

**N-ASETİLSİSTEİNİN DENEYSEL SİSPLATİN KARDİYOTOKSİSİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Zeynep BULUTLAR

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof.Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ**

Yeksek Lisans Tezi – 2025

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

N-ASETİLSİSETİNİN DENEYSEL SİSPLATİN KARDİYOTOKSİSİTESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Zeynep BULUTLAR

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ

Tez Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ
Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Doç. Dr. Ayşe Şebnem ERENLER

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından TYL-
2023-3419 Proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA
2025

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İlaç Kaynaklı Kardiyotoksisite	3
2.2. Sisplatin (CIS) ve Sisplatin Kaynaklı Kardiyotoksisite	5
2.3. Kardiyotoksisitede P53 Geni	9
2.4. Kardiyotoksisitede Troponin Geni	12
2.6. Kardiyotoksisitede Miyogloblin Geni	13
2.7. Kardiyotoksisite ve N-asetilsistein	15
2.8. Kardiyotoksisite ve Glutasyon (GSH)	18
2.9. Kardiyotoksisite ve Malondialdehit (MDA)	20
2.10. Kardiyotoksisite ve Süperoksit Dismutaz (SOD).....	21
2.11. Kardiyotoksisite ve Katalaz (CAT)	23
3. MATERYAL ve METOT	25
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	25
3.2. Kullanılan Alet ve Gereçler	25
3.3. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar	26
3.3.1. RNA saklama çözeltisi	26
3.3.2. 10X TBE (Tris-Borat-EDTA) çözeltisinin hazırlanışı	26
3.3.3. Lizis solüsyonu hazırlanışı	26
3.3.4. Sisplatin ve N-asetilsistein Temini	26
3.4. Sıçanların Temini ve Bakımı	26
3.5. Grupların Oluşturulması	27
3.6. Hemodinami, Elektrokardiyogram ve Elektrofizyolojik Analizler	28
3.7. Biyokimyasal Analizler	29
3.7.1. Malondialdehit Analizi (MDA)	29

3.7.2. Bakır-Çinko Süperoksit Dismutaz Analizi (Cu-Zn SOD).....	30
3.7.3. Redükte Glutasyon Analizi (GSH)	31
3.7.4. Katalaz (CAT) Analizi	31
3.7.5. Protein Tayini	32
3.8. ELISA Analizleri.....	32
3.9. Moleküler Analizler.....	33
3.9.1. Dokudan RNA Saflaştırılması.....	33
3.9.2. cDNA Sentezi.....	35
3.9.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR).....	35
3.10. İstatistiksel Analizler	37
4. BULGULAR	38
4.1. Hayvanların Vücut Ağırlıkları Bulguları.....	38
4.2. Hemodinami ve Elektrokardiyogram Sonuçları.....	39
4.3. Kalp Dokusu MDA, GSH Seviyeleri, SOD ve CAT aktiviteleri	42
4.4. Serum ELISA Analiz Sonuçları	45
4.5. Moleküler Genetik Bulgular.....	47
4.6. Histopatolojik Bulgular	51
5. TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR.....	68
EK. Primer Dizileri.....	83

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecimin en başından itibaren sabrıyla, yönlendirmeleriyle ve desteğiyle her zaman yanımda olan, değerli danışmanım ve hocam Sayın Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana katkıları ve destekleri için tüm Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve lisansüstü eğitim gören arkadaşlarıma,

Tez çalışmamda hemodinamik analizlerin yapılmasında destek olan Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Onural ÖZHAN'a, histopatolojik analizlerin yapılmasında destek olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Azibe YILDIZ'a ve maddi desteklerinden dolayı İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Her zaman yanımda olan, desteğini ve sevgisini hiçbir zaman eksik etmeyen kıymetli aileme,

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar,
Teşekkür ederim.

ZEYNEP BULUTLAR

ÖZET

N-ASETİLSİSETİNİN DENEYSEL SİSPLATİN KARDİYOTOKSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Bu tez, sıçanlarda sisplatinle oluşturulan deneysel kardiyotoksosite modelinde N-asetilsistein'in kardiyotoksositeye karşı olası koruyucu etkilerini moleküler, biyokimyasal ve histopatolojik yönden incelemeyi amaçlamıştır.

Materyal ve Metot: Araştırmada 46 adet *Wistar albino* cinsi erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar Kontrol, N-Asetilsistein, Sisplatin, Sisplatin+N-asetilsistein, N-asetilsistein+Sisplatin olmak üzere 5 gruba ayrıldılar. Deney sonunda hayvanlardan hemodinamik analizler, vücut ağırlık ölçümleri ile serum örneklerinden ELISA yöntemi ile Troponin, Miyogloblin ve P53 miktarları ölçüldü. Sıçanların kalp dokularından MDA, GSH seviyeleri ve SOD, CAT aktiviteleri ile Troponin, Miyogloblin ve P53 gen ifadeleri analiz edildi. Ayrıca kalp doku örnekleri hematoksilin-eozin boyama ile histopatolojik olarak incelendi.

Bulgular: Sisplatin grubunda hayvanların vücut ağırlığının deney sonunda azaldığı ($P < 0.05$), diğer gruplarda ise herhangi bir fark olmadığı ($P > 0.05$) tespit edildi. Sisplatin grubu diğer gruplardan daha fazla EKG düzensizliği gösterdi. Kalp dokuda MDA seviyesi ve CAT aktivitesi Sisplatin uygulanan tüm gruplarda Kontrol ve N-asetilsistein gruplarına göre anlamlı artış gösterdi ($P < 0.05$). Gruplar arasında kalp doku GSH ve SOD seviyeleri, Troponin, Miyogloblin ve P53 gen ifadesinde bir fark gözlenmedi ($P > 0.05$). Serum P53 protein miktarı Sisplatin grubunda, diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek bulunurken ($P < 0.05$), Troponin ve Miyogloblin protein miktarlarında anlamlı bir fark gözlenmedi ($P > 0.05$). Histopatolojik olarak Sisplatin grubularına ait kalp dokusunda şiddetli hemoraji ve nekrotik kardiyomiyositler gözlemlendi ($P < 0.05$).

Sonuç: Sisplatin kullanımının kilo kaybına ve kardiyak ölçümlerde anormalliğe neden olması, kardiyovasküler sorunlara yol açabilir. Kalp dokusunda artan MDA ve CAT seviyeleri ile oksidatif stresin artacağını gösterebilir. N-asetilsistein'in yükselen değerlere düşüş sağlamasının oksidatif stres, lipid metabolizması ve glutatyon mekanizmasında katkısının olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Sisplatin, N-asetilsistein, Kardiyotoksosite, Sıçan.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF N-ACETYLCYSTEINE ON EXPERIMENTAL CISPLATIN CARDIOTOXICITY

Objective: This thesis aimed to investigate the potential protective effects of N-acetylcysteine against cisplatin-induced cardiotoxicity in rats from molecular, biochemical, and histopathological perspectives.

Materials and Methods: Forty-six male Wistar albino rats were divided into five groups: Control, N-acetylcysteine, Cisplatin, Cisplatin + N-acetylcysteine, and N-acetylcysteine + Cisplatin. Hemodynamic analyses, body weight measurements, and ELISA assays for Troponin, Myoglobin, and P53 were conducted on serum samples. Cardiac tissue was analyzed for MDA, GSH, SOD, and CAT, along with gene expression of Troponin, Myoglobin, and P53. Histopathological evaluation was performed using H&E staining.

Results: Significant weight loss and ECG irregularities were observed in the Cisplatin group ($P < 0.05$). MDA levels and CAT activity were elevated in cisplatin-treated groups, indicating oxidative stress ($P < 0.05$). No differences were found in GSH, SOD, or gene expressions ($P > 0.05$). Serum P53 levels were significantly higher in the Cisplatin group ($P < 0.05$), while Troponin and Myoglobin levels showed no difference. Severe hemorrhage and necrosis were detected in cardiac tissue of the Cisplatin group.

Conclusion: Cisplatin administration may cause weight loss and abnormalities in cardiac measurements, potentially leading to cardiovascular complications. The increased MDA and CAT levels in heart tissue indicate elevated oxidative stress. The reduction of elevated values by N-acetylcysteine suggests that it may contribute to the regulation of oxidative stress, lipid metabolism, and the glutathione mechanism.

Keywords: Cisplatin, N-acetylcysteine, Cardiotoxicity, Rat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALP	: Alkalen Fosfataz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AST	: Aspartat Aminotransferaz
BUN	: Kan Üre Nitrojen
CAT	: Katalaz
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CIS	: Sisplatin
CuCl₂	: Bakır Klorit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EKG	: Elektrokardiyogram
ELISA	: Enzim Bağlı İmmüno Absorbe Analiz
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Redükte Glutasyon
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
G.Y.D	: Gram Yaş Doku
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipid
IL-6 ve IL-1β	: İnterlökinlerin
İ.P	: İnraperitoneal
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipid
MDA	: Malondialdehit
NAC	: N-asetilsistein
NF-Kβ	: Nükleer Faktör Kappa B
RNA	: Ribonükleik Asit
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
qRT-PZT	: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi
SOD	: Süper Oksit Dismutaz
TNFα	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
V.A	: Vücut Ağırlığı

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. İlaç kaynaklı kardiyotoksisitenin mekanizmaları	4
Şekil 2.2. Sisplatin molekül yapısı	5
Şekil 2.3. Sisplatin etki mekanizmaları	7
Şekil 2.4. KVH'larda p53'e bağlı apoptozis yolu	10
Şekil 2.5. Troponin molekül mekanizması.	12
Şekil 2.6. Miyogloblin molekül mekanizması	14
Şekil 2.7. N-asetilsistein açık formülü	16
Şekil 2.8. N-asetilsisteinin etki mekanizması	17
Şekil 2.9. Glutasyonun yapısı	18
Şekil 2.10. Glutasyon sentez mekanizması	19
Şekil 2.11. Malondialdehit açık formülü	20
Şekil 2.12. Cu, Zn-SOD'nin döngüsel oksidasyon-redüksiyon elektron transfer mekanizması yoluyla katalizlediği biyolojik sürecinin şematik gösterimi	22
Şekil 2.13. Katalaz reaksiyonu.	23
Şekil 3.1. EKG ölçümü için kanüle edilen sıçan.....	29
Şekil 3.2. Gruplara ait toplam RNA % 1 agaroz jel görüntüsü.	35
Şekil 4.1. Grupların deney başlangıcı ve deney sonunda vücut ağırlıkları karşılaştırmaları.	39
Şekil 4.2. Normal ve bradikardi EKG görselleri.	40
Şekil 4.3. ST elevasyonu ve VES EKG görselleri.....	41
Şekil 4.4. Dal blok ve T negatifliği EKG görselleri.	41
Şekil 4.5. Gruplara ait kalp MDA seviyeleri.	43
Şekil 4.6. Gruplara ait kalp GSH seviyeleri.	43
Şekil 4.7. Gruplara ait kalp SOD aktiviteleri.....	44
Şekil 4.8. Gruplara ait kalp CAT aktiviteleri.....	44
Şekil 4.9. Gruplara ait serum Troponin seviyeleri.....	46
Şekil 4.10. Gruplara ait serum Miyogloblin seviyeleri.....	46
Şekil 4.11. Gruplara ait serum P53 seviyeleri.	47
Şekil 4.12. Kalp cDNA örneklerinden qPZT ile çoğaltılan Troponin, Miyogloblin, P53 ve	

β -aktin eğrileri.....	47
Şekil 4.13. β -aktin, Troponin ve Miyogloblin cDNA'larının PZR'deki çoğalımının agaroz jel (%1.5) elektroforezi görüntüsü.	48
Şekil 4.14. Gruplarda kalp örneklerine ait Troponin gen ifade seviyeleri.	49
Şekil 4.15. Gruplarda kalp örneklerine ait Miyogloblin gen ifade seviyeleri.	50
Şekil 4.16. Gruplarda kalp örneklerine ait P53 gen ifade seviyeleri.	50
Şekil 4.17. Kalp dokusuna ait H-E boyanmış mikroskopik görüntü.	52
Şekil 4.18. Kalp dokusuna ait H-E boyanmış mikroskopik görüntü.	52
Şekil 4.19. Kalp dokusuna ait H-E boyanmış mikroskopik görüntü.	53
Şekil 4.20. Kalp dokusuna ait H-E boyanmış mikroskopik görüntü.	54
Şekil 4.21. Kalp dokusuna ait H-E boyanmış mikroskopik görüntü.	55
Şekil 4.22. Kalp dokusuna ait H-E boyanmış mikroskopik görüntü.	55

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1. Çalışma zaman çizelgesi.....	28
Tablo 3.2. MDA analiz reaksiyon tablosu .	29
Tablo 3.3. SOD analiz reaksiyon tablosu	30
Tablo 3.4. GSH analiz reaksiyon tablosu	31
Tablo 3.5. Katalaz analiz reaksiyon tablosu	32
Tablo 3.6. Doku örneklerinden elde edilen toplam RNA ölçüm sonuçları.....	34
Tablo 3.7. Primer bilgileri. İleri primer (F), geri primer (R).	36
Tablo 4.1. Gruplara ait deney başlangıcı ve deney sonu vücut ağırlıkları ortalaması	38
Tablo 4.2. Gruplarda gözlenen EKG değişimleri.....	40
Tablo 4.3. Gruplara ait kalp MDA ve GSH miktarları ile SOD ve CAT aktiviteleri	42
Tablo 4.4. Kalp dokusu Troponin, Miyogloblin ve P53 ELISA sonuçları	45
Tablo 4.5. Kalp dokusu Troponin, Miyogloblin ve P53 gen ifadeleri	49
Tablo 4.6. Kalp histopatolojik değerlendirme sonuçları	51

1. GİRİŞ

Kardiyotoksisite, kalp dokusuna zarar vererek kalp fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyen bir durumu ifade etmekte (1) ve kalp kasına zarar vererek kardiyovasküler komplikasyonlara yol açan bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır (2). Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlar, etkinlikleri kadar yan etkileri ile de dikkat çekmektedir (3) Çeşitli kemoterapötik ajanlar kardiyotoksisite geliştirebilmektedir. Örneğin güçlü bir kemoterapi ilacı olan Sisplatin bunlardan biridir (4). Sisplatin, mesane, baş-boyun ve akciğer gibi katı organ tümörlerinin tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmış bir ilaçtır; ancak nefrotoksisite, nörotoksisite ve özellikle kardiyotoksisite gibi yan etkileri nedeni ile klinik kullanımını sınırlanmaktadır (5, 6).

Sisplatin kullanımının en ciddi yan etkilerinden biri kardiyotoksisite olarak belirlenmiştir (2). Sisplatin, Deoksiribonükleik Asit (DNA) ile etkileşerek kanser hücrelerinin ölümüne neden olan bir platin bileşiğidir. Ancak, bu etkili tedavi seçeneği, kardiyak sistem üzerinde toksik etkiler yaratabilmektedir (3). Yapılan araştırmalar, Sisplatin kaynaklı kardiyotoksisite oluşumunda oksidatif stres, nitrozatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve vasküler endotel hasarı gibi faktörlerin yer aldığını göstermiştir (2, 7).

Sisplatin tedavisi sırasında ve sonrasında kardiyak hasar, kalp yetmezliği, miyokardit, anjina ve diğer kardiyovasküler sorunlar gelişebilmektedir (3). Sisplatin tedavisinin başlıca akut kardiyotoksisite riskinin yanı sıra, kemoterapi sırasında meydana gelen ancak klinik belirtileri hemen göstermeyen toksik kardiyak etkiler, yıllar sonra kendini gösteren bir durum olarak karşımıza çıkabilmektedir (8).

Araştırmalar, Sisplatin tedavisinden 20 yıl sonra bile dolaşımda tespit edilebilir düzeyde Sisplatin kalabildiğini göstermektedir. Sisplatin kaynaklı geç dönem kardiyotoksisitenin gelişiminde bu durumun sorumlu faktör olarak değerlendirilebileceği bildirilmiştir (9). Bu nedenle, kardiyotoksisite riskini artıran ilaçların kullanımında, bu tür etkileri olabildiğince erken tespit etmek yapılan araştırmalarda kritik önem taşımaktadır (10).

Sisplatin kullanımına bağlı gelişen toksik etkileri engellemek amacıyla günümüzde onaylanmış spesifik bir antidot (vücuda zarar veren bir maddeye karşı kullanılan, onun etkisini azaltan veya tamamen ortadan kaldıran bir bileşik) veya standart bir tedavi protokolü bulunmamaktadır (11). Bu nedenle, Sisplatin'in neden olduğu

toksisiteyi önlemeye yönelik stratejiler üzerine yoğun araştırmalar devam etmektedir. Kardiyotoksisite mekanizmasında oksidatif ve nitrozatif stresin belirgin bir rol oynaması, antioksidan ajanların potansiyel koruyucu etkisini ön plana çıkarmaktadır. N-asetilsistein (NAC) bu antioksidanlardan biri olarak görölmektedir (12).

Güçlü bir antioksidan olan NAC, serbest radikalleri nötralize edebilmektedir (13). Oksidatif stres kaynaklı oluşabilen kardiyotoksisite üzerinde NAC'ın çeşitli klinik ve deneysel çalışmalarda koruyucu bir rol üstlendiği belirtilmiştir (14). NAC'ın yüksek dozlarda bile ciddi yan etkisi olmayan ve klinikte uzun süredir kullanılan bir bileşik olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (15, 16).

Bu yüksek lisans tezinde Sisplatin ile oluşturulan deneysel kardiyotoksisite sıçan modelinde NAC varsa karsiyotoksisite üzerine olan koruyucu etkisinin moleküler, biyokimyasal ve histopatolojik yönden incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 İlaç Kaynaklı Kardiyotoksisite

Kalp, dolaşım sisteminin en önemli organı olup, vücudun her bölgesine oksijen ve besin taşımaktadır. Kas yapısında olan bu organ, yaşamın sürdürülebilmesi için düzenli olarak çalışmaktadır. Kalp iki ana döngü ile büyük (sistemik) dolaşım ve küçük (pulmoner) dolaşım aracılığı ile kanı dolaştırmaktadır. Bu döngüler sayesinde vücut hücreleri, yaşamsal faaliyetleri için gerekli olan oksijeni almakta ve metabolik atıklardan arındırılmaktadır (17, 18).

Sürekli çalışan ve büyük oranda enerjiye ihtiyaç duyan kalp, çeşitli içsel ve dışsal etkenlere karşı oldukça hassas olarak görülmektedir. Kalp dokusunun hasar görmesi, sistemik dolaşımı olumsuz etkileyerek yaşamı tehdit eden durumlara yol açmaktadır. Kalbin bu denli hasara karşı duyarlı olmasının nedeni yüksek oksijen tüketimi ve enerji ihtiyacına rağmen sınırlı yenilenme kapasitesine sahip olması ile ilişkilendirilmektedir (19). Kardiyotoksisite ise bu süreçlerin sonucunda ortaya çıkan ve kalp fonksiyonlarını bozan patolojik bir durum olarak tanımlanmaktadır (20).

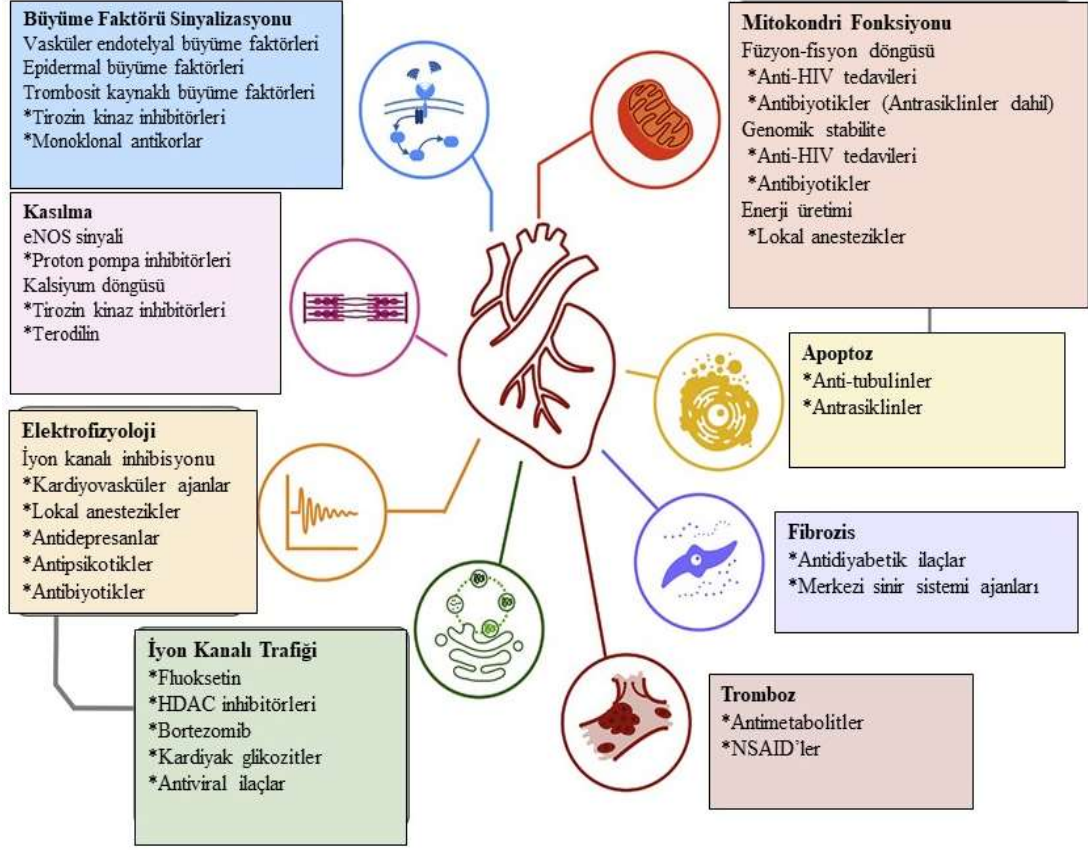
Özellikle kemoterapötik ajanlar (doksorubisin, sisplatin vd), ağır metaller, bazı antibiyotikler ve çevresel toksinler, serbest radikal oluşumunu tetikleyerek veya mitokondriyal fonksiyonları bozarak kardiyotoksisiteye yol açabilmektedir (21). Ayrıca, DNA metilasyonundaki değişiklikler ve otofaji mekanizmasının bozulması, kardiyomiyositlerde programlanmış hücre ölümünü tetikleyerek kalp dokusunun zarar görmesine neden olmaktadır (20).

Diğer organlarla karşılaştırıldığında, kalp dokusunun düşük bir antioksidan kapasiteye ve sınırlı bir rejeneratif potansiyele sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle kalp doku oksidatif hasara karşı oldukça hassas olabilmekte ve bu nedenle meydana gelebilecek kardiyotoksisite genellikle ilerleyici ve geri döndürülemez olarak görülmektedir (22).

Kardiyak dokunun hasara karşı duyarlılığının altında yatan biyolojik mekanizmaların anlaşılması, koruyucu stratejilerin geliştirilmesi, alternatif tedavi yöntemlerinin araştırılması ve düzenli kardiyak takip ile erken müdahalenin sağlanması büyük önem taşımaktadır (23, 24).

Kardiyotoksisite genellikle miyokardiyal fonksiyonların ve hücre canlılığının eş zamanlı olarak bozulmasından kaynaklanmaktadır. Elektrofizyolojik değişiklikler, kasılma gücünün azalması, mitokondriyal hasar, büyüme faktörleri ve sitokinlerin

düzensizliği gibi mekanizmalar üzerinden ilaçların olumsuz etkileri incelenmektedir. İlaç kaynaklı kardiyotoksitenin bu temel mekanizmaları, risk taşıyan başlıca terapötik ajanlarla birlikte ele alınmaktadır. (Şekil 2.1.).



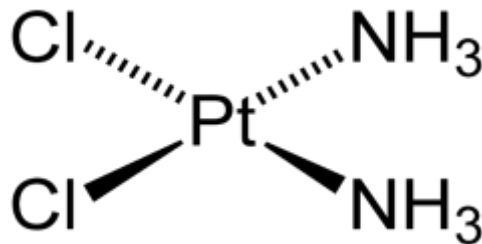
Antibiyotikler ve antiviral ilaçlar, mitokondriyal disfonksiyona yol açarak hücrelerin füzyon-fisyon dengesini bozmaktadır. Lokal anestezipler, mitokondriyal zar geçirgenliğini artırarak enerji üretim süreçlerini olumsuz etkilemektedir. Tirozin kinaz inhibitörleri ve monoklonal antikorlar, kardiyomiyositlerin hayatta kalmasını sağlayan kritik sinyal yollarını baskılayarak kardiyotoksitete neden olmaktadır. Merkezi sinir sistemi ajanları ve bazı antidiyabetik ilaçlar, kardiyak fibroz gelişimiyle bağlantılı bulunmaktadır. Proton pompa inhibitörleri, nitrik oksit sentezini azaltarak kalp kasının kasılma yetisini olumsuz etkilemektedir. Benzer şekilde, tirozin kinaz inhibitörleri kalsiyum döngüsünde düzensizliklere yol açmaktadır. Çeşitli nörolojik, kardiyovasküler ve anti-enfektif ilaçlar, kardiyak elektrofizyoloji üzerinde etkili olmaktadır. Ayrıca, fluoksetin, HDAC inhibitörleri ve bortezomib gibi ajanların kardiyak yan etkileri, akut iyon kanalı blokajından ziyade iyon kanalı taşınımını değiştirmeleriyle ilişkilendirilmektedir.

Şekil 2.1. İlaç kaynaklı kardiyotoksitenin mekanizmaları (25).

2.2 Sisplatin (CIS) ve Sisplatin Kaynaklı Kardiyotoksisite

Sisplatin, kanser tedavisinde sıkça kullanılan etkili bir kemoterapi ilacı olarak bilinmektedir. Kimyager Barnett Rosenberg, kanser tedavisinde devrim yaratan Sisplatin adlı ilacın keşfinde öncü bir rol oynadığı kabul edilmektedir (26). 1965 yılında, Rosenberg ve ekibi, platin içeren bileşiklerin hücre bölünmesini engellediğini gösteren deneyler gerçekleştirmiştir (27). Bu ilk bulguların ardından, 1969 yılında yapılan daha ileri çalışmalar, bu bileşiklerin katı tümörler üzerinde iyileştirici etkiler sağladığını ortaya konulmuştur (28). Bu keşiflerin ardından, sisplatin, 1978 yılında ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanarak kanser tedavisinde kullanılmaya başlamıştır (29). Rosenberg'in keşfi, aslında beklenmedik bir rastlantının sonucudur. Bakterilerin elektrik alanlarının büyüme üzerindeki etkilerini incelerken, bu mikroorganizmaların elektrik alanına maruz kaldıklarında bölünmeyi durdurduklarını gözlemlemiştir (27). Bu gözlem, platin ile elektrot arasındaki etkileşime bağlı olarak ortaya çıkan bir etki olarak açıklanmıştır ve bu durum, Sisplatin'in keşfiyle sonuçlanmıştır (30).

Sisplatin'in, çeşitli kanser türlerinin, özellikle de baş-boyun, mesane, akciğer ve meme kanserlerinin tedavisinde etkili olduğu ortaya konulmuştur (31). Ancak Sisplatin'in tedaviye bağlı bazı yan etkilerinin de bulunduğu dikkat çekmektedir. Bunlar arasında böbrek hasarı (nefrotoksisite), iştih kaybı (ototoksisite), bulantı ve kusma gibi sorunların yer aldığı görülmektedir. Ayrıca, bazı hastalarda kardiyotoksisiteye de neden olduğu ortaya konulmuştur(31). Sisplatin'in sitotoksisitesi DNA-Sisplatin etkileşimlerinden kaynaklansa da kan plazma proteini-Sisplatin etkileşimlerinin, Sisplatin'in antikanser ilacı olarak etkinliğinde önemli roller oynadığı düşünülmektedir. Sisplatin'in kan plazma proteinlerine geri döndürülemez şekilde bağlanması da yan etkilere neden olmaktadır(32). Sisplatin (sis-diaminodikloroplatinum (II)) yatay düzlemde sis pozisyonunda ortada platin atomu etrafında klor ve amonyom atomları ile çevrili inorganik bir platin kompleksi olarak bilinmektedir (Şekil 2.2.) (33).



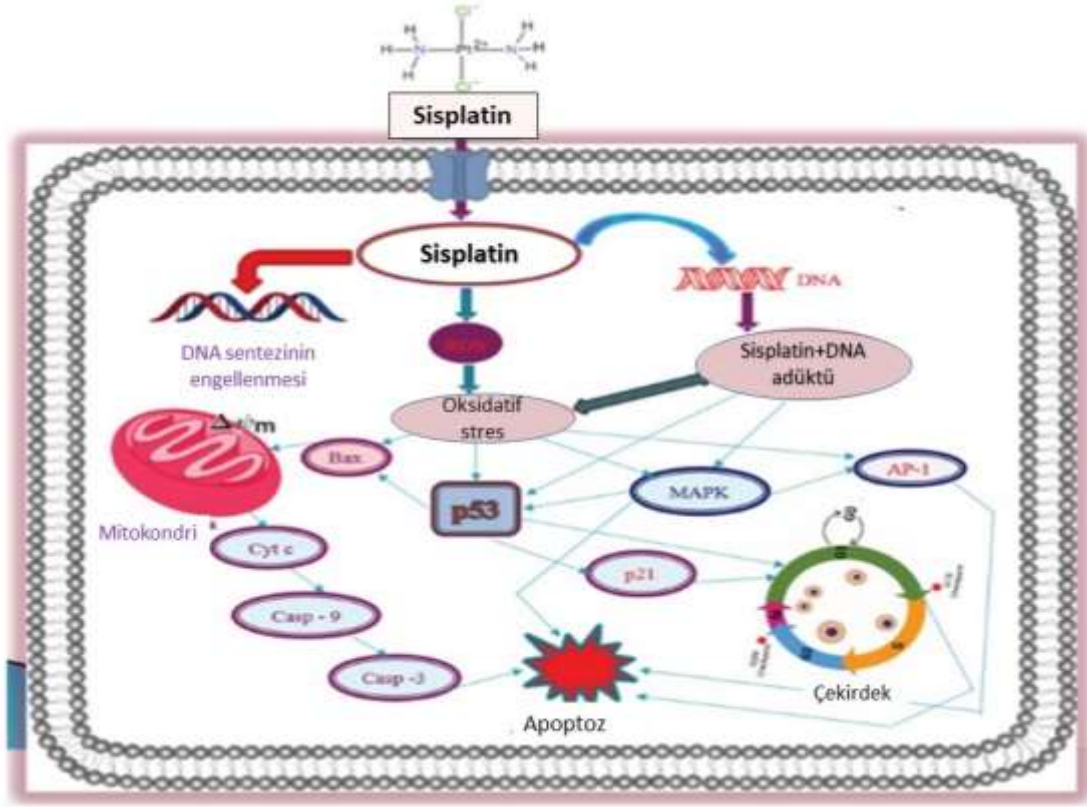
Şekil 2.2. Sisplatin molekül yapısı (33).

Sisplatin, bir kemoterapi ilacı olarak hücreye üç farklı yolla giriş yapmaktadır: pasif difüzyon, Bakır Taşıyıcı 1 (CTR1) taşıyıcı proteini aracılığıyla aktif taşıma ve endositoz yoluyla alım gerçekleşmektedir. Hücre içine girdikten sonra, düşük klor konsantrasyonu nedeniyle hidrolize uğrayarak aktif forma dönüşmektedir. Bu aktif form, DNA'ya bağlanarak çapraz bağlar oluşturmada ve DNA replikasyonu ile transkripsiyonunu engellemektedir (34).

Sisplatin'in DNA üzerinde oluşturduğu hasar, hücresel yanıt mekanizmalarını tetiklemektedir. Ataksi Telanjiektazi ve Rad3 (ATR) kinaz enzimi aktive olarak Kontrol Noktası Kinaz 1 (Chk1) ve Kontrol Noktası Kinaz 2 (Chk2) proteinlerini harekete geçirmekte ve hücre döngüsünü S ve G₂/M fazlarında duraksatmaktadır. Hasarlı DNA'nın onarımı için nükleotid eksizyon onarım (NER) mekanizması devreye girmekte ve bu süreçte Büyüme Durdurulması ve DNA Hasarına Bağlı İndüklenebilir 45 (GADD45) proteini görev almaktadır (6).

Eğer DNA hasarı onarılamazsa, p53 ve Mitojenle Aktive Protein Kinaz (MAPK) sinyal yolu aktive olmaktadır. Bu süreç, Bax proteininin etkinleşmesine yol açmakta ve hücrenin programlanmış hücre ölümü (apoptoz) sürecine girmesine neden olmaktadır. Bu mekanizmalar sayesinde Sisplatin, kanser hücrelerinin ölümüne yol açarak tedavi edici etkisini göstermektedir (35).

p38 Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz (p38MAPK) sinyal molekülleri, hücrelerin içindeki çeşitli stres faktörlerine karşı oldukça hassas bir şekilde yanıt vermektedir. Akut Promiyelositik Lösemi (APL) hücrelerinde stres sinyallemesinde Sisplatin katılımını araştırmak amacıyla hem kontrol hem de Sisplatin ile tedavi edilen hücrelerde p38MAPK yolağı moleküllerinin fosforilasyon seviyeleri değerlendirilmektedir. Yapılan araştırmalar, Sisplatin'in p38MAPK moleküllerinin fosforilasyon seviyesini konsantrasyona bağlı olarak azalttığını göstermektedir. Genel olarak, APL hücrelerinde Sisplatin kaynaklı sitotoksiste, Şekil 2.3.'de gösterildiği gibi bir dizi önemli moleküler etki mekanizması aracılığıyla modüle edilmektedir (36).



Sisplatin sitotoksitesinin genel moleküler mekanizmaları birçok aşamadan oluşmaktadır. Öncelikle, Sisplatin hücreye giriş yapmakta ve DNA ile etkileşime girerek DNA aduktü (iki farklı molekülün kovalent bağ ile birleşerek oluşturduğu yeni bileşik) oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra, DNA sentezini inhibe etmekte ve replikasyonu durdurmaktadır. Hücre içinde reaktif oksijen türleri (ROS) üretmekte ve oksidatif stres oluşturmaktadır. APL hücrelerinde DNA aduktü oluşumu ve oksidatif stres, p53 sinyalleme mekanizmasının ve Aktivatör Protein 1 (AP-1) fosforilasyonunun aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu süreçler, mitokondriyal membran potansiyelinde değişikliklere yol açarak hücre döngüsünün durmasına sebep olmaktadır. Mitokondriyal membran potansiyelindeki bu değişiklik, sitokrom C'nin mitokondriden salınmasına neden olmakta ve bu da kaspaz-9 ile kaspaz-3'ün aktivasyonunu tetikleyerek apoptoz sürecini başlatmaktadır. Sisplatin sitotoksitesi, aynı zamanda Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz (MAPK) sinyal yolunu düzenlemekte ve bu mekanizmalar sonucunda genel olarak kanser hücrelerinin ölümüne yol açmaktadır.

Şekil 2.3. Sisplatin etki mekanizmaları (36).

Sisplatin'in etkileri yalnızca tümör hücreleriyle sınırlı kalmamaktadır. Böbrek, sinir ve kalp hücreleri gibi sağlıklı dokular da bu ajan nedeniyle toksik etkilere maruz kalmaktadır. Böbrek toksisitesi, proksimal tübül hücrelerinde hasara yol açarak nefrotoksisiteye neden olmaktadır (37). Sisplatin kaynaklı nörotoksistide periferik sinir hücrelerinde oksidatif stresin artışıyla duyuşsal sinir hasarı oluşabilirken, kardiyotoksistite

de ise, oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve kalsiyum dengesizliği nedeniyle kardiyomiyositlerde kalıcı hasar oluşabilmektedir (38).

Sisplatin genellikle diğer kemoterapi ilaçlarıyla kombinasyon halinde kullanılmaktadır ve yan etkilerinin azaltılması amacıyla çeşitli destekleyici tedavi yaklaşımları da ortaya konulmuştur (39). Kombinasyon tedavileri, Sisplatin'in yan etkilerini hafifletebilmekte ve ilaca karşı direnç gelişimini önleyebilmektedir (40).

Sisplatin kaynaklı kardiyotoksisite, kalp fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Ayrıca, kemik iliği baskılanması nedeniyle kan hücrelerinin üretiminde geçici bir azalma görülmektedir. Bu yan etkiler, Sisplatin'in tedavi sürecindeki yönetimi açısından kritik öneme sahiptir ve hastaların tedavi süresince izlenmesini ve uygun önlemlerin alınmasını gerektirmektedir (3, 12).

Özellikle bazı kemoterapi ilaçlarının ve radyasyon tedavilerinin kardiyotoksisiteye neden olduğu bilinmektedir. Sisplatin de bu ilaçlardan biri olarak görülmektedir (41). Sisplatin kaynaklı kardiyotoksisitenin altında yatan mekanizmalar arasında oksidatif stresin kardiyotoksisitede kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir (11). Sisplatin' in serbest radikal üretimini artırarak hücrel hasara yol açtığı ve özellikle miyokardiyal hücrelerde apoptoz (programlanmış hücre ölümü) süreçlerini tetiklediği bilinmektedir. Ayrıca, Sisplatin vasküler disfonksiyona neden olarak kardiyovasküler risk faktörlerini artırabilmektedir (3).

Sisplatin kaynaklı kardiyotoksisitenin altında yatan patolojik mekanizmalar arasında inflamasyon, oksidatif stres, programlanmış hücre ölümü (apoptoz, otofaji ve ferroptoz gibi), metabolik bozukluk, endoplazmik retikulum stresi vb. yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda Sisplatin'nin kardiyotoksik etkilerinin spesifik mekanizması kesin olarak belirlenmemiştir. Sisplatin, kalp dokusunda ROS üretimini artırmaktadır. Daha yüksek ROS seviyeleri, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) ve interlökin-6 (IL-6) gibi enflamatuar maddelerin salınımını kontrol eden nükleer faktör- κ B'yi (NF- κ B) açarak iltihaplanmaya neden olmaktadır. Artan ROS üretiminin endoplazmik retikulum stresini artırdığı da bildirilmiştir. Kardiyomiyositler mitokondri bakımından zengin olarak bilinmektedir. Çalışmalar, Sisplatin'nin mitokondriyal matriste biriktiğini ve bu da mitokondrideki ROS seviyesini yükselttiğini göstermektedir. Sisplatin ayrıca mitokondri ile doğrudan etkileşime girerek sitokrom-c'yi serbest bırakabilmektedir. Yapılan çalışmalar, Sisplatin'nin kalp dokusundaki olumsuz etkilerinin ROS üretimini uyarmasından kaynaklandığını, oksidatif strese, endoplazmik retikulum stresine, iltihaplanmaya ve nihayetinde apoptoza yol açtığını göstermektedir (3).

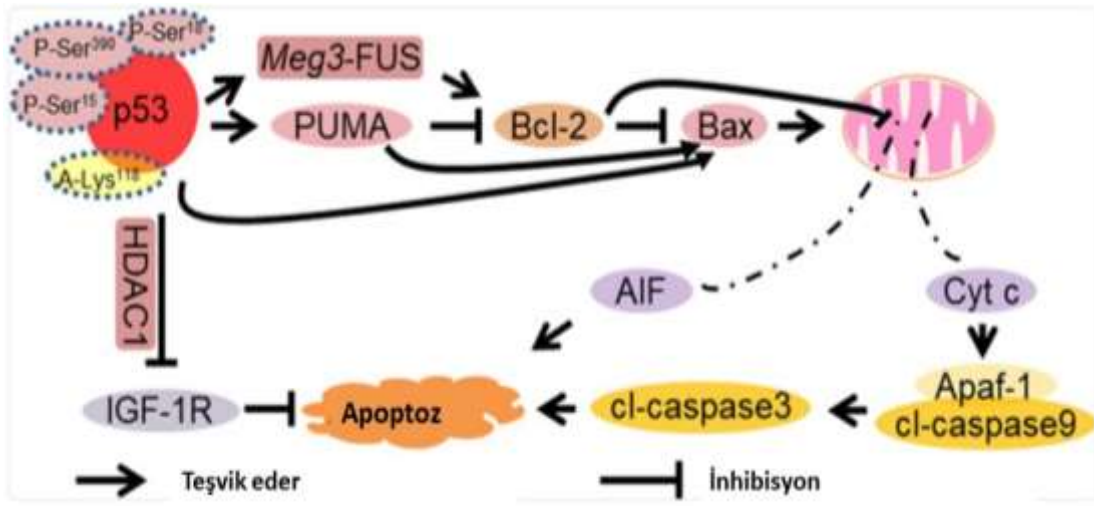
Kanser tedavisi sırasında veya sonrasında kalp fonksiyonlarının düzenli olarak izlenmesi, kardiyotoksisite için erken teşhis ve gerekirse uygun tedaviye zamanında başlanması büyük önem taşımaktadır (42).

Kanser tedavisinde kullanılan bazı ilaçlar, genetik yatkınlıkları olan bireylerde kardiyotoksisite riskini artırabilmektedir. Kardiyotoksisite risk genleri, bu tür yan etkilerin ortaya çıkma olasılığını etkileyen genetik faktörleri ifade etmektedir. Bu genler, bireylerin kemoterapi veya diğer tedavi ajanlarına karşı genetik olarak nasıl tepki verdiklerini belirlemektedir (43).

2.3 Kardiyotoksisitede P53 Geni

P53, tümör baskılayıcı bir protein olarak bilinmektedir. Hücrelerde stresli koşullar altında apoptozu (programlı hücre ölümü) ve DNA onarımını teşvik ederek hücre büyümesini düzenlemektedir. P53 geni, hücrelerin genetik bütünlüğünü korumak için kritik bir rol oynamaktadır (18). DNA hasarı tespit edildiğinde, P53 proteini hücre döngüsünü durdurarak hasarın onarılması için zaman tanır veya hasar onarılamazsa hücrenin apoptoz yoluyla yok edilmesini sağlamaktadır (44). P53 geni'nin mutasyona uğraması, proteinin işlevini kaybetmesine ve bu da anormal hücre çoğalmasına ve tümör gelişimine yol açmaktadır (45).

Apoptozu indükleyen üç klasik sinyal yolu bilinmektedir; dışsal yol, içsel yol ve endoplazmik retikulum (ER) stres yolu. P53 geninin işlevi esas olarak mitokondri tarafından başlatılan içsel yolla indüklenen apoptozda tanımlanmaktadır (46) İçsel apoptoz, Kardiyovasküler Hastalık (KVH)'larda yaygın olan ve mitokondrinin dış zarında lokalize olan B hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) ailesi proteinleri tarafından aracılık edilen DNA hasarıyla aktive edilmektedir (46). Bunların karşılık gelen gen promotörlerinin P53 bağlayıcı elementlerini içerdiği bilinmektedir (47). Başlangıçta, P53 yalnızca BH3 proteinlerini aktive ederek apoptozu tetiklemektedir ve bu da anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin Bax ve Bak'ı inhibe etmesini önlemektedir. Yalnızca BH3 proteinlerinden bazıları ayrıca iki hücre ölüm etkilisine bağlanabilmekte ve onları aktive edebilmektedir (48). KVH modelleri arasında, sitokrom c, apoptozis indükleyici faktör (AIF), Apaf-1, aktive edilmiş kaspaz-3 ve kaspaz9 dahil olmak üzere Bax'ın akış aşağı hedeflerinin artmış ekspresyonuyla birlikte P53 aracılı apoptozis görülmektedir (Şekil 2.4.)(18).



p53, KVH'larda Bcl-2 ailesi proteinlerini düzenleyerek pro-apoptotik aktivite göstermektedir. p53, IGF-1R ekspresyonunu HDAC1 ile ilişki kurarak epigenetik olarak düzenlemektedir ve bu durum IGF-1R'nin pro-sağkalım etkisini zayıflatmaktadır. Bcl-2 B hücreli lenfoma 2 ailesi proteini, Cyt c sitokrom c, IGF-1R insülin benzeri büyüme faktörü-1 reseptörü, AIF apoptozis indükleyici faktör, Apaf-1 apoptotik proteaz aktive edici faktör-1, GRP78 78-kDa glikoz düzenlenmiş protein, Meg3 uzun kodlamayan RNA Meg3, sarkomda kaynaşmış FUS , cl-kaspaz-3 kesilmiş kaspaz-3, cl-kaspaz9 kesilmiş kaspaz9 (18).

Şekil 2.4. KVH'larda p53'e bağlı apoptozis yolu (18).

P53 hem kalpte metabolik yakıt algılamada hem de fizyolojik koşullar altında düzenlemede önemli bir rol oynadığı ve böylece yetişkin kardiyomiyositlerde homeostazı koruduğu bilinmektedir (18).

Bir transkripsiyon faktörü olarak P53, hücre döngüsü ilerlemesi için gerekli olan hücre döngüsü kontrol noktalarıyla ilişkili proteinleri kodlayan genleri aşağı düzenlemektedir. Klasik p53/p21 yolu, hücre döngüsü durmasını düzenlemektedir. p53, çoğalmayı ve hücre yaşlanmanın ilerlemesini düzenlemek için G1 fazından mitozun sonuna kadar kontrol noktası düzenleyicilerini hedef almaktadır (49).

P53 ayrıca kardiyak fibroblastlarda düzenleyici proliferatif ve hücre yaşlanma fonksiyonlarını gerçekleştirmektedir. Bunlar kardiyak fibroz ile ilişkilidir ve bu nedenle kardiyak yapının yeniden şekillenmesine katkıda bulunduğu kabul edilmektedir (50).

Yaşlanma stres faktörleri hücrelerde DNA hasar yanıt mekanizmalarını aktive etmektedir. Bu faktörler hasarın boyutuna veya hücrenin türüne göre farklı sonuçlara yol açabilmektedir. Örneğin, DNA'nın hafif hasarı hücre döngüsünü duraklatırken; ciddi hasarı yaşlanma ya da ölüm programlarını (apoptoz, otofaji, nekroz, vb.) aktif hale getirebilmektedir. Normal hücre döngüsünün durması ve hücre yaşlanma durumlarının her ikisinde de DNA hasarı onarım mekanizmaları devreye girmektedir (50). Bu iki durum arasındaki temel fark, zararlı yaşlanma ile ilişkili salgı fenotipi (SASP) varlığıdır.

Bu salgı, hücre büyümesini inhibe eden inflamatuvar sitokinleri, proteazları ve büyüme faktörlerini oluşturmaktadır (51).

Son otuz yılda yapılan çalışmalar P53'ün kalpte düzenleyici bir rol oynadığını da göstermektedir (18). P53'ün kardiyomyosit (kalp kas hücresi) ölümünde kritik bir rol oynadığı belirlenmiştir. Tiyopurin (TP) kaynaklı kardiyomyosit toksisitesi üzerine yapılan çalışmalar, P53 proteininin akut kalp hasarında önemli bir faktör olduğunu öne sürmektedir (52). Özellikle sisplatin, doksorubisin ve tiyopurin gibi kemoterapötik ajanlara bağlı gelişen kardiyotoksosite, P53'ün aşırı aktivasyonu ile ilişkilendirilmektedir (53).

DNA hasarı ve oksidatif stresin tetiklediği bu süreçte p53, pro-apoptotik proteinleri aktive ederek kardiyomyositlerin ölümüne neden olabilmektedir (54). Bununla birlikte, P53'ün aşırı aktivasyonu hücre döngüsünün geri dönüşsüz şekilde durmasına ve kardiyak rejenerasyonun engellenmesine yol açmaktadır (55).

Bazı çalışmalarda, P53 baskılanmasının kemoterapiye bağlı kardiyotoksiteyi azalttığı ve kalp hücrelerinin hayatta kalmasını artırdığı bildirilmiştir (18). Sisplatin ve P53 arasındaki ilişki, kemoterapi tedavisinin etkileri ve hücresel yanıt süreçleri açısından önem taşımaktadır (56).

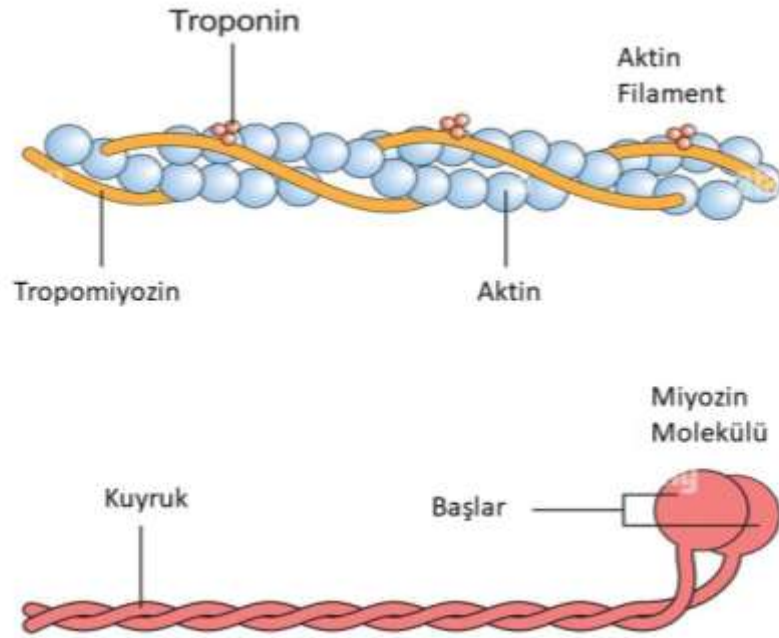
Sisplatin direncinin birincil nedenlerinden biri P53'ün mutasyonu veya inaktivasyonu olarak görülmektedir (22). P53 geninde meydana gelen mutasyonlar, P53'ün fonksiyonlarını bozarak hücrenin hasar yanıtını etkilemektedir (57). P53 geninin fonksiyon kaybı DNA onarımını ve apoptoz sürecini bozmaktadır, bu durum kanser hücrelerinin Sisplatin'e karşı daha dirençli hale gelmesine neden olmaktadır. P53, Sisplatin'in yol açtığı DNA hasarına karşı hücresel yanıtı düzenlemektedir (35). Dahası, Sisplatin'in neden olduğu P53'ün spesifik olmayan aktivasyonu kanserli olmayan hücreleri öldürebildiğinden, P53 toksiteyi azaltmak için bir hedef olarak görülmektedir. Ancak, P53 baskılanması yoluyla Sisplatin kaynaklı kardiyotoksitenin azaltılması genellikle P53 reaktivasyonunun antitümör avantajlarıyla çelişmektedir (22).

Sisplatin, P53'ü ve hedef genlerini (p21, BAX ve PUMA) aktive ederek DNA onarımını, hücre döngüsünün durmasını ve tümör hücresi ölümünü teşvik etmektedir. Ancak, P53 aktivasyonu normal hücrelerde de spesifik olmayan kemotoksositeye neden olmaktadır. Ek olarak, çoğu insan kanserinde P53'ün mutasyonu veya inaktivasyonunun Sisplatin direncine neden olduğu ve tümör gelişimini hızlandırdığı bilinmektedir (32).

P53'ün tümör oluşumunu engellediği ve apoptozu, hücre döngüsü durmasını ve DNA onarımını indükleyerek DNA hasarına karşı koruma sağladığı bilinmektedir. wtp53'ün aşırı ekspresyonu, kemoterapötik ajanlara duyarlılığı artırırken, mutasyona uğramış p53 genlerinin ekspresyonu Sisplatin direncine yol açmaktadır. Mutp53 ekspresyonu veya p53 delesyonlarının varlığında, tümör hücreleri G1 fazında bloke edilemez, anormal hücre çoğalması artar ve apoptoz inhibe edilir, bu da ilaç direncine yol açmaktadır (32).

2.4 Kardiyotoksistide Troponin Geni

Kalp dokusunda bulunan Troponin, kalp kaslarının kasılmasını düzenleyen kritik bir protein kompleksidir. Troponin, aktin ve miyozin arasındaki etkileşimi düzenleyerek kas kasılmasını kontrol etmektedir (58). Troponin, Troponin I, Troponin T ve Troponin C olmak üzere üç ana alt birime sahiptir. Normalde, bu proteinler kalp kaslarında bulunur ve kana karışmamaktadır (Şekil 2.5.) (59). Ancak, kalpte herhangi bir hasar veya anormallik meydana geldiğinde, troponinler kan dolaşımına geçmektedirler (60).



Troponin I'nin tropomyozin üzerinden ayrılmasını sağlayarak aktin-miyozin etkileşimini başlatmaktadır. Uyarının sona ermesiyle kalsiyumun sarkoplazmik retikulumuna geri pompalanması, troponin kompleksinin yeniden inhibitör konumuna dönmesine ve kas gevşemesine yol açmaktadır.

Şekil 2.5. Troponin molekül yapısı (59).

Troponin düzeylerinin normalden yüksek olması, genellikle kalp dokusunda hasar veya kalp krizi gibi ciddi sorunların belirtisi olarak görülmektedir (61, 62). Kalp krizi durumunda, troponin seviyeleri yükselir çünkü hasar gören kalp kasları troponinleri kana salmaktadır. Bu nedenle, troponin seviyeleri kalp krizinin teşhisinde önemli bir belirteç olarak kullanılmakta ve kalp sağlığının değerlendirilmesinde önem taşımaktadır (62, 63).

Kardiyotoksitenin tanısı için en sık kullanılan biyobelirteçlerin troponinler ve N-terminal pro-B-tipi Natriüretik Peptid (NT-pro) ile Beyin Natriüretik Peptid (BNP) olduğu bilinmektedir. Troponin testi, kemoterapi alan hastalar için tamamlayıcı bir tanı aracı sunmaktadır (64).

Yapılan çalışmalar cTn ile kardiyak disfonksiyon arasındaki ilişki için çelişkili sonuçlar göstermektedir (65).

Kemoterapi ilaçlarının kalp hücrelerinde yapısal ve fonksiyonel hasara yol açması sonucu troponinler kana geçmektedir. Özellikle, kemoterapi ilaçlarından bazıları (sisplatin, doksorobüsin vd.) kalp kası hücrelerinde oksidatif stres, inflamasyon ve hücre ölümüne yol açarak troponin genlerinin ifadesini tetiklemektedir (66). Bu genler, hasar gören kalp kası hücrelerinin bir yanıtı olarak yüksek miktarda protein üretimi sağlamakta ve bu da kandaki troponin seviyelerinin artmasına neden olmaktadır (67).

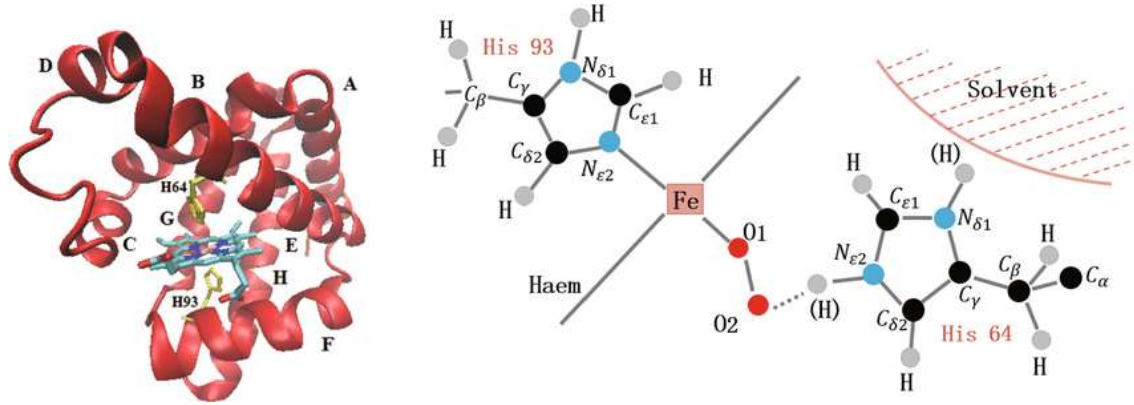
Özellikle antrasiklin ve sisplatin gibi ajanların uygulanmasından sonra troponin seviyelerindeki artış, ilerleyen dönemde gelişebilecek sol ventrikül fonksiyon bozukluğuna neden olabileceği ön görülmektedir. Bu nedenle kemoterapi alan hastalarda troponin düzeylerinin izlenmesi, kardiyak yan etkilerin erken tanınması açısından kritik öneme sahip olduğu düşünülmektedir (68, 69).

2.6 Kardiyotoksitede Miyoglobin Geni

Miyoglobin, yaklaşık 153 amino asitten oluşan küçük, tek zincirli bir proteindir ve kas hücrelerinde oksijen depolamak ve taşımakla sorumludur (70). Kalp kasında yoğun olarak bulunan miyoglobin, oksijenin kaslara taşınmasına yardımcı olmakta, özellikle kasın güçlü kasılmalarında oksijen teminini sağlamaktadır. Miyoglobin, kas hücrelerinin enerji ihtiyacı arttığında hızla oksijen sağlamakta, böylece kasın uzun süreli ve yoğun aktivitelerinde hayati bir rol oynamaktadır (71).

Miyoglobin geninin yapısı, diğer hemoglobin ailesindeki proteinler gibi, oksijen bağlanma kapasitesini sağlayan hem grubu içermektedir (Şekil 2.7.) (70). Hemoglobin ve miyoglobin arasındaki fark, miyoglobinin tek zincirli yapısı ve oksijen bağlama kapasitesinin daha sınırlı olmasıdır. Ancak, miyoglobin, özellikle oksijen tüketiminin

arttığı anlarda kaslarda yüksek miktarda depolanmakta ve hızla serbest bırakılmaktadır (72).



Miyoglobin çift-His koordinasyon durumunun şematik yapısı, PDB girişi 1a6m'deki gibi (sol panel); oksimB'deki distal (His64) ve proksimal (His93) histidinlerin düzenlenmesi ve aktif bölgesindeki hidrojen bağlama etkileşimi (sağ panel) gösterilmektedir.

Şekil 2.6. Miyoglobin molekül mekanizması (73).

Miyoglobin kalp kası hücrelerinde yer alırken, kalp hücrelerinde meydana gelen hasar durumunda bu protein kan dolaşımına geçmektedir (70). Bu durum, kalp kası hücrelerinin zedelenmesi veya ölmesiyle doğrudan ilişkilidir. Kemoterapi ilaçları veya kalp kasını etkileyen diğer toksik ajanlar, miyoglobinin kan dolaşımına geçmesine yol açarak biyobelirteç olarak kullanılmasını sağlamaktadır (74).

Miyoglobin konsantrasyonunun troponinden daha önce arttığı ortaya konulmuştur. Miyoglobin, kanda çok hızlı yükselip düşen bir protein olduğu için, yarılanma ömrü kısa olarak kabul edilmektedir (75).

Miyoglobin, kan dolaşımında çok hızlı bir şekilde artış gösterdiğinden dolayı kalp kası hasarının erken bir belirtisi olarak klinik izlemde faydalı olarak kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra, miyoglobin seviyeleri kalp krizi, kalp yetmezliği ve kardiyotoksisiteye bağlı diğer kardiyovasküler rahatsızlıkların değerlendirilmesinde önemli bir biyobelirteç olarak görülmektedir (76, 77). Miyoglobin seviyesinin yükselmesi, kalp krizinin olabileceğini göstermektedir, ancak tek başına kesin bir tanı koymak için yeterli görülmemektedir. Bu nedenle, troponin gibi daha özgül biyobelirteçlerle birlikte değerlendirilmektedir (78).

Sisplatin tedavisi sırasında miyogloblin seviyelerindeki artış, genellikle kas hasarı ve böbrek fonksiyonlarının bozulması ile ilişkilendirilmektedir. Sisplatin'in neden olduğu nefrotoksisite ve kardiyotoksisite, kaslarda hasara yol açarak miyogloblin salınımını arttırmaktadır ve böylece böbrek ve kalp hasarının kötüleşmesine sebep olmaktadır (79, 80).

Genetik düzeyde incelendiğinde, Miyogloblin *geni*'nin oksidatif strese karşı duyarlılığı da araştırılmaktadır. Oksidatif stres koşullarında Miyogloblin *geni*'nin transkripsiyonel regülasyonunda değişiklikler meydana gelmektedir. Bu durum, miyogloblinin yalnızca bir oksijen taşıyıcısı değil, aynı zamanda oksidatif hasara karşı savunmada da rol oynadığını göstermektedir (81).

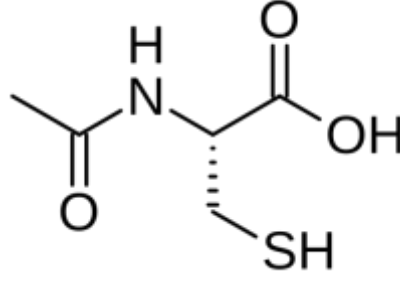
Kardiyotoksik etkilere sahip ajanlar, Miyogloblin *gen* ekspresyonunu artırmakta ya da azaltmakta, bu da kalp dokusunun oksijen taşıma kapasitesini doğrudan etkilemektedir. Örneğin, Sisplatin gibi ajanların neden olduğu kardiyotoksisite durumlarında, miyogloblin düzeylerinde belirgin bir değişim gözlemlenmektedir. Bu durum hem oksijen taşınımını hem de hücrel enerji metabolizmasını olumsuz etkilemektedir (82).

Miyogloblin, oksijenle bağlandığında süperoksit üretimine aracılık edebilmektedir. Bu özelliği nedeniyle miyogloblinin kardiyomiyositlerde hem koruyucu hem de zararlı etkileri olabileceği düşünülmektedir. Bu ikili rol, miyogloblin geninin kardiyotoksisite patogenezindeki yerini daha karmaşık hâle getirmektedir (83).

Miyogloblin geni kardiyak doku sağlığı açısından hem oksijen taşınımını hem de oksidatif stresle mücadele süreçlerinde görev almaktadır. Kardiyotoksisiteye neden olan faktörler miyogloblin geninin ekspresyonunu etkilemekte, bu da kalp kasının fizyolojik dengesini bozabilmektedir. Bu nedenle miyogloblin geni, kardiyotoksisite araştırmalarında hem biyobelirteç hem de terapötik hedef olarak kullanılmaktadır (83).

2.7 Kardiyotoksisite ve N-asetilsistein

N-Asetilsistein (NAC), L-sistein için bir öncül olarak kullanılan bir bileşiktir. Vücutta NAC, sisteinin bir türü olan L-sistein üretmek için kullanılmaktadır. L-sistein ise glutasyon (GSH) adı verilen güçlü bir antioksidanın sentezinde kritik bir rol oynamaktadır. GSH, serbest radikallerin ve oksidatif stresin hücrelerde neden olduğu zararlara karşı koruma sağlamaktadır. NAC, bir asetil grubu (CH₃CO) ile bağlanmış sistein amino asidinin bir türevidir (Şekil 2.8.) (84).



NAC, sistein adlı bir amino asidin türevi olarak bilinmektedir. Sistein, bir tiol grubu (-SH) içermektedir ve bu grup kükürt atomuyla bağlanmaktadır. Asetil grubu (-COCH₃), sistein molekülüne bağlanmaktadır. Asetil grubu, sisteinin amino grubuna (-NH₂) bağlanmış olan asetil (CH₃CO) grubu olarak bilinmektedir. Asetil grubu, sistein molekülünün genellikle daha az reaktif hale gelmesini sağlamaktadır.

Şekil 2.7. N-asetilsistein açık formülü (84).

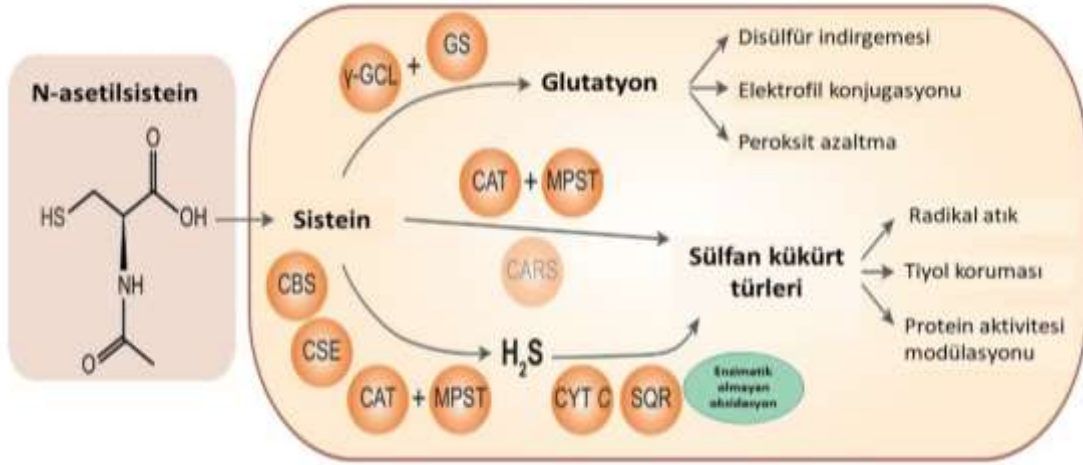
NAC, karaciğerde doğrudan sentezlenen bir bileşik olmaktan ziyade, sistein metabolizmasının bir ürünü olarak ortaya çıkmaktadır. NAC'ın biyosentezi, metiyonin-sistein döngüsü ve asetilasyon süreci ile gerçekleşmektedir (85).

NAC üretimi için karaciğerde yeterli miktarda sistein bulunması gerekmektedir. Sistein doğrudan besinlerle alınabileceği gibi, metiyonin metabolizması yoluyla da sentezlenebilmektedir (86). Elde edilen sistein, Asetil Koenzim A (Asetil-CoA) ile reaksiyona girerek NAC'ı oluşumunu gerçekleştirmektedir. Bu işlem asetil transferaz enzimleri tarafından katalize edilmektedir. NAC'ın hücre zarlarından daha kolay geçebilmesi ve biyolojik olarak daha uzun süre aktif kalabilmesi önemli görülmektedir (87). Karaciğerde sentezlenen NAC, GSH üretiminin hız sınırlayıcı bileşenlerinden biri olan sistein kaynağı olarak görev yapmaktadır. NAC, glutamat ve glisin ile birleşerek GSH sentezini desteklemektedir. GSH, hücreSEL detoksifikasyon süreçlerinde ve antioksidan savunmada kritik bir rol oynamaktadır (88, 89).

NAC'nin temel işlevi, hücrelerde GSH sentezini artırmaktır. Bu sayede hücreler, daha fazla antioksidan koruması elde eder ve oksidatif strese karşı daha dayanıklı hale gelmektedir (89). Özellikle karaciğerde, parasetamol zehirlenmesinde kullanılan NAC, etkili bir antidot olarak bilinmektedir. Ayrıca akciğer hastalıkları gibi durumlarda da NAC'ın kullanımı araştırılmaktadır (90). NAC, genellikle takviye formunda bulunur ve oral olarak alınabilir (88).

NAC aynı zamanda bir antiinflamatuvar bileşik olarak da işlev görmektedir. Nükleer faktör kappa B (NF-κB) aktivitesini baskılayarak, pro-inflamatuvar sitokinler olan

tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) ve interlökinlerin (IL-6 ve IL-1 β) seviyelerini azaltabilmektedir (Şekil 2.8.) (91).



NAC türevi metabolitler disülfür indirgeyici ve oksidan temizleme aktivitelerini kolaylaştırmaktadır. Bu aktivitelerin NAC türevi metabolitler, GSH ve H₂S/sülfan kükürt türleri tarafından kolaylaştırıldığını göstermektedir. Daha önce tükenmiş GSH seviyelerinin yenilenmesi, glutaredoksinler (GRX) tarafından enzimatik disülfür indirgemesini, glutasyon S-transferazlar (GST) tarafından elektrofil detoksifikasyonunu ve glutasyon peroksidazlar (GPX) tarafından (lipit) peroksit temizlemesini desteklemektedir. Öte yandan, sülfan kükürt türleri doğrudan radikal temizleyiciler olarak hareket edebilmektedir ve proteinleri geri döndürülemez oksidatif hasara karşı koruyabilmektedir. Ek olarak, proteinler üzerindeki persülfür modifikasyonları, strese adaptif hücresel tepkileri tetiklemek için aktivitelerini ve sinyal özelliklerini değiştirebilmektedir.

Şekil 2.8. N-asetilsisteinin etki mekanizması (91).

NAC, aynı zamanda serbest radikalleri nötralize etmenin yanı sıra, inflamasyonu azaltarak kardiyotoksik etkilere karşı koruma sağlamaktadır. Bunun yanı sıra, NAC, apoptotik hücre ölümünü azaltarak kalp hücrelerinin hayatta kalmasını teşvik etmektedir ve bu sayede kalp kasının daha fazla hasar görmesini engellediği bilinmektedir (12, 92).

Kardiyotoksisite, özellikle Doksorubisin ve Sisplatin gibi bazı kemoterapötik ajanların kullanımını sonrasında belirginleşmektedir. Bu toksik etki, kalp kasında hücresel düzeyde hasar oluşturarak kalp fonksiyonlarını bozmaktadır. Kalp kası hücrelerinde meydana gelen hasar, serbest radikallerin ve oksidatif stresin artışı ile ilişkilendirilmiştir. Bu bağlamda, NAC, güçlü bir antioksidan olarak kardiyotoksisite tedavisinde potansiyel bir koruyucu ajan olarak öne çıkmaktadır (12).

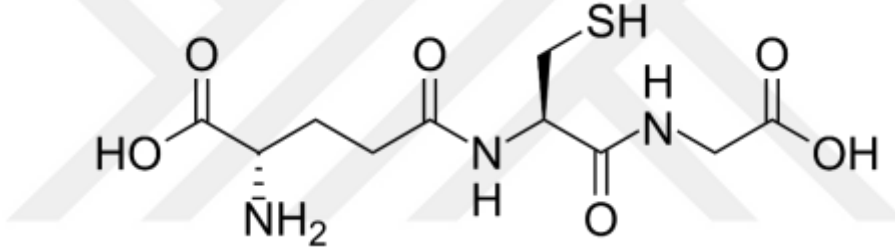
NAC, Sisplatin tedavisine bağlı olarak gelişen yan etkilerin, özellikle de nefrotoksisitenin azaltılmasında potansiyel bir koruyucu ajan olarak öne çıkmaktadır.

NAC'in güçlü antioksidan özellikleri, Sisplatin'in neden olduğu oksidatif stresi hafifletmekte ve böylece tedaviye bağlı toksik etkilerin en aza indirilmesine katkı sağladığı düşünülmektedir (12, 79).

NAC, GSH'ın ciddi şekilde tükendiği durumlarda GSH biyosentezi için sistein kaynağı sağlamaktadır ve bu yolla GSH düzeylerinin yeniden yapılandırılması etki göstermektedir (84, 93). Ancak, NAC'ın klinik etkinliği konusunda bazı sınırlılıklar bulunmaktadır. Çeşitli deneysel çalışmalarda ve klinik araştırmalarda, farklı patolojik durumları hedef alırken NAC'ın etkinliği hakkında tutarsız sonuçlar elde edilmiştir. Bu durum, NAC'ın insan sağlığı üzerindeki tam etkilerinin netleştirilmesi gerektiğini göstermektedir (94).

2.8 Kardiyotoksisite ve Glutasyon (GSH)

Glutasyon (GSH), tripeptit yapısına sahip bir moleküldür ve hücrelerde yaygın olarak bulunan bir antioksidan olarak bilinmektedir (Şekil 2.9) (95).



GSH, glutamat, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptit olarak bilinmektedir.

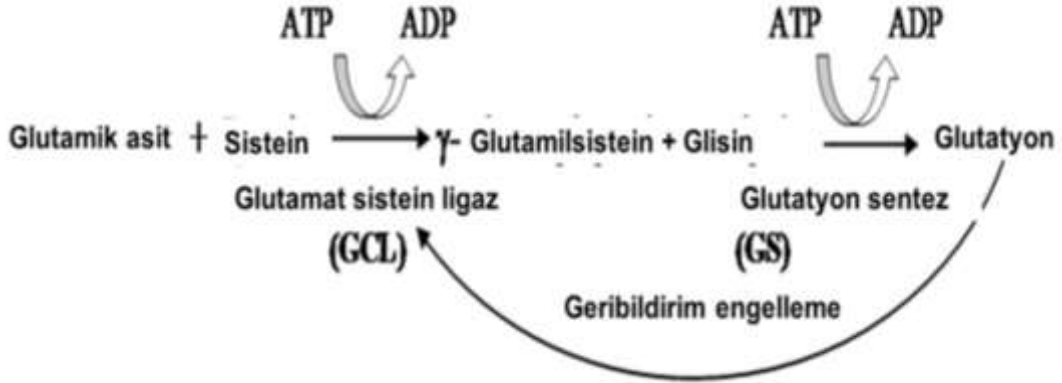
Şekil 2.9. Glutasyonun yapısı (95).

İçerdiği sülfhidril (-SH) grubu sayesinde, GSH serbest radikalleri ve diğer oksidatif zarar verici molekülleri nötralize etmektedir. GSH'ın en bilinen işlevi, hücre içindeki toksik bileşenlerin, özellikle de ROS temizlenmesidir. Bu, hücrelerin oksidatif stresin yol açtığı hasara karşı korunmasına yardımcı olduğu bilinmektedir (96).

GSH, iki formda bulunur: indirgenmiş GSH ve oksitlenmiş glutasyon (GSSG). GSH, aktif formudur ve serbest radikalleri nötralize edebilir. Ancak, oksidatif stres altında, GSH oksitlenerek GSSG'ye dönüşür. Vücut, GSH düzeyini dengeleyerek hücrel sağlığı korumaya çalışmaktadır (97).

GSH, sistein, glisin ve glutamik asitten oluşan bir tripeptittir ve ya indirgenmiş formunda GSH olarak ya da GSSG olarak bulunmaktadır. Pro-oksidan koşullarda, iki GSH molekülü bir disülfür bağı aracılığıyla dimerleşerek GSSG oluştururken,

antioksidan koşullarda GSSG, Şekil 2.10.' de gösterildiği gibi NADPH'ye bağlı glutatyon redüktaz aracılığıyla GSH'ye dönüştürülmektedir (98).



GSH, g-glutamil sistein sentaz (g-GCS) ve GSH sentaz (GS) tarafından katalize edilen Adenosin Trifosfat (ATP)'ye bağlı iki aşamalı bir işlemle sitozolde sentezlenmektedir.

Şekil 2.10. Glutatyon sentez mekanizması (98).

GSH sentezi her hücrede gerçekleşebilmekle birlikte, organizma genelinde en yoğun sentez ve metabolizmasının gerçekleştiği organ karaciğer olarak bilinmektedir.

Bazı kanser türlerinde GSH sentezinin artış göstermesi, bu hücrelerin kemoterapiye ve radyoterapiye karşı direnç geliştirmesinde önemli bir rol oynamaktadır (99). GSH düzeyleri azaldığında, oksidatif stres artar ve serbest radikaller hücrelerde birikerek daha fazla hasara yol açmaktadır. Bu nedenle, GSH'ın korunması veya artırılması, kardiyotoksisiteyi azaltabilmekte ve kalp sağlığını koruyabileceği düşünülmektedir (12). NAC'nin uygulanması GSH seviyelerini yukarı düzenleyerek antioksidan ve nöroprotektif etkilerini arttırmaktadır (100).

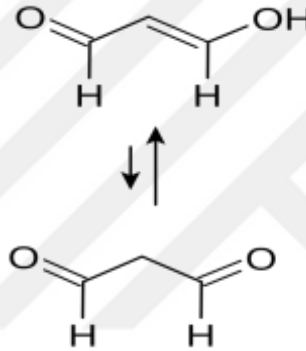
GSH'ın, kardiyotoksisiteyi azaltmadaki etkisi, özellikle kemoterapi tedavisi gören hastalarda dikkat çekicidir. Yapılan çalışmalarda GSH'ın kardiyomiyosit hasarının iyileşmesine katkıda bulunduğu gösterilmektedir (101). Özellikle oksidatif stresin neden olduğu kalp kası hasarında GSH'ın antioksidan kapasitesi sayesinde hücre hasarı azalttığı bildirilmiştir. Bunun yanı sıra, Sisplatin tedavisine bağlı olarak ortaya çıkan apoptoz mekanizmalarının baskılanmasında da GSH'ın koruyucu etkilerinin olduğu belirtilmiştir (102). Bu çalışmalar, GSH'ın hem kardiyotoksisiteye karşı koruyucu rolünü

hem de kemoterapötik ajanların neden olduğu hücrel hasarı azaltmadaki potansiyelini göstermektedir (6).

Yapılan çalışmalarda, doksorubisin uygulanan deneysel hayvan modellerinde kalp dokusunda GSH düzeylerinin anlamlı ölçüde azaldığı ve bunun kardiyak fonksiyonlarda bozulmaya yol açtığı bildirilmektedir. GSH eksikliğine bağlı olarak mitokondriyal membran bütünlüğünün bozulduğu ve kalsiyum dengesinin sağlanamadığı gösterilmektedir. Bu durum, kardiyomiyositlerde hücre içi sinyal yollarının bozulmasına ve kasılma gücünün zayıflamasına neden olmaktadır (103, 104).

2.9 Kardiyotoksisite ve Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit (MDA), hücrelerdeki oksidatif stresin bir göstergesi olan reaktif bir bileşik olduğu bilinmektedir (Şekil 2.11) (105).



Şekil 2.11. Malondialdehit açık formülü (105).

Oksidatif stres, serbest radikallerin ve ROS in hücrel bileşenlerle etkileşerek zarar vermesi sonucu ortaya çıkan bir durumu göstermektedir (106). MDA, özellikle lipid peroksidasyonunun (yağların oksidasyonu) bir yan ürünü olarak oluşmaktadır. Lipid peroksidasyonu, hücre zarlarındaki yağların serbest radikallerle reaksiyona girerek oksitlenmesiyle başlamaktadır. Bu reaksiyonların sonunda MDA gibi küçük, reaktif bileşikler oluşmaktadır (107). Lipit peroksidasyon reaksiyonları sonucunda oluşan lipit peroksitleri (Lipit peroksit, siklik peroksit ve siklik endoperoksit) sonuçta sekonder veya son ürünler olan Malondialdehit (MDA), 4-Hidroksinonenal (HNE) ve hegzanal isimli aldehitlere dönüşmektedir. MDA, hücrel zarları, proteinleri ve DNA'yı etkileyerek hücrel hasara yol açmaktadır. Bunun sonucu olarak, MDA'nın yüksek düzeyleri, hücrel fonksiyonların bozulmasına, doku hasarına ve hastalıkların gelişimine yol açabilmektedir. Bu nedenle, MDA'nın tespiti, oksidatif stresin derecesinin ve hücrel hasarın değerlendirilmesinde yaygın bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (108).

Sisplatin gibi ajanların, kalp üzerinde oksidatif stres yaratacak şekilde MDA seviyelerini arttırabildiği ortaya konulmuştur. Artan MDA seviyesi, kalp hücrelerinde lipit peroksidasyonuna yol açarak hücrel yapıların bozulmasına, bunun sonucunda da kardiyomiyopati ve kalp yetmezliği gibi klinik problemlere yol açmaktadır. Bu bağlamda, MDA'nın kardiyotoksisite üzerindeki etkileri, oksidatif stresin biyolojik sistemlerdeki rolünü ve tedavi stratejilerinin önemini vurgulamaktadır (109).

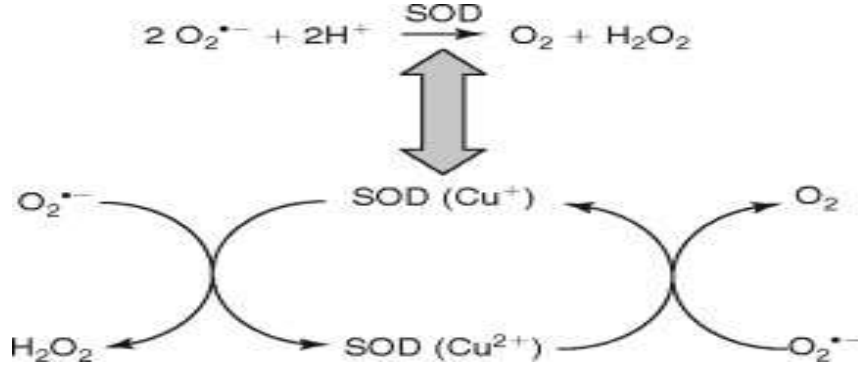
Yapılan çalışmalarda aşırı MDA üretimi, oksidatif stresin bir göstergesi olarak Alzheimer hastalığı, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, karaciğer hastalıkları ve Parkinson gibi çeşitli patolojik durumlarla ilişkilendirilmektedir (110).

Bazı çalışmalarda, MDA seviyelerinin yükselmesi ile kardiyotoksisite arasında doğrudan bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Örneğin, doksorubisin tedavisi gören hastalarda MDA seviyelerinin arttığı ve bu artışın kalp fonksiyonlarındaki bozulmalarla paralel olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, MDA'nın kardiyotoksisitenin bir biyomarkeri olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, MDA seviyelerinin yüksek olması, oksidatif strese karşı vücudun savunma mekanizmalarının yetersiz kaldığını göstermektedir ve bu durum kalp dokusunda kalıcı hasara yol açabilmektedir (111).

MDA seviyelerinin izlenmesi, kardiyotoksisite riskinin değerlendirilmesinde ve tedavi stratejilerinin belirlenmesinde önemli bir göstergesi olarak düşünülmektedir. MDA düzeylerinin düşürülmesi, oksidatif stresin azaltılmasına yardımcı olabilmektedir ve bu da kardiyotoksisiteyi önleyebilmekte ya da azaltabilmektedir. Bu nedenle, MDA'nın kardiyotoksisite ile ilişkisini anlamak, daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır (112).

2. 10 Kardiyotoksisite ve Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit Dismutaz (SOD), hücrelerde bulunan ve oksidatif strese karşı savunma mekanizmalarının önemli bir bileşeni olan bir enzim olduğu bilinmektedir. SOD, süperoksit radikallerini (O_2^-) hidrojen perokside (H_2O_2) dönüştürerek oksidatif stresi azalttığı bilinmektedir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Cu, Zn-SOD'nin döngüsel oksidasyon-redüksiyon elektron transfer mekanizması yoluyla katalizlediği biyolojik sürecinin şematik gösterimi (113).

Bu dönüşüm, hücrelere zarar verebilecek olan süperoksit radikallerinin etkilerini nötralize eder ve böylece hücre fonksiyonlarının korunmasına yardımcı olmaktadır (114).

Hidrojen peroksit, daha sonra başka enzimler (örneğin, katalaz veya glutatyon peroksidaz) tarafından suya dönüştürülür, böylece hücredeki oksidatif stresin düzeyi kontrol edilmektedir (3).

SOD enzimleri, üç ana izoformda bulunmaktadır. Süperoksit Dismutaz 1 (Cu/Zn-SOD) hücre sitoplazmasında bulunmaktadır. Süperoksit Dismutaz 2 (Mn-SOD) mitokondri içinde bulunur. Süperoksit Dismutaz 3 (EC-SOD) ekstraselüler alanda bulunmaktadır. SOD'un etkinliği, hücre oksidatif stresin kontrol edilmesinde kritik öneme sahiptir ve çeşitli hastalıkların, özellikle kalp hastalıkları ve kanserin gelişimiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (114).

Fridovich yaptığı çalışmalarda, oksijen radikallerinin hücreye zarar verme potansiyelini ve bu zararların nörodejeneratif hastalıklar, kanser ve yaşlanma ile ilişkisini detaylı biçimde açıklamaktadır (115). Kalp kası hücrelerinde SOD aktivitesinin azalması, oksidatif stresin birikmesine yol açarak kardiyotoksisite riskini artırabilmektedir (3).

Özellikle sisplatin gibi kemoterapötik ilaçlar, kalp üzerinde oksidatif stres yaratarak, SOD aktivitesini engelleyebilmekte ve bu da hücre yapıları tahrip edebilmektedir. SOD'nun korunması veya artırılması, kardiyotoksisiteyi önlemek adına potansiyel bir tedavi stratejisi olarak öne çıkmaktadır (116, 117).

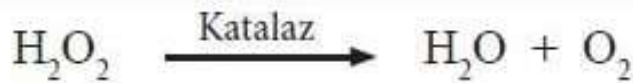
Doksorubisin, geniş spektrumlu bir kemoterapötik ajan olmasına rağmen kardiyotoksik etkileri nedeniyle klinik kullanımı sınırlandırılmaktadır. Bu toksisite büyük oranda oksidatif stres ve ROS üretimi ile ilişkilendirilmekte, hücre düzeyinde ciddi

hasarlara yol açmaktadır. Yapılan çalışmalarda, doksorubisin tedavisi gören bireylerde SOD aktivitesinin arttığı gözlemlenmekte, ancak başlangıçta yüksek düzeyde bulunan SOD seviyelerinin sol ventrikül disfonksiyonu gelişimiyle ilişkili olabileceği öne sürülmektedir. Bu durum, yüksek bazal SOD aktivitesinin doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisite riskini öngörmeye bir biyobelirteç işlevi görebileceğini düşündürmektedir (118).

EC-SOD eksikliği oluşturulmuş hayvan modellerinde, miyokard enfarktüsü sonrasında oksidatif stresin belirgin şekilde arttığı, bu durumun ise kardiyak hipertrofiye ve fonksiyon bozukluklarına yol açtığı bildirilmektedir. Bu veriler, EC-SOD'un kalp dokusunu oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösterdiğini desteklemektedir (119). SOD, özellikle EC-SOD izoformu, kardiyak fonksiyonların korunması ve oksidatif stresin azaltılması açısından kritik öneme sahip bulunmaktadır. Bununla birlikte, SOD aktivitesindeki değişimlerin kardiyotoksisite riskinin belirlenmesinde kullanılabilir bir biyobelirteç olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, SOD düzeylerinin izlenmesi ve düzenlenmesi, kardiyotoksisiteye karşı koruyucu bir yaklaşım olarak stratejik önem taşımaktadır (120). Özellikle açık kalp cerrahisinde, iskemi-reperfüzyon hasarını önlemek amacıyla rekombinant insan süperoksit dismutaz (rh-SOD) uygulanmaktadır. Bu enzim, süperoksit radikallerini parçalayarak oksidatif stresi azaltır ve kardiyomiyositleri koruyarak kalbin fonksiyonel bütünlüğünü desteklemektedir (121). Reperfüzyon hasarının önlenmesi ve miyokardiyal koruma için rh-SOD kullanımının etkili olduğu yapılan bazı çalışmalarda da ortaya konulmuştur (117, 122).

2.11 Kardiyotoksisite ve Katalaz (CAT)

Katalaz (CAT), hücrelerde bulunan ve oksidatif stresle mücadelede kritik rol oynayan bir enzim olarak bilinmektedir. Bu enzim, hidrojen peroksiti (H_2O_2) suya (H_2O) ve oksijene (O_2) dönüştürerek, hücrelerde zararlı etkiler yaratabilen hidrojen peroksit birikimini engellemektedir (Şekil 2.13.) (3).



Şekil 2.133. Katalaz reaksiyonu (3).

H₂O₂, metabolik süreçler sırasında serbest radikal olarak üretilen ve hücre zarlarına, proteinlere ve DNA'ya zarar verebilen reaktif bir bileşik olduğu bilinmektedir. Katalaz, özellikle peroksizomlar gibi hücresel organellerde bulunur ve yüksek etkinliği sayesinde bu zararlı molekülleri hızla nötralize etmektedir (116).

Katalaz enzimi, tek bir reaksiyonla hidrojen peroksiti etkisiz hale getirebilir, bu da hücrelere zarar vermesini engeller ve hücresel sağlığı korumaktadır. Katalazın düşük seviyeleri, oksidatif hasarların artmasına ve çeşitli hastalıkların gelişmesine yol açabilmektedir (3, 123).

Kardiyak dokular, yüksek enerji ihtiyacı ve yoğun mitokondriyal aktiviteye sahip olmaları nedeniyle ROS üretimine oldukça yatkın olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, kalp hücrelerinin korunmasında antioksidan enzim sistemlerinin bütünlüğü ve işlevselliği hayati önem taşımaktadır. Katalaz enziminin kardiyak dokularda aktif olarak bulunması, oksidatif stresin neden olduğu hücresel hasarın sınırlandırılmasında etkili olmaktadır. Kemoterapi ilaçlarının kullanımı sırasında, aşırı ROS üretimi gözlemlenmekte ve bu durum kardiyomiyositlerde oksidatif hasarı tetiklemektedir. Bu bağlamda, katalaz enziminin düzeyi ve aktivitesi, kemoterapi ilaç kaynaklı kardiyotoksisitenin şiddetini belirleyebilecek önemli biyokimyasal göstergelerden biri olarak değerlendirilmektedir (124).

Yapılan hayvan modeli çalışmalarında, doksorubisin uygulanan gruplarda katalaz aktivitesinde anlamlı bir azalma gözlemlenmektedir, bu azalma kalp dokusunda biriken H₂O₂ miktarının artmasına ve mitokondriyal hasarın şiddetlenmesine yol açmaktadır. Transgenik fare modellerinde katalazın aşırı ekspresyonunun kardiyotoksisiteye karşı koruyucu etki gösterdiği belirlenmektedir. Bu veriler, katalazın farmakolojik olarak hedeflenmesinin kardiyotoksisitenin önlenmesinde ya da azaltılmasında terapötik potansiyel taşıdığını ortaya koymaktadır (125). Ayrıca, katalaz eksikliği veya yetersiz aktivitesi durumunda, inflamatuvar süreçlerin arttığı, lipid peroksidasyonunun hızlandığı ve kardiyak fonksiyonların olumsuz etkilenmekte olduğu gösterilmektedir. Bu bağlamda, katalaz enziminin ekspresyon seviyeleri, oksidatif stres göstergeleri ve kardiyak biyobelirteçlerle birlikte değerlendirilerek kardiyotoksisite riski öngörülebilir. Katalaz enzimi, kardiyak dokuların oksidatif strese karşı korunmasında kritik bir rol oynamaktadır. Özellikle kemoterapiye bağlı kardiyotoksisite mekanizmalarının aydınlatılmasında ve bu toksik etkilerin önlenmesinde önemli bir hedef olarak değerlendirilmektedir (126).

3. MATERYAL ve METOT

Çalışma İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim Merkezinde (İNÜTF-DEHÜM) ve İnönü Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirildi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanan (03/09/2023 tarihli ve 2023/9-4 protokol no'lu karar) bu çalışmada tüm uygulamalar etik kurul protokolüne uygun şekilde yapıldı.

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Sisplatin (Koçak), N-asetilsistein (Asist), Üretan (Etil Karbamat, TCI), Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA, Sigma-Aldrich), Ksantin (Sigma), Ksantin oksidaz (5UN-Sigma), Nitrotetrazolium Blue Klor (Sigma), Sığır Serum Albümin (Sigma), Trikloroasetik asit (AppliChem), N-Butanol (Fluka), Potasyum Klorür (KCl, Merck), Sodyum Klorür (NaCl, Sigma), 2-Tiyobarbitirik Asit (Sigma), 5,5'-ditiyobis-2 nitrobenzoik asit (DTNB, Sigma), Sodyum Dihidrojen Fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Riedel-de-Haen), Disodyum Hidrojen Fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Riedel-de-Haen), Fosforik Asit (H_3PO_4 , %85'lik, Riedel-de-Haen), 1,1,3,3, Tetramethoksiopropan (Sigma-Aldrich), sodyum hidroksit (NaOH, Sigma-Aldrich), tri sodyum sitrat (Sigma-Aldrich), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4 , Sigma-Aldrich), Dipotasyum Hidrojen Fosfat (K_2HPO_4 , Sigma-Aldrich), Hidrojen Peroksit (H_2O_2 , Sigma-Aldrich) Na-K-tartarat (Sigma-Aldrich), bakır sülfat (CuSO_4 , Sigma), Etidyum bromid (EtBr, Fisher Scientific), Agaroz (Sigma), Sodyum Sitrat Tri-bazik Dihidrat (Sigma), Sodyum Asetat (Sigma), Guanidin Tiyosiyanat (Sigma), Hidroklorik Asit (HCl, Sigma), Troponin, Miyogloblin ve P53 ELİSA analizleri Sunred Biotechnology. RNA saflaştırma kitleri, cDNA sentez kiti, qPZT için gerekli master mix ve primerler Qiagen firmasından tedarik edildi.

3.2. Kullanılan Alet ve Gereçler

Araştırmada; millipore marka saf su ünitesi, Hamilton marka 10 µl hacimli enjektör, Hemodinami ve EKG analizlerinde BIOPAC MP-100 cihazı (BIOPAC Systems, Inc. Santa Barbara, CA), gerçek zamanlı qPZT analizlerinde Roche marka LC96 model gerçek zamanlı qPZT cihazı, tartımlarda Denver Instrument marka terazi, Ohaus marka hassas terazi, Biorad marka elektroforez güç kaynağı, Retsch marka MM400 model bilyeli parçalama sistemi, Mettler Toledo marka EL20 model pH metre, Hettich-zentrifugen marka 200 model soğutmalı masaüstü santrifüj cihazı, Hermle marka Z216MK

model mikro santrifüj, EpochBiotek marka spektrofotometre cihazı, Heidolph marka vorteks, Heidolph marka manyetik karıştırıcı, Scotsmann marka buz makinesi, Leica marka mikrotom ve mikroskop kullanıldı.

3.3. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

3.3.1. RNA saklama çözeltisi

70 gr Amonyum Sülfat 100 ml dietilpirokarbonat (DEPC)'lı suda çözüldü. Üzerine 10 mM EDTA (pH=8) ve 25 mM Sodyum Sitrat (pH=5.2) eklenip DEPC'li saf su ile 150 ml'ye tamamlandı ve pH 5.2'ye ayarlandı.

3.3.2. 10X TBE (Tris-Borat-EDTA) çözeltisinin hazırlanışı

1 litre 10X TBE tamponu hazırlarken; öncelikle 108 gr TRIS baz, 55 gr Borik Asit ve 40 ml 0.5 M EDTA çözeltisi 900 ml saf su içerisinde manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Çözeltinin pH değeri 8.0 oluncaya kadar HCl eklendi. Daha sonra çözeltinin toplam hacmi 1000 ml'ye tamamlandı ve son olarak otoklavda 121 °C' de 20 dakika otoklavlandı.

3.3.3. Lizis solüsyonu hazırlanışı

4 M Guanidin izotiyosiyanat, 25 mM sodyum sitrat (pH:7) ve % 0.5 sarkosil (N Lauroylsarcosine) eklenerek lizis karışımı hazırlandı ve çalışma esnasında kullanılacak solüsyonun miktarının % 1'i olacak kadar β -Merkaptoetanol eklenerek homojenizasyonda kullanıldı.

3.3.4. Sisplatin ve N-asetilsistein Temini

Sisplatin, Cisplatin Koçak 50 mg/100 mL I.V İnfüzyon için konsantre solüsyon içeren flakon olarak Koçak Farma firmasından hazır çözelti şişesinde temin edildi. N-asetilsistein, Asist Asetilsistein 300mg/3ml (%10) solüsyon içeren ampul Steril ve Apirojen i.m/i.v TOPİK firmasından hazır çözelti olarak temin edildi.

3.4. Sıçanların Temini ve Bakımı

Araştırmada İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen, ortalama ağırlıkları 250-300 gram olan 3 aylık Wistar Albino cinsi toplam 46 adet erkek sıçan kullanıldı. Deney süresince sıçanlar sıcaklığın 21 °C ve ortam neminin %55-60 olduğu, 12 saat ışık (08:00-20:00 saatleri), 12

saat karanlık uygulanan odalarda tutuldular, *ad libitum* olarak standart sıçan yemiyle beslendiler ve normal musluk suyu içtiler.

3.5. Grupların Oluşturulması

Deneye başlamadan önce hayvanlar ağırlıklarına göre eş dağılım olacak şekilde aşağıdaki gibi 5 gruba ayrıldı. Kullanılacak hayvan sayısını belirlemek için güç analizi yapıldı. Gruplar arası en yüksek SOD farkı 33 unit/L, standart sapması da 20 ve tip1 hata α : 0.05, tip2 hata β : 0.020 (16) olduğundan her bir grupta en az 8 deney hayvanı olmak üzere (Sisplatin kardiyotoksitesine bağlı olarak mortalite oranı yükselebileceği için Sisplatin uygulanan gruplara 2 şer yedek hayvan eklendi.) en az 46 deney hayvanı olması gerektiği güç analiziyle hesaplandı.

1- Kontrol Grubu (K, n=8): Bu grupta bulunan hayvanlara 5 gün boyunca sisplatin ve N-asetil sisteinin çözücüsü olan 1 mg/kg vücut ağırlığı dozunda salin çözeltisi intraperitoneal olarak verildi. Başka herhangi bir uygulama yapılmadı.

2- N-Asetilsistein Grubu (NAC, n=8): Bu grupta bulunan hayvanlara ilk günden başlanarak 5 gün boyunca i.p. olarak 250 mg/kg vücut ağırlığı dozunda N-asetilsistein verildi (12). Bunların dışında bir uygulama yapılmadı.

3- Sisplatin Grubu (CIS, n=10): Bu grupta bulunan hayvanlara ilk gün tek doz Sisplatin 7 mg/kg i.p vücut ağırlığı dozunda verildi (127). Bunun dışında bir uygulama yapılmadı.

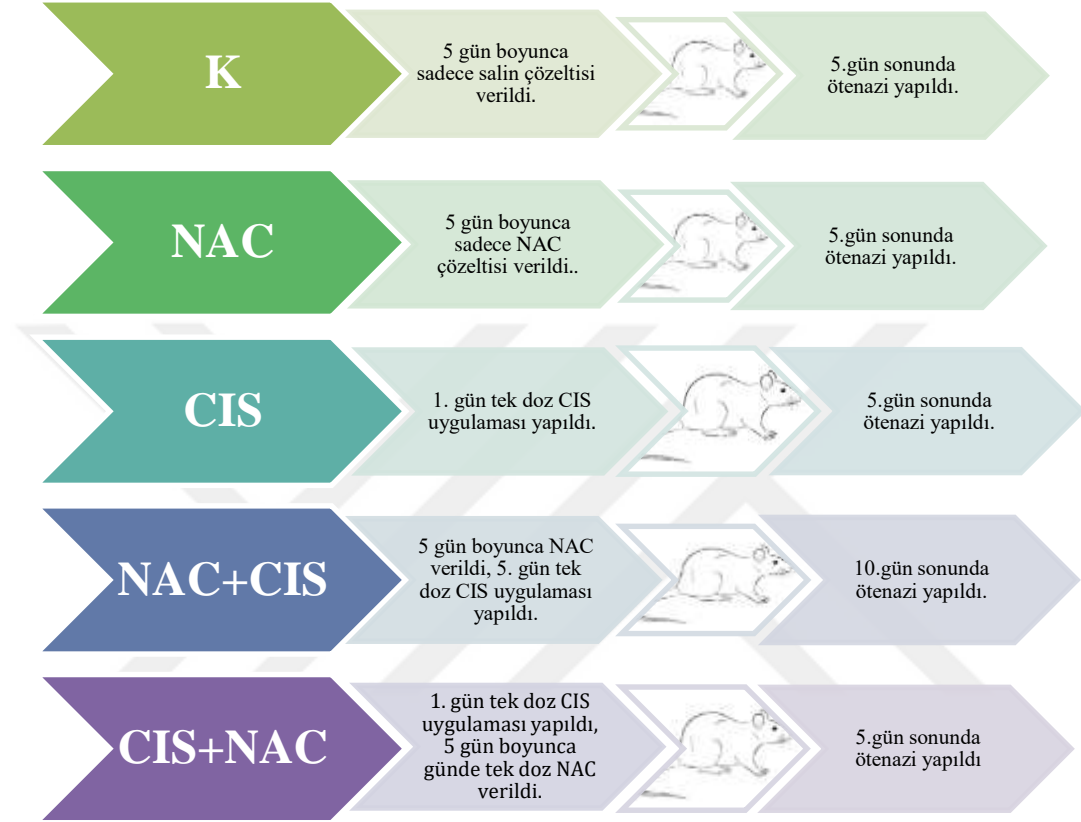
4- Sisplatin+N-asetilsistein Grubu (CIS+NAC, n=10): Bu grupta bulunan hayvanlara 1. gün tek doz Sisplatin 7 mg/kg i.p vücut ağırlığı dozunda verildi ardından 4 saat sonra 250 mg/kg vücut ağırlığı dozunda N-asetilsistein i.p olarak verildi. Devam eden 4 gün boyunca günde tek doz N-asetilsistein vücut ağırlığı dozunda i.p olarak verildi.

5- N-asetilsistein+Sisplatin Grubu (NAC+CIS, n=10): Bu grupta bulunan hayvanlara 5 gün boyunca 250 mg/kg vücut ağırlığı dozunda N-asetilsistein i.p olarak günde tek doz verilmiştir. 5.gün N-asetilsistein uygulamasından sonra 2 saat içerisinde Sisplatin uygulaması i.p olarak yapıldı.

Çalışmaya başlamadan önce yapılacak uygulamaların planlanması için bir çizelge hazırlandı. Çalışma zamanı çizelgesine göre deney hayvanlarının Kontrol, N-asetilsistein, Sisplatin, Sisplatin + N-asetilsistein gruplarına aynı gün enjeksiyon yapıldı. N-

asetilsistein+Sisplatin grubuna deneyden 4 gün önce N-asetilsistein vermeye başlandı. Her grubun enjeksiyon süresi 5 gün sürdü. Son olarak hayvanların anestezi altında EKG ölçümleri yapıldı, kan ve kalp dokuları alındı.

Tablo 3.1. Çalışma zaman çizelgesi.



K: Kontrol, NAC: N-asetilsistein, CIS:Sisplatin

3.6. Hemodinami, Elektokardiyogram ve Elektrofizyolojik Analizler

Sıçanlar 1.2 gr / kg vücut ağırlığı (v.a) üretan (etil karbamat) ile anestezi altına alındıktan sonra sol karotid arterleri dikkatlice kanüle edilerek 3 elektrotlu EKG ile hemodinamik parametreler olarak sistolik, diyastolik, ortalama kan basıncı ve EKG patolojileri ölçüldü (Şekil 3.1.). Lambeth Convention kriterlerine göre hem aritmi çeşitliliği hem de PR, QRS ve QT süreleri hesaplandı. Deney protokolü tamamlandıktan sonra vena kava inferiordan kan örnekleri ve diğer analizler için doku örnekleri alındı.



Şekil 3.1. EKG ölçümü için kanüle edilen sıçan

3.7 Biyokimyasal Analizler

3.7.1 Malondialdehit Analizi (MDA)

Sıçan kalp doku örnekleri Mihara ve Uchiyama'nın yöntemine göre çalışıldı (128). Doku örnekleri % 1.15 KCl çözeltisi ile %10 konsantrasyonda olacak şekilde 15000 devir/dakika homojenizatör kullanılarak 1 dakika süresince buz üzerinde parçalandı. Homojenat örnekleri doğrudan analiz için kullanıldı.

Tablo 3.2. MDA analiz reaksiyon tablosu (128).

Reaktifler	Miktar
Homojenat	250 µl
%1 Fosforik Asit	1500 µl
% 0.6 (Tiyobarbütirik Asit) TBA	500 µl

Tablo 3.2.'te belirtilen oranlara göre cam tüplerde hazırlanan karışımlar vortekslendikten sonra en az 95 derecede 1 saat suda bırakıldı. Süre sonunda soğutulan tüplere 2 ml n-butanol eklendi, sonra en az 5 dakika kuvvetlice vortekslendi. Örnek tüpleri 1500 x g hızında faz ayırımını sağlamak amacıyla en az 20 dakika santrifüj edildi. Renkli faz kısımların absorbans değerleri spektrofotometrik olarak 520 ve 535 nm dalga boyunda okundu ve 1,1',3,3' tetrametoksiopropan ile hazırlanmış standart grafiğinden MDA konsantrasyonları değerlendirildi ve nmol/gram yaş doku (g.y.d) olarak sonuç hesaplandı.

3.7.2 Bakır-Çinko Süperoksit Dismutaz Analizi (Cu-Zn SOD)

Kalp doku örneklerindeki SOD aktivitesi Sun ve arkadaşlarının metoduna göre analiz edildi (129). Doku örnekleri distile su ile %10 konsantrasyonda olacak şekilde 15000 devir/dakika homojenizatör kullanılarak 1 dakika süresince buz üzerinde parçalandı. Mikrosantrifüj tüplerine alınan homojenatlar 8000 x g hızında 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Elde edilen süpernatın üzerine 3:5 oranında hazırlanan kloroform/etanol karışımından 1:1 oranında eklendi ve bu karışım 1500 x g hızında 20 dakika santrifüj edildi. En üstte oluşan berrak kloroform fazından alınan örnekler CuZn-SOD analizi için kullanıldı.

Tablo 3.3. SOD analiz reaksiyon tablosu (129).

Reaktifler	Örnek	Kör
Analiz reaktifi (0.3 mM/L ksantin, 0.6 mM/L Na₂EDTA, 150 µmol/L NBT, 400 mmol/L Na₂CO₃, 1 g/L BSA)	2.45 ml	2.45 ml
Süpernatın	0.5 ml	-
Distile Su	0.5 ml	-
Ksantin Oksidaz (167 Ü/L)	0.05 ml	0.05 ml

Tablo 3.3.'te yer alan tüm reaktifler eklendikten sonra vortekslenip oda sıcaklığında, karanlıkta 20 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüplere 1 ml CuCl₂ (0.8 mmol/L) eklenerek reaksiyon durduruldu. Spektrofotometrede distile su

ile sıfırlama yapıldıktan sonra 560 nm dalga boyunda absorbens değeri ölçüldü ve enzim aktivitesi U/gr protein olarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{\text{Absorbans (kör)} - \text{Absorbans (numune)}}{\text{Absorbans (kör)}} \times 100$$

$$\text{Ü / ml SOD} = \frac{\% \text{ inhibisyon}}{\% 50 \text{ inhibisyon}}$$

3.7.3 Redükte Glutasyon Analizi (GSH)

Sıçan kalp doku örneklerinden glutasyon tayini Ellman'ın yöntemine göre analiz edildi (130). Doku örnekleri distile su ile %10 konsantrasyonda olacak şekilde mekanik olarak 15000 devir/dakika homojenizatör kullanılarak 1 dakika süresince buz üzerinde parçalandı. Homojenatlar mikro santrifüj tüplerinde 1500 x g hızı 4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar farklı tüplerde 1:1 oranında %10 trikloroasetik asit (TCA) ile karıştırılarak tekrar santrifüj edildi ve elde edilen süpernatantlar GSH analizi için kullanıldı.

Tablo 3.4. GSH analiz reaksiyon tablosu (130).

Reaktifler	Örnek	Kör
%10'luk Homojenat	500 µl	-
0.3 M Na ₂ HPO ₄	4 ml	4 ml
5,5-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)-DTNB (4 mg DTNB+10 ml %1'lik trisodyum sitrat)	500 µl	500 µl
Distile Su	-	500 µl

GSH reaktif karışımlarına örnekler ve aynı miktarda DTNB eklendikten sonra vortekslenip oda sıcaklığında, karanlıkta 5-10 dakika inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan glutasyon standart grafiği ile 410 nm'de okunan absorbens değeri karşılaştırıldı ve sonuçlar µmol/gram yaş doku (µmol/gyd) olarak verildi.

3.7.4 Katalaz (CAT) Analizi

Kalp doku örneklerindeki CAT aktivitesi Luck'un metoduna göre analiz edildi (131). Doku örnekleri distile su ile %10 konsantrasyon olacak şekilde mekanik olarak

15000 devir/dakika homojenizatör kullanılarak 1 dakika süresince buz üzerinde parçalandı. Mikrosantrifüj tüplerine alınan homojenatlar 8000 x g hızında 20 dakika boyunca santrifüj edildi.

Tablo 3.5. Katalaz analiz reaksiyon tablosu (131).

Reaktifler	Örnek	Kör
Fosfat Tamponu (50 mM, ph: 7.0)	-	2.99 ml
H₂O₂'li Fosfat Tamponubulgu	2.99 ml	0.01 ml
Süpernatant	0.01 ml	-

Spektrofotometre kinetik okuma için 240 nm dalga boyuna ayarlanıp kör ile sıfırlandı ve örnekler eklendikten sonra absorbans ölçümleri 15 saniyede bir olacak şekilde 90 saniye boyunca ölçüldü. Azalan absorbans değerleri kaydedildi ve doğrusal azalma aralığı değerlendirilerek enzim aktivitesi K / gr protein olarak aşağıda verilen formül ile hesaplandı.

$$K = \frac{2.3 \times \log (\text{İlk absorbans/Son absorbans})}{\Delta t (\text{ölçüm süresi, sn})} \times \text{sulandırma faktörü}$$

$$K / \text{gr protein} = \frac{K}{\text{gr/ml}}$$

K = katalaz aktivite sabitesi

3.7.5 Protein Tayini

Örneklerde bulunan protein miktar hesabı standart olarak sığır serum albümin kullanılan Biüret yöntemi ile hesaplandı.

3.8 ELISA Analizleri

Hayvanlardan alınan kan dokuya ait serumlar ELISA analizi için kullanıldı. Serum örneklerinden Troponin (Sunred, Lot:201-11-0306), Miyoglobin (Sunred, Lot:201-11-0309) ve P53 (Sunred, Lot:201-11-0072) protokole uygun bir şekilde çalışıldı. ELISA plate kuyucuklarına serum örneklerinden 40 µl numune+ 10 µl TN-I ve 50 µl HRP bağlı çalışma solüsyonu (HRP Conjugate Work Solution) eklenip 37 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu işlemlerden sonra tüm kuyucuklar aspire edildi ve her

kuyucuğa 350 µl kitte hazır bulunan yıkama solüsyonu (Wash Buffer) eklendi ve daha sonra solüsyon aspire edildi. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklar pipetle tamamen temizlendi, hızlı bir şekilde kitte bulunan Biotinli Antikor tespit solüsyonundan (Biotinylated Detection Ab working solution) 50 µl eklendi, plate tekrar 10 dakika 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Bu işlemlerden sonra tüm kuyucuklar aspire edildi ve her kuyucuğa 350 µl kitte hazır bulunan yıkama solüsyonu (Wash Buffer) eklendi ve daha sonra solüsyon aspire edildi. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. Son olarak kuyucuklara 50 µl reaksiyon durdurma solüsyonu (Stop Solution) eklendi ve 450 nm’de spektrofotometre cihazında ölçüm alındı. Standart solüsyonlardan elde edilen ölçümler ile analiz sonuçlarında örneklerde bulunan protein miktarları hesaplandı.

3.9. Moleküler Analizler

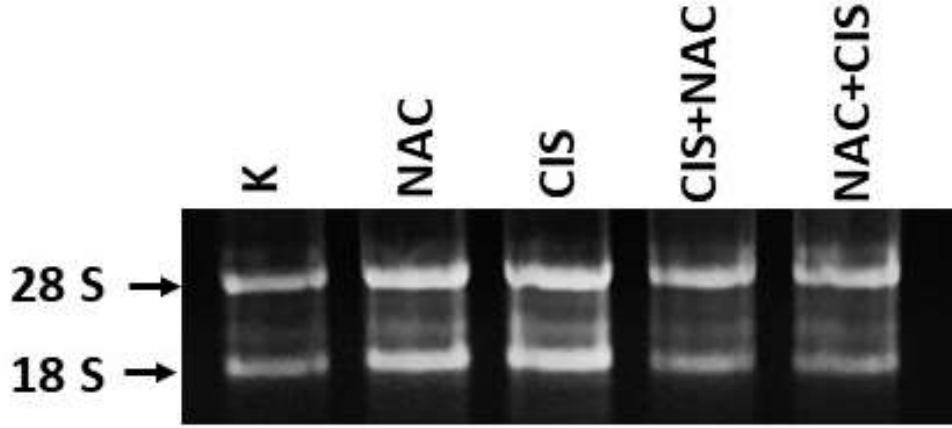
3.9.1. Dokudan RNA Saflaştırılması

Kalp dokusu Troponin, Miyogloblin ve P53 genlerinin mRNA seviyelerinin tespiti için gruplardan alınan kalp doku örnekleri RNA saklama çözeltisi içine konuldu ve bu dokulardan QIAGEN firmasının “RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Lot no: 178010511 ve referans no: 74704 protokolüne göre gerçekleştirildi. Elde edilen kalp doku örnekleri % 10 homojenat olacak şekilde RLT solüsyonu içinde toplam 1 dakika boyunca 30 Hz hız ile bilyeli parçalayıcıda (Retsch MM 400, Almanya) homojenize edildi Elde edilen homojenatlar 3 dakika 15000 x g hızında santrifüj edildi ve sonrasında süpernatantlar farklı tüplere aktarıldı. Numuneler 1:1 oranında % 70 etanol ile karıştırıldı, spin-kolon tüplerine alındı. Spin-kolon tüpleri 8000 x g’de 15 saniye (sn) santrifüj edildikten sonra kolonda biriken sıvı döküldü kalan örnek için bu işlem tekrarlandı. Bu aşamada DNA kontaminasyonunu önlemek amacıyla DNaz solüsyonu filtre üzerine eklenip 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Filtreli tüpe 700 µl RW1 solüsyonu eklenip 8000 x g hızında 15 saniye santrifüj edildi ve kolonda biriken sıvı atıldı. Daha sonra filtreli tüpe 500 µl RPE solüsyonu eklenip 8000 x g hızında 15 saniye santrifüj edildi ve kolonda biriken sıvı atıldı. Tekrar filtreli tüpe 500 µl RPE solüsyonu eklenip 8000 x g hızında 2 dakika santrifüj edildi ve kolonda biriken sıvı atıldı. Filtreli tüpler steril RNaz-DNaz temiz mikro santrifüj tüplerine alınarak üzerine 30-50 µl RNaz-DNaz temiz su eklenip 8000 x g hızında 1 dakika santrifüj edildi. Tüplerde toplanan sıvılardaki RNA miktarları spektrofotometrik olarak Biotek-Gen5 programında ng/µl olarak ölçüldü (Tablo 3.6.) ve % 1 agaroz jelinde koşturularak elde edilen RNA saflığı kontrol edildi (Şekil 3.2.).

Tablo 3.6. Doku örneklerinden elde edilen toplam RNA ölçüm sonuçları.

Örnek no	Kalp doku toplam RNA (ng/µl)	260/280 nm Oranı
1	494.0	2.0
2	678.0	2.0
3	415.0	2.0
4	550.0	2.0
5	498.5	2.0
6	426.5	2.0
7	583.0	2.2
8	516.0	2.0
9	653.0	2.0
10	757.5	2.0
11	583.0	2.0
12	818.0	2.0
13	671.0	2.1
14	549.0	2.1
15	649.5	2.0
16	962.5	2.0
17	661.0	2.0
18	446.0	2.0
19	596.0	1.9
20	451.5	2.0
21	762.0	2.0
22	607.0	2.0
23	473.5	2.0
24	254.5	2.0
25	671.5	2.0
26	487.5	2.1
27	750.0	2.0
28	742.5	2.0
29	626.5	2.0
30	596.0	2.0
31	470.5	2.0
32	628.5	2.0
33	465.0	2.0
34	522.5	2.0
35	588.5	2.0
36	362.5	2.1
37	681.0	2.0
38	630.0	2.0
39	580.0	2.0
40	1069.0	2.0

41	542.5	2.0
42	589.5	2.0
43	679.0	2.0
44	401.5	2.0
45	506.5	2.0
46	491.0	2.0



Kontrol grubu (K), N-asetilsistein grubu (NAC), Sisplatin grubu (CIS), Sisplatin+N-asetilsistein grubu (CIS+NAC), N-asetilsistein+Sisplatin grubu (NAC+CIS)

Şekil 3.2. Gruplara ait toplam RNA % 1 agaroz jel görüntüsü.

3.9.2. cDNA Sentezi

Kalp doku örneklerinden saflaştırılan toplam RNA'dan 1000 ng kullanılarak Qiagen- Quantitect Reverse Transcription Kit (Lot no: 178012837, Ref no: 205311) protokolüne uygun olarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Örnek başına 2 µl cDNA Wipeout buffer eklendikten sonra belirlenen konsantrasyonlara göre her bir örnek için RNA ve saf su ile hacim 14 µl olarak tamamlandı. Örnekler 2 dakika boyunca 42 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası her bir tüpe 1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase, 4 µl Quantiscript RT Buffer ve 1 µl RT Primer Mix eklenerek toplam hacim 20 µl'ye tamamlandı ve numuneler 15 dakika boyunca 42 °C ve 3 dakika boyunca 95 °C'de inkübe edildi. Elde edilen cDNA örnekleri analize kadar -80 °C'de saklandı.

3.9.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR)

Troponin, Miyoglobin, P53 ve β-aktin cDNA örnekleri kullanılarak Roche Light Cycler 96 RT-qPZT cihazında Qiagen marka "QuantiNova SYBR Green PCR Kit" (Lot

no: 175044540, Ref no: 208054)” ve “QuantiTect Primer Assays β -Actin” (order no: 50345551, bconfig no:249990) ile gen ifadelerine bakıldı. Kit protokolüne göre her bir reaksiyon için 12.5 μ l SYBR Green master mix, 1 μ l cDNA, 1 μ l primer ve 10.5 μ l saf su ile toplamda 25 μ l PZT karışımı hazırlandı. 10 dakika 95 °C’de denatürasyonun ardından, 15 saniye 95 °C ve 1 dakika 60 °C döngüsü ile 45 döngü olarak çoğaltım sağlandı. Her örneğin cDNA’sı β -aktin (<https://geneglobe.qiagen.com/us/product-groups/quantinova-lna-pcr-assay/SBR1166867>, RN_ACTB_2411074 QuantiNova LNA PCR Assay | GeneGlobe), Troponin (<https://geneglobe.qiagen.com/us/product-groups/quantinova-lna-pcr-assay/SBR1180357>, RN_TNNI1_2424564 QuantiNova LNA PCR Assay | GeneGlobe), Miyogloblin (<https://geneglobe.qiagen.com/us/product-groups/quantinova-lna-pcr-assay/SBR1179220>, RN_MB_2423427 QuantiNova LNA PCR Assay | GeneGlobe) ve P53 (<https://geneglobe.qiagen.com/us/product-groups/quantinova-lna-pcr-assay/SBR1172374>, RN_TP53_2416581 QuantiNova LNA PCR Assay | GeneGlobe) genlerine özgü primerler ile çoğaltılarak, sonuçlar β -aktin genine oranlandı ve Livak’ın $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile gen ifadesi hesaplandı (132). Çoğaltılan genlere ait primer bilgileri aşağıdaki tabloda verildi (Tablo 3.7.).

Tablo 3.7. Primer bilgileri. İleri primer (F), geri primer (R).

Gen Adı	Primer dizileri	Ref. Sekans Number	Ürün büyüklüğü (bp)
β-aktin	F: 5'- GTCGAGTCCGCGTCCACCCG -3'	NM_031	139
	R: 5'- TTTTTTTTTTTTTTTTTGCGCAA -3'	144.3	
Troponin	F: 5'- TCTCATCTGCACAGGACACC -3'	NM_017	76
	R: 5'- CACATACAAGCCCAAGTTTTA -3'	184.2	
Miyogloblin	F: 5'- CTCCTTTTGT CCTCTTTAGA -3'	NM_021	102
	R: 5'- TTGGAGGAGT GGGTTGGGAC -3'	588.2	
P53	F: 5'- AGTTCATTGGGACTTATCCTTGC -3'	NM_001	103
	R: 5'- GGGTGGGGTGAAATTCCTG -3'	429996.1	

3.9. Histopatolojik Analizler

Deney sonunda çıkarılan kalp dokuları, %10'luk formaldehit içerisinde alınarak tespit edildi. Tespit sonunda çeşme suyunda yıkanan dokular, dehidrasyon ve parlatma işlemlerinden geçirilerek parafine gömüldü. Hazırlanan parafin bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler genel morfolojik yapının belirlenmesi için hematoksilin-eozin boyama metodu ile boyandı. Değerlendirmeler Leica DFC-280 araştırma mikroskobu ile Leica Q Win Image Analiz Sistemi (Leica Micros Imaging Solutions Ltd, Cambridge, UK) kullanılarak yapıldı. Doku kesitleri hemoraji, intersisyel alanda ödem ve kardiyomiyosit dejenerasyonu (sitoplazma eozinofilitesinde artma/azalma, piknotik nükleus) yönünden değerlendirildi. Her bir kesitte rastgele seçilen 10 alan incelendi ve alanlar histolojik değişikliklerin derecesine göre; 0: değişiklik yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli değişiklik olarak skorlandı (133).

3.10. İstatistiksel Analizler

Verilerin analizlerinde MedCalc Versiyon 23.0.9 İstatistik programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro Wilk testiyle, varyans homojenliği Levene testi ile incelendi. Dağılımların parametrik ve non parametrik olma durumlarına göre sırasıyla, istatistik analizlerde ANOVA, tek yönlü varyans analizi, Kruskal Wallis ile Conover post hoc testleri uygun olan yerlerde kullanıldı. MDA ve GSH seviyeleri ile SOD ve CAT aktivitelerinin gruplar arası karşılaştırılmasında parametrik dağılım gösteren veriler için ANOVA, Student-Newman-Keuls post hoc testi yapılırken, non parametrik veriler için Kruskal Wallis H testi, Conover post hoc test yapıldı. Troponin, β-aktin, Miyogloblin, P53 gen ifadesi analizleri için Kruskal Wallis H testi sonrası Conover post hoc testleri kullanıldı. Hayvanların vücut ağılıkları karşılaştırılmasında Paired sample t testi kullanıldı. Normal dağılım gösteren veriler ortalama (\bar{x}) ± standart sapma (ss), normal dağılım göstermeyen veriler ise ortanca (25-75 P) olarak gösterildi. ($P < 0.05$) değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Histolojik verilerin istatistiksel analizleri SPSS istatistiksel yazılım programı (SPSS for Windows version 26) ile yapıldı. Veriler normal dağılım göstermediğinden parametrik olmayan testlerden Kruskal Wallis H varyans analizi tüm değişkenler yönünden grupların genel karşılaştırılmasında kullanıldı ve ikili gruplar arası karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmesiyle Mann-Whitney-U testi ile yapıldı. Veriler ortanca (min-maks) ve aritmetik ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. ($P < 0.05$) anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

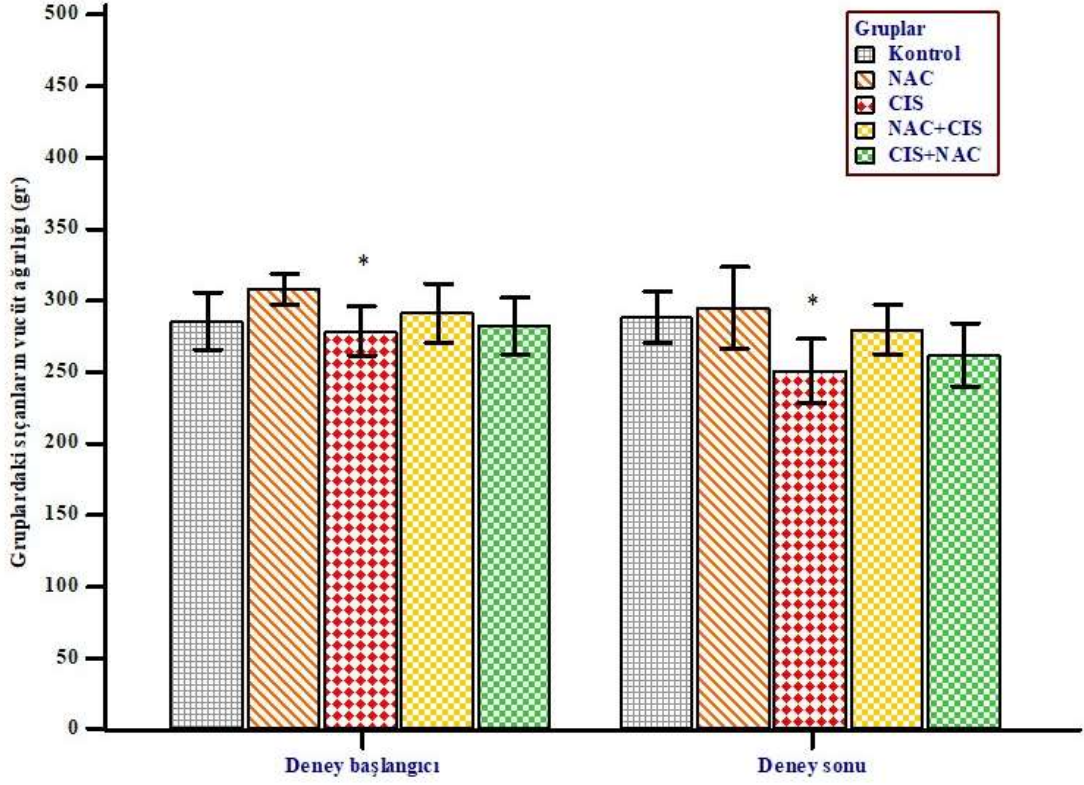
4.1. Hayvanların Vücut Ağırlıkları Bulguları

Hayvanların vücut ağırlıkları deney başlangıcı ve deney sonunda ölçüldü. Yapılan tartımlarda yalnızca CIS grubu hayvanların vücut ağırlığının deney sonunda azaldığı ($P < 0.05$), diğer gruplarda ise herhangi bir fark olmadığı ($P > 0.05$) tespit edildi (Tablo 4.1.), (Şekil 4.1.).

Tablo 4.1. Gruplara ait deney başlangıcı ve deney sonu vücut ağırlıkları ortalaması (gr).

Gruplar	Deney başlangıcı	Deney sonu
K (n=8)	285.5 ± 20.3	288.3 ± 18.1
NAC (n=8)	307.5 ± 10.7	295.4 ± 28.3
CIS (n=10)	278.9 ± 16.9 *	250.6 ± 22.6 *
NAC+CIS (n=10)	291 ± 20.7	279.6 ± 17.2
CIS+NAC (n=10)	280.1 ± 19.6	262.2 ± 22

Kontrol (K), N-asetilsistein (NAC), Sisplatin (CIS). Veriler $\bar{x} \pm ss$ olarak gösterildi. * İstatistiki olarak birbirinden anlamlı ($P < 0.05$, Paired sample t test).



N-asetilsistein (NAC), Sisplatin (CIS). * İstatistiki olarak birbirinden anlamlı ($P < 0.05$, Paired sample t test).

Şekil 4.1. Grupların deney başlangıcı ve deney sonunda vücut ağırlıkları karşılaştırmaları.

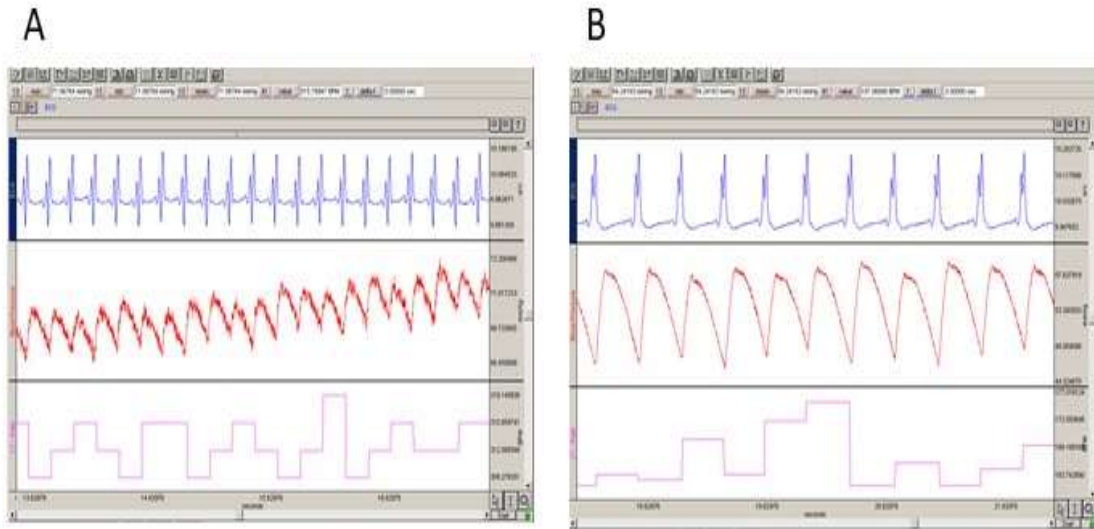
4.2 Hemodinami ve Elektrokardiyogram Sonuçları

EKG kayıt videoları görsel olarak analiz edildi ve Aritmi, U dalgası, ST elevasyonu, PAF ve VES değerlendirildi. Tabloda yüzde olarak gruplara ait sonuçlar verildi (Tablo 4.2.). EKG anomalileri gruplar arası kalp hızı ve kan basıncı farklılıkları, QR, QT ve QRS değişkenliklerindeki süre ve dalgalanmaların yüksek hassasiyetli ölçümleri Lambeth Sözleşmesi kriterlerine göre yapılmıştır (134). EKG kayıtlarına göre CIS, NAC+CIS ve CIS+NAC gruplarında aritmi gözlenirken, gruplarda ST elevasyonu CIS grubunda yüksek bulunurken, NAC+CIS grubunda daha az gözlemlendi. U dalgası yüzdesi en fazla CIS grubunda tespit edildi ve ST elevasyonu CIS grubunda en yüksek ölçüldü (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. Gruplarda gözlenen EKG değişimleri.

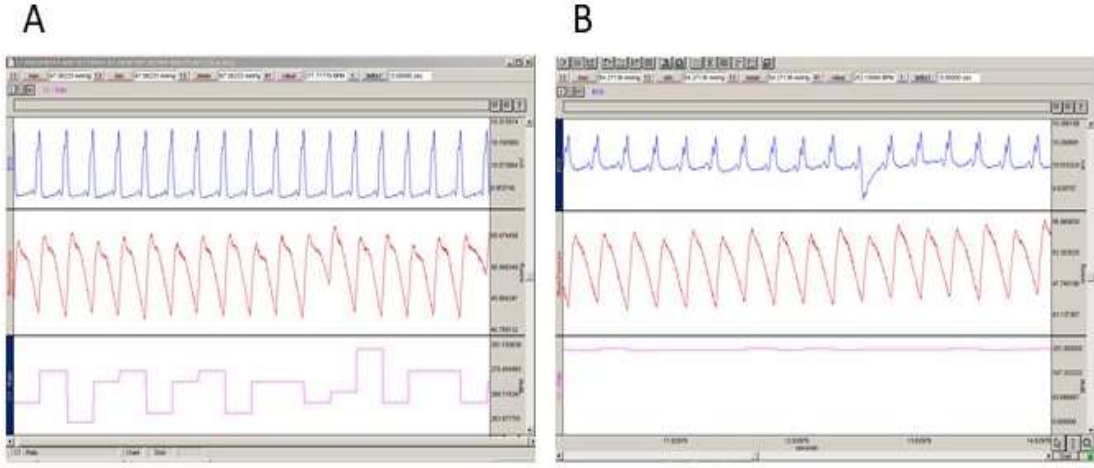
Gruplar	Aritmi (gözlenen %)	U Dalgası (gözlenen %)	ST elevasyonu (gözlenen %)	PAF (gözlenen %)	VES (gözlenen %)
K (n=8)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
NAC (n=8)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
CIS (n=10)	30.00	20.00	20.00	0.00	10.00
NAC+CIS (n=10)	10.00	10.00	10.00	10.00	0.00
CIS+NAC (n=10)	20.00	10.00	0.00	0.00	0.00

K (Kontrol), NAC (N-asetilsistein), CIS (Sisplatin).



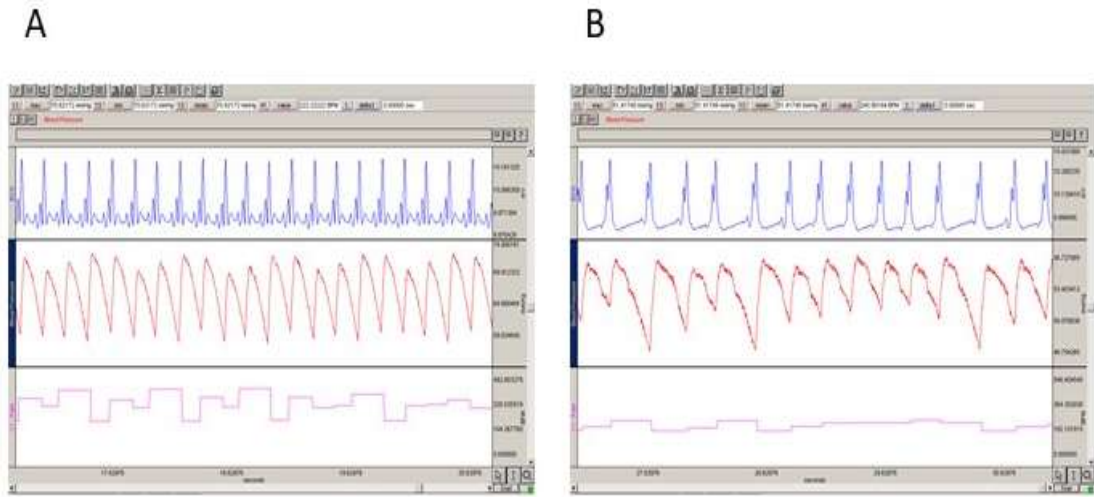
A) Normal EKG, B) Bradikardi EKG

Şekil 4.2. Normal ve bradikardi EKG görselleri.



A) ST elevasyonu B) VES

Şekil 4.3. ST elevasyonu ve VES EKG görselleri.



A) U Dal blok, B) T negatifliği (paf)

Şekil 4.4. Dal blok ve T negatifliği EKG görselleri.

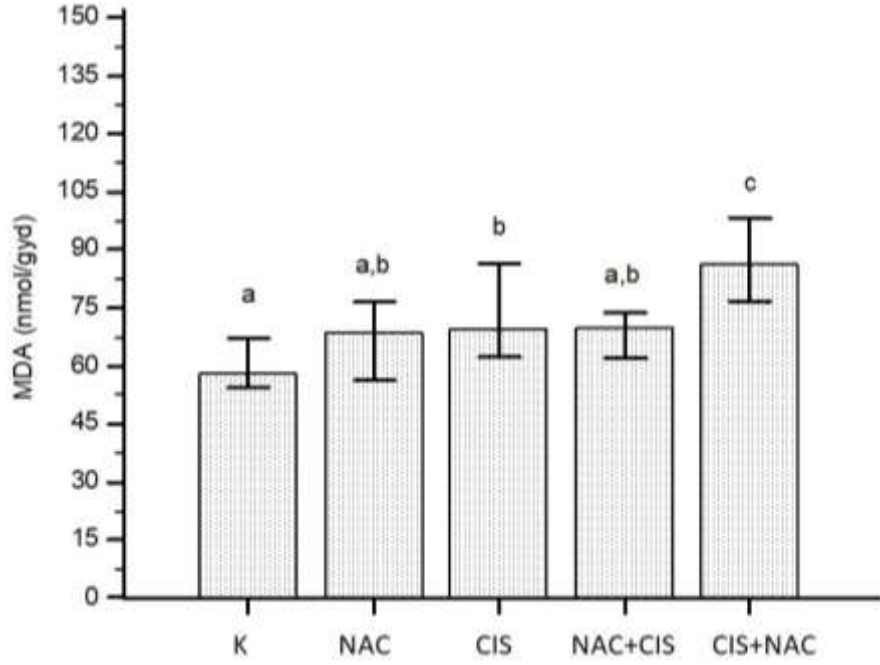
4.3 Kalp Dokusu MDA, GSH Seviyeleri, SOD ve CAT aktiviteleri

Kalp doku CIS ve CIS+NAC grubu MDA seviyesi K, NAC, ve NAC+CIS gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ($P < 0.05$). CIS+NAC grubu MDA seviyesi, CIS ve NAC+CIS grubuna göre daha yüksekti ($P < 0.05$) (Şekil 4.5, Tablo 4.3.). Kalp doku GSH seviyeleri ve SOD aktivitesi bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($P > 0.05$) (Şekil 4.6., 4.7., Tablo 4.3.). Kalp CAT aktivitesi kontrol ve NAC grubuna göre CIS, NAC+CIS ve CIS+NAC gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ($P < 0.05$) (Şekil 4.8., Tablo 4.3.).

Tablo 4.3. Gruplara ait kalp MDA ve GSH miktarları ile SOD ve CAT aktiviteleri

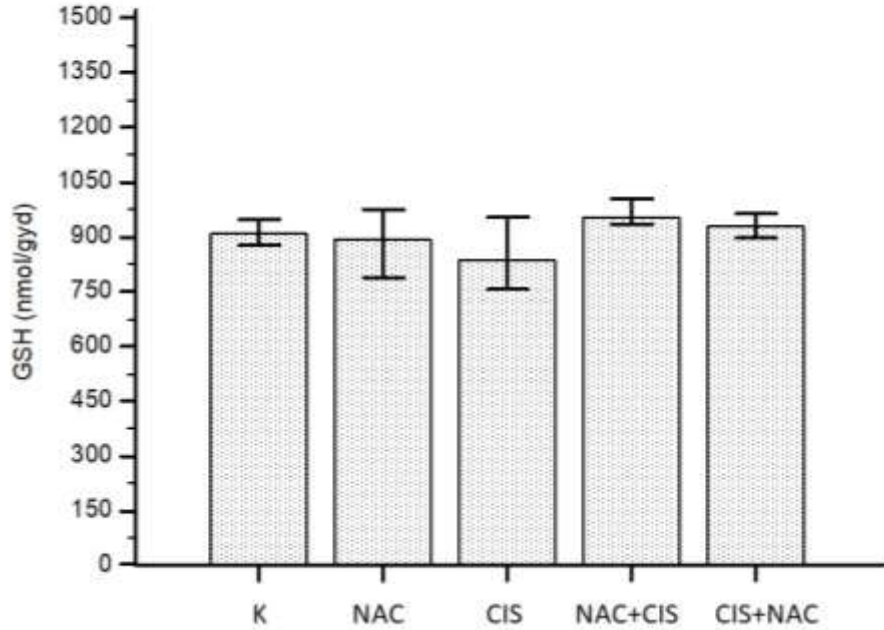
Gruplar	MDA (nmol/gyd) ($\bar{x} \pm ss$)	GSH (nmol/ gyd) ($\bar{x} \pm ss$)	SOD (Ü/gr protein) ($\bar{x} \pm ss$)	CAT (K/gr protein) (ortanca 25-75 P)
K (n=8)	59.7 \pm 6.3 ^a	902.8 \pm 64.6	25.5 \pm 2.7	34.1 (28.3-36.5) ^a
NAC (n=8)	66.9 \pm 11.5 ^{a,b}	871.9 \pm 121.1	23.5 \pm 3.7	39.1 (35.1-46.8) ^a
CIS (n=10)	73.6 \pm 14.1 ^b	840.0 \pm 136.9	24.4 \pm 2.1	49.7 (44.4-57.5) ^b
NAC+CIS (n=10)	69.4 \pm 6.6 ^{a,b}	952.9 \pm 58.6	27.7 \pm 8.7	46.9 (40.2-58.1) ^b
CIS+NAC (n=10)	87.9 \pm 12.8 ^c	922.5 \pm 53.2	23.2 \pm 2.9	49.8 (43.1-53.4) ^b

Her bir grupta farklı olan harfler birbirlerinden istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0.05$). Kontrol (K), N-asetilsistein (NAC), Sisplatin (CIS).. Veriler MDA, GSH ve SOD için $\bar{x} \pm ss$ olarak, CAT için ise ortanca (25-75 P) olarak gösterildi. (Parametrik dağılım gösteren veriler için ANOVA, Student-Newman-Keuls post hoc testi, non parametrik veriler için Kruskal Wallis, Conover post hoc test yapıldı).



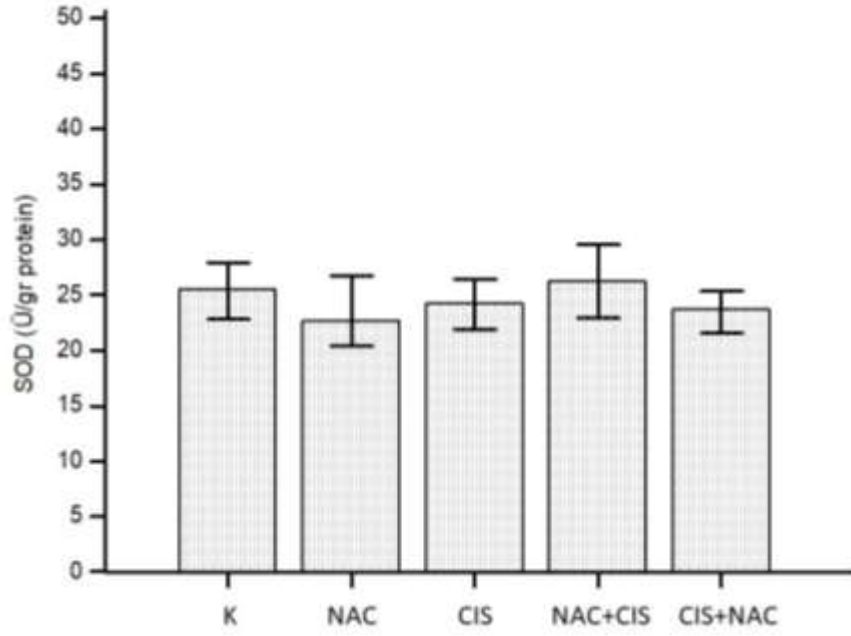
Kontrol (K), N-asetilsistein (NAC), Sisplatin(CIS), N-asetilsistein+Sisplatin(NAC+CIS), Sisplatin+N-asetilsistein(CIS+NAC). Her bir grupta farklı olan harfler birbirlerinden istatistiki olarak anlamlıdır ($P < 0.05$). (ANOVA, Student-Newman-Keuls post hoc testi).

Şekil 4.5. Gruplara ait kalp MDA seviyeleri.



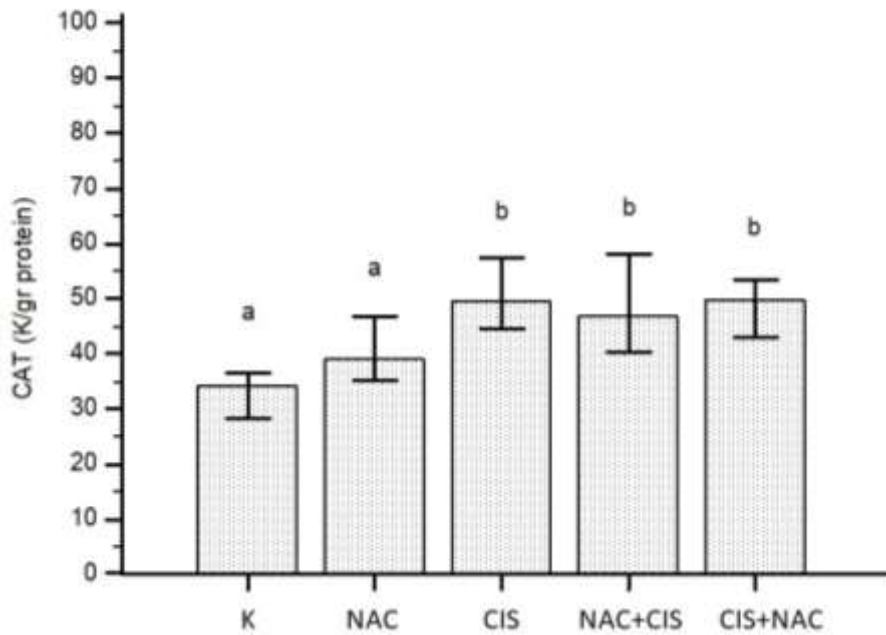
Kontrol (K), N-asetilsistein (NAC), Sisplatin(CIS), N-asetilsistein+Sisplatin(NAC+CIS), Sisplatin+N-asetilsistein(CIS+NAC). (ANOVA)($P > 0.05$).

Şekil 4.6. Gruplara ait kalp GSH seviyeleri.



Kontrol (K), N-asetilsistein (NAC), Sisplatin(CIS), N-asetilsistein+Sisplatin (NAC+CIS), Sisplatin+N-asetilsistein(CIS+NAC) (ANOVA) ($P > 0.05$).

Şekil 4.7. Gruplara ait kalp SOD aktiviteleri.



Kontrol (K), N-asetilsistein (NAC), Sisplatin (CIS), N-asetilsistein+Sisplatin (NAC+CIS), Sisplatin+N-asetilsistein (CIS+NAC). Her bir grupta farklı olan harfler birbirlerinden istatistiki olarak anlamlıdır. (Kruskal-Wallis, Conover post hoc testi) ($P < 0.05$).

Şekil 4.8. Gruplara ait kalp CAT aktiviteleri.

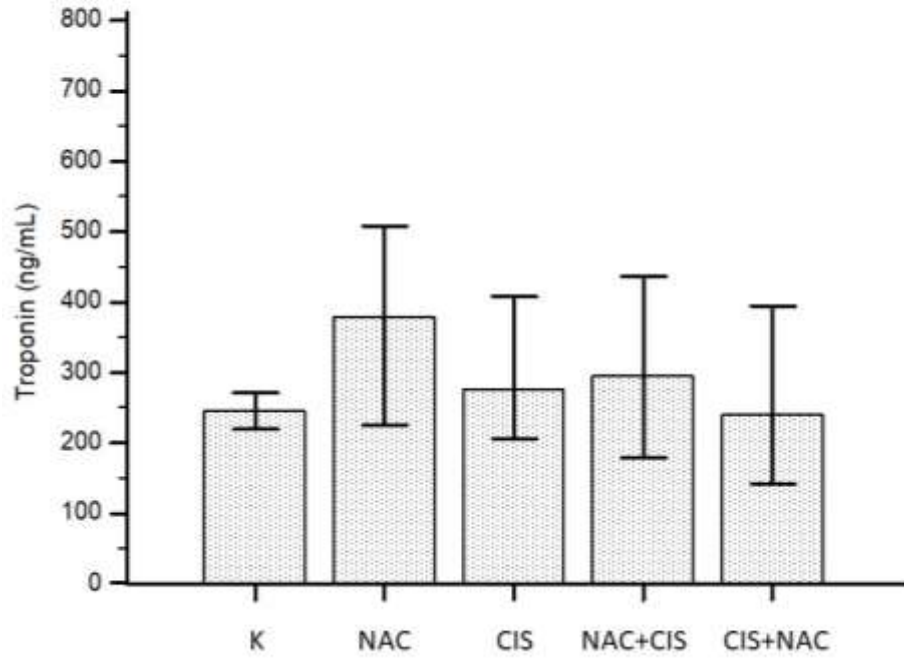
4.4 Serum ELISA Analiz Sonuçları

Serum örneklerinde ELISA yöntemi ile ölçülen Troponin ve Miyogloblin protein miktarlarında istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($P > 0.05$) (Şekil 4.9, 4.10, Tablo 4.4.). Serum P53 protein miktarı CIS grubunda, Kontrol, NAC, NAC+CIS ve CIS+NAC gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($P < 0.05$) (Şekil 4.11, Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. Kalp dokusu Troponin, Miyogloblin ve P53 ELISA sonuçları

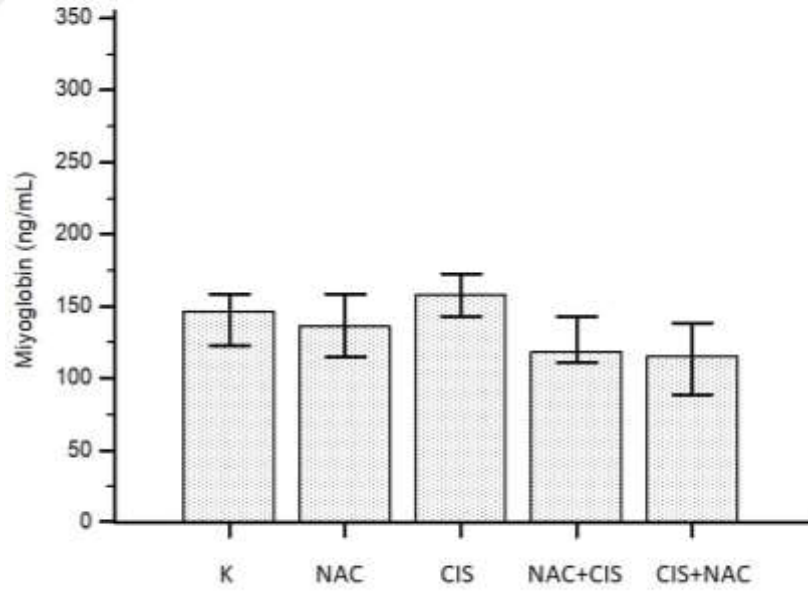
Gruplar	Troponin (ng/ml)	Miyogloblin (ng/ml)	P53 (pg/ml)
K (n=8)	246.1 (220.2 - 270.9)	147.0 (123.4 - 158.5)	82.4 (77.2 - 86) ^a
NAC (n=8)	380.2 (224.9 - 508.3)	136.8 (115.1 - 158.6)	79.9 (63.6 - 92.5) ^a
CIS (n=10)	276.9 (206.9 - 409.2)	157.6 (143 - 172.9)	102.3 (96.1 - 109.9) ^b
NAC+CIS (n=10)	294.9 (179.3 - 436.9)	118.5 (111.2 - 142.8)	78.3 (75.6 - 92.7) ^a
CIS+NAC (n=10)	241.3 (141.9 - 395.6)	115.8 (89.1 - 138.6)	86.3 (67.5 - 95) ^a

Kontrol (K), N-asetilsistein (NAC), Sisplatin (CIS). Veriler ortanca (25-75 P) olarak gösterildi. Her bir sütünde farklı olan harfler birbirlerinden istatistiki olarak anlamlıdır ($P < 0.05$).



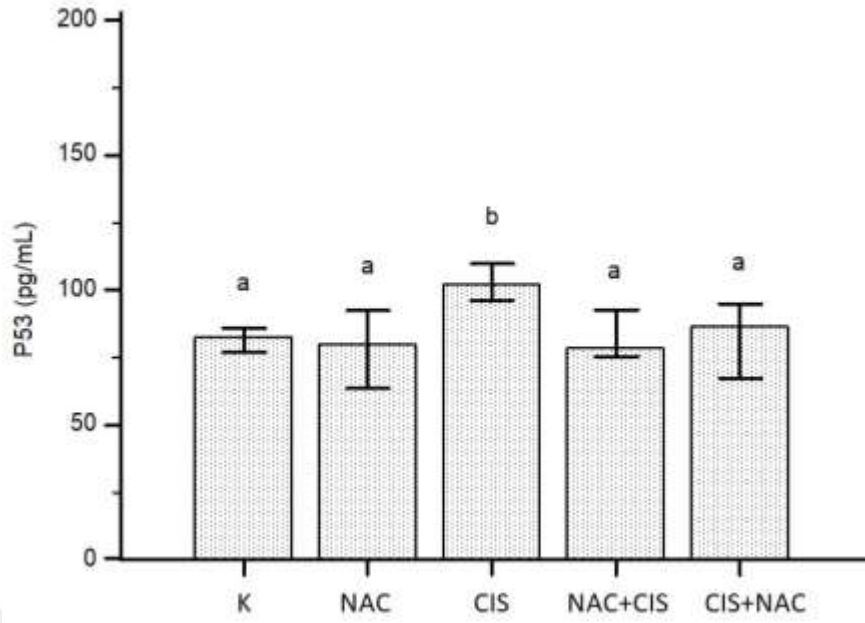
Kontrol (K), N-asetilsistein (NAC), Sisplatin (CIS). (Kruskal-Wallis, Conover post hoc testi yapıldı).

Şekil 4.9. Gruplara ait serum Troponin seviyeleri.



Kontrol (K), N-asetilsistein (NAC), Sisplatin (CIS). (Kruskal-Wallis, Conover post hoc testi yapıldı).

Şekil 4.10. Gruplara ait serum Miyoglobin seviyeleri.

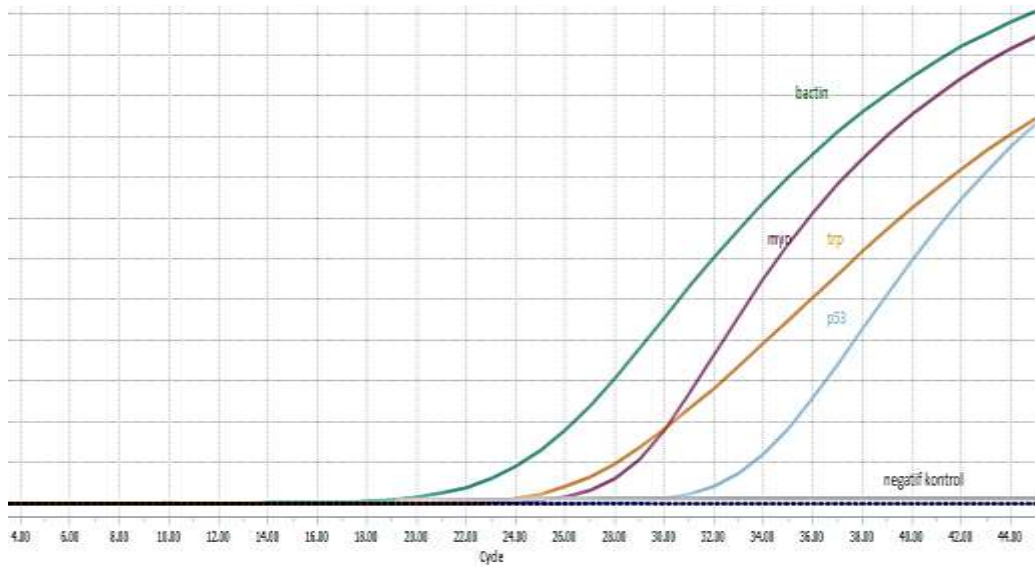


Kontrol (K), N-asetilsistein (NAC), Sisplatin (CIS). Her bir grupta farklı olan harfler birbirlerinden istatistiki olarak anlamlıdır ($P < 0.05$). (Kruskal-Wallis, Conover post hoc testi yapıldı).

Şekil 4.11. Gruplara ait serum P53 seviyeleri.

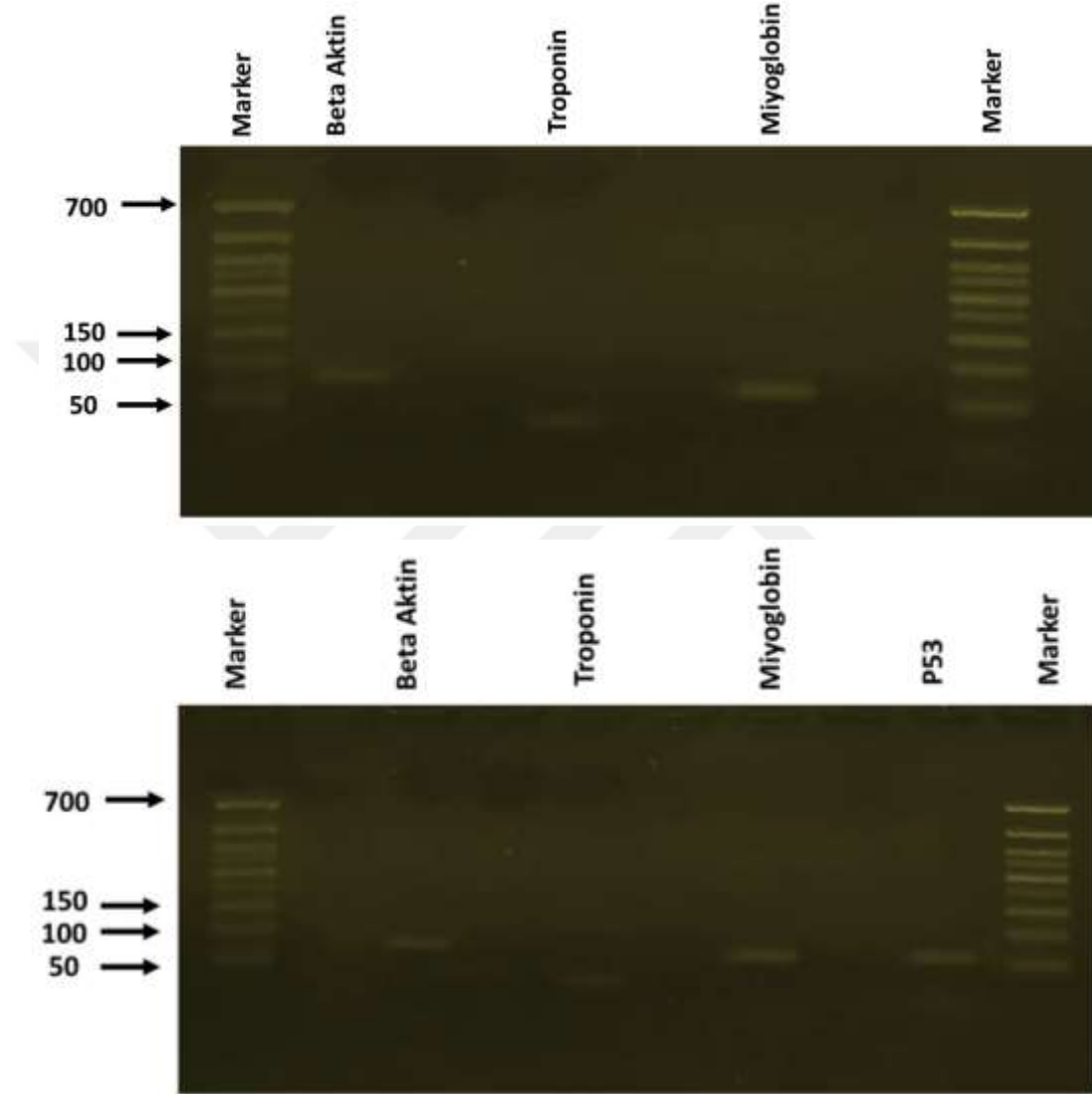
4.5. Moleküler Genetik Bulgular

Moleküler analizlerde “Syber Green” kimyası kullanılarak β -aktin, Troponin, MYO ve P53 mRNA’larından sentezlenen cDNA’ların gerçek zamanlı PZR ile çoğaltımı yapıldı (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Kalp cDNA örneklerinden qPZT ile çoğaltılan Troponin, Miyogloblin, P53 ve β -aktin eğrileri.

β -aktin, Troponin, Miyoglobin ve P53 cDNA'ları kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PZR sonrası agaroz jelinde örnekler koşturularak primer bağlanmasının özgülüğü kontrol edildi. Analiz sonucunda her iki gen için de tek ve istenilen boyda bir DNA bandı oluştuğu görüldü (Şekil 4.13.).



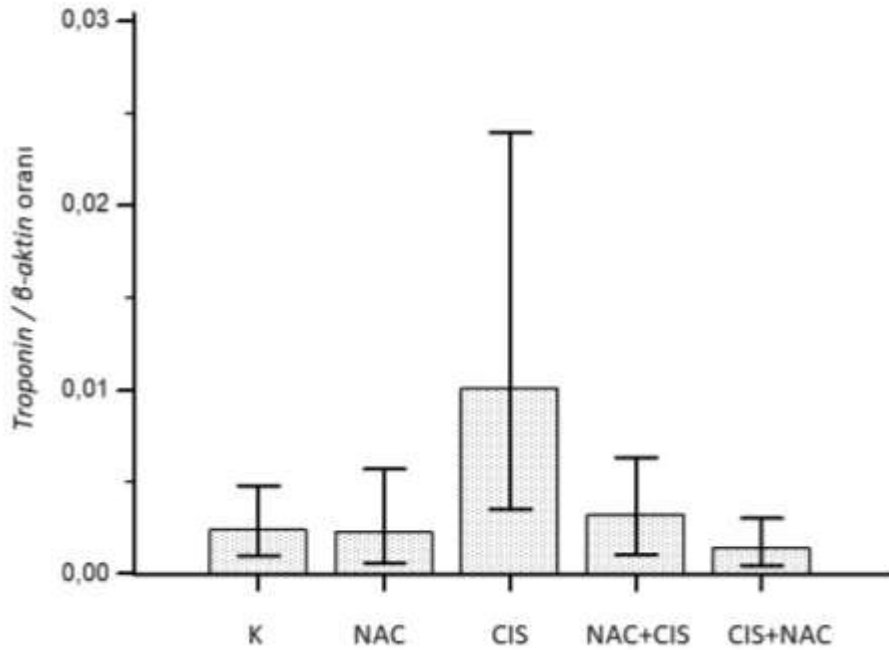
Şekil 4.13. β -aktin, Troponin ve Miyoglobin cDNA'larının PZR'deki çoğalımının agaroz jel (%1.5) elektroforezi görüntüsü. Kullanılan DNA Markeri 50 bç DNA Markeri'dir (Bioron, 50 bp, catalog no: 304007)

Kalp doku örneklerinden çalışılan qPZT sonuçlarına bakıldığında gruplar arasında Troponin, Miyogloblin ve P53 gen ifadeleri bakımından istatistiksel olarak bir fark gözlenmedi ($P > 0.05$) (Şekil 4.14, 4.15, 4.16, Tablo 4.5.).

Tablo 4.5. Kalp dokusu Troponin, Miyogloblin ve P53 gen ifadeleri

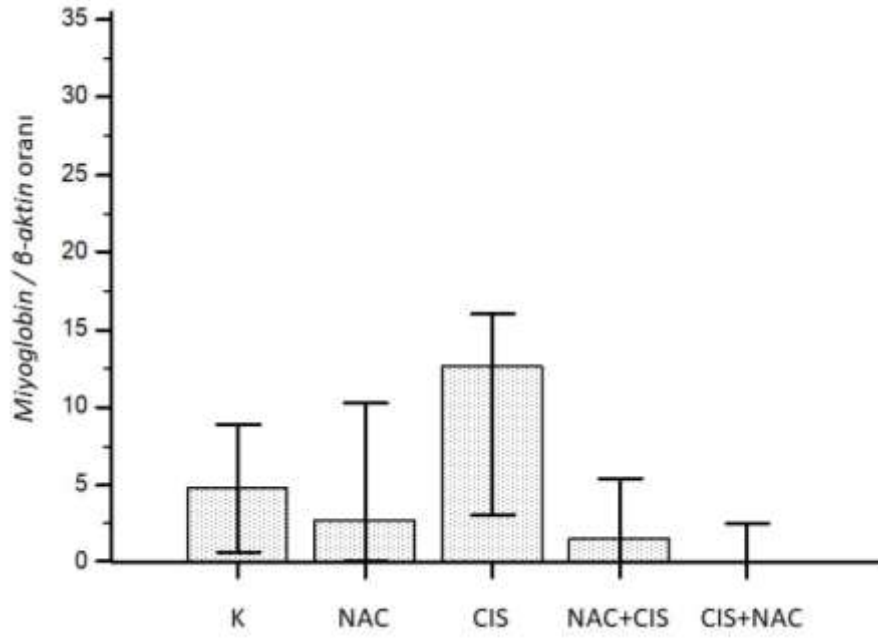
Gruplar	Troponin / β -aktin oranı	Miyogloblin / β -aktin oranı	P53 / β -aktin oranı
K (n=8)	0.0024 (0.00099 – 0.005)	4.80 (0.65 - 8.88)	0.008 (0.006 - 0.0097)
NAC (n=8)	0.0023 (0.0006 – 0.006)	2.74 (0.05 - 10.29)	0.0075 (0.002 - 0.02)
CIS (n=10)	0.0100 (0.0036 – 0.02)	12.69 (3.04 - 15.99)	0.0078 (0.005 - 0.012)
NAC+CIS (n=10)	0.0030 (0.001 – 0.006)	1.53 (0.02 - 5.44)	0.008 (0.003 - 0.0097)
CIS+NAC (n=10)	0.0015 (0.0005 – 0.003)	0.02 (0.005 - 2.51)	0.006 (0.002 - 0.037)

Kontrol (K), N-asetilsistein (NAC), Sisplatin (CIS). Veriler Troponin, Miyogloblin ve P53 için ortanca (25-75 P) olarak gösterildi.



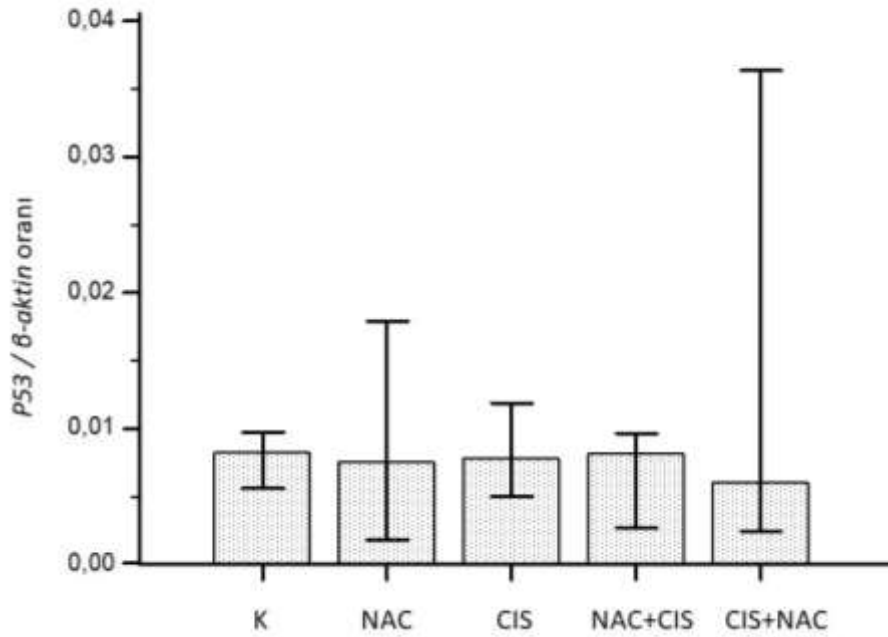
Kontrol (K), N-asetilsistein (NAC), Sisplatin (CIS). (Kruskal-Wallis, Conover post hoc testi yapıldı).

Şekil 4.14. Gruplarda kalp örneklerine ait Troponin gen ifade seviyeleri.



Kontrol (K), N-asetilsistein (NAC), Sisplatin (CIS). (Kruskal-Wallis, Conover post hoc testi yapıldı).

Şekil 4.15. Gruplarda kalp örneklerine ait Miyoglobin gen ifade seviyeleri.



Kontrol (K), N-asetilsistein (NAC), Sisplatin (CIS). (Kruskal-Wallis, Conover post hoc testi yapıldı).

Şekil 4.16. Gruplarda kalp örneklerine ait P53 gen ifade seviyeleri.

4.6. Histopatolojik Bulgular

Doku kesitleri hemoraji, intersisyel alanda ödem ve kardiyomiyosit dejenerasyonu yönünden değerlendirildi. Kalp için yapılan histopatolojik değerlendirme sonuçları (Tablo 4.6.)’da verildi.

Tablo 4.6. Kalp histopatolojik değerlendirme sonuçları

Gruplar	Hemoraji	Ödem	Kardiyomiyosit dejenerasyonu
K	0 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-1)
NAC	0 (0-3)	0 (0-1)	0 (0-1)
CIS	1 (0-3) ^a	1 (0-3) ^a	1 (0-3) ^a
NAC+CIS	0 (0-3) ^b	0 (0-3)	0.5 (0-3)
CIS+NAC	0 (0-3) ^b	0 (0-2) ^c	0 (0-2) ^c

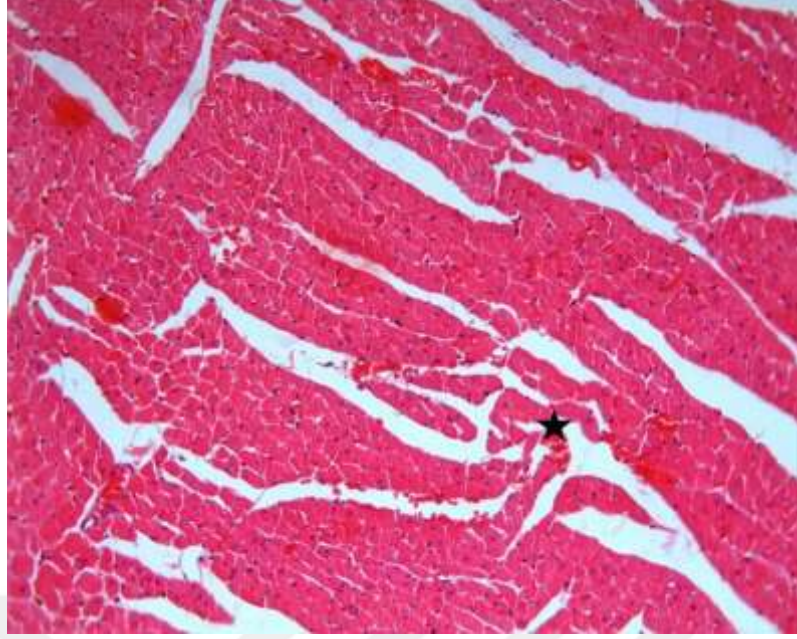
Kontrol (K), N-asetilsistein (NAC), Sisplatin (CIS). Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak ifade edildi.

^a Kontrol ve NAC gruplarına göre anlamlı göre artış (P < 0.0001).

^b CIS grubuna göre anlamlı azalış (P < 0.0001).

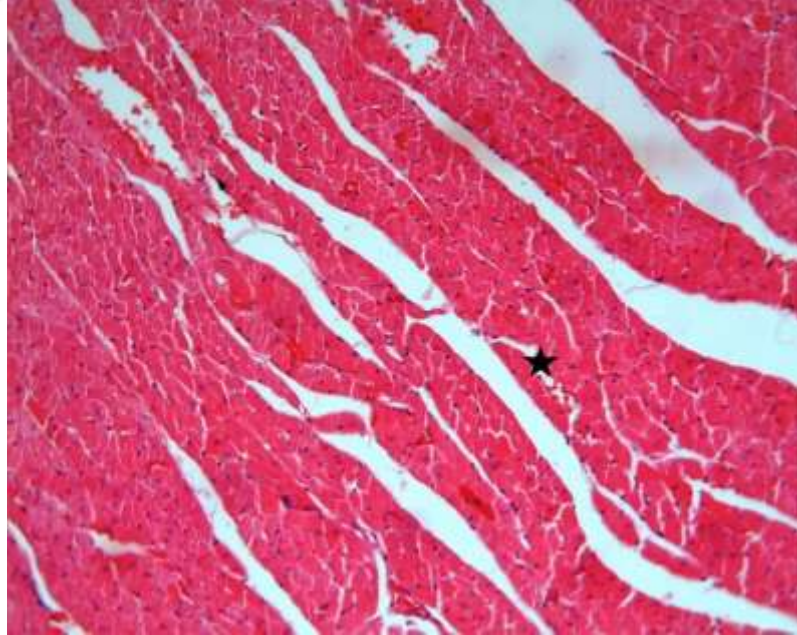
^c CIS grubuna göre anlamlı azalış (P < 0.05).

Kontrol ve NAC gruplarında, yer yer izlenen hafif düzeydeki değişiklikler dışında, kardiyak doku normal histolojik görünümdeydi (Şekil 4.17., 4.18.).



Kontrol grubunda hafif düzeydeki hemoraji dışında kardiyak doku normal histolojik görünüm sergilemekte. H-E, 200x.

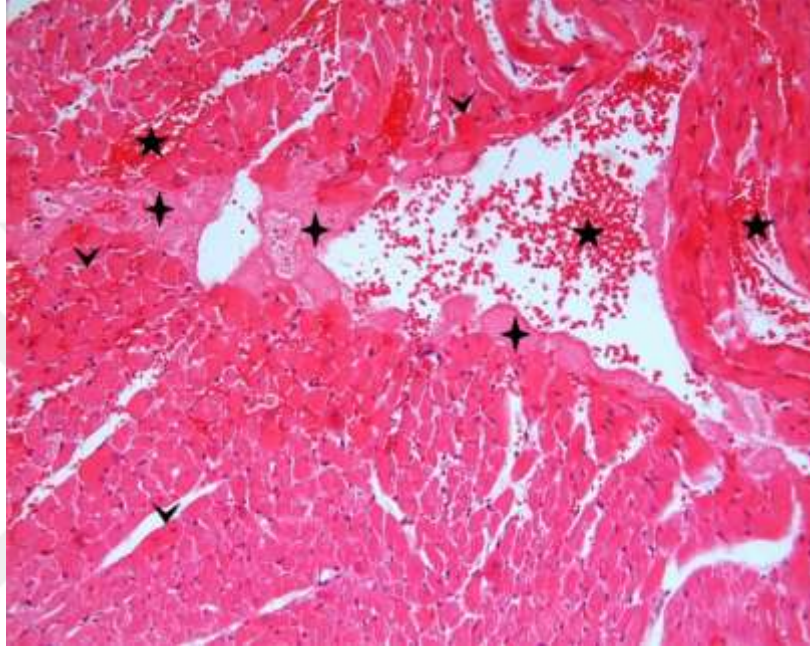
Şekil 4.17. Kalp dokusuna ait H-E boyanmış mikroskobik görüntü.



NAC grubunda, kontrol grubuna benzer şekilde, hafif düzeydeki hemoraji dışında kardiyak doku normal histolojik görünümde izlenmekte. H-E, 200x.

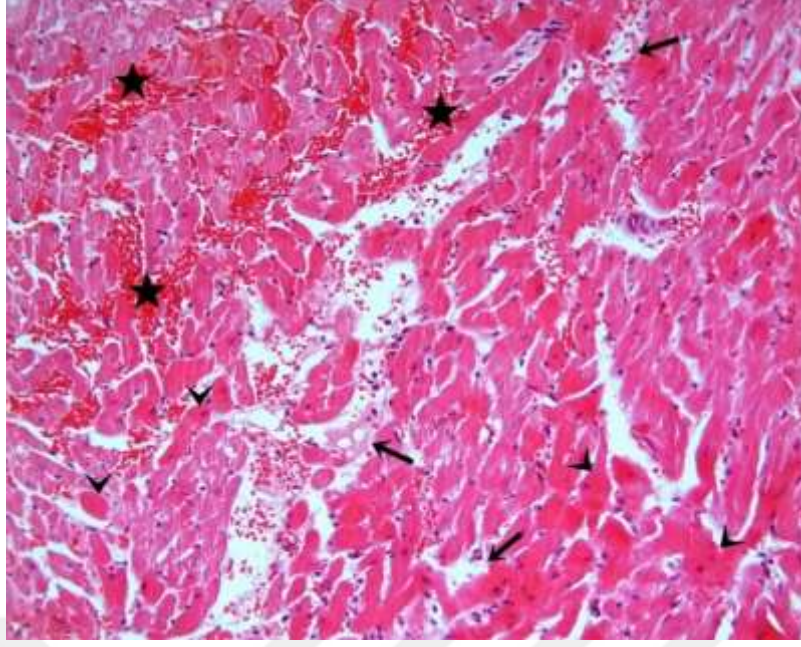
Şekil 4.18. Kalp dokusuna ait H-E boyanmış mikroskobik görüntü.

CIS grubunda belirgin histopatolojik değişiklikler gözlemlendi (Şekil 4.19., 4.20.). Bu grupta bazı örneklerde şiddetli hemoraji, hemorajik alanlarda artmış interstiyel ödem ve nekrotik kardiyomiyositlerin varlığı dikkat çekti. Ayrıca çoğu örnekte yaygın olarak sitoplazmik eozinifilitesi artmış, piknotik nükleuslu kardiyomiyositler izlendi. Bu değişiklikler yönünden CIS grubu hem kontrol hem de NAC grubundan istatistiksel olarak farklı bulundu.



CIS grubunda yaygın konjesyon/hemoraji (yıldızlar), hemorajik alanlarda nekrotik kardiyomiyositler (döt köşeli yıldızlar) ile sitoplazmik eozinofilitesi artmış, piknotik nükleuslu kardiyomiyositler (ok başları) izlenmekte. H-E, 200x.

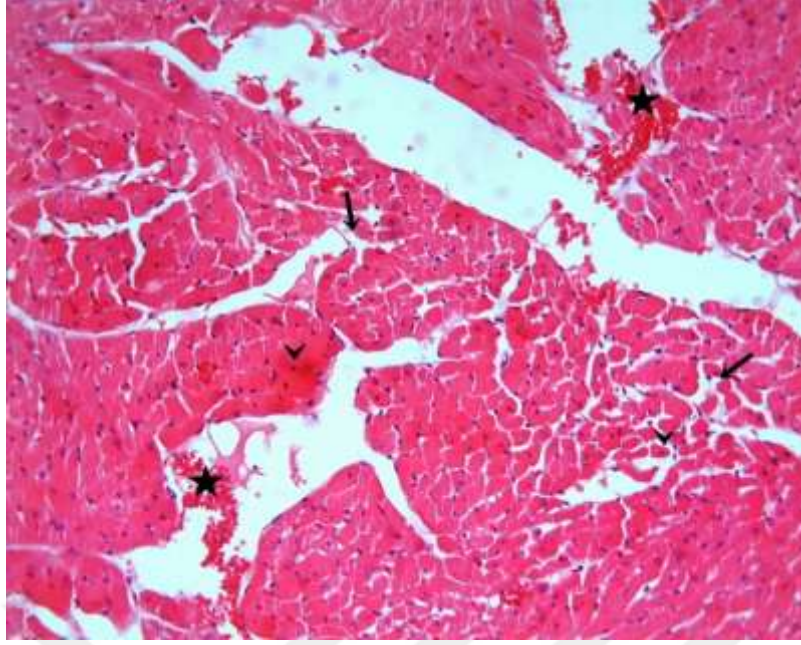
Şekil 4.19. Kalp dokusuna ait H-E boyanmış mikroskopik görüntü.



CIS grubunda yaygın konjesyon/hemoraji (yıldızlar), sitoplazmik eozinofilitesi artmış, piknotik nükleuslu kardiyomiyositler (ok başları) ve interstisyel ödem (oklar) izlenmekte. H-E, 200x.

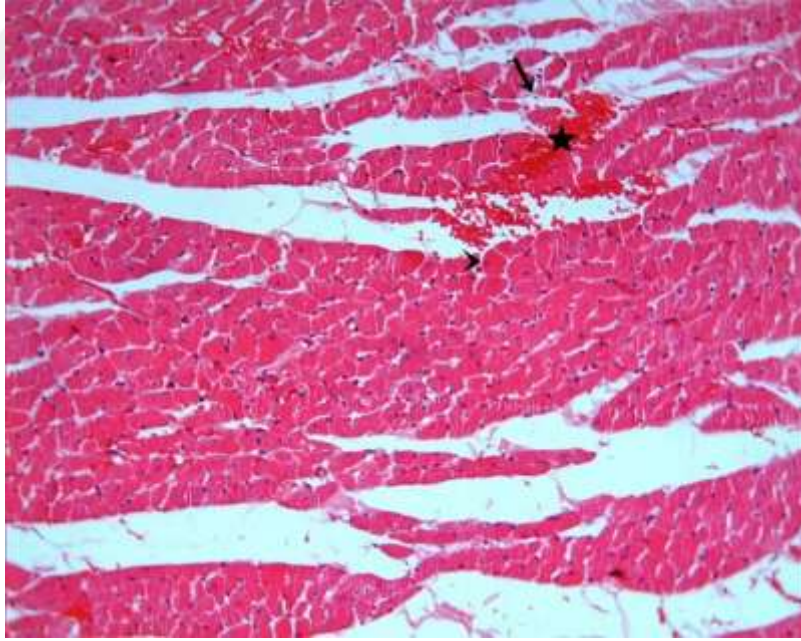
Şekil 4.20. Kalp dokusuna ait H-E boyanmış mikroskopik görüntü.

NAC+CIS grubunda, CIS grubu ile karşılaştırıldığında, hemorajinin anlamlı olarak azaldığı; ödem ve kardiyomiyosit dejenerasyonunun ise hafif düzeyde azaldığı ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi (Şekil 4.21.). CIS+NAC grubunda tüm histopatolojik değişikliklerin CIS grubuna göre belirgin şekilde azaldığı saptandı (Şekil 4.22.). Diğer yandan, CIS+NAC grubunda histopatolojik değişiklikler NAC+CIS grubuna göre daha hafiflemiş olduğu halde bu gruplar tüm parametreler yönünden istatistiksel olarak benzer bulundu.



NAC+CIS grubunda hemorajinin (yıldızlar) belirgin şekilde, kardiyomiyosit dejenerasyonu (ok başları) ve ödemin (oklar) hafif düzeyde azaldığı dikkat çekmekte.

Şekil 4.21. Kalp dokusuna ait H-E boyanmış mikroskopik görüntü.



CIS+NAC grubunda hemoraji (yıldız), kardiyomiyosit dejenerasyonu (ok başı) ve ödemin (ok) belirgin şekilde azaldığı izlenmekte.

Şekil 4.22. Kalp dokusuna ait H-E boyanmış mikroskopik görüntü.

5. TARTIŞMA

Kemoterapi tedavisinde sıklıkla tercih edilen Sisplatin'in, tedavi edici etkilerine ek olarak ciddi düzeyde sistemik toksisiteye, özellikle de kardiyotoksisiteye neden olabildiği bilinmektedir. Son yıllarda, kemoterapötik ajanların yan etkilerini azaltmaya yönelik çeşitli antioksidan bileşiklerin koruyucu potansiyelleri araştırılmaktadır. Bu doğrultuda, antioksidan özellikleri ile bilinen N-Asetilsistein gibi bileşiklerin Sisplatin kaynaklı toksisiteyi azaltmadaki etkileri hayvan modelleri üzerinde yürütülen çalışmalarla değerlendirilmektedir (36).

Çalışmamızda, belirlenen dozda ve süreyle Sisplatin uygulanan sıçanlarda, kontrol grubuna kıyasla vücut ağırlığında anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Bu durum, Sisplatin'in sistemik toksisiteye neden olarak beslenme davranışlarında bozulmaya ve genel sağlık durumunda zayıflamaya yol açtığını göstermektedir. Vücut ağırlığı değişimleri, sistemik toksisitenin dolaylı bir göstergesi olarak değerlendirilmiş; bu doğrultuda NAC ile birlikte Sisplatin uygulanan grupta, yalnızca Sisplatin verilen gruba kıyasla vücut ağırlığında daha az kayıp tespit edilmiştir. İnsanlarda sisplatin yan etkisinin bir belirtisi de kilo kaybıdır. Bulgularımız, sisplatinin iştah kaybı ve gastrointestinal yan etkiler yoluyla kilo kaybına neden olduğu önceki çalışmalarla uyumludur (135). Bu sonuçlar Sisplatin uygulamasının öncesinde ve sonrasında N asetilsistein uygulamasının yan etkileri hafifletmede etkili olduğunu doğrular niteliktedir. Yapılan bir araştırmada Sisplatin uygulanan sıçanların vücut ağırlığının Sisplatin uygulamasından sonra azaldığı gösterilmiştir (136). Ayrıca tüm grupların yem tüketim miktarları karşılaştırıldığında, Sisplatin uygulanan grubun kontrol grubuna göre daha az yem tükettiği; buna karşılık NAC ile birlikte Sisplatin uygulanan grupta yem tüketiminin kısmen korunabildiği gözlemlenmiştir. Bu bulgular, NAC'ın beslenme davranışları ve metabolik denge üzerinde koruyucu bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda elde edilen veriler, NAC'ın Sisplatin kaynaklı vücut ağırlığı kaybını ve yem tüketiminde azalmayı kısmen engelleyebildiğini ortaya koymuştur.

Literatürde kronik Sisplatin tedavisine çeşitli aritmi tipleri, iskemik kalp hastalığı ve kalp yetmezliği gibi çok sayıda kardiyotoksik etkinin eşlik ettiği bildirilmiştir (137). Çalışmamızda aritmi yalnızca Sisplatin uygulanan gruplarda tespit edilmiş ve diğer gruplarda aritmi seyredilmemiştir. Kardiyak değerlendirmelerde, EKG analizleri Sisplatin uygulanan gruplarda bazı elektrofizyolojik değişiklikleri ortaya koymuştur. Özellikle Sisplatin verilen grupta T dalgası negatifliğinin daha belirgin olduğu tespit

edilmiştir. Kontrol grubunda bu bulguya rastlanmamıştır. T negatifliği, literatürde ani kardiyak ölüm ve miyokardiyal repolarizasyon bozukluklarıyla ilişkilendirilmiş olup, kardiyovasküler toksisitenin bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (138). EKG bulguları arasında ST segment düzeyleri NAC+CIS uygulanan grupta diğer gruplara kıyasla daha az gözlenmiştir bu bulgu Rosic ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile uyumludur (16). PR aralığı ve QRS süresi gibi diğer parametrelerde ise NAC ile birlikte Sisplatin uygulanan grupta, yalnızca NAC verilen gruba kıyasla daha uzun QRS süresi elde edilmiştir. Bu durum, NAC'ın bazı kardiyak parametreler üzerindeki etkisinin sınırlı veya koşula bağlı olabileceğini düşündürmektedir. PR aralığı açısından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. NAC ile ilgili yapılmış çalışmalar, kardiyovasküler operasyonlarda iyileşme sürecini hızlandırdığı ve kardiyotoksik ajanların yan etkilerini azalttığını ortaya koymuştur (12). Benzer şekilde NAC'ın da antioksidan özellikleri sayesinde kalp dokusunda oksidatif stresin azaltılmasına katkı sağlayabileceği bildirilmektedir (16). Ancak, çalışmamızın 5 günlük uygulama süresinin, kardiyak parametrelerde belirgin değişiklikleri gözlemlemek açısından yetersiz kalabileceği düşünülmektedir. Araştırmamızda, deney gruplarına ait EKG kayıtları analiz edilerek aritmi, U dalgası, ST elevasyonu, PAF ve VES gibi kardiyak parametreler değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, CIS uygulamasının kardiyak fonksiyonlar üzerindeki olumsuz etkilerini ortaya koyarken, NAC tedavisinin bu etkileri azaltma potansiyeline sahip olabileceğini düşündürmektedir. Kardiyak hasarı tespit etmek için kullanılan tanısal yaklaşım ekokardiyografinin hesaplanmasıdır. Ancak bu tanı testleri özellikle erken dönemlerde kardiyak hasarın tespitinde düşük duyarlılık göstermektedir. Bu nedenle klinik ve deneysel çalışmalarda kardiyotoksisitenin tespiti için biyokimyasal belirteçler tercih edilmektedir (16). CIS grubunda aritmi insidansının yüksek olması, CIS'in kardiyotoksik etkileriyle tutarlıdır. Literatürde, CIS'in oksidatif stres ve inflamasyon mekanizmaları yoluyla miyokard hücrelerinde hasara neden olduğu ve bu durumun aritmi riskini artırabileceği belirtilmektedir (31). NAC+CIS grubunda aritmi sıklığının azalması, NAC'ın güçlü antioksidan özellikleri sayesinde oksidatif stresi baskılayarak kardiyak ritim bozukluklarını önleyebileceği düşüncesini desteklemektedir. NAC'ın sülfidril grupları aracılığıyla ROS'u nötralize ettiği ve hücrel savunma sistemlerini desteklediği bildirilmiştir (139). ST elevasyonu açısından değerlendirildiğinde, CIS grubunda en yüksek oranların gözlenmesi, bu grupta miyokardiyal hasarın daha belirgin olduğunu göstermektedir. ST elevasyonu, genellikle miyokardiyal iskemi ve inflamasyon ile ilişkilendirilmekte olup, Sisplatin'in endotelial

disfonksiyon ve mitokondriyal stres yoluyla kardiyotoksositeye neden olabileceği belirtilmektedir (140). NAC+CIS grubunda ST elevasyonunun daha az görülmesi, NAC'ın anti-enflamatuar ve hücre koruyucu etkileriyle ilişkili olabilir. NAC'ın nitrik oksit biyoyararlanımını artırarak endotel fonksiyonlarını iyileştirdiği ve bu sayede kardiyovasküler hasarı azalttığı gösterilmiştir (89). CIS grubunda U dalgası yüzdesinin en yüksek olması, CIS'in elektrolit dengesi üzerindeki olumsuz etkileriyle açıklanabilir. U dalgaları, genellikle hipokalemi ve repolarizasyon anormallikleri ile ilişkili olup, CIS'in renal fonksiyonları bozarak elektrolit dengesizliklerine yol açabileceği bilinmektedir (141). Bu bağlamda, CIS grubunda tespit edilen yüksek U dalgası oranı, hipokalemi kaynaklı repolarizasyon bozukluklarını düşündürmektedir. NAC'ın elektrolit dengesini düzenleyici etkileri tam olarak bilinmemekle beraber, oksidatif stresin azaltılması yoluyla dolaylı olarak kardiyak repolarizasyonu iyileştirebileceği öne sürülmektedir. CIS uygulanan gruplarda QRS süresinde uzama ve T dalgasında belirgin değişiklikler tespit edilmiştir. Bu bulgular, literatürde Sisplatinin kardiyak elektriksel iletim üzerinde olumsuz etkiler yaratabileceğini bildiren çalışmalarla örtüşmektedir. Ancak bu veriler, farklı kardiyolojik bozukluklarla kıyaslanarak daha geniş kapsamlı değerlendirilmelidir. Araştırmamızda, yalnızca CIS uygulanan grupta kardiyak dokuda belirgin histopatolojik hasarlar gözlemlenirken, kan basıncı değerlerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu saptanmıştır. NAC + CIS grubunda ise QRS süresinin yalnızca sisplatin grubuna kıyasla daha kısa olması, NAC'ın oksidatif stresin neden olduğu elektriksel iletim bozukluklarını hafifletebileceğini düşündürmektedir. Atriyal ve ventriküler depolarizasyon arasındaki ileti süresini yansıtan PR aralıklarında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamış, NAC uygulamasının bu parametre üzerinde belirgin bir etkisi saptanamamıştır.

Bu tezde, kalp doku örneklerinden analiz edilen MDA düzeylerine bakıldığında, Sisplatin uygulanan grupta ve Sisplatin ile birlikte NAC uygulanan grupta MDA seviyesinin kontrol ve NAC grubuna kıyasla anlamlı düzeyde arttığı gözlemlenmiştir. Sisplatin uygulamasıyla birlikte vücutta artan oksidatif stresin, lipid peroksidasyonu yoluyla MDA gibi zararlı bileşiklerin oluşumunu tetiklediği düşünülmektedir. Bu durum, doku düzeyinde gelişen oksidatif hasarın önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (142). NAC uygulamasının, Sisplatin kaynaklı artan MDA seviyesini düşürdüğü ve bu düzeyin kontrol grubuna yakınlığı tespit edilmiştir. Bu bulgu, NAC'ın güçlü antioksidan özelliği sayesinde serbest radikallerin temizlenmesine katkı sağlayarak lipid peroksidasyonunu azaltabileceğini göstermektedir. Nitekim literatürde, NAC'ın oksidatif

stres kaynaklı dokusal hasarları azalttığı ve MDA seviyelerini düşürdüğü yönünde bulgulara sıkça rastlanmaktadır (16). Bir başka çalışmada da Sisplatin uygulamasının serbest radikal üretimini artırarak oksidatif dengeyi bozduğu ve MDA düzeylerinde yükselişe neden olduğu belirtilmektedir (143). Sisplatin ile indüklenen kardiyak hasarda NAC uygulamasının MDA seviyelerini düşürmesi, bu bileşiğin kardiyak doku üzerindeki koruyucu etkisini destekler niteliktedir (36). Dolayısıyla çalışmamızda elde edilen bulgular, NAC'ın Sisplatin kaynaklı lipid peroksidasyonunu baskılayabildiğini göstermektedir. Araştırmamızda CIS+NAC grubunda MDA seviyelerinin yalnızca Sisplatin alan gruptan daha düşük olması beklenirken, CIS+NAC grubunda MDA seviyelerinin NAC+CIS grubuna göre daha yüksek bulunması dikkat çekmektedir. Bu durum, NAC'nin Sisplatin'e bağlı oksidatif stresi yeterince baskılayamadığını ya da uygulama zamanlaması ve dozuna bağlı olarak farklı bir etki mekanizması gösterebileceğini düşündürmektedir (144).

Çalışmamızda kalp doku MDA seviyelerinde gözlenen anlamlı artış, özellikle CIS ve CIS+NAC gruplarında, CIS'in kardiyotoksik etkisinin önemli bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. MDA, lipid peroksidasyonunun bir son ürünü olup hücrel düzeyde membran hasarının bir belirticidir. Bu bağlamda, CIS'in kalp dokusunda oksidatif stres oluşturduğu ve bunun NAC ile birlikte uygulanmasına rağmen tamamen baskılanamadığı görülmektedir. Özellikle CIS+NAC grubunda MDA seviyelerinin CIS ve NAC+CIS grubuna göre daha yüksek bulunması, NAC uygulama sırasının ve zamanlamasının oksidatif stres üzerindeki etkisini değiştirebileceğini düşündürmektedir.

Literatürde kalp dokusuna ait GSH düzeyleri incelendiğinde, Sisplatin grubunda GSH seviyesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azaldığı bildirilmiştir. Bu durum, Sisplatin uygulamasının oksidatif stres yaratmasının, vücudun endojen antioksidan savunma sistemini zayıflattığını göstermektedir (79). Ancak çalışmamızda GSH düzeylerinde grup arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Bu bulgu, Sisplatin uygulamasının glutatyon metabolizmasındaki etkisinin vücuttaki genel antioksidan savunma sistemini yeterince baskılayamadığını veya çalışma koşullarının oksidatif stresin yeterince yoğun olmamasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir (145).

NAC uygulanan grupta da GSH seviyelerinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Bu bulgu, NAC'ın glutatyon üretimini artırma potansiyeline rağmen, Sisplatin uygulamasının etkisinin bu düzeyde bir iyileşmeye yol açacak kadar belirgin olmadığı veya araştırmanın süresinin ve dozunun bu tür bir etkiyi gözlemlemek için yeterli olmayabileceğini düşündürmektedir. Ancak, literatürde NAC'ın antioksidan sistem

üzerinde düzenleyici etkilerinin kalp dokusunda GSH düzeylerini artırmada faydalı olduğu bildirilmiştir (12). Çalışmamızda elde edilen bulgular, NAC'ın antioksidan savunmayı güçlendirme potansiyeline rağmen, histopatolojik olarak gözlenen Sisplatin kaynaklı kardiyotoksisiteyi hafifletici etkisinin, GSH seviyelerinde gözle görülür bir değişim olmaksızın gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir. NAC'nin antioksidan etkisinin olası mekanizması, NAC'nin neden olduğu artmış GSH seviyelerinde bulunabilir. Bu, çeşitli kemoterapötik ajanların neden olduğu oksidatif stresin azaltılması yoluyla farklı antioksidanların yararlı etkisini bildiren literatür verileriyle uyumludur (16).

Oksidatif stresin önemli belirteçlerinden biri olan SOD enzimi, serbest oksijen radikallerinin zararsız hale getirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bazı çalışmalarda oksidatif stresin başlangıç evrelerinde SOD aktivitesinde geçici bir artış gözlenmişken, uzun vadede oksidatif hasarın artmasıyla birlikte enzim aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (143, 146). Çalışmamızda, Sisplatin uygulanan grupta kalp dokusundaki SOD enzim aktivitesinde anlamlı şekilde fark tespit edilememiştir. NAC uygulanan grupta da yine aynı şekilde SOD aktivitesinde anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Buna karşın kanser hücreleriyle yapılan bazı araştırmalarda yüksek konsantrasyonda antioksidan maddelerin uygulanması SOD aktivitesini azaltabilirken, düşük konsantrasyonda ise artırabilmektedir (147). Bu bulgu, NAC'ın serbest radikalleri nötralize etme potansiyeline rağmen, oksidatif stresi tamamen engellemeyebileceğini ve enzim aktivitesindeki değişimlerin belirgin olabilmesi için daha uzun süreli ve yüksek dozlu bir tedavi gerekebileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda GSH seviyeleri ve SOD aktivitesi bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmemesi, CIS'in antioksidan savunma sisteminin bazı bileşenleri üzerinde sınırlı etkiler gösterdiğini ya da bu parametrelerin dengeleme mekanizmaları tarafından korunmuş olabileceğini düşündürmektedir. GSH, önemli bir hücre içi antioksidan olup CIS ile ilişkili oksidatif hasara karşı hücrel savunmada rol oynamaktadır. Ancak elde edilen bulgular, GSH seviyelerinin CIS uygulamasına rağmen sabit kalabildiğini göstermektedir.

Bir diğer çalışmada uygulanan kronik sisplatin tedavisi, kontrol grubuna kıyasla kan GSH ve SOD seviyelerini önemli ölçüde düşürdüğü bildirilmiştir (16). GSH'nin hücre geçirgen bir öncüsü olarak NAC'nin yararlı etkilerinin, hücre içi GSH'nin artışıyla veya yüksek hücre içi GSH seviyelerini sürdürme yeteneğiyle ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Üstelik, NAC'nin koruyucu etkisini kısmen doğrudan ROS'u temizleyerek ve kısmen ERK1/2 aktivasyonu yoluyla gösterdiği bildirilmiştir (148). Bu durum

NAC'nin sisteinil tiyolünün antioksidan özelliklerini sağladığını düşündürmektedir. Rosic ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, NAC uygulamasının tek başına kalpteki glutasyon seviyesini ve GPx ve GR'nin aktivitesini değiştirmede gösterilmiştir (149). Uygulanan dozda NAC'nin kalpte redoks glutasyon aracılı etkilerle değil, ROS'u azaltan kendi antioksidan özellikleriyle (NAC'nin kendisi serbest SH grubu olan güçlü bir antioksidandır) çalıştığı ile ilişkilendirilmektedir. NAC tedavisinin hem tek başına hem de sislipatin tedavisiyle birlikte uygulanmasının kalpteki H₂O₂ ve süperoksit düzeylerini azalttığı gerçeğiyle desteklenmektedir. Sislipatin tedavisinin, ROS salınımının artması da dahil olmak üzere, redoks homeostazı üzerindeki olumsuz etkisi daha önce gözlemlenmiştir (150). Ayrıca, Sislipatin uygulamasının antioksidan enzim aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (143). Dokulardaki redoks durumunun sislipatin etkisinin her iki mekanizması da oksidatif hasarın artmasına yol açar ve Sislipatin kaynaklı toksisiteyi azaltmak için NAC ve diğerleri gibi antioksidan takviyesine olan ihtiyacı güçlü bir şekilde destekler niteliktedir (151).

Bir diğer önemli antioksidan savunma enzimi olan katalaz, hidrojen peroksit gibi zararlı reaktif oksijen türlerinin suya dönüştürülmesinde görev almaktadır (152). Oksidatif stresin arttığı durumlarda, özellikle ilaç kaynaklı toksisite modellerinde katalaz aktivitesinde artış bildirilmektedir (33). Çalışmamızda, Sislipatin uygulanan gruplarda kalp dokusu katalaz aktivitesinin yüksek olması da literatürle benzerdir. Truong ve arkadaşları yaptıkları araştırmalarında, SOD seviyelerinin arttığını ve bu durumun artan antioksidan tepki nedeniyle bir risk oluşturabileceğini öne sürmüştür (41). Bu durum, Sislipatin uygulamasının oksidatif stres oluşturduğunu gösterebilmektedir. Yüksek katalaz aktivitesi, hücrelerin oksidatif stresle mücadele etmeye çalıştığını ve bu enzimin toksisiteye karşı savunma mekanizmasında önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. NAC uygulanan grupta ise katalaz aktivitesinin, sislipatin grubuna kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir, ancak bu artış da istatistiksel olarak anlamlı değildir. Literatürde, bazı çalışmalar NAC'ın katalaz aktivitesini doğrudan artırabileceğini bildirirken, bazıları bu enzimin NAC'tan daha az etkilendiğini belirtmektedir (16, 87). Bulgularımız da bu çelişkili literatürle paralellik göstermektedir. Ancak, kalp dokusu katalaz aktivitesinin CIS, NAC+CIS ve CIS+NAC gruplarında kontrol ve NAC gruplarına göre anlamlı düzeyde artış göstermesi, oksidatif stresin artışına karşı hücre adaptasyon gelişmiş olabileceğini düşündürmektedir (153). Ayrıca NAC'ın ön uygulama veya eş zamanlı verilmesine rağmen CAT aktivitesindeki artışın devam etmesi, CIS'in kardiyak doku

üzerinde oluşturduğu stresin güçlü olduğunu ve antioksidan savunma sisteminin bu duruma cevap verdiğini ortaya koymaktadır.

Troponin ve Miyogloblin, kardiyak dokuya özgü biyobelirteçler arasında yer almakta olup, özellikle kardiyomiyosit hasarı durumlarında serum düzeylerinde artış gözlemlenmektedir. Oksidatif stresin, hücrel hasarın ve enflamatuvar süreçlerin eşlik ettiği kardiyotoksik durumlarda bu biyobelirteçlerin düzeyleri, doku zedelenmesini göstermek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (62, 83). Sisplatin'in kalp dokusu üzerinde oluşturabileceği potansiyel toksik etkiler, literatürde troponin ve miyogloblin gibi kardiyak belirteçlerin artışıyla ilişkilendirilmiştir (154). Ancak çalışmamızda, Troponin ve Miyogloblin gen ifade seviyelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Bu durum, Sisplatin uygulamasının kardiyomiyosit düzeyinde anlamlı bir doku hasarı oluşturmadığını veya çalışma süresinin bu tür bir hasarı yansıtacak düzeyde olmadığını düşündürmektedir. Aynı zamanda, NAC uygulanan grupta da bu belirteçlerin ifadesinde anlamlı bir farklılık izlenmemiştir. Bu bulgu, NAC'ın kardiyoprotektif etkilerinin gen düzeyinde belirgin bir değişim oluşturmamış olabileceğini göstermektedir.

P53, hücrel stres ve DNA hasarı karşısında aktive olan bir tümör baskılayıcı gen olup, apoptozun düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır (45). Sisplatin'in, DNA hasarı oluşturarak p53 aracılığıyla hücre ölümünü tetiklediği deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (52). Ancak çalışmamızda P53 gen ifade seviyelerinde gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu durum, Sisplatin uygulamasının kalp dokusunda P53 aracılı bir apoptoz yanıtını tetiklememiş olabileceğini veya yanıtın zamansal olarak farklı bir periyotta ortaya çıktığını düşündürmektedir. Aynı şekilde, NAC uygulamasının da P53 ifadesi üzerinde anlamlı bir etkisi tespit edilmemiştir. Literatürde NAC'ın P53 aktivitesini baskılayabileceğine yönelik bazı bulgular mevcut olsa da, çalışmamızda bu etki istatistiksel düzeyde ortaya konulamamıştır (155). Yapılan çalışmalarda, kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçlardan kaynaklı kardiyotoksistide, pifithrin- α , p53 ve onun fosforile edilmiş formunun seviyelerini değiştirmeden, Bax ve MDM2 protein seviyelerinin yükselmesini azaltarak, apoptozla ilişkili kalp disfonksiyonu değişikliklerini iyileştirdiği ortaya konulmuştur (156). Bununla tutarlı olarak, bir in vitro çalışma, pifithrin- α 'nın, Bcl-2 proteininin indirgenmesini engellemenin yanı sıra, Bax, PUMA- α 'yı aşağı düzenleyerek ve kaspaz-3'ü parçalayarak doksorubisin kaynaklı H9c2 hücre apoptozunu azalttığını ortaya koymaktadır (157, 158). Araştırmamızda gen ifade analizlerinde Troponin, Miyogloblin ve P53 gen ifadeleri açısından gruplar arasında

anlamli bir fark gözlenmemiştir. Bu durum, sisplatinin kardiyotoksik etkilerinin transkripsiyonel düzeyde belirgin bir değişikliğe yol açmadığını veya gen ifadesi üzerindeki etkilerinin belirli bir zaman diliminde ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir.

Araştırmamızda Serum örneklerinden ELISA yöntemi ile ölçülen Troponin ve Miyogloblin seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Bu sonuç, sisplatinin akut dönemde belirgin miyokardiyal hücre hasarına yol açmadığını düşündürmektedir. Bununla birlikte, P53 protein seviyelerinin sadece sisplatin uygulanan grupta belirgin bir artış göstermesi, sisplatinin kardiyotoksikite mekanizmasında P53 aracılı hücrel ölüm mekanizmalarının aktif olabileceğini destekler niteliktedir (159). Ancak, qPCR analizlerinde P53 gen ifadesinde anlamlı bir farklılık gözlenmemesi, translasyon sonrası düzenlemelerin ve protein mekanizmalarının bu süreçte rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, Sisplatin kaynaklı kardiyotoksitenin sınırlı düzeyde kaldığını veya ölçüm zamanlamasının protein düzeylerindeki değişimi yakalayacak uygunlukta olmadığını düşündürmektedir. Aynı şekilde, NAC tedavisi uygulanan grupta da bu protein düzeylerinde belirgin bir farklılık izlenmemiştir. NAC'ın kardiyoprotektif etkileri literatürde sıklıkla vurgulansa da, çalışmamızda bu etkinin troponin ve miyogloblin protein düzeylerine anlamlı düzeyde yansımadağı gözlemlenmiştir (160). Çalışmamızda yalnızca Sisplatin uygulanan grupta serum p53 protein düzeylerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Nitekin, Xiu ve arkadaşlarının küçük hücreli kanser hücreleriyle yaptığı çalışmada Sisplatin'in p53 aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir (161). Bu artış, Sisplatin'in hücrel DNA hasarını tetikleme sonucu apoptozun uyarıldığını ve p53 aracılı bir hücrel yanıtın devreye girdiğini düşündürmektedir. NAC tedavisi ile birlikte p53 protein düzeylerinde Sisplatin grubuna kıyasla azalma eğilimi gözlenmiş, ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durum, NAC'ın oksidatif stres üzerindeki düzenleyici etkisinin p53 protein yanıtını sınırlı ölçüde baskıladığını gösterebilir. NAC'ın antioksidan özelliklerinin yanı sıra bazı çalışmalarda p53 üzerinden apoptotik yanıtı modüle edebildiği bildirilmektedir (161). Ancak çalışmamızda bu etkinin protein düzeyine yansımadağı, muhtemelen uygulama süresi, dozaj ve Sisplatin kaynaklı stresin şiddeti gibi parametrelere bağılı olarak değişiklik göstermiştir. Çalışmamızda troponin ve miyogloblin protein düzeylerinde anlamlı değişiklikler gözlenmemekle birlikte, p53 protein düzeyindeki artış Sisplatin kaynaklı hücrel hasar ve apoptoz sürecini literatür ile uyumlu olarak destekler niteliktedir (56). NAC'ın bu süreci sınırlandırıcı etkisi tam olarak istatistiksel düzeyde ortaya konamasa da, p53 protein seviyesindeki baskılanma eğilimi,

antioksidan tedavilerin bu mekanizma üzerindeki potansiyel koruyucu etkisini düşündürmektedir. Bu bulgular, yalnızca gen ifade düzeylerinin değil, protein düzeyindeki biyolojik değişimlerin de değerlendirilmesinin toksisite çalışmalarında önemli olduğunu düşündürmektedir. Hücresel stres yanıtlarında önemli rol oynayan p53 proteininin ekspresyonunun düzenlenmesi yoluyla, NAC'ın apoptoz mekanizmaları üzerinde de koruyucu bir etkisi olabileceği öne sürülmektedir (14).

Histopatolojik incelemeler, Sisplatinin kalp dokusunda belirgin hasara yol açtığını ortaya koymuştur. Kontrol ve NAC gruplarında kardiyak dokunun genel olarak normal histolojik yapısını koruduğu gözlenirken, CIS grubunda yaygın hemoraji, interstisyel ödem ve nekrotik kardiyomiyositlerin varlığı dikkat çekmiştir. Ayrıca, sisplatin grubunda sitoplazmik eozinofili artışı ve piknotik nükleuslu kardiyomiyositlerin yaygın olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, sisplatinin kardiyotoksisite mekanizmasında nekrotik hücre ölümü ve vasküler hasarın önemli rol oynayabileceğini göstermektedir (162). Sisplatine ek olarak NAC verilen gruplarda, kardiyak hasarın azaldığı gözlenmiştir. NAC+CIS grubunda hemorajide anlamlı bir azalma tespit edilmesine rağmen, ödem ve kardiyomiyosit dejenerasyonundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. CIS+NAC grubunda ise tüm histopatolojik değişikliklerin belirgin şekilde azaldığı saptanmıştır. Bununla birlikte, CIS+NAC ve NAC+CIS grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmaması, NAC'nin koruyucu etkisinin uygulama zamanlaması ve biyoyararlanımı (ilacın uygulandığı formdan sistemik dolaşıma geçerek hedef dokulara ulaşabilme oranını ve hızını ifade eder) gibi faktörlerden etkilenebileceğini düşündürmektedir (163).

Sisplatin kullanımının, hem insan hem de hayvan çalışmalarına ait derlemelere bakıldığında, kardiyotoksisteye yol açtığı ortaya konmuştur (3). Kardiyotoksisite durumunda dolaşımda artan serbest radikallerin troponin ve miyogloblin ile birlikte kalp hasarını tetiklediği ve devamında P53 aktivitesinin arttığı, dolayısıyla sisplatin direncinin geliştiği bilinmektedir (154, 164). Sisplatin, kalp kası hücrelerinde ROS üretimini arttırmakta ve GSH, SOD ve CAT seviyelerinin yanı sıra diğer doğal olarak oluşan antioksidan seviyelerini düşürmektedir (3). Bu nedenle tedavinin tamamlanması sırasında veya sonrasında kardiyak bozuklukların gelişmesi ciddi bir sorundur ve bu konudaki temel sorular kardiyotoksistenin gelişmesinin nasıl öngörülebileceğidir (165). Sisplatinin çeşitli dokularda oksidatif hasara neden olduğu bildirildiği için, sisplatin toksisitelerinin azaltılması için NAC takviyesinin potansiyel terapötik yaklaşım olarak araştırılması uygun görülmektedir (12).

Birçok deneysel çalışmada, NAC'ın Sisplatin kaynaklı kardiyotoksisite üzerindeki etkisi incelenmiştir. Araştırmalar, NAC tedavisinin sisplatinle indüklenen oksidatif hasarı önemli ölçüde azaltabildiğini ve kalp fonksiyonlarını koruduğunu göstermektedir (12, 16). Bunun yanı sıra, NAC'ın inflamasyonu baskılayıcı etkisi ve apoptotik süreçleri engellemeye yönelik rolü de dikkat çekicidir. Bu bulgular, NAC'ın kardiyotoksisiteyi önlemek için etkili bir strateji olabileceğini göstermektedir (165). Ancak, NAC'ın sisplatin kardiyotoksisitesine karşı etkinliğini daha iyi anlayabilmek için daha fazla klinik ve prelinik araştırma gerekmektedir (16). Örneğin, NAC'ın farklı dozajlarının ve tedavi sürelerinin kardiyotoksisite üzerindeki etkileri hala net bir şekilde belirlenmemiştir. Ayrıca, NAC'ın uzun süreli kullanımıyla ilgili güvenilirliğinin ve olası yan etkilerinin de araştırılması gerekmektedir (16, 165). Literatürde NAC'ın yalnızca antioksidan savunma sistemini desteklemekle kalmayıp aynı zamanda hücresel düzeyde inflamasyon ve oksidatif stres yanıtlarını da modüle edebildiği bildirilmektedir (91). NAC'ın serbest radikalleri nötralize edebilme kapasitesi sayesinde, mitokondriyal fonksiyonları koruduğu ve metabolik süreçleri dengeleyebildiği gösterilmiştir (87). Bu yönüyle NAC, Sisplatin'in neden olduğu kardiyak ve metabolik yan etkileri baskılamada potansiyel bir ajan olarak değerlendirilmektedir (16). Ayrıca, sisplatinle birlikte oksidatif stresin artması sonucu antioksidan savunma sistemine ait enzimlerde (SOD, CAT vb.) dengesizlikler oluşabileceği de önceki araştırmalarla ortaya konmuştur. Çalışmamızda, NAC+CIS grubunda MDA düzeylerinin kontrol grubuna yakın seviyelerde olması, NAC'ın antioksidan etkisiyle oksidatif stresin baskılandığını düşündürmektedir. NAC'ın sülfidril grubu içeriği sayesinde reaktif oksijen türlerini nötralize ederek hücresel lipid peroksidasyonunu azalttığı bilinmektedir. Bu etkinin bir sonucu olarak, CIS kaynaklı kardiyotoksisiteye karşı koruyucu rol üstlenmiş olabilir. Nitekim, pek çok deneysel ve klinik çalışmada NAC takviyesinin çeşitli doku ve organlardaki oksidatif hasarı azalttığı, MDA düzeylerinde düşüş sağladığı ve antioksidan savunma sistemini desteklediği rapor edilmiştir (12, 143).

Bu tez çalışması; Sisplatin uygulamasının kardiyak dokuda belirgin oksidatif stres, histopatolojik hasar ve hemodinamik değişiklikler gibi kardiyotoksik etkilere yol açabileceğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, NAC uygulamasının bu olumsuz etkileri belirli düzeyde hafiflettiği gözlemlenmiştir. NAC, özellikle ROS'u nötralize etme kapasitesi sayesinde oksidatif stresin azaltılmasında ve lipid peroksidasyonunun baskılanmasında etkili olmuştur. Ayrıca, bazı kardiyak parametrelerin korunmasında ve doku bütünlüğünün sürdürülmesinde NAC'ın koruyucu bir rol üstlendiği belirlenmiştir.

NAC'ın bu etkileri, antioksidan savunma sistemini destekleyici yapısı ve serbest radikallerin etkilerini baskılayıcı özellikleri ile ilişkilendirilmektedir. Literatürde de belirtildiği üzere, NAC yalnızca glutatyon üretimini desteklemekle kalmayıp aynı zamanda iltihabı azaltıcı ve hücreleri koruyucu özelliklere sahip bir bileşen olarak da işlev görmektedir (12). Ayrıca NAC'ın, oksidatif stresle ilişkili iyon kanalları üzerinde dengeleyici etkiler gösterebildiği, aşırı aktivasyonlarını baskılayarak hücrel hasarı azaltabileceği bildirilmektedir. Çalışmamızda da NAC'ın kardiyak dokuda oksidatif stres kaynaklı zararı azaltarak, potansiyel bir kalp dokusunu koruyucu ajan olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Son çalışmalar, Sisplatin uygulamasının ROS aşırı üretiminin uyarılması ve antioksidan enzim aktivitesinin azaltılması yoluyla redoks homeostazını bozduğunu göstermiştir (12, 149). Bu durum, Sisplatin'in neden olduğu toksik etkilere karşı, NAC gibi serbest radikalleri temizleyen ve antioksidan özellik taşıyan ajanların kullanımını güçlü şekilde desteklemektedir. Ancak, mevcut verilerin büyük bölümü böbrek dokusu üzerinde yürütülen deneysel ve klinik çalışmalara dayanmaktadır. Sisplatin'in kalp kası üzerindeki etkilerine ilişkin bulgular ise hala tutarsız ve yetersiz görülmektedir (16).

NAC, Sisplatin kaynaklı kardiyotoksisiteye karşı etkili ve güvenli bir destekleyici ajan olabilir. Antioksidan ve anti-enflamatuvar özellikleriyle NAC, bu tür kemoterapiye bağlı komplikasyonları önleyebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın bulguları N-asetilsisteinin deneysel Sisplatin kardiyotoksitesisi üzerinde kısmen koruyucu etki gösterdiği ortaya konulmuştur. Sisplatin uygulanan sıçanlarda gözlemlenen vücut ağırlığı azalışı, oksidatif stres artışı gibi kardiyotoksitesiyi tetikleyen ve Sisplatin kullanımını sonrası ortaya çıkabilecek kalp hasarına yönelik tedavilerin anlaşılması açısından önemli veriler sunmuştur.

Sisplatin'in N-asetilsistein ile birlikte uygulanması, vücut ağırlığını gibi bazı metabolik parametreleri olumlu yönde etkileyebilmektedir. Ayrıca, N-asetilsistein'in oksidatif stresle başa çıkma konusundaki potansiyel faydaları, özellikle MDA ve CAT seviyeleri üzerindeki etkileriyle gözlemlenmiştir.

NAC uygulamasının daha önce verilmesinin kalp dokusu üzerinde daha önemli olduğu tespit edilmiştir. Klinikte kemoterapotik ajan olarak Sisplatin verilecek hastalara NAC'in Sisplatin öncesi verilmesi tavsiye edilebilir.

Çalışmamız NAC uygulamasının Sisplatin'e bağlı oksidatif stres üzerindeki etkileri kısmen gözlemlenmiş, histopatolojik bulgular ise NAC'nin sisplatin kaynaklı kalp hasarını belirli ölçüde hafiflettiğini göstermiştir. Ancak, kardiyak biyobelirteçler ve gen ifadeleri üzerinde belirgin bir etki ortaya konulamamıştır. NAC'nin antioksidan etkilerinin sisplatinin kardiyotoksitesite mekanizmaları üzerindeki tam etkisini belirleyebilmek için farklı doz ve uygulama zamanlamalarını içeren ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Chen YF, Qi RQ, Zhao L, Liang LR, Song JW, Zhou XY, et al. Aprocitentan mitigates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting cuproptosis, oxidative stress, and mitochondrial impairments via the activation of sirtuin 7. *Int Immunopharmacol.* 2025;148:114141.
2. Matovic V, Ljubic B, Radojevic I, Delic G, Kovacevic MM, Zivanovic S, et al. *Trapa natans* L. Extract Attenuates Inflammation and Oxidative Damage in Cisplatin-Induced Cardiotoxicity in Rats by Promoting M2 Macrophage Polarization. *Mediators Inflamm.* 2025;2025:6587305.
3. Gur FM, Bilgic S, Aktas I. Lutein, a non-provitamin A carotenoid, reduces cisplatin-induced cardiotoxicity. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2025;177:106965.
4. Zare-Zardini H, Hedayati-Goudarzi MT, Alizadeh A, Sadeghian-Nodoushan F, Soltaninejad H. A review of cardioprotective effect of ginsenosides in chemotherapy-induced cardiotoxicity. *Biomed Eng Online.* 2024;23(1):128.
5. Somdas MA, Gunturk I, Balcioglu E, Avci D, Yazici C, Ozdamar S. Protective effect of N-acetylcysteine against cisplatin ototoxicity in rats: a study with hearing tests and scanning electron microscopy. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2020;86(1):30-7.
6. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene.* 2012;31(15):1869-83.
7. Abudalo R, Gammoh O, Altaber S, Bseiso Y, Qnais E, Wedyan M, et al. Mitigation of cisplatin-induced cardiotoxicity by Isorhamnetin: Mechanistic insights into oxidative stress, inflammation, and apoptosis modulation. *Toxicol Rep.* 2024;12:564-73.
8. Gunturk I, Ozmen R, Ozocak O, Gunturk EE, Dagli F, Yazici C. The Systemic Immune-Inflammation Index Predicts In-Hospital Mortality in Patients Who Underwent On-Pump Cardiac Surgery. *Arq Bras Cardiol.* 2024;121(4):e20230245.
9. Ananthan K, Lyon AR. The Role of Biomarkers in Cardio-Oncology. *J Cardiovasc Transl Res.* 2020;13(3):431-50.

10. Chan SHY, Khatib Y, Webley S, Layton D, Salek S. Identification of cardiotoxicity related to non-small cell lung cancer (NSCLC) treatments: A systematic review. *Front Pharmacol.* 2023;14:1137983.
11. Florea AM, Busselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel).* 2011;3(1):1351-71.
12. Gunturk EE, Yucel B, Gunturk I, Yazici C, Yay A, Kose K. The effects of N-acetylcysteine on cisplatin induced cardiotoxicity. *Bratisl Lek Listy.* 2019;120(6):423-8.
13. Eker A, Eraslan G. Single and combined effect of chrysin and N-acetylcysteine against deltamethrin exposure in rats. *Food Chem Toxicol.* 2025;196:115191.
14. Zhu X, Yuan F, Sun Q, Yang C, Jiang H, Xiang X, et al. N-acetylcysteine remodels the tumor microenvironment of primary and recurrent mouse glioblastoma. *J Neurooncol.* 2025.
15. Wang Y, Wang A, Zhao G, Liu S, Li K, Li W, et al. Glutathione conjugation and protein modification resulting from metabolic activation of pesticide metalaxyl in vitro and in vivo. *Pestic Biochem Physiol.* 2023;196:105606.
16. Rosic G, Srejovic I, Zivkovic V, Selakovic D, Joksimovic J, Jakovljevic V. The effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced cardiotoxicity on isolated rat hearts after short-term global ischemia. *Toxicol Rep.* 2015;2:996-1006.
17. Chaudhry R, Miao JH, Rehman A. *Physiology, Cardiovascular.* StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Julia Miao declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Afzal Rehman declares no relevant financial relationships with ineligible companies.2025.
18. Men H, Cai H, Cheng Q, Zhou W, Wang X, Huang S, et al. The regulatory roles of p53 in cardiovascular health and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(5):2001-18.
19. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest.* 2013;123(1):92-100.
20. Brade T, Pane LS, Moretti A, Chien KR, Laugwitz KL. Embryonic heart progenitors and cardiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(10):a013847.

21. Rawat PS, Jaiswal A, Khurana A, Bhatti JS, Navik U. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. *Biomed Pharmacother.* 2021;139:111708.
22. Guo Y, Tang Y, Lu G, Gu J. p53 at the Crossroads between Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity and Resistance: A Nutritional Balancing Act. *Nutrients.* 2023;15(10).
23. Orhan H. Extrahepatic targets and cellular reactivity of drug metabolites. *Curr Med Chem.* 2015;22(4):408-37.
24. Karrar HR, Nouh MI, Alnami AA, Alrasheedi BE, Alrwilli SR, Durbashi NA, et al. Recent Advances and Perspectives of Atherosclerotic Occlusive Disease. *Ann Afr Med.* 2025;24(2):220-4.
25. Mamoshina P, Rodriguez B, Bueno-Orovio A. Toward a broader view of mechanisms of drug cardiotoxicity. *Cell Rep Med.* 2021;2(3):100216.
26. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature.* 1969;222(5191):385-6.
27. 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.
28. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(8):573-84.
29. Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans.* 2010;39(35):8113-27.
30. Russo C, Ma L, Johnson WR, Singaraju R. Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury and Renal Salt Wasting Syndrome. *Fed Pract.* 2021;38(12):606-11a.
31. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014;740:364-78.
32. Zhao T, King FL. A mass spectrometric comparison of the interactions of cisplatin and transplatin with myoglobin. *J Inorg Biochem.* 2010;104(2):186-92.
33. Yonezawa A, Masuda S, Yokoo S, Katsura T, Inui K. Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319(2):879-86.
34. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(4):307-20.

35. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7265-79.
36. Kumar S, Tchounwou PB. Molecular mechanisms of cisplatin cytotoxicity in acute promyelocytic leukemia cells. *Oncotarget*. 2015;6(38):40734-46.
37. Al-Lbban AM. Role of zinc oxide nanoparticles supplementation on alleviate side effects of cisplatin induced cardiotoxicity in rats. *Braz J Biol*. 2025;84:e287764.
38. Liu CJ, Wang LK, Tsai FM. The Application and Molecular Mechanisms of Mitochondria-Targeted Antioxidants in Chemotherapy-Induced Cardiac Injury. *Curr Issues Mol Biol*. 2025;47(3).
39. Guchelaar HJ, Uges DR, de Vries EG, Oosterhuis JW, Mulder NH. Combination therapy with cisplatin: modulation of activity and tumour sensitivity. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 1992;4(6):388-93.
40. Hong Y, Che S, Hui B, Wang X, Zhang X, Ma H. Combination Therapy of Lung Cancer Using Layer-by-Layer Cisplatin Prodrug and Curcumin Co-Encapsulated Nanomedicine. *Drug Des Devel Ther*. 2020;14:2263-74.
41. Truong J, Yan AT, Cramarossa G, Chan KK. Chemotherapy-induced cardiotoxicity: detection, prevention, and management. *Can J Cardiol*. 2014;30(8):869-78.
42. Altena R, Perik PJ, van Veldhuisen DJ, de Vries EG, Gietema JA. Cardiovascular toxicity caused by cancer treatment: strategies for early detection. *Lancet Oncol*. 2009;10(4):391-9.
43. Linschoten M, Teske AJ, Cramer MJ, van der Wall E, Asselbergs FW. Chemotherapy-Related Cardiac Dysfunction: A Systematic Review of Genetic Variants Modulating Individual Risk. *Circ Genom Precis Med*. 2018;11(1):e001753.
44. Speidel D. The role of DNA damage responses in p53 biology. *Arch Toxicol*. 2015;89(4):501-17.
45. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(4):275-83.
46. Dong Y, Chen H, Gao J, Liu Y, Li J, Wang J. Molecular machinery and interplay of apoptosis and autophagy in coronary heart disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2019;136:27-41.
47. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*. 2003;22(56):9030-40.

48. Delbridge AR, Grabow S, Strasser A, Vaux DL. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(2):99-109.
49. Schwartz D, Rotter V. p53-dependent cell cycle control: response to genotoxic stress. *Semin Cancer Biol*. 1998;8(5):325-36.
50. Rhinn M, Ritschka B, Keyes WM. Cellular senescence in development, regeneration and disease. *Development*. 2019;146(20).
51. Fujita K. p53 Isoforms in Cellular Senescence- and Ageing-Associated Biological and Physiological Functions. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23).
52. Xi Y, Wang W, Wang L, Pan J, Cheng Y, Shen F, et al. Triptolide induces p53-dependent cardiotoxicity through mitochondrial membrane permeabilization in cardiomyocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018;355:269-85.
53. Li J, Wang PY, Long NA, Zhuang J, Springer DA, Zou J, et al. p53 prevents doxorubicin cardiotoxicity independently of its prototypical tumor suppressor activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(39):19626-34.
54. Sano M, Minamino T, Toko H, Miyauchi H, Orimo M, Qin Y, et al. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature*. 2007;446(7134):444-8.
55. Levine AJ. p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(8):471-80.
56. Jiang M, Yi X, Hsu S, Wang CY, Dong Z. Role of p53 in cisplatin-induced tubular cell apoptosis: dependence on p53 transcriptional activity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;287(6):F1140-7.
57. Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(10):701-13.
58. Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev*. 2000;80(2):853-924.
59. Missov E, Calzolari C, Pau B. Circulating cardiac troponin I in severe congestive heart failure. *Circulation*. 1997;96(9):2953-8.
60. Antman EM. The Introduction and Clinical Use of Cardiac-Specific Troponin Assays. *Clin Pharmacol Ther*. 2018;103(1):31-3.
61. Apple FS, Collinson PO, Biomarkers ITFoCAoC. Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays. *Clin Chem*. 2012;58(1):54-61.

62. Adamcova M, Sterba M, Simunek T, Potacova A, Popelova O, Mazurova Y, et al. Troponin as a marker of myocardial damage in drug-induced cardiotoxicity. *Expert Opin Drug Saf.* 2005;4(3):457-72.
63. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2012;33(20):2551-67.
64. Lyon AR, Dent S, Stanway S, Earl H, Brezden-Masley C, Cohen-Solal A, et al. Baseline cardiovascular risk assessment in cancer patients scheduled to receive cardiotoxic cancer therapies: a position statement and new risk assessment tools from the Cardio-Oncology Study Group of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology in collaboration with the International Cardio-Oncology Society. *Eur J Heart Fail.* 2020;22(11):1945-60.
65. Sorodoc V, Sirbu O, Lionte C, Haliga RE, Stoica A, Ceasovschih A, et al. The Value of Troponin as a Biomarker of Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity. *Life (Basel).* 2022;12(8).
66. Battisha A, Sawalha K, Obeidat Y, Patel B. Role of Cardiac Biomarkers in Monitoring Cardiotoxicity in Chemotherapy Patients. *Crit Pathw Cardiol.* 2023;22(3):83-7.
67. Baigent C, Landray MJ, Reith C, Emberson J, Wheeler DC, Tomson C, et al. The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2011;377(9784):2181-92.
68. Eschenhagen T, Force T, Ewer MS, de Keulenaer GW, Suter TM, Anker SD, et al. Cardiovascular side effects of cancer therapies: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail.* 2011;13(1):1-10.
69. Haller MJ, Long SA, Blanchfield JL, Schatz DA, Skyler JS, Krischer JP, et al. Low-Dose Anti-Thymocyte Globulin Preserves C-Peptide, Reduces HbA(1c), and Increases Regulatory to Conventional T-Cell Ratios in New-Onset Type 1 Diabetes: Two-Year Clinical Trial Data. *Diabetes.* 2019;68(6):1267-76.
70. Cartas-Espinel I, Telechea-Fernandez M, Manterola Delgado C, Avila Barrera A, Saavedra Cuevas N, Riffo-Campos AL. Novel molecular biomarkers of cancer therapy-induced cardiotoxicity in adult population: a scoping review. *ESC Heart Fail.* 2022;9(3):1651-65.

71. Kanatous SB, Mammen PP. Regulation of myoglobin expression. *J Exp Biol.* 2010;213(Pt 16):2741-7.
72. Radulescu LM, Radulescu D, Ciuleanu TE, Crisan D, Buzdugan E, Romitan DM, et al. Cardiotoxicity Associated with Chemotherapy Used in Gastrointestinal Tumours. *Medicina (Kaunas).* 2021;57(8).
73. Liu H, Zhang N, Cui M, Liu Z, Liu S. Mass spectrometry based strategy for studies of binding sites and structural changes of cisplatin binding to myoglobin. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2016;30(22):2433-41.
74. Wickramasinghe CD, Nguyen KL, Watson KE, Vorobiof G, Yang EH. Concepts in cardio-oncology: definitions, mechanisms, diagnosis and treatment strategies of cancer therapy-induced cardiotoxicity. *Future Oncol.* 2016;12(6):855-70.
75. Matyas C, Erdelyi K, Trojnar E, Zhao S, Varga ZV, Paloczi J, et al. Interplay of Liver-Heart Inflammatory Axis and Cannabinoid 2 Receptor Signaling in an Experimental Model of Hepatic Cardiomyopathy. *Hepatology.* 2020;71(4):1391-407.
76. Majerczak J, Drzymala-Celichowska H, Grandys M, Kij A, Kus K, Celichowski J, et al. Exercise Training Decreases Nitrite Concentration in the Heart and Locomotory Muscles of Rats Without Changing the Muscle Nitrate Content. *J Am Heart Assoc.* 2024;13(2):e031085.
77. Nguyen HC, Qadura M, Singh KK. Role of the Fatty Acid Binding Proteins in Cardiovascular Diseases: A Systematic Review. *J Clin Med.* 2020;9(11).
78. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *J Am Coll Cardiol.* 2018;72(18):2231-64.
79. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int.* 2008;73(9):994-1007.
80. Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci.* 2007;334(2):115-24.
81. Flögel U, Godecke A, Klotz LO, Schrader J. Role of myoglobin in the antioxidant defense of the heart. *FASEB J.* 2004;18(10):1156-8.
82. Taylor DJ, Matthews PM, Radda GK. Myoglobin-dependent oxidative metabolism in the hypoxic rat heart. *Respir Physiol.* 1986;63(3):275-83.
83. Merx MW, Flögel U, Stumpe T, Godecke A, Decking UK, Schrader J. Myoglobin facilitates oxygen diffusion. *FASEB J.* 2001;15(6):1077-9.

84. Prescott LF, Illingworth RN, Critchley JA, Stewart MJ, Adam RD, Proudfoot AT. Intravenous N-acetylcysteine: the treatment of choice for paracetamol poisoning. *Br Med J.* 1979;2(6198):1097-100.
85. Saravanan N, Senthil D, Varalakshmi P. Effect of L-cysteine on lipid peroxidation in experimental urolithiatic rats. *Pharmacol Res.* 1995;32(3):165-9.
86. Eghtedari Y, Oh LJ, Girolamo ND, Watson SL. The role of topical N-acetylcysteine in ocular therapeutics. *Surv Ophthalmol.* 2022 Mar-Apr;67(2):608-622.
87. Ronis MJ, Butura A, Sampey BP, Shankar K, Prior RL, Korourian S, et al. Effects of N-acetylcysteine on ethanol-induced hepatotoxicity in rats fed via total enteral nutrition. *Free Radic Biol Med.* 2005;39(5):619-30.
88. Zavala-Valencia AC, Velasco-Hidalgo L, Martinez-Avalos A, Castillejos-Lopez M, Torres-Espindola LM. Effect of N-Acetylcysteine on Cisplatin Toxicity: A Review of the Literature. *Biologics.* 2024;18:7-19.
89. Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(8):4117-29.
90. Ershad M, Naji A, Patel P, Vearrier D. N-Acetylcysteine. *StatPearls.* Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Abdullah Naji declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Preeti Patel declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: David Vearrier declares no relevant financial relationships with ineligible companies. 2025.
91. Pedre B, Barayeu U, Ezerina D, Dick TP. The mechanism of action of N-acetylcysteine (NAC): The emerging role of H₂S and sulfane sulfur species. *Pharmacol Ther.* 2021;228:107916.
92. Arslan C, Aksoy S, Dizdar O, Dede DS, Harputluoglu H, Altundag K. Zoledronic acid and atrial fibrillation in cancer patients. *Support Care Cancer.* 2011;19(3):425-30.
93. Sheffner AL. The reduction in vitro in viscosity of mucoprotein solutions by a new mucolytic agent, N-acetyl-L-cysteine. *Ann N Y Acad Sci.* 1963;106:298-310.
94. Tenorio M, Graciliano NG, Moura FA, Oliveira ACM, Goulart MOF. N-Acetylcysteine (NAC): Impacts on Human Health. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(6).

95. Liu Y, Hyde AS, Simpson MA, Barycki JJ. Emerging regulatory paradigms in glutathione metabolism. *Adv Cancer Res.* 2014;122:69-101.
96. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med.* 2009;30(1-2):1-12.
97. Oestreicher J, Morgan B. Glutathione: subcellular distribution and membrane transport (1). *Biochem Cell Biol.* 2019;97(3):270-89.
98. Mari M, Colell A, Morales A, von Montfort C, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Redox control of liver function in health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2010;12(11):1295-331.
99. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(5):3143-53.
100. Poladian N, Navasardyan I, Narinyan W, Orujyan D, Venketaraman V. Potential Role of Glutathione Antioxidant Pathways in the Pathophysiology and Adjunct Treatment of Psychiatric Disorders. *Clin Pract.* 2023;13(4):768-79.
101. Wang SH, Tsai KL, Chou WC, Cheng HC, Huang YT, Ou HC, et al. Quercetin Mitigates Cisplatin-Induced Oxidative Damage and Apoptosis in Cardiomyocytes through Nrf2/HO-1 Signaling Pathway. *Am J Chin Med.* 2022;50(5):1281-98.
102. Di Re F, Bohm S, Oriana S, Spatti GB, Pirovano C, Tedeschi M, et al. High-dose cisplatin and cyclophosphamide with glutathione in the treatment of advanced ovarian cancer. *Ann Oncol.* 1993;4(1):55-61.
103. Ghosh J, Das J, Manna P, Sil PC. The protective role of arjunolic acid against doxorubicin induced intracellular ROS dependent JNK-p38 and p53-mediated cardiac apoptosis. *Biomaterials.* 2011;32(21):4857-66.
104. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother.* 2003;57(3-4):145-55.
105. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem.* 2017;524:13-30.
106. Li X, Cao H, Yang Q, Yu S, Huang L, Liu Q, et al. Sex differences in cardiac fibrosis induced by gestational exposure to polystyrene nanoplastics in mice offspring. *Environ Sci Process Impacts.* 2025;27(3):694-705.
107. Yang L, Tang H, Wang J, Xu D, Xuan R, Xie S, et al. O-GlcNAcylation attenuates ischemia-reperfusion-induced pulmonary epithelial cell ferroptosis via the Nrf2/G6PDH pathway. *BMC Biol.* 2025;23(1):32.

108. Fanti F, Sergi M, Compagnone D. LC-MS/MS based analytical strategies for the detection of lipid peroxidation products in biological matrices. *J Pharm Biomed Anal.* 2025;256:116681.
109. Xia J, Hu JN, Zhang RB, Liu W, Zhang H, Wang Z, et al. Icariin exhibits protective effects on cisplatin-induced cardiotoxicity via ROS-mediated oxidative stress injury in vivo and in vitro. *Phytomedicine.* 2022;104:154331.
110. Asfandiyar, Hadi N, Ali Zaidi I, Kamal Z, Ashraf, Ullah Khan R, et al. Estimation of Serum Malondialdehyde (a Marker of Oxidative Stress) as a Predictive Biomarker for the Severity of Coronary Artery Disease (CAD) and Cardiovascular Outcomes. *Cureus.* 2024;16(9):e69756.
111. Lankin VZ, Tikhaze AK, Melkumyants AM. Malondialdehyde as an Important Key Factor of Molecular Mechanisms of Vascular Wall Damage under Heart Diseases Development. *Int J Mol Sci.* 2022;24(1).
112. Estevez M, Padilla P, Carvalho L, Martin L, Carrapiso A, Delgado J. Malondialdehyde interferes with the formation and detection of primary carbonyls in oxidized proteins. *Redox Biol.* 2019;26:101277.
113. Islam MN, Rauf A, Fahad FI, Emran TB, Mitra S, Olatunde A, et al. Superoxide dismutase: an updated review on its health benefits and industrial applications. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2022;62(26):7282-300.
114. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969;244(22):6049-55.
115. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:97-112.
116. Cakmak F, Kucukler S, Gur C, Ileriturk M, Gul M, Varisli B. Cardiotoxicity caused by acrylamide in rats can be alleviated as a result of suppression of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, inflammation, and apoptosis by morin treatment. *Iran J Basic Med Sci.* 2025;28(3):376-84.
117. Takemura T. [A clinical trial of recombinant human superoxide dismutase for myocardial protection]. *Nihon Kyobu Geka Gakkai Zasshi.* 1993;41(2):247-53.
118. Carrasco R, Ramirez MC, Nes K, Schuster A, Aguayo R, Morales M, et al. Prevention of doxorubicin-induced Cardiotoxicity by pharmacological non-hypoxic myocardial preconditioning based on Docosahexaenoic Acid (DHA) and carvedilol direct antioxidant effects: study protocol for a pilot, randomized, double-blind, controlled trial (CarDHA trial). *Trials.* 2020;21(1):137.

119. Wrobel-Nowicka K, Wojciechowska C, Jachec W, Zalewska M, Romuk E. The Role of Oxidative Stress and Inflammatory Parameters in Heart Failure. *Medicina (Kaunas)*. 2024;60(5).
120. Zhou ZY, Wan LL, Yang QJ, Han YL, Li Y, Yu Q, et al. Evaluation of the pharmacokinetics and cardiotoxicity of doxorubicin in rat receiving nilotinib. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;272(1):238-44.
121. Shibata T, Yamamoto F, Kosakai Y, Kawazoe K, Komai H, Ichikawa H, et al. [Clinical application of recombinant human SOD for the protection of ischemia reperfusion injury during open heart surgery]. *Nihon Kyobu Geka Gakkai Zasshi*. 1993;41(3):427-32.
122. Hamano K, Mori F, Miyamoto M, Tsuboi H, Fujimura Y, Noda H, et al. [Significance of measuring Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD) levels in open heart surgery]. *Nihon Kyobu Geka Gakkai Zasshi*. 1990;38(3):412-5.
123. Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:9613090.
124. Vitale R, Marzocco S, Popolo A. Role of Oxidative Stress and Inflammation in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Brief Account. *Int J Mol Sci*. 2024;25(13).
125. Gilliam LA, Lark DS, Reese LR, Torres MJ, Ryan TE, Lin CT, et al. Targeted overexpression of mitochondrial catalase protects against cancer chemotherapy-induced skeletal muscle dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016;311(2):E293-301.
126. Paramo JA, Orbe MJ, Rodriguez JA. [Role of antioxidants in the prevention of cardiovascular disease]. *Med Clin (Barc)*. 2001;116(16):629-35.
127. Gad FA, Abdelghaffar Emam M, Eldeeb AA, Abdelhameed AA, Soliman MM, Alotaibi KS, et al. Mitigative Effects of l-Arginine and N-Acetyl Cysteine against Cisplatin-Induced Testicular Dysfunction and Toxicity through the Regulation of Antioxidant, Anti-inflammatory, and Antiapoptotic Markers: Role of miR-155 and miR-34c Expression. *ACS Omega*. 2024;9(25):27680-91.
128. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 1978;86(1):271-8.
129. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 1988;34(3):497-500.
130. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959;82(1):70-7.

131. Lück H. Catalase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of Enzymatic Analysis*: Elsevier; 1965. p. 885-94.
132. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
133. Salem MA, Ezzat SM, Ahmed KA, Alseekh S, Fernie AR, Essam RM. A Comparative Study of the Antihypertensive and Cardioprotective Potentials of Hot and Cold Aqueous Extracts of Hibiscus sabdariffa L. in Relation to Their Metabolic Profiles. *Front Pharmacol*. 2022;13:840478.
134. Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse MJ, Yellon DM, et al. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res*. 1988;22(7):447-55.
135. Su HW, Qiu CW. A comparative review of murine models of repeated low-dose cisplatin-induced chronic kidney disease. *Lab Anim (NY)*. 2025;54(2):42-9.
136. Zhang PF, Wang JH, Liang JQ, Zhang HJ, Li JT. [Effect of cisplatin combined with Guiqi Yiyuan Ointment on Lewis lung cancer-bearing mice by regulating EGFR/MAPK pathway]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2025;50(2):472-80.
137. Yeh ET, Tong AT, Lenihan DJ, Yusuf SW, Swafford J, Champion C, et al. Cardiovascular complications of cancer therapy: diagnosis, pathogenesis, and management. *Circulation*. 2004;109(25):3122-31.
138. Dykiert I, Florek K, Kraik K, Gac P, Poreba R, Poreba M. Tpeak-Tend ECG Marker in Obesity and Cardiovascular Diseases: A Comprehensive Review. *Scientifica (Cairo)*. 2024;2024:4904508.
139. Dekhuijzen PN, van Beurden WJ. The role for N-acetylcysteine in the management of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2006;1(2):99-106.
140. Morelli MB, Bongiovanni C, Da Pra S, Miano C, Sacchi F, Lauriola M, et al. Cardiotoxicity of Anticancer Drugs: Molecular Mechanisms and Strategies for Cardioprotection. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:847012.
141. Lajer H, Daugaard G. Cisplatin and hypomagnesemia. *Cancer Treat Rev*. 1999;25(1):47-58.
142. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2005;15(4):316-28.

143. El-Awady el SE, Moustafa YM, Abo-Elmatty DM, Radwan A. Cisplatin-induced cardiotoxicity: Mechanisms and cardioprotective strategies. *Eur J Pharmacol.* 2011;650(1):335-41.
144. Sener G, Sehirli AO, Altunbas HZ, Ersoy Y, Paskaloglu K, Arbak S, et al. Melatonin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Pineal Res.* 2002;32(4):231-6.
145. Meijer C, Mulder NH, Hospers GA, Uges DR, de Vries EG. The role of glutathione in resistance to cisplatin in a human small cell lung cancer cell line. *Br J Cancer.* 1990;62(1):72-7.
146. Lewandowski L, Kepinska M, Milnerowicz H. Alterations in Concentration/Activity of Superoxide Dismutases in Context of Obesity and Selected Single Nucleotide Polymorphisms in Genes: SOD1, SOD2, SOD3. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14).
147. Gabr SA, Elsaed WM, Eladl MA, El-Sherbiny M, Ebrahim HA, Asseri SM, et al. Curcumin Modulates Oxidative Stress, Fibrosis, and Apoptosis in Drug-Resistant Cancer Cell Lines. *Life (Basel).* 2022;12(9).
148. Zhang F, Lau SS, Monks TJ. The cytoprotective effect of N-acetyl-L-cysteine against ROS-induced cytotoxicity is independent of its ability to enhance glutathione synthesis. *Toxicol Sci.* 2011;120(1):87-97.
149. Rosic G, Selakovic D, Joksimovic J, Srejovic I, Zivkovic V, Tatalovic N, 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.
150. Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Exp Toxicol Pathol.* 2009;61(3):223-42.
151. Kaminsky D, Kryshchshyn A, Lesyk R. 5-Ene-4-thiazolidinones - An efficient tool in medicinal chemistry. *Eur J Med Chem.* 2017;140:542-94.
152. Shin SK, Cho HW, Song SE, Bae JH, Im SS, Hwang I, et al. Ablation of catalase promotes non-alcoholic fatty liver via oxidative stress and mitochondrial dysfunction in diet-induced obese mice. *Pflugers Arch.* 2019;471(6):829-43.
153. Wang F, Liu S, Shen Y, Zhuang R, Xi J, Fang H, et al. Protective effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced oxidative stress and DNA damage in HepG2 cells. *Exp Ther Med.* 2014;8(6):1939-45.

154. Yang S, Guo J, Chen D, Sun Z, Pu L, Sun G, et al. The Cardioprotective Effect of Ginseng Derived Exosomes via Inhibition of Oxidative Stress and Apoptosis. *ACS Appl Bio Mater.* 2025;8(1):814-24.
155. Keith WC, Hemmati F, Vaghasiya RS, Amiri F, Mistriotis P. Differential Effects of Confinement-Induced ROS Accumulation on Highly Motile Cancerous and Non-Cancerous Cells. *AIChE J.* 2024;70(12).
156. Liu X, Chua CC, Gao J, Chen Z, Landy CL, Hamdy R, et al. Pifithrin-alpha protects against doxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(3):H933-9.
157. Liu J, Mao W, Ding B, Liang CS. ERKs/p53 signal transduction pathway is involved in doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells and cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295(5):H1956-65.
158. Sardao VA, Oliveira PJ, Holy J, Oliveira CR, Wallace KB. Morphological alterations induced by doxorubicin on H9c2 myoblasts: nuclear, mitochondrial, and cytoskeletal targets. *Cell Biol Toxicol.* 2009;25(3):227-43.
159. Cui H, Schroering A, Ding HF. p53 mediates DNA damaging drug-induced apoptosis through a caspase-9-dependent pathway in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2002;1(9):679-86.
160. Poullos A, Papanikolaou K, Draganidis D, Tsimeas P, Chatzinikolaou A, Tsiokanos A, et al. The Effects of Antioxidant Supplementation on Soccer Performance and Recovery: A Critical Review of the Available Evidence. *Nutrients.* 2024;16(22).
161. Xie J, Liu H, Yang C, Shen W, Zhang J. VANGL2 downregulates HINT1 to inhibit the ATM-p53 pathway and promote cisplatin resistance in small cell lung cancer. *Cell Death Discov.* 2025;11(1):153.
162. Luke DR, Vadiiei K, Lopez-Berestein G. Role of vascular congestion in cisplatin-induced acute renal failure in the rat. *Nephrol Dial Transplant.* 1992;7(1):1-7.
163. Wang W, Chen E, Ding X, Lu P, Chen J, Ma P, et al. N-acetylcysteine protect inner hair cells from cisplatin by alleviated cellular oxidative stress and apoptosis. *Toxicol In Vitro.* 2022;81:105354.
164. Matsumoto C, Sekine H, Zhang N, Mogami S, Fujitsuka N, Takeda H. Role of p53 in Cisplatin-Induced Myotube Atrophy. *Int J Mol Sci.* 2023;24(11).

165. Santos DD, Belote NM, Sasso GRS, Correia-Silva RD, Franco PC, da Silva Neto AF, et al. Effect of modified citrus pectin on galectin-3 inhibition in cisplatin-induced cardiac and renal toxicity. *Toxicology*. 2024;504:153786.



EKLER

EK. Primer Dizileri

1. Beta aktin Geni

Sıçan β -aktin geninin 1293 baz çiftinden oluşan mRNA dizilimi ve primerlerin dizilimdeki yerleri gösterilmiştir. Gen Bankası Kayıt No: NM_031144.3

```
1 gtcgagtcg cgtccaccg cgagtacaac ctcttcgag ctcctccgtc gccggtccac
61 accgccacc agttgccat ggatgacgat atcgtgcgc tcgtcgtcga caacggetcc
121 ggcatgtgca aggccggctt cgcgggcgac gatgctcccc gggccgtctt ccctccatc
181 gtgggcccgc ctaggcacca ggggtgatg gtgggtatgg gtcagaagga ctctacgtg
241 ggcgacgagg cccagagcaa gagaggcatc ctgaccctga agtaccat tgaacacggc
301 attgtacca actgggacga tatggagaag attggcacc acacttcta caatgagctg
361 cgtgtggccc ctgaggagca cctgtgctg ctcaccgagg cccctctgaa ccctaaggcc
421 aaccgtgaaa agatgacca gatcatgttt gagacctca acaccaccgc catgtacgta
481 gccatccagg ctgtgtgic cctgtatgcc tctggtcgta cactggcat tgtgatggac
541 tccggagacg gggtcacca cactgtgccc atctatgagg gttacgcgct cctcatgcc
601 atcctgcgtc tggacctggc tggccgggac ctgacagact acctcatgaa gatcctgacc
661 gacgctggct acagcttacc caccacagct gagagggaaa tcgtgcgta cattaagag
721 aagctgtgct atgttgcct agacttcgag caagagatgg cactgccgc atcctctcc
781 tcctggaga agagctatga gctgcctgac ggtcaggta tcaactcgg caatgagcgg
841 ttccgatgcc ccgaggtct ctccagcct tcttctggt gtatggaatc ctgtggcatc
901 catgaaacta cattcaatc catcatgaag tgtgacgttg acatccgtaa agaccttat
961 gccaacacag tgctgtctgg tggcaccacc atgtaccag gcattgctga caggatgcag
1021 aaggagatta ctgccctgac tcttagcacc atgaagatca agatcattgc tctcctgag
1081 cgcaagtact ctgtgtggat tgggtgctct atcctggcct cactgtccac ctccagcag
1141 atgtggatca gcaagcagga gtacgatgag tccggcccct ccatcgtgca ccgcaaatgc
1201 ttctagcggg actgttactg agctgcgttt tacacccttt ctttgacaaa acctaactg
1261 cgcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa
```

2.Troponin Geni

Sıçan Troponin geninin 822 baz çiftinden oluşan mRNA dizilimi ve primerlerin dizilimdeki yerleri gösterilmiştir. Gen Bankası Kayıt No: NM_017184.2

1 tetcatctgc acaggacacc aacaggtgct gccttggtac caccatgccg gaagttgaga
61 ggaaatctaa gatactgcc tcecgtaaac tcatgctgaa gagcctgatg ctageccaagg
121 ccaaggagtg ctgggagcag gagcacgagg agcgagaggc tgagaaggtg cgttacctct
181 cggagcgcac ccctacgctg cagacccgcg gtctttccct cagcgcctt caggacttat
241 gccgagagct ccatgccaag gtggaggtgg tggatgagga gcgctatgat atcgaagcca
301 aatgcctcca caacacgaga gagatcaagg acctgaagct gaaggtgctg gacctccgtg
361 ggaagttcaa gegtccacce ctgcgccggg tccgtgtctc agccgacgcc atgctccgag
421 ccctactggg ttcaaacac aaggtgtcca tggatctgcg ggccaacctc aagtctgtga
481 agaaagaaga cacagaaaag gagcggccag tggaggtggg agactggagg aagaacgtgg
541 aggccatgct tggcatggaa ggccgcaaga agatgttcga tgctgccaag tccccaacct
601 cgcagtagag gtgcttagag tgctcttctt ggtgccctc agaactctgg ggcactcagg
661 agaagggatg ggaggctgac ccaacgtaca gaactcttag gagtcagctc tcttgggttc
721 aagcctactg cagtgtcttc agacactggg cacagcatgc ctgtgtcagg tcttttttg
781 ctgttgtgt tcctcatca ataaaacttg ggcttgatg tg

3.Miyoglobin Geni

Sıçan Miyoglobin geninin 1015 baz çiftinden oluşan mRNA dizilimi ve primerlerin dizilimdeki yerleri gösterilmiştir. Gen Bankası Kayıt: NM_021588.2

```
1 ctcctttgt cctctttaga agccaccatg gggctcagtg atggggagtg gcagatggtg
61 ctgaacatct gggggaaagt ggagggcgac cttgctggcc atggacagga agtcctcatc
121 agtctattta aggctcacc cgagaccctg gaaaagtctg acaagtcaa gaacctgaaa
181 tccgaggaag agatgaagag ttcagaggac ctgaagaagc acggctgcac cgtgctcaca
241 gccctgggta ccctcctgaa gaagaaggga caacatgctg ctgagatcca gcctctggcc
301 cagtcccacg ccaccaagca caagatcccg gtcaagtacc tggagtatat ctcagaagtc
361 atcatccaag tctgaagaa gagatattcc ggggactttg gagcagatgc tcagggcgcc
421 atgagaagg ccctggagct gttccggaat gacattgctg ccaagtacaa ggagctgggc
481 ttccagggct gagccatggg ctcccactgt ccagcccagc aagctgggac ccaatgttgt
541 gtagaaggta gagtgtgctg tgccttaggt tagcagagaa cagaagaggg gagcatagtg
601 tggeatctac ccacaccct ggggacagag ctctgggcag cattgtctg gaaccagag
661 gtgcaaagtg gcctctgctt cctcagctct gctgggtcat gtcaggtct cctgtcacct
721 aagteccaac ccactttct cctggtttg ggaaaaatct ctttccact gtcacattg
781 accccaatg caagtcacca gctagcagac actgacctt gaaggagaca gagggttact
841 tagagggagt ggagggtgga aagtgggcag gtgagcatcg gaagtctcca gctgcttagc
901 tccccctga cccacctggt ttcaataaaa catcctgcaa ctctcaaaa aaaaaaaaaa
961 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa
```

4. P53 Geni

Sıçan P53 geninin 1745 baz çiftinden oluşan mRNA dizilimi ve primerlerin dizilimdeki yerleri gösterilmiştir. Gen Bankası Kayıt No: NM_030989.4

1 agttcattgg gacttatcct tgctataggt agcgactaca gttaggggggt acctggcatc
61 cgggcccgcga ccctacttcc cagcaggggtg tcacgctccc ctgaagactg gataactgtc
121 atggaggatt cacagtcgga tatgagcatc gagctccctc tgagtcagga gacattttca
181 tgcttatgga aactttctcc tccagatgat attctgccc cccacagcgac agggtcacat
241 aattccatgg aagatctgtt cctgccccag gatgttgacag agttgttaga aggcccagag
301 gaagccctcc aagtgtcagc tctgcagca caggaacctg gaactgagge cctgcaccc
361 gtggcccctg cttcagctac accgtggcct ctgtcatctt ccgtcccttc tcaaaaaact
421 taccaggca actatggctt ccacctgggc ttctgcagt cagggacagc caagtctgtt
481 atgtgcacgt actcaattc cctcaataag ctgttctgcc agctggcgaa gacatgcct
541 gtgcagttgt gggtcacctc cacacctca cctggtagcc gtgtccgtgc catggccatc
601 tacaagaagt cacaacacat gactgaggtc gtgagacgct gccccacca tgagegttgc
661 tctgatgtg acggcctggc tcctcccaa catctatcc ggggtgaagg aaatccgtat
721 gctgagtatc tggacgacag gcagactttt cggcacagcg tgggtgtacc gtatgagcca
781 cctgaggtcg gctccgacta taccactatc cactacaagt acatgtgcaa cagctcctgc
841 atgggggggca tgaaccgccc gccatcctt accatcatca cgctggaaga ctccagtggg
901 aatcttctgg gacgggacag ctttgagggt cgtgtttgtg cctgtcctgg gagagacctg
961 cggacagagg aagaaaattt ccgcaaaaaa gaagagcatt gcccgagct gccccaggg
1021 agtgcaaaga gagcactgcc caccagcaca agctcctctc cccagcaaaa gaaaaacca
1081 ctcgatggag aatatttcac ccttaagatc cgtgggcgtg agcgcttcga gatgtccga
1141 gagctgaatg aggccttggg attaaaggat gccctgctg ccgaggagtc aggagacagc
1201 agggctcact ccagctacc gaagaccaag aagggccagt ctacgtccc ccataaaaa
1261 ccaatgatca agaaagtggg gcctgactca gactgacagc ctctgcatcc tgtcccac
1321 accagcctcc ccgtccctc ctttcttccc atttatgac ttagggcctt gttatgagag
1381 ctgacaagac aatgctagtc cttcactgc cttttttac cttgtagata gtactcggcc
1441 ccctctatgc aaactggctc ctggcccaga ttggggaatg ggttggtagt tgctgggtct
1501 ctgctgtgcc agcgaaatcc tatccggta gttgtggac ctggcaccta cagtgaatt
1561 tcacccacc ccaccgctg taagatteta tcttgggccc tcatacgate tgatectcc
1621 aggaccatt tctccactc tgcaaagcct gtctgcattt atccatccc caccctctc
1681 cctcttttta tctcttttta tatatcaatt tcttatttta caataaactt ttgttaccac
1741 ttgta