarda FeTPPS'nin, (fizyolojik şartlar altında ONOO⁻i nitrata çeviren suda çözünen Fe(III) kompleksi) CP kaynaklı nefrotoksiside göstermiş olduğu protein nitrasyonunu azaltıcı yöndeki etkisi, ONOO⁻ nin hem protein oksidasyonuna hem de CP nefrotoksisitesine neden olduğunu göstermektedir (137).

Literatürde deneysel CP kardiyotoksisitesi çalışmalarında 3-NT çalışmasına rastlanılmamıştır. CP ilişkili kardiyotoksisite de SNR'nin dolaylı olarak da nitrozatif stresin literatür eksikliği nedeniyle, CP ilişkili kardiyotoksisitesinin daha iyi anlaşılabilmesi için nitrozatif stresin açıklanması bu ve ileri çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Bu çalışma da CP ilişkili kardiyotoksisitede kalp dokusu 3-NT düzeyleri çalışıldı. 3-NT düzeyleri 10mg/kg CP verilen grupta Kontrol grubuna kıyasla kaydadeğer yüksek bulunmuştur. Bu bulgu bundan önce yapılan nefrotoksisite çalışmalarının aksine immunohistokimyasal bir çalışma değildir. Bu çalışmada NAC, CP'nin neden olduğu nitrozatif stresi kısmen giderse de yeterli gelmemiştir. Farklı protokoller, ip uygulama yöntemi ve farklı dozlar (20, 21) NAC'ın kardiyoproteksiyonda etkili olmamasının nedeni olabilir. NAC'ın daha yüksek dozda kullanımı kardiyoprotektif etkiyi anlamlı biçimde gösterebilir. Kardiyotoksisiteyi nitrozatif stres zemininde daha iyi anlayabilmek için hem moleküler düzeyde hem de immunohistokimyasal düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır.

CP kardiyotoksisinde, bir tiyol olan GSH (8, 9, 91, 92, 94, 102) peroksizomda yer alan H₂O₂'yi su ve moleküler oksijene indirgeyen CAT (94, 95, 96) hücre içindeki en etkili enzimatik antioksidan olup O₂'i, kendisinden daha az reaktif olan H₂O₂'ye dönüştüren SOD (91, 95, 102) gibi antioksidan tarafta yer alan enzimatik ve nonenzimatik parametrelerin düştüğünü gösteren birçok çalışma mevcuttur.

Tiyoller serbest radikalleri temizleme yeteneğine sahip mükemmel moleküllerdir. GSH'da memeli hücrelerde non-protein tiyollerden en yaygın olanıdır. GSH serbest radikalleri temizleyerek oksidize formu olan glutatyon disülfüt (GSSG) 'e dönüşür.

CP'nin 5mg/kg dozda uygulanıp, CP nefrotoksisitesinde total glutatyon ve protein bağlı tiyol düzeyleri böbrek dokusunda araştırılmış olup, CP uygulmasının 1 saat sonrasında böbrek korteks ve medullasında total glutatyon (GSH ve GSOG birden) düzeylerinin arttığını, Kontrol düzeyiyle karşılaştırıldığında 72 saat sonra artışın %50 ye yaklaştığını bu düzeylerde de yaklaşık olarak 120 saat yüksek seyrettiğini raporlandı. Bunun aksine proksimal tübülde ölçülen protein-tiyol düzeyinin CP uygulmasının 8 saat sonrasında kaydedeğer düzeyde düştüğünü, 120 saat sonra ise bu düşüşün % 29'a vardığını gözlemlediler (138). CP nefrotoksisitesinde uygulanan GSH'nin, ratlarda mükemmel nefroprotektif olduğu ve CP'nin sistemik toksisitesinde de benzeri etkiler gösterdiği ayrıca uygun tedavi koşullarında CP'nin antitümör etkinliğinin azaltmadığı gösterilmiştir (139).

Rosic et al. (21) CP kardiyotoksiste çalışmasında, CP grubunda kan SOD ve GSH düzeylerini Kontrol grubuyla kıyasladığında ciddi derecede düşük olduğunu gözlediler. NAC ve CP'in birlikte uygulamasından sonrasında intrasellüler GSH ve SOD düzeylerinin kaydedeğer artış gösterdiği gözlemlendi. Bununla birlikte SOD düzeyleri kontrol grubuyla kıyaslandığında hala düşük olduğu raporlandı (21).

Rosic et al (20) başka bir çalışmasında ise kronik CP uygulmasının kalpte total glutatyon düzeyleriyle birlikte, GPx ve GR aktivitesini etkilemediğini bildirdiler. Benzer şekilde NAC'ın hem tek başına hem de CP'le birlikte uygulandığında, bu parametreleri değıştirmediğini gözlemlediler. NAC kardiyotoksisiteyi önlerken bu parametrelerde herhangi bir değışiklik olmamasını, NAC'ın sadece glutatyon redoks sisteminde etki yapmadığını aynı zamanda NAC'ın sahip olduğu antioksidan özelliklere bağlamışlardır, Öyle ki NAC, içerdığı SH gruplarıyla çok güçlü bir antioksidandır ve SOR üretimini glutatyon siklüsü haricinde kendisi de düşürebilir (20).

CP uygulmasında antioksidan savunma sisteminde yol açtığı defektleri tiyol, GSH ve antioksidan enzimlerden haricen genel olarak gösteren TAK ile CP-Antioksidan sistemi hakkında bilgi sahibi olunabilir. Moghadam et al. (22)'ın yapmış olduğu çalışma da 7 mg ip tek doz CP'nin plazma TAK düzeylerinde ciddi düşüşe yol açtığını bildirdiler. TAK düzeyi düşerken tiyol düzeyinde düşüş olsa da anlamlı bir düşüş olmadığını raporladılar.

Bu çalışmada kalp dokusunda çalışılan tiyol ve TAK düzeylerinin yalnız CP uygulması sonrasında Kontrol grubuna göre anlamlı düşüş gösterdiği gözlemlendi. Bu görüşü destekler nitelikte yalnız NAC uygulanan grupta Kontrol grubuna kıyasla

anlamli yükseklik gözlemlendi. Daha nceki birçok çalışma da NAC'ın antioksidan olduğu ve TAK (130,140) ve GSH düzeylerini artıarak, antoksidan kapasiteyi arttırdığı gösterildi (21). Shalby et al. (140) yaptığı çalışma da CP nefrotoksisitesi geliştirilen ratlarda NAC uygulmasının hem plazma hemde böbrek dokusunda değerlendirdileri TAK'ın CP grubuna göre anlamli arttığını raporladılar (S11). Atakısı ve ark. (130) NAC'ın çok kısa bir sürede TAK'ı arttırdığını gözlemlediler.

Bu alışma da CP ile birlikte uygulanan NAC'ın CP grubuna göre kıyaslandığında hem TAK hemde dok tiyol düzeylerinin ciddi bir biçimde yükselttiğini, kontrol grubuyla kıyaslandığında ise TAK düzeylerini istatikselsel olarak anlamli yükseltirken, doku tiyol değerlerinin ise arasında anlamli bir farklılık olmadığı gözlendi. NAC CP'nin doku düzeyinde yapmış olduğu toksisiteye TAK ve tiyol düzeyinin artıarak cevap vermiştir. nceki yıllarda yapılan bir çalışmada kalp dokusunun antioksidan kapasite bakımından böbrek, karaciğer ve beyin dokusunun gerisinde kaldığı hatta tüm bu dokulardaki antioksidan kapasitesinin neredeyse 10 da birinden daha az olduğu gösterilmiştir (135). Bu alışmada, TAK hesaplanmasında TRAP (Total reaktif antioksidan potansiyel) testini kullanan araştırmacılar, en yüksekte en düşüğe sırasıyla karaciğer homojenatı (3900 μ M Trolox-Equivalent /doku kg), böbrek, (2700 μ MTE/Kg), beyin (1700 μ MTE/Kg) ve kalp (320 μ MTE/Kg) olarak gözlemledi. Araştırmada kalp antioksidan içeriği bakımından en duyarlı doku olarak gözlemlendi (135). Bu alışma da NAC her ne kadar serbest tiyol düzeyini ve TAK'ı, CP grubuna göre anlamli oranda artırmasına ragmen, CP kardiyotoksisite modelinde kardiyotoksisiteyi tam anlamıyla engelleyici etki göstermemiştir. Bu bulgu birkaç nedenden kaynaklı olabilir. Uygulama süresi bakımından muldoon et al. (83) yaptığı sreye bağlı kalınsa da *ip* NAC'ın tam etkinlik gösteremediği ve karaciğerde ilk geçiş etkisine uğradığı söylenebilir (15). Ayrıca günde 250 totalde 750 mg/kg uygulanan NAC'ın yetersiz geldiği söylenebilir (17).

Sonuç olarak; Oksijeni yüksek miktarda ve sürekli tüketen ve herhangi bir kardiyak sorundan ötürü meydana gelen SOR'a yüksek oranda maruz kalan kalbin antioksidan kapasitesinin yeterli olmadığından, CP'nin yüksek toksistesine maruz kalmış hem oksidatif hem de nitrozatif strese bağlı kardiyotoksisite meydana gelmiştir. Ancak CP kardiyotoksisitesinde verilen NAC'ın; dozu, süresi ya da uygulama yöntemlerinden biri veya hepsi birden kalp üzerindeki patolojiyi ortadan kaldırmaya yetmediği söylenebilir. Bu açıdan NAC uygulama yolu değişikliğine gidilmesi, NAC dozunun

artırılması veya NAC'a ileveten ekstra antioksidan özelliği olan adjuvanın eklenmesi CP kardiyotoksisitesi giderilmesinde yardımcı olabilir.



6. SONUÇLAR

CP kardiyotoksitesisi patogeneğinde rol oynayan bazı mekanizmaların aydınlatılması ve NAC'ın etkisini öğrenmek için yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar:

- Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, CP grubunda; BUN, kreatinin, CK-MB LDH, cTnI, CMLC-1, İMA, TOK, OSİ, 4-HNE, 3-NT, ROOH değerleri yüksek; tiyol ve TAK ise düşük bulundu. Kalbin histolojik skorlamasında anlamlı fark görüldü.
- Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, NAC grubunda; TAK düzeyleri yüksek bulundu; ancak BUN, kreatinin, CK-MB LDH, cTnI, CMLC-1, İMA, TOK, OSİ, 4-HNE, 3-NT, ROOH ve tiyol düzeyleri arasında fark olmadığı görüldü. Kalbin histolojik skorlamasında fark olmadığı görüldü.
- Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında CP-NAC grubunda; BUN, kreatinin, CK-MB, LDH, İMA, TOK, OSİ, 3-NT, ROOH düzeyleri arasında fark olmadığı görüldü. cTnI, CMLC-1, 4-HNE düzeylerinin yüksek; tiyol ve TAK düzeylerinin düşük olduğu görüldü. Kalbin histolojik skorlamasında fark görüldü.
- CP grubuyla karşılaştırıldığında CP-NAC grubunda; BUN, kreatinin, CK-MB LDH, cTnI, CMLC-1, İMA, TOK, OSİ, 4-HNE, 3-NT, ROOH değerlerinin farklı olmadığı görüldü: tiyol ve TAK düzeyleri ise yüksek bulundu. Kalbin histolojik skorlamasında fark görülmedi.
- CP grubuyla karşılaştırıldığında NAC grubunda; BUN, kreatinin, CK-MB LDH, cTnI, CMLC-1, İMA, TOK, OSİ, 4-HNE, 3-NT, ROOH değerleri

- düşük: tiyol ve TAK ise yüksek bulundu. Kalbin histolojik skorlamasında fark olmadığı görüldü.
- NAC grubuyla karşılaştırıldığında CP-NAC grubunda; BUN, kreatinin, LDH, OSİ düzeylerinin yüksek; tiyol ve TAK düzeylerinin ise düşük olduğu görüldü. cTnI, CMLC-1, İMA, TOK, 4-HNE, 3-NT, ROOH düzeylerinde farklılık görülmedi. Kalbin histolojik skorlmasında fark olmadığı görüldü.



7. KAYNAKLAR

1. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 2014; 740: 364-78.
2. dos Santos NA, Carvalho Rodrigues MA, Martins NM, dos Santos AC. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. *Arch Toxicol* 2012; 86: 1233-50.
3. Demkow U, Stelmaszczyk-Emmel A. Cardiotoxicity of cisplatin-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer patients. *Respir Physiol Neurobiol* 2013; 187: 64-7.
4. Patanè S. Cardiotoxicity: cisplatin and long-term cancer survivors. *Int J Cardiol* 2014; 175: 201-2.
5. Vincent DT, Ibrahim YF, Espey MG, Suzuki YJ. The role of antioxidants in the era of cardio-oncology. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 72: 1157-68.
6. O'Hare M, Sharma A, Murphy K, Mookadam F, Lee H. Cardio-oncology Part I: chemotherapy and cardiovascular toxicity. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2015; 13: 511-8.
7. Muller PY, Dieterle F. Tissue-specific, non-invasive toxicity biomarkers: translation from preclinical safety assessment to clinical safety monitoring. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009; 5: 1023-38.
8. Rasha M. Saleh, Walaa F. Awadin, Yousef Y. Elseady, Faheim E. Waheish. "Renal and cardiovascular damage induced by cisplatin in rats." *Life Sci J* 2014; 11: 191-203
9. Al-Majed AA, Sayed-Ahmed MM, Al-Yahya AA, Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Al-Shabanah OA. Propionyl-L-carnitine prevents the progression of cisplatin-induced cardiomyopathy in a carnitine-depleted rat model. *Pharmacol Res* 2006; 53: 278-86.
10. Panthegini M, Miyosin Light and Heavy Chains. In: Alan H. B. Wu, *Cardiac Markers* (1nd ed) Humana Press Inc. New York 1998, pp. 245-56.

11. Ma Y, Kang W, Bao Y, Jiao F, Ma Y. Clinical significance of ischemia-modified albumin in the diagnosis of doxorubicin-induced myocardial injury in breast cancer patients. *PLoS One* 2013; 8: e79426.
12. Kelly GS. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev* 1998; 3: 114-27.
13. Tepel M, van der Giet M, Statz M, Jankowski J, Zidek W. The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure: a randomized, controlled trial. *Circulation* 2003; 107: 992-5.
14. Scholze A, Rinder C, Beige J, et al. Acetylcysteine reduces plasma homocysteine concentration and improves pulse pressure and endothelial function in patients with end-stage renal failure. *Circulation* 2004; 109: 369-74.
15. Dickey DT, Muldoon LL, Doolittle ND, Peterson DR, Kraemer DF, Neuwalt EA. Effect of N-acetylcysteine route of administration on chemoprotection against cisplatin-induced toxicity in rat models. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 62: 235-41.
16. Dickey DT, Wu Y J, Muldoon LL, Neuwalt EA. Protection against cisplatin-induced toxicities by N-acetylcysteine and sodium thiosulphate as assessed at the molecular, cellular and in vivo levels. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 1052-8.
17. Abdelrahman AM, Al Salam S, AlMahruqi AS, Al husseni IS, Mansour MA, Ali BH. N-acetylcysteine improves renal hemodynamics in rats with cisplatin-induced nephrotoxicity. *J Appl Toxicol* 2010; 30: 15-21.
18. Fatima A, Nadia W, Hina Y, Maria A. Role of N-acetylcysteine in rescue of mice heart. *IJPSR* 2014; 5: 1178-82.
19. Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 4 117-29.
20. Rosic G, Selakovic D, Joksimovic J et al. The effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced changes of cardiodynamic parameters within coronary autoregulation range in isolated rat hearts. *Toxicol Lett* 2016; 242: 34-46.
21. Rosic G, Srejovic I, Zivkovic V et al. The effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced cardiotoxicity on isolated rat hearts after short-term global ischemia. *Toxicology Reports* 2015; 2: 996-1006.

22. Moghadam GT, Hosseini-Zijoud SM, Shayesteh TH, Ghasemi H, Ranjbar. Attenuation of cisplatin-induced toxic oxidative stress by propofol. *Anesth Pain Med* 2014; 4: e14221.
23. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia Coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 1965; 205: 698-9.
24. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 1969; 222: 385-6.
25. Haxton KJ, Burt HM. Polymeric drug delivery of platinum-based anticancer agents. *J Pharm Sci* 2009; 98: 2299-316.
26. Apps MG, Choi EH, Wheate NJ. The state-of-play and future of platinum drugs. *Endocr Relat Cancer* 2015; 22: 219-33.
27. Kayaalp O. S. Akılcıl Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji (13. Baskı). Pelikan Yayıncılık, Ankara 2012.
28. Tsang RY, Al-Fayea T, Au HJ. Cisplatin overdose: toxicities and management. *Drug Saf* 2009; 32: 1109-22.
29. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int* 2008; 73: 994-1007.
30. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 307-20.
31. Albin A, Pennesi G, Donatelli F, Cammarota R, De Flora S, Noonan DM. Cardiotoxicity of anticancer drugs: the need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102: 14-25.
32. Pai VB, Nahata MC. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Saf* 2000; 22: 263-302.
33. El-Sawalhi MM, Ahmed LA. Exploring the protective role of apocynin, a specific NADPH oxidase inhibitor, in cisplatin-induced cardiotoxicity in rats. *Chem Biol Interact* 2014; 207: 58-66.
34. Simbre VC, Duffy SA, Dadlani GH, Miller TL, Lipshultz SE. Cardiotoxicity of cancer chemotherapy: implications for children. *Paediatr Drugs* 2005; 7: 187-202.
35. Dolci A, Dominici R, Cardinale D, Sandri MT, Panteghini M. Biochemical markers for prediction of chemotherapy-induced cardiotoxicity: systematic

- review of the literature and recommendations for use. *Am J Clin Pathol* 2008; 130: 688-95.
36. Urbanová D, Urban L, Carter A, Maasova D, Mladosevicova B. Cardiac troponins--biochemical markers of cardiac toxicity after cytostatic therapy. *Neoplasma* 2006; 53: 183-90.
 37. Cardinale D, Sandri MT. Role of biomarkers in chemotherapy-induced cardiotoxicity. *Prog Cardiovasc Dis* 2010; 53: 121-9.
 38. Daubert MA, Jeremias A. The utility of troponin measurement to detect myocardial infarction: review of the current findings. *Vasc Health Risk Manag* 2010; 6: 691-9.
 39. Hawkins JW, Dugaiczky A. The human serum albumin gene: structure of unique locus. *Gene* 1982; 19: 55-8.
 40. Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia-a preliminary report. *J Emerg Med* 2000; 19: 311-5.
 41. Sbarouni E, Georgiadou P, Kremastinos DT, Voudris V. Ischemia modified albumin: is this marker of ischemia ready for prime time use? *Hellenic J Cardiol* 2008; 49: 260-6.
 42. Bar-Or D, Curtis G, Rao N, Bampos, Lau E. Characterization of the Co⁺² and Ni⁺² binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin. *Eur J Biochem* 2001; 268: 42-7.
 43. Gaze DC. Ischemia modified albumin: a novel biomarker for the detection of cardiac ischemia. *Drug Metab Pharmacokinet* 2009; 24: 333-41.
 44. Roy D, Quiles J, Gaze DC, et al. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischaemia modified albumin. *Heart* 2006; 92: 113-4.
 45. Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 1999; 65: 1865-74.
 46. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine* (4nd ed), Oxford University Press 2007.
 47. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 481-93.
 48. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-28.

49. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest.* 2005; 115: 500-8.
50. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000; 408: 239-47.
51. Halliwell B. *Free Radicals and Other Reactive Species in Disease* 2015 eLS. 1–9.
52. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
53. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007; 87: 315-424.
54. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280: 1-8.
55. Fishbane S. N-Acetylcysteine in the Prevention of Contrast-Induced Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3: 281–8.
56. Ziment I. Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic. *Biomed Pharmacother* 1988; 42: 513-19.
57. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol* 2007 ;7: 355-9.
58. D.M. Radomska-Lesniewska, P. Skopinski, N-acetylcysteine as an antioxidant and anti-inflammatory drug and its some clinical applications, *Cent Eur J Immun* 2012; 37: 57–66.
59. Prakash M, Shetty MS, Tilak P, Anwar N Total thiols: biomedical importance and their alteration in various disorders. *Online J Health Allied Scs* 2009; 8: 1–9
60. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1-40.
61. Hu ML, Louie S, Cross CE, Motchnik P, Halliwell B. Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. *J Lab Clin Med* 1993; 121: 257-62.
62. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies Mj. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997; 324: 1-18.

63. Erel Ö. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004; 37: 277-85.
64. Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 1999; 299: 15-27.
65. Benzie IF, Szeto YT. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 633-6.
66. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991; 91: 31-8.
67. Amira AM. Oxidative stress and disease: An updated review. *Res J Immunol* 2010; 3: 129-45.
68. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 1998; 39: 1529-42.
69. Erel Ö. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005; 38: 1103-1111.
70. Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev* 2011; 111: 5944-72.
71. Avery SV. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J* 2011; 434: 201-10.
72. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014;2014: 360438.
73. Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, Jouanin I, Siems W, Uchida K. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res* 2010; 44: 1098-124.
74. Lee R, Margaritis M, Channon KM, Antoniadou C. Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations. *Curr Med Chem* 2012; 19: 2504-20.
75. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 2000; 32: 307-26.
76. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272: 20313-6.

77. Breusing N, Grune T. Biomarkers of protein oxidation from a chemical, biological and medical point of view. *Exp Gerontol* 2010; 45: 733-7.
78. Peluffo G, Radi R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovasc Res* 2007; 75: 291-302.
79. Gow AJ, McClelland M, Garner SE, Malcolm S, Ischiropoulos H. The determination of nitrotyrosine residues in proteins. *Methods Mol Biol* 1998; 100: 291-9.
80. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006; 52: 601-23.
81. Ho E, Karimi Galougahi K, Liu CC, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol* 2013; 1: 483-91.
82. Daiber A, Münzel T. Increased circulating levels of 3-nitrotyrosine autoantibodies: marker for or maker of cardiovascular disease? *Circulation* 2012; 126: 2371-3.
83. Muldoon LL, Wu YJ, Pagel MA, Neuwelt EA. N-acetylcysteine chemoprotection without decreased cisplatin antitumor efficacy in pediatric tumor models. *J Neurooncol* 2015; 121: 433-40.
84. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-75.
85. Forster MJ, Sohal BH, Sohal RS. Reversible effects of long term caloric restriction on protein oxidative damage. *Gerontol* 2000; 55: 522-529.
86. Nourrooz-Zadeh J. Ferrous ion oxidation in presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxides in plasma. *Methods Enzymol* 1999; 300: 58-62.
87. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Türkiye Kanseri İstatistikleri. Ankara 2016: 48-50.
88. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins* 2010; 2: 2490-518.
89. Ewer MS, Ewer SM. Cardiotoxicity of anticancer treatments: what the cardiologist needs to know. *Nat Rev Cardiol* 2010; 7: 564-75.
90. Arica V, Demir İH, Tutanc M et al. N acetylcysteine prevents doxorubicine-induced cardiotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol* 2013; 32: 655-61.

91. Hussein A, Ahmed AA, Shouman SA, Sharawy S. Ameliorating effect of DL- α -lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and cardiotoxicity in experimental animals. *Drug Discov Ther* 2012;6: 147-56.
92. Coskun R, Turan MI, Turan IS, Gulapoglu M. The protective effect of thiamine pyrophosphate, but not thiamine, against cardiotoxicity induced with cisplatin in rats. *Drug Chem Toxicol* 2014; 37: 290-4.
93. Appenroth D, Winnefeld K, Schröter H, Rost M. Beneficial effect of acetylcysteine on cisplatin nephrotoxicity in rats. *J Appl Toxicol* 1993;13: 189-92.
94. Rjiba-Touati K, Ayed-Boussema I, Belarbia A, Achour A, Bacha H. Recombinant human erythropoietin prevents cisplatin-induced genotoxicity in rat liver and heart tissues via an antioxidant process. *Drug Chem Toxicol*. 2012; 3: 134-40.
95. Wang J, He D, Zhang Q, Han Y, Jin S, Qi F. Resveratrol protects against Cisplatin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage. *Cancer Biother Radiopharm* 2009; 24: 675-80.
96. Yüce A, Ateşşahin A, Ceribaşı AO, Aksakal M. Ellagic acid prevents cisplatin-induced oxidative stress in liver and heart tissue of rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007;101: 345-9.
97. Sadowska AM, Verbraecken J, Darquennes K, De Backer WA. Role of N-acetylcysteine in the management of COPD. *Therapeut Clin Risk Manag* 2006; 2: 3-18.
98. Ryberg M. Recent advances in cardiotoxicity of anticancer therapies. *Am Soc. Clin Oncol Educ Book* 2012: 555-9.
99. Demkow U, Biatas-Chromiec B, Stelmaszczyk-Emmel A and et al. The Cardiac Markers and Oxidative Stress Parameters in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients Receiving Cisplatin-Based Chemotherapy. *EJIFCC*. 2011; 22: 6-15.
100. Wu YJ, Muldoon LL, Neuwelt EA. The chemoprotective agent acetylcysteine blocks cisplatin-induced apoptosis through caspase signaling pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312: 424-431.
101. Adams JE, Bodor GS, Dávila-Román and et al. Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation* 1993; 88: 101-6.

102. El-Awady el-SE, Moustafa YM, Abo-Elmatty DM, Radwan A. Cisplatin-induced cardiotoxicity: Mechanisms and cardioprotective strategies. *Eur J Pharmacol* 2011; 650: 335-41.
103. Klein MS, Shell WE, Sobel BE. Serum creatine phosphokinase (CPK) isoenzymes after intramuscular injections, surgery, and myocardial infarction. *Experimental and clinical studies. Cardiovasc Res* 1973; 7: 412-8.
104. McLaurin MD, Apple FS, Voss EM, Herzog CA, Sharkey SW. Cardiac troponin I, cardiac troponin T, and creatine kinase MB in dialysis patients without ischemic heart disease: evidence of cardiac troponin T expression in skeletal muscle. *Clin Chem* 1997; 43: 976-82.
105. Elberry AA, Abdel-Naim AB, Abdel-Sattar EA. and et all. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 1178-84.
106. ElZarrad MK, Mukhopadhyay P, Mohan N et all. Trastuzumab alters the expression of genes essential for cardiac function and induces ultrastructural changes of cardiomyocytes in mice. *PLoS One* 2013; 8: e79543.
107. Najam R, Bano N, Mirza T, Hassan S. Adverse effects on cardiovascular status and lipid levels of albino Wistar rats treated with cisplatin and oxaliplatin in combination with 5 Fluorouracil. *Pak J Pharm Sci* 2014; 27: 1409-18.
108. O'Brien PJ, Smith DE, Knechtel TJ et al. Cardiac troponin I is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Lab Anim* 2006; 40: 153-71.
109. Ammar Abdulkareem Hadi, Sabah N. Al-Thamir. Evaluation of the Protective Properties of Amlodipine, on Cisplatin Induced Cardiotoxicity in Male Rats. *Global Journals Inc* 2013; 13: 22-8
110. Polena S, Shikara M, Naik S, Chouhdry F, Sharma M, Gintautas J, Maniar R. Troponin I as a marker of doxorubicin induced cardiotoxicity. *Proc West Pharmacol Soc* 2005; 48: 142-4.
111. Hansen MS, Stanton EB, Gawad Y, Packer M, Pitt B, Swedberg K, Rouleau JL. Relation of circulating cardiac myosin light chain 1 isoform in stable severe congestive heart failure to survival and treatment with flosequinan. *Am J Cardiol* 2002; 90: 969-73.

112. Berna MJ, Zhen Y, Watson DE, Hale JE, Ackermann BL. Strategic use of immunoprecipitation and LC/MS/MS for trace-level protein quantification: myosin light chain 1, a biomarker of cardiac necrosis. *Anal Chem* 2007; 79: 4199-205.
113. J. Mair, I. Wagner, L. Fridrich and et all. Cardiac myosin light chain-1 release in acute myocardial infarction is associated with scintigraphic estimates of myocardial scar *Clinica Chimica Acta* 1994; 229: 153-9.
114. Hillis GS, Zhao N, Taggart P, Dalsey WC, Mangione A. Utility of cardiac troponin I, creatine kinase-MB(mass), myosin light chain 1, and myoglobin in the early in-hospital triage of "high risk" patients with chest pain. *Heart* 1999; 82: 614-20
115. Luo X, Reichetzer B, Trines J, Benson LN, Lehotay DC. L-carnitine attenuates doxorubicin-induced lipid peroxidation in rats. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 1158-65.
116. Hazini A, Cemek M, Isildak İ ve ark. Investigation of ischemia modified albumin, oxidant and antioxidant markers in acute myocardial infarction *Postepy Kardiol Interwencyjnej* 2015; 11: 298-303.
117. Sbarouni E, Georgiadou P, Voudris V. Ischemia modified albumin changes - review and clinical implications. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49: 177-84.
118. Ellidag HY, Eren E, Yılmaz N, Cekin Y. Oxidative stress and ischemia-modified albumin in chronic ischemic heart failure. *Redox Rep* 2014; 19: 118-23.
119. Piwovar A, Knapik-Kordecka M, Warwas M. Ischemia-modified albumin level in type 2 diabetes mellitus Preliminary report. *Dis Markers* 2008; 24: 311-7.
120. Collinson PO, Gaze DC, Bainbridge K, et al. Utility of admission cardiac troponin and "Ischemia Modified Albumin" measurements for rapid evaluation and rule out of suspected acute myocardial infarction in the emergency department. *Emerg Med J* 2006; 23: 256-61.
121. Sinha MK, Roy D, Gaze DC, Collinson PO, Kaski JC. Role of "Ischemia modified albumin", a new biochemical marker of myocardial ischaemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Emerg Med J* 2004; 21: 29-34.

122. Minami SB, Sha SH, Schacht J. Antioxidant protection in a new animal model of cisplatin-induced ototoxicity. *Hear Res* 2004;198: 137-43.
123. Haleagrahara N, Julian V, Chakravarthi S. N-acetylcysteine offers cardioprotection by decreasing cardiac lipid hydroperoxides and 8-isoprostane level in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. *Cardiovasc Toxicol* 2011; 11: 373-81.
124. Mansour HH, El Kiki SM, Hasan HF. Protective effect of N-acetylcysteine on cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015;40: 417-22.
125. Farshid AA, Tamaddonfard E, Simaee N. and et all. Effects of histidine and N-acetylcysteine on doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Cardiovasc Toxicol*. 2014; 14: 153-61.
126. Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Exp Toxicol Pathol* 2009; 61: 223-42.
127. Chirino YI, Trujillo J, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM and et al. Selective iNOS inhibition reduces renal damage induced by cisplatin. *Toxicol Lett* 2008; 176: 48-57.
128. Tucker PS, Dalbo VJ, Han T, Kingsley MI. Clinical and research markers of oxidative stress in chronic kidney disease. *Biomarkers* 2013; 18: 103-115.
129. Cetin D, Hacimuftuoglu A, Tatar A, Turkez H, Togar B. The in vitro protective effect of salicylic acid against paclitaxel and cisplatin-induced neurotoxicity. *Cytotechnology* 2016; 68: 1361-7.
130. Atakısı E, Topcu B, Yıldız Dalgınlı K, Gülmez C, Atakısı O. Acute Effects of N-Acetylcysteine on Total Antioxidant Capacity, Total Oxidant Capacity, Nitric Oxide Level and Gammaglutamyl Transpeptidase Activity in Rabbits. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* 2016; 22: 871-5.
131. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 715-24.
132. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 515-40.
133. Noori S, Mahboob T. Antioxidant effect of carnosine pretreatment on cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. *Indian J Clin Biochem* 2010; 25: 86-91.

134. Potočnjak I, Škoda M, Pernjak-Pugel E, Peršić MP, Domitrović R. Oral administration of oleuropein attenuates cisplatin-induced acute renal injury in mice through inhibition of ERK signaling. *Mol Nutr Food Res* 2016; 60: 530-41.
135. Carlos Cusano, Bucalen Ferrari; Total Antioxidant Capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies *Journal of Cell and Molecular Biology* 2008; 7: 1-15.
136. Colakogullari M, Ulukaya E, Yilmaztepe A, et al. Higher serum nitrate levels are associated with poor survival in lung cancer patients. *Clinical Biochemistry* 2006; 39: 898-903.
137. Chirino YI, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverrí J. Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Pharmacol* 2004; 4: 20.
138. Mistry P, Merazga Y, Spargo DJ, Riley PA, McBrien DC. The effects of cisplatin on the concentration of protein thiols and glutathione in the rat kidney. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991; 28: 277-82.
139. Zunino F, Pratesi G, Micheloni A, Cavalletti E, Sala F, Tofanetti O. Protective effect of reduced glutathione against cisplatin-induced renal and systemic toxicity and its influence on the therapeutic activity of the antitumor drug. *Chem Biol Interact* 1989; 70: 89-101.
140. Shalby AB, Assaf N, Ahmed HH. Possible mechanisms for N-acetyl cysteine and taurine in ameliorating acute renal failure induced by cisplatin in rats. *Toxicol Mech Methods* 2011; 21: 538-44.

EKLER

Ek Tablo 1. Biyokimya Tüm Sonuçlar

	cTnI	CMLC-1	3-NT	4-HNE	TAK	TOK	TİYOL	ROOH	İMA	CK	CK-MB	LDH	BUN	Kreatinin
	pg/mL	ng/mL	nmol/g	ng/g	mmol/g	μmol/g	nmol/mg	nmol/g	OD	U/L	U/L	U/L	mg/dL	mg/dL
K1	11	0,34	468,02	57,79	0,77	1,80	43,74	0,75	0,294	1023	147	148	18,5	0,43
K2	12	0,82	443,02	53,31	0,74	1,62	40,93	0,60	0,304	857	162	137	18,3	0,52
K3	3	1	366,45	49,44	0,65	1,92	42,39	0,80	0,259	617	239	188	20,8	0,61
K4	8	0,91	358,68	42,93	0,86	1,89	40,87	0,39	0,325	2664	209,7	284	21,3	0,52
K5	0	0,8	334,88	53,89	0,68	1,83	40,93	0,75	0,342	3017	211,4	343	15,7	0,37
K6	5	0,73	250,5	46,2	0,70	1,60	39,23	0,39	0,353	391	101	145	17,8	0,35
K7	18	0,39	353,84	42,47	0,72	1,64	44,89	0,50	0,334	433	92	167	20,3	0,41
K8	0	0,7	361,76	40,76	0,77	1,98	50,58	0,53	0,319	441	103	146	18,4	0,41
CP1	305	13,49	663,25	90,12	0,28	4,09	27,51	1,01	0,53	3158	484	1359	92	2,25
CP2	498	25,35	667,70	83,12	0,06	3,20	29,3	0,87	0,448	2060	369	792	108,5	2,62
CP3	306	22,26	583,97	89	0,29	3,05	32,36	1,21	0,528	804	423,6	795	93,8	1,83
CP4	304	23,54	859,06	99,64	0,06	3,20	31,42	1,20	0,466	597	402	568	192	5,6
CP5	294	13,57	701,74	86,86	0,31	2,44	31,24	1,12	0,598	712	619	722	147,4	2,91
CP6	296	11,03	703,68	114,17	0,24	3,45	35,28	1,34	0,46	750	402	780	174,7	4,16
CP7	352	13,3	756,05	83,24	0,20	3,41	40,39	1,64	0,519	655	389	578	133,8	3,53
CP8	344	17,33	754,09	79,23	0,26	3,59	33,18	1,12	0,472	941	690	579	149,7	3,76
NAC1	30	0,68	302,87	58,04	0,94	1,24	39,23	0,51	0,249	283	111	129	19,8	0,33
NAC2	14	0,8	343,02	57,73	1,21	1,86	38,43	0,45	0,24	272	108	57	14,8	0,4
NAC3	14	0,75	443,03	59,17	1,07	1,59	41,84	0,89	0,302	412	98,1	103	15,3	0,42
NAC4	13	1,09	273,33	53,75	0,98	1,81	42,67	0,62	0,297	501	108,2	166	13,4	0,33
NAC5	13	0,98	380,37	61,32	1,13	2,09	44,56	0,65	0,267	372	119,2	136	15,3	0,39
NAC6	16	1,04	346,01	56,80	0,93	1,42	44,51	0,63	0,265	339	102,1	105	16,2	0,34
NAC7	13	0,39	473,37	63,76	0,74	1,77	43,97	0,58	0,273	443	114,8	110	18,6	0,43
NAC8	12	0,67	627,65	69,29	1,00	2,83	52,22	0,64	0,262	725	171,8	232	15,3	0,42
CP-NAC1	114	4,78	428,07	63,74	0,61	2,40	39,28	0,67	0,361	1617	213	421	77,2	1,66
CP-NAC2	217	5,68	415,25	68,81	0,54	2,02	33,40	0,80	0,283	1603	211	477	99,7	1,89
CP-NAC3	163	4,49	516,12	69,48	0,54	2,27	39,87	0,99	0,31	1367	201	547	83,5	1,76
CP-NAC4	146	5,49	428,07	69,59	0,57	2,062	37,71	0,75	0,272	1288	231	460	98,1	1,77
CP-NAC5	184	6,35	484,24	75,45	0,66	2,45	39,41	0,78	0,405	1114	224	431	109,3	1,9
CP-NAC6	133	6,25	461,20	68,25	0,53	2,24	36,71	0,84	0,334	798	176	425	108	2,22
CP-NAC7	132	8,32	581,09	80,24	0,67	1,89	38,99	0,86	0,333	886	221	461	105	2,11
CP-NAC8	167	5,97	454,06	70,05	0,65	2,14	35,93	0,90	0,339	865	197	391	97	1,68

Ek Tablo 2. Histolojik Skolama Sonuçları

GRUPLAR	Histopatolojik Bulgular			GRUPLAR	Histopatolojik Bulgular		
	Hem.	İnt. Ödem	Vak.		Hem.	İnt. ödem	Vak.
Kontrol (1)	0	0	0	CP(1)	2	2	3
Kontrol (2)	0	0	0	CP(2)	3	2	2
Kontrol (3)	0	0	0	CP(3)	2	2	3
Kontrol (4)	0	0	0	CP(4)	3	3	2
Kontrol (5)	0	0	0	CP(5)	3	3	2
Kontrol (6)	0	0	0	CP(6)	2	2	3
Kontrol (7)	0	0	0	CP(7)	3	3	3
Kontrol (8)	0	0	0	CP(8)	2	3	3
NAC (1)	0	1	0	CP-NAC (1)	1	0	1
NAC (2)	0	1	0	CP-NAC (2)	2	1	1
NAC (3)	1	1	1	CP-NAC (3)	2	0	1
NAC (4)	1	0	1	CP-NAC (4)	1	0	1
NAC (5)	1	1	1	CP-NAC (5)	2	1	1
NAC (6)	1	0	0	CP-NAC (6)	1	2	2
NAC (7)	2	1	0	CP-NAC (7)	2	0	1
NAC (8)	0	0	1	CP-NAC (8)	2	1	1

Hem: Hemoraji İnt. Ödem: İnterstisyel ödem Vak: Vakuolizasyon

8. TEZ ONAY SAYFASI

Araş. Gör. Dr. Bilal YÜCEL'in "Sisplatin nefrotoksisitesi geliştirilen ratlarda N-asetilsistein (NAC) kullanımının, kalp dokusu üzerindeki etkilerinin incelenmesi" konulu tezi 04.11.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliğı ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU

Prof. Dr. Cevat YAZICI (Danışman)

Prof. Dr. Eser Kılıç