

T.C.  
Süleyman Demirel Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları  
Anabilim Dalı

**DOKSORUBİSİN ile OLUŞTURULAN DENEYSEL KARDİYOTOKSİSİTE  
ÜZERİNE N-ASETİLSİSTEİNİN BİYOKİMYASAL ve HİSTOPATOLOJİK  
DÜZEYLERDEKİ KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Hasan Tahsin TOLA  
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ali AYATA**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından 1668-TU-08 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**2008 – ISPARTA**

## KABUL VE ONAY

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Uzmanlık Tezi çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Tez Savunma Tarihi:

#### Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ali AYATA  
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

#### Üye

Prof. Dr. Duran Canatan  
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

#### Üye

Doç. Dr. Bumin Dünder  
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

#### Üye

Doç. Dr. Faruk Öktem  
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

#### Üye

Doç. Dr. Hasan Çetin  
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

## ONAY

Bu doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Yönetim Kurulu'nca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yıldırım SONGUR  
Dekan

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim sürecinde emeği geçen, mesleki bilgi ve birikimlerini bana aktaran, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerinden başta tez hocam Prof. Dr. Ali Ayata olmak üzere, Prof. Dr. Ahmet Rifat Örmeci, Prof. Dr. Duran Canatan, Doç. Dr. Faruk Öktem, Doç. Dr. Bumin Dünder, Doç. Dr. Hasan Çetin, Doç. Dr. Mustafa Akçam, Yrd. Doç. Dr. Nihal Dünder'a, tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Efkan Uz, Doç. Dr. Ramazan Yılmaz, Doç. Dr. Alpaslan Gökçimen, Prof. Dr. Hüseyin Vural, Prof. Dr. Fehmi Özgüner, Dr. Ahmet Koçak, Dr. Dilek Bayram ve Dr. Hilmi Demirin'e teşekkür ederim.

Bu süreçte birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı araştırma görevlisi arkadaşlarıma, hemşire ve personeline en derin sevgilerimi, eğitimim süresince her zaman yanımda hissettiğim ve büyük desteklerini gördüğüm, sevgili anneme, babama, kardeşime minnet ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Hasan Tahsin Tola  
Isparta - 2008

## İÇİNDEKİLER

İç kapak .....	i
Kabul ve onay sayfası .....	ii
Önsöz .....	iii
İçindekiler .....	iv
Kısaltmalar .....	v
Dizinler .....	vi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
Doksorubisin .....	3
N-asetilsistein .....	12
Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistemler .....	14
3. MATERYAL ve METOD .....	21
4. BULGULAR .....	29
5. TARTIŞMA .....	37
ÖZET .....	45
SUMMARY .....	46
KAYNAKLAR .....	47

## KISALTMALAR

<b>ATPaz</b>	Adenozin trifosfataz
<b>Ca<sup>++</sup></b>	Kalsiyum
<b>CAPE</b>	Caffeic acid phenethyl ester
<b>CAT</b>	Katalaz
<b>D</b>	Dokсорubisin grubu
<b>DN</b>	“Dokсорubisin + N-asetilsistein” grubu
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>EKG</b>	Elektrokardiyografide
<b>EKO</b>	Ekokardiyografi
<b>GSH</b>	Glutatyon
<b>GSH-Px</b>	Glutatyon peroksidaz
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Su
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen peroksit
<b>HPLC</b>	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
<b>ICRF-187</b>	Dexrazoksane
<b>İM</b>	İntramüsküler
<b>İP</b>	İntraperitoneal
<b>İV</b>	İntravenöz
<b>K</b>	Kontrol grubu
<b>KOAH</b>	Kronik obstruktif akciğer hastalığı
<b>MDA</b>	Malondialdehid
<b>ml</b>	Mililitre
<b>NAC</b>	N-asetilsistein
<b>NG</b>	Nazogastrik yol
<b>NADPH</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>O<sup>-</sup></b>	Süperoksit radikali
<b>OH<sup>-</sup></b>	Hidroksil radikali
<b>pro-BNP</b>	Pro-brain natriüretik peptid
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>SF</b>	Serum fizyolojik
<b>SOD</b>	Süperoksit dismutaz
<b>SOR</b>	Serbest oksijen radikalleri

## DİZİNLER

### Tablolar Dizini

- Tablo 1.** Doksorubisinin klinikte sıklıkla görülen yan etkileri.  
**Tablo 2.** Karditoksisiteyi artıran risk faktörleri.  
**Tablo 3.** Doksorubisin ilişkili kardiyotoksisite tedavisinde kullanılan ajanlar ve etki mekanizması.  
**Tablo 4.** Doğal antioksidanların sınıflandırılması.  
**Tablo 5.** Ekzojen antioksidanların sınıflandırılması  
**Tablo 6.** Rat grupları ve uygulanan ilaçlar.  
**Tablo 7.** Grupların enzim etkinlik seviyelerine göre karşılaştırılması ve p değerleri.  
**Tablo 8.** Grupların rat ağırlıklarına göre karşılaştırılması ve p değerleri.  
**Tablo 9.** Grupların histopatolojik parametrelere göre değerlendirilmesi ve p değerleri.  
**Tablo 10.** Grupların sol ventrikül duvarı miyofibril kalınlıklarına göre karşılaştırılması ve p değerleri.

### Şekiller Dizini

- Şekil 1.** Doksorubisinin yapısı  
**Şekil 2.** Doksorubisin metabolizması sırasında ortaya çıkan metabolitler  
**Şekil 3.** Kümülatif doksorubisin dozu ile kalp yetersizliği gelişme riski arasındaki ilişki.  
**Şekil 4.** N-asetilsisteinin yapısı.  
**Şekil 5.** Moleküler oksijenden reaktif ara ürünlerin oluşumu.  
**Şekil 6.** Glutasyonun okside ve redükte formları arasındaki dönüşümü.  
**Şekil 7.** Deney gruplarında kalp dokusu ortalama Malondialdehid (MDA) enzim aktiviteleri.  
**Şekil 8.** Deney gruplarında kalp dokusu ortalama Süperoksid Dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri.  
**Şekil 9.** Gruplarda kalp dokusu ortalama Katalaz (CAT) enzim aktiviteleri.  
**Şekil 10.** Gruplarda kalp dokusu ortalama Gsh-Px (Glutasyon Peroksidaz) enzim aktiviteleri.  
**Şekil 11.** Ratların deney başlangıcındaki vücut ağırlıkları.  
**Şekil 12.** Ratların deney sonunda vücut ağırlıkları.

### Resimler Dizini

- Resim 1.** Kontrol grubuna ait rat miyokard tabakası.  
**Resim 2.** Doksorubisin grubuna ait miyokard tabakası.  
**Resim 3.** Doksorubisin - N-asetilsistein grubuna ait miyokard tabakası.

## 1. GİRİŞ

Doksorubisin, antrasiklin türevi bir antibiyotik ve grubunun ilk bulunan antikanser üyesidir. Geniş spektrumlu antineoplastik etkisi sayesinde solid tümörler ve hematolojik malignitelerde yaygın olarak kullanılmaktadır (1-7). Doksorubisin ve diğer antrasiklinlerin kanser tedavisinde kullanımını sınırlayan en önemli ve olumsuz özellikleri, kardiyotoksik yan etkileridir (8-13). Doksorubisinin kardiyak toksisite oluşturma mekanizması ile ilgili fikir birliği yoktur. Günümüzde en fazla kabul gören görüş; doksorubisin ve metabolitlerine bağlı oksidatif stres ve bunun hücrede oluşturduğu hasardır (14,15,16-29).

Oksidatif stresin etkisiyle başlayan lipid peroksidasyonu hücre membranındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olaydır. Bu olay kuvvetli oksidan olarak daha çok hidroksil radikali ile daha az süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen ürünlerinin  $\alpha$ -metil grubundan hidrojen atomu çıkarması ve su oluşturması ile başlar ve zincir reaksiyonu şeklinde devam eder (30-35).

Lipid hidroperoksitler membran fonksiyonlarını bozar ve aldehidleri oluşturur. Malondialdehidin (MDA) ölçümüyle klinikte lipid peroksidasyonu hakkında bilgi alınabilir. Lipid peroksidleri membran proteinlerine zarar verir ve membrana bağlı enzim ve reseptörleri inaktive eder. Oksidatif stres ve sonucunda oluşunda ürünlerin vücuttaki etkilerini nötralize eden sistem antioksidanlardır. Serbest radikaller, normal hücre metabolizması sırasında da oluşabilir. Serbest radikallerle, antioksidanlar arasındaki dengenin korunması organizmanın devamını sağlar. Organizma, bu reaksiyonların yayılmasını önlemek için süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimlerini kullanır (36-41).

Doksorubisin kardiyotoksitesisi dört klinik tabloda ortaya çıkar. Akut, subakut, kronik ve geç toksisitedir. Doksorubisin kardiyotoksitesisi için en önemlisi risk faktörü, kümülatif dozun  $550 \text{ mg/m}^2$  üzerine çıkmasıdır. Yaş, mediastinal radyasyon ve önceki kemoterapi öyküsü diğer önemli risk faktörleridir (29).

Deneyisel çalışmalarda doksorubisinin kardiyotoksitesisini önlemek üzere birçok ajan denenmiş (antioksidan vitaminler, bitkisel antioksidanlar, desferroksamin, oabain, CAPE, bosentan, vb) ancak hiç birisi klinik kullanıma girememiştir (42-45). Dokudaki glutatyon ve glutatyon bağımlı enzim düzeylerini artırdığı bilinen N-asetilsisteinin, doksorubisin ile indüklenen kardiyak toksisite

zerindeki biyokimyasal ve histopatolojik etkilerini değerlendiren nadir sayıda çalışma vardır (46-56). Deneysel olarak doksorubisinle indüklenmiş kardiyotoksisitede doku glutasyon, glutasyon peroksidaz, glutasyon-S transferaz düzeyleri düşük olarak bulunmakta ve bu süreçte N-asetilsisteinin kardiyoprotektif rolünün olacağı vurgulanmaktadır.

Bizim çalışmamızın amacı da; doksorubisinin yol açtığı akut kardiyak hasarda oksidatif stresin rolünü göstererek N-asetilsistein'in bu hasarlanmadaki biyokimyasal ve histopatolojik koruyucu etkilerini belirlemek ve N-asetilsisteinin bu maksatla onkoloji kliniklerinde kullanımına zemin oluşturacak çalışmalara bir örnek teşkil etmek ve ışık tutmaktır.



## 2. GENEL BİLGİLER

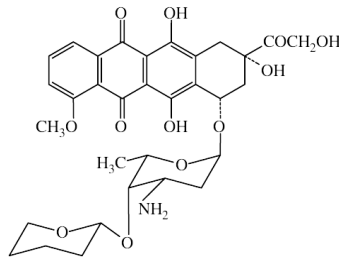
### 2.1. Doksorubisin

#### 2.1.1.Genel Bilgi

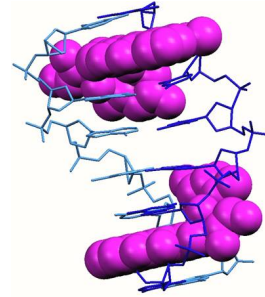
Doksorubisin; antrasiklin türevi, farklı kanser türlerine güçlü etki gösteren, geniş spektrumlu, antitümöral bir antibiyotiktir. Antrasiklinler 1963 yılında bir mantar türü olan *Streptomyces peucetius variete caesiu* kültüründen üretilmiştir (1-3). Doksorubisin, 1967-1969'da, ilk tedaviye giren ve grubun en yaygın kullanılan üyesidir (4,5). Lösemi, lenfoma, yumuşak doku ve kemik sarkomları, Wilms tümörü, nöroblastom, hepatoblastom tedavisinde kullanılmaktadır (6,7).

**2.1.a. Yapısı:** Antrasiklin molekülü, tetrasiklik çekirdek ve aminoşekerden (daunosamin) oluşur (Şekil 1). Tetrasiklik çekirdek ilaca kırmızı rengini verir. Grubun tüm üyelerinin tetrasiklik halkaya komşu kinon ve hidrokinon grupları vardır (14).

Daunorubisin molekülündeki 14. karbonun hidroksil grubu alması ile doksorubisin meydana gelir. Doksorubisinin kimyasal ve uzaysal düzlemdeki yapıları Şekil 1'de gösterilmiştir.



A. Kimyasal



B. Uzaysal Düzlemde

**Şekil 1.** Doksorubisinin yapısı

**2.1.b. Etki Mekanizması:** Hücrede 4 şekilde etki gösterir (15,57):

a. Kompleks oluşturarak deoksiribonükleik aside (DNA) bağlanma: DNA'nın içine girip, DNA topoizomeraz II-DNA-antrasiklin kompleksini oluşturur. DNA replikasyonu ve RNA transkripsiyon ve sentezini inhibe eder. DNA zincir kırıklarına da neden olur (58).

b. DNA ve RNA polimerazların inhibisyonu: DNA ve RNA polimerazların fonksiyonlarını engelleyerek DNA replikasyonunu ve RNA transkripsiyonunu bozar.

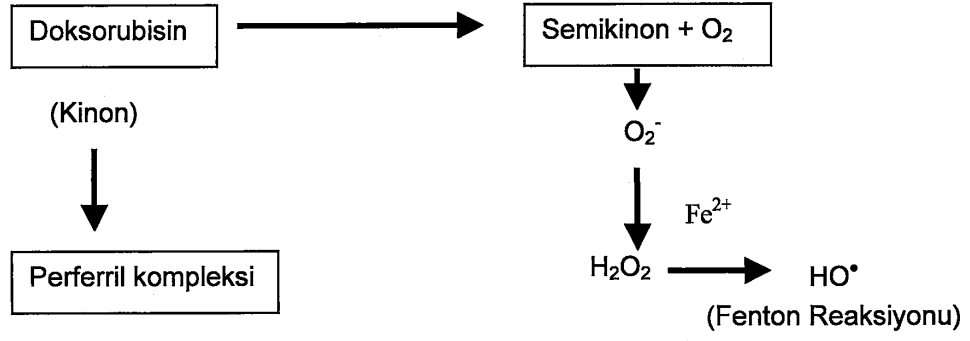
c. Hücre membranı üzerine etkileri: Hücre membranına bağlanarak, membran fonksiyonunu bozar (6,7).

d. Serbest radikal oluşturma: Mikrozomlardaki sitokrom P-450 redüktaz enzimi ile reaksiyona girer ve serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşturur (59-62).

**2.1.c. Metabolizması:** İntravenöz (İV) uygulamadan sonra hızla parçalanır. Doksorubisinol ve daunorubisinol oluşur (16).

Bunlar ana bileşikten daha az aktiftir. Asit ortamda stabil olmaması oral yolla, doku hasarı yapıcı özelliği ise intramuskuler ve subkutan kullanımına izin vermez (6,7). İV uygulamadan sonra dokularda birikir (kalp, karaciğer, dalak, miyokard) ve plazmadan daha yüksek konsantrasyona ulaşır (5-10 kat). Tümör dokusu en yüksek doku konsantrasyonunu içerir (63).

Atılımı karaciğer ve böbrekten gerçekleşir. Karaciğerden biyotransformasyonla ve safradan ekskresyonla atılır. Atılan madde doksorubisinol ve daunorubisinoldur. Karaciğerde önce indirgenme gerçekleşir ve ardından karbonil kökü ayrılır. Böbreklerde ise tam tersi gerçekleşir (64).



**Şekil 2.** Dokсорubisin metabolizması sırasında ortaya çıkan metabolitler.

**2.1.d. Yan Etkileri:** Dokсорubisinin klinikte daha önemli yan etkileri Tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Dokсорubisinin klinikte sıklıkla görülen yan etkileri.

Yan Etki <sup>8-11</sup>	Açıklama
Saç Dökülmesi	Anti-mitotik etki
Kemik iliği supresyonu	Anti-mitotik etki
Mukozit	Anti-mitotik etki
Ekstravazasyon zedelenmesi	Lokal toksisite
Radyosensitizasyon	En çok etkilenen organ kalptir. 2000 rad üzeri radyasyonda toksisite hızla gelişir.
Gastrointestinal toksisite	
Nefrotoksisite	Asıl mekanizma serbest radikal aracılı hasar
<b>*Kardiyotoksisite</b>	Birden çok mekanizma ile

\*Kardiyotoksisite: Dokсорubisine bağlı olarak gelişen en önemli ve sıklıkla doz sınırlayıcı olan yan etkidir (1-3).

Dokсорubisinin İV enjeksiyonundan sonra vücuttaki dağılımı sırasında, dokсорubisini plazmadan en hızlı olarak alan dokulardan birisi kalp dokusudur (12).

### 2.1.2. Doksorubisin ve Kardiyotoksisite

İlacın kullanımını kısıtlayan en önemli yan etkisi kardiyak toksisitedir. Kardiyotoksisite oluşturma mekanizması ise tam anlaşılamamış olup, bu konuda birçok teori üretilmiştir (13). Nükleik asit ve protein sentezinde inhibisyon, vazoaktif amin salınımı, adrenerjik fonksiyonlarda değişiklikler, mitokondriyal anormallik, lizozomal değişiklikler, sarkolemmal kalsiyum ( $Ca^{++}$ ) transportunda değişiklik, Na-K-ATPaz (sodyum potasyum adenozin trifosfataz) ve Ca-ATPaz adenilat siklazda değişiklik, miyokardiyal elektrolit değişikliği, SOR oluşumu, miyokardiyal antioksidan enzim düzeyinde azalma, lipid peroksidasyonu, protein olmayan doku sülfidril bileşiklerinde azalma ve programlanmış hücre ölümü bunlardan birkaçıdır (16,17).

Kardiyotoksisitenin sebebi karmaşık ve birçok nedene bağlıdır (18). Değişikliklerin ortak etkisi, SOR'ların oluşumu ve lipid peroksidasyonudur. Günümüzde de en fazla kabul gören görüş doksorubisin ve metabolitlerine bağlı SOR oluşumudur (19). Antrasiklinler SOR oluşmasında ve redoks resiklusunu oluşmasında etkin maddelerdir. Bir antrasiklinin molekülü birçok reaktif oksijen SOR'ü oluşturabilmektedir (20).

Kardiyotoksisite oluşumunda kabul edilen iki teori vardır. Birinci teori kinon halkasının enzimatik redüksiyonudur. Sonuçta moleküler oksijen redükte olur, semikinon, hidrokinon, SOR oluşur (Şekil 2). Demir hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) oluşumunda gereklidir. Oluşan maddeler mikrozomal ve mitokondriyal enzimleri inhibe eder, lipid peroksidasyonu yapar, elektron transport zincirini bozar. İkinci teori ise doksorubisin-metal kompleksinin meydana gelmesidir ve redoks siklusunu ile kuvvetli oksidan oluşumuna yol açar. Doksorubisin ile oluşan hasar SOR ve mitokondriyal kaynaklıdır. Doksorubisin demiri, major hücrel demir deposu olan ferritinden alır. Ferritin, antrasiklin bağımlı mikrozomal lipid peroksidasyonunun etkili bir katalizleyicisidir (21,22).

Fe, iki şekilde etkir; **1)** Direkt etki: oluşan kompleks fosfolipid ve kardiyolipine toksiktir. Bunlar sarkoplazmik retikulumda ve mitokondri iç membranında vardır. Ayrıca NADH (nikotinamid adenin dinükleotit) sitokrom-c redüktaz ve sitokrom oksidazı direkt inhibe eder (22).

2) İndirekt etki; tiyol içeren bileşiklerden (GSH ve sistein vb) moleküler oksijene ( $O_2$ ) elektron transferini katalize eder ya da internal oksido-redüksiyon siklusu içinde radikal kompleks  $Fe^{+3}$ -(antrasiklin)<sub>3</sub> kompleksini oluşturur. Bu kompleks, dönüşte bir elektronu moleküler oksijene bırakır. Sonuçta süperoksit radikallerinin oluşmasına yol açar (4). Doksorubisin varlığında kalp kasında  $Ca^{++}$ 'nin hareketi ve kullanımı bozulur (1). Kalbin kasılma durumu sitozoldeki  $Ca^{++}$  yoğunluğuyla ilişkilidir. Kalp kası hücrelerinde kasılmayı başlatan  $Ca^{++}$ , sarkoplazmik retikulumdan salınır. Bundan dolayı uyarılma-kasılma olayında sarkoplazmik retikulumdaki  $Ca^{++}$  salınım kanallarının çok önemli bir rolü vardır. Doksorubisin sarkoplazmik retikulumdaki  $Ca^{++}$  salınım kanallarını özellikle ryanodin reseptörünü geri dönüşümlü olarak inhibe eder. Doksorubisin sarkoplazmik retikulumun  $Ca^{++}$  salınımını engeller ve miyokard fonksiyon bozukluğuna yol açar (23).

Organizma SOR'ları temizleme yeteneğine sahiptir. Ama kalpte antioksidan enzimler daha az bulunduğu için SOR hasarlarına karşı kendini koruyamaz. Bu durum ise neden doksorubisin verilmesi sonrası kalpte hasarın oluştuğunu açıklamaktadır (21).

Yeni üretilen antrasiklinlerin lipozomal formları kardiyak hasar geliştirme sıklığı daha az olmakla birlikte bunlarda bile kardiyotoksisite hala en önemli problemdir (24,25).

Kardiyotoksisitenin tanısında birçok klasik yöntem kullanılabilir. Birlikte son dönemlerdeki çalışmalarda troponin ve pro-BNP (pro-brain natriüretik peptid) ön plana çıkmakta ve bu parametreler doksorubisin uygulamasından sonra kardiyak yetersizlik gelişeceği hakkında bilgi vermektedir (26-28).

### 2.1.3. Kardiyotoksisitenin Klinik Tipleri

Doksorubisin kardiyotoksisitesi dört farklı klinik tipte gelişebilmektedir:

**1. Akut Kardiyotoksisite:** İlacın verilmesi sırasında veya ilaç verildikten birkaç saat sonra ortaya çıkar. Görülme sıklığı % 0.4-41 arasındadır. Genellikle semptomsuz ama nadiren miyokardiyal infarkt gelişir. Doz ilişkisiz

elektrokardiyografide (EKG) değişiklikleri görülebilir. Ölümcül komplikasyonlar elektrolit dengesizliği olan hastalarda daha sıktır (37,42).

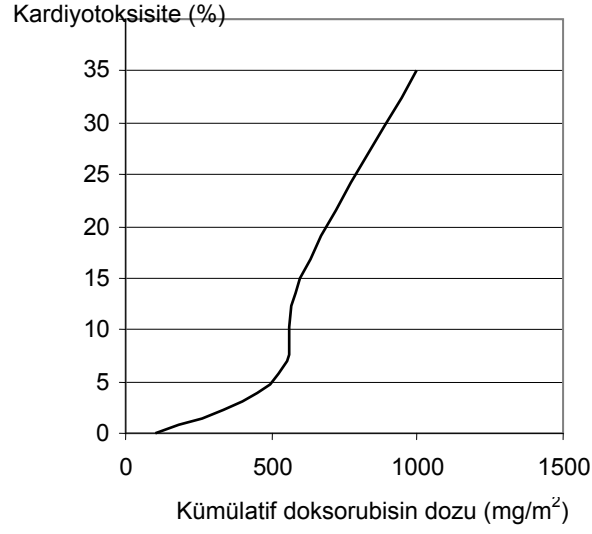
**2. Subakut Kardiyotoksisite:** Nadiren görülür, son doksorubisin dozundan birkaç gün veya birkaç hafta sonra toksik perikardit ve miyokardit şeklinde ortaya çıkar (43).

**3. Kronik Kardiyotoksisite:** Kardiyak hasarın daha sık görülen şeklidir. Sıklığı % 0.4-23 arasındadır. Kümülatif doza bağlıdır. Kemoterapiden birkaç hafta veya birkaç ay sonra kalp yetersizliği veya kardiyak şok kliniği ve laboratuvarı ile ortaya çıkar. Kalp yetersizliğinin pik yaptığı dönem, tedavi kesildikten 1-3 ay sonradır. Genellikle sol ventrikülü, nadiren her iki ventrikülü etkiler. Klinik kardiyotoksisitede 550 mg/m<sup>2</sup> üzerindeki dozlarda belirgin artış görülür (37).

**4. Geç Kardiyotoksisite:** Doksorubisin tedavisi tamamlandıktan en az bir yıl sonra ortaya çıkan kalp yetersizliği bulgular ile ortaya çıkar (40,41). Geç başlayan ventrikül fonksiyon bozukluğu ve aritmilerle birlikte gider, nadiren ani ölümlerle sonuçlanabilir. Bazı hastalarda kardiyotoksisitenin ilk bulguları çok geç ortaya çıkabilir (1).

#### 2.1.4. Doz ve Kardiyotoksisite

Miyokardiyal hasar, düşük kümülatif dozlarda da (180 mg/m<sup>2</sup>) gelişmektedir (65). Morfolojik değişiklikler kümülatif dozdan bağımsızdır. Fonksiyonel değişikliklerin doz ve kalp yetmezliği ile ilgisi zayıftır. Doksorubisin için 400 mg/m<sup>2</sup> dozda kalp yetersizliği insidansı %0.01, 400-500 mg/m<sup>2</sup>lik kümülatif doz sonrası hastaların % 2-4'ünde semptomatik kardiyotoksisite gelişmektedir. Buna karşın 550 mg/m<sup>2</sup>'de % 7, 600 mg/m<sup>2</sup>'de % 15, 700 mg/m<sup>2</sup>'de % 30-40, 1000 mg/m<sup>2</sup>'de % 50 hastada klinik konjestif kalp yetmezliği gelişmektedir. Kardiyotoksik doz için sınır son çalışmalarda 550 mg/m<sup>2</sup> 'dir (Şekil 3) (20,66). Doksorubisinin doz modifikasyonu kardiyotoksisiteye engel olacak en önemli değişkendir (67).



**Şekil 3.** Kümülatif doksorubisin dozu ile kalp yetersizliği gelişme riski arasındaki ilişki.

### 2.1.5. Kardiyotoksisite Risk Faktörleri

Kardiyotoksisite oluşumu için çeşitli risk faktörleri belirlenmiştir. En önemlileri Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 2.** Kardiyotoksisiteyi artıran risk faktörleri.

Risk Faktörleri <sup>8, 68-70</sup>	
Kümülatif doksorubisin dozu	> 550 mg/m <sup>2</sup> belirgin artar
Yaş	< 4 yıl
Mediastinal radyasyon	> 2000 cgray
Kalp hastalığı	Koroner arter hastalığı
Kemoterapi öyküsü	Antrasiklinler, siklofosfamid, metotreksat

### **2.1.6. Çocuklarda Kullanımı**

Miyosit sayısı postnatal altıncı aydan itibaren belirlenir. Kalbin büyümesi ise kas hücre hipertrofisi yoluyla olur. Dört yaşın altındaki hastalara doksorubisin uygulanması, miyositin geri dönüşümsüz hasarı ile sonuçlanır. Geriye kalan miyositlerin hipertrofisi, muhtemel kalp yetmezliği gelişecek olan çocukların büyümesindeki artan ihtiyaçlarını karşılayamayacaktır. Bu durum, çocuklarda antrasikline bağlı gecikmiş kalp yetmezliğinin temelini oluşturmaktadır (66,67). Bir çalışmada antrasiklinle tedavi edilmiş 201 çocuk hastanın kardiyak fonksiyonları 4-20 yıl süre ekokardiyografi (EKO) ile değerlendirilmiş, hastaların % 23'ünde kardiyak anormallik saptanmıştır. On yıldan daha az süre izlenen hastalarda % 18 oranında kardiyak anormallik bulunurken, 10 yıldan sonrası için bu oran % 38'e yükselmiştir. Kümülatif antrasiklin dozunu 500 mg/m<sup>2</sup>'nin üzerinde alan ve tedavi sonrası 10 yıldan fazla geçen hastalarda EKO'da % 63 anormal bulgular saptanmış, kümülatif doz ve izleme süresiyle ciddi anormallik sıklığı arasında pozitif ilişki bulunmuştur (11). Lipshultz ve ark.<sup>64</sup> antrasiklinle tedavi edilmiş 4 yaşından küçük çocuklarda, daha büyük çocuklara göre kardiyotoksisite riskinin arttığını rapor etmişlerdir. Bu çocuklarda somatik büyümeye oranla, miyokardiyal büyüme yetersiz kalmaktadır. Bu durum antrasiklin bağımlı kardiyak hasarlanmada miyokardın bozulmuş büyüme kapasitesini göstermekte olup küçük çocuklar için önemli bir sorun oluşturmaktadır.

### **2.1.7. Kardiyotoksisite Tedavisindeki Yeni Ajanlar**

Doksorubisin kullanımını kısıtlayan yan etkileri ortadan kaldırmak için birçok ajan denenmiş olup bu konudaki yeni çalışmalar da halen devam edilmektedir. Doksorubisin kardiyotoksisite oluşum mekanizması net olarak belli olmadığından birçok farklı ajan bu amaçla gündeme gelmiş, ancak doksorubisin oluşturduğu kardiyotoksisiteyi geriye çeviren bir ajan bulunamamıştır (11). Doksorubisin kardiyotoksisitesini geriye çevirmek için kullanılan ajanlar ve kullanım nedenleri Tablo 3'te gösterilmiştir.



**Tablo 3.** Dokсорubisin ilişkili kardiyotoksisite tedavisinde kullanılan ajanlar ve etki mekanizması.

<b>Kullanılan ajan <sup>71-74</sup></b>	<b>Kardiyoproteksiyon için öngörülen etki mekanizması</b>
Kalsiyum kanal blokerleri	İntrasellüler Ca <sup>++</sup> ↓
Antioksidan vitaminler	SOR ↓
Desferroksamin	İntrasellüler demir ↓
CAPE	Oksidatif Stres ↓
Pentoksifilin	Bilinmiyor
Oabain	Na-K ATPaz
Melatonin	Antioksidan
Bitkisel antioksidanlar	Antioksidan
Bosentan	Endotelin-1 antagonizması

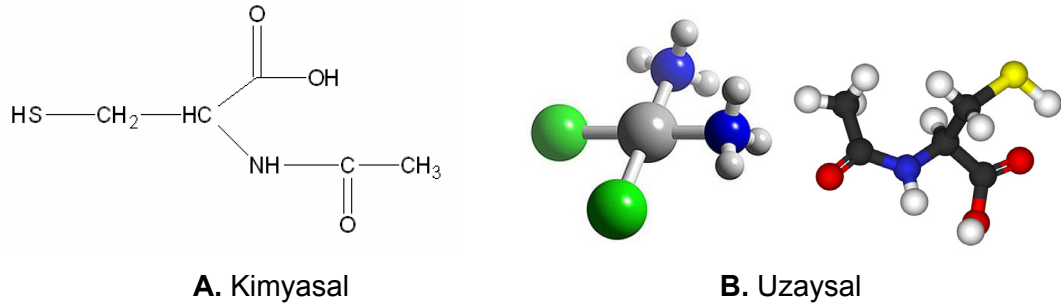
### 2.1.8. Yapısal Değişiklikler

Dokсорubisin, erken evrelerde sadece elektron mikroskobu ile tespit edilebilen, miyositlerde farklı tiplerde yapısal değişiklikler meydana getirir. Artmış fibrozis ve miyosit dejenerasyonuna ait diğer formlar genel olarak 250 mg/m<sup>2</sup>'nin altında ışık mikroskobu ile tespit edilemezler. Miyosit hasarına ait ilk bulgu, sarkoplazmik retikulumun dilatasyonudur. Bu ilerleyerek vakuolizasyon oluşturur. Daha sonra membran incilmesi ve yoğun inklüzyonlarla birlikte, mitokondride şişme gözlenir. Son olarak hücre nekrozuna nükleer değişiklikler eşlik eder. Işık mikroskobunda normal miyokardiyal doku ile birlikte, vakuolizasyon ve bazı miyositlerde dejenerasyon açığa çıkar. Daha sonraki evrede ise fibrozis başlar (75). Histolojik değişikliklerin şiddeti uygulanan kümülatif doz ile doğru orantılıdır (76).

## 2.2. N-asetilsistein

### 2.2.1. Genel bilgi ve etki mekanizması

Asetilsistein düşük molekül ağırlıklıdır. Küçük miktarlarda hidrojen sülfür açığa çıkmasına bağlı olarak sodyum tuzu hafif kükürtsü kokudur. Suda ve diğer çözücülerde % 22 oranında çözülür. Fizyolojik koşullarda pH'sı stabildir. İlaç emilimden sonra kana karışır. Tüm dokulara hızla geçer. N-asetilsisteinin kimyasal ve uzaysal yapısı Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. N-asetilsisteinin yapısı

Mukolitik etkisi balgamdaki sülfidril bağlarını kırmasından kaynaklanmaktadır (50,51). Doğal sisteinin en az toksik ve en etkili formu L-sisteinin N-asetil formudur. Daha çok sülfidril grubu içermesi ve çözünürlüğünün daha iyi olması nedeniyle klinikte sıklıkla kullanılan formdur. N-asetilsistein, L-sisteinin N-asetil türevidir, mukoregülatör etkilidir. Vücudu zararlı etkilerden oksidanlara karşı korumada tiyol içeren bileşiklerin önemi giderek artmaktadır. En yaygın kullanılan mukolitikdir ve etkisi mukokinetiklerden daha fazladır (52,53). Sisteine dönüşüm sonrası GSH sentezinde rol oynar. Antioksidan etkisi iki yoldan gerçekleşir. Direkt etkisiyle, serbest oksijen radikallerini doğrudan inhibe eder. Yapısındaki sisteini artırarak, GSH sentezini artırması ise indirekt etkisidir. Oksidan strese bu mekanizmalarla karşı çıkar (54,55). N-asetilsistein, SOR'lardan OH<sup>-</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, hidrojen peroksit radikallerini indirger (56).

## 2.2.2. N-asetilsisteinin Kullanım Alanları

Pnömoni, sinüzit tedavisi, asetaminofen ve amanita phalloides zehirlenmeleri, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) başlıca kullanım alanlarıdır. N-asetilsistein ve glutatyon değişik dozlarda mutajen ve karsinojenlerin etkilerini inhibe eder (50). Özellikle antioksidan olarak NAC'nin KOAH'ta atak sıklığını azalttığı ve atak tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir (53). N-asetilsistein, sülfidril grubu kaynağı olduğundan SOR'lara ve diğer oksidantlara karşı "scavenger" (çöpçü) olduğu ve hayvan modellerinde reperfüzyon hasarını düzelttiği gösterilmiştir. N-asetilsistein hücre içinde sistein için bir kaynaktır ve hücre içi sistein, GSH redoks sistem üretimini sağlar. N-asetilsistein H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile gelişen epitel hücre hasarını ve sigaranın neden olduğu enflamatuvar hücre artışını azaltır (71).

NAC bir tiyol bileşiği olmakla birlikte potent bir antioksidan ve antienflamatuvar özelliktedir. Aynı zamanda iyi bilinen bir GSH prokürsörü ve direkt hareket etkileriyle SOR'ları, OH<sup>-</sup>'yi ve hipoklorik asidi esas indirgeyicisi olarak temizler. Redoks, sensitif değişim faktörlerini hızla aktive ederken enflamasyon, immün ve akut faz yanıtını içeren genleri aktive eder (77).

Deneysel sepsis modelinde NAC verilmesi plazma MDA düzeylerini düşürmüştür. Ratlarda alkol stresi altında NAC verilmesi sonucu plazma MDA, GSH ve karaciğer MDA değerleri kontrol grubu değerleriyle aynı düzeyde ölçülmüştür (78). İskemi ve reperfüzyon hasarlanmalarında etkin bulunmuştur (79). NAC intratrakeal olarak erişkinlerin kronik akciğer hastalığının tedavisi amacıyla yaygın olarak kullanılmakta ve oldukça olumlu sonuçlar bildirilmektedir (80).

Dokularda, oksidatif hasara karşı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan mekanizmalar vardır. Antioksidan enzim sistemleri; SOD, CAT ve GSH-Px'dir (81-83). Enzimatik olmayan doğal antioksidanların en önemlilerinden biri GSH'dur. NAC'ın SOR'lar tarafından oluşturulan doku hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu ve bu etkisini GSH düzeyini arttırarak oluşturduğu bildirilmektedir (84). NAC, asetaminofen ve alkol toksisitesinde verildiğinde karaciğeri hasardan korumakta ve mortaliteyi azaltmaktadır. Antitoksitesindeki muhtemel mekanizmalar; karaciğer kan akımını artırması, GSH artışı ve SOR'ları temizlemesi sayılabilir (85). NAC ratlara verildiğinde lipid peroksidasyonunu önleyerek karaciğer toksisitesini

azaltmaktadır. Kokaine bağı karaciğer hasarı NAC ile azalabilmektedir (86). Karaciğer transplantasyonunda reperfüzyon ile gelişen oksidan hasar da NAC ile anlamlı derecede azaltılabilmektedir. Mevcut bilinen etkinlikleriyle NAC, karaciğerde oksidatif strese karşı tedavi edici etki ile transplantasyon hasarı, alkolizm, metal toksisitesi ve fibrozda tedavi rolü oynayabilir (87).

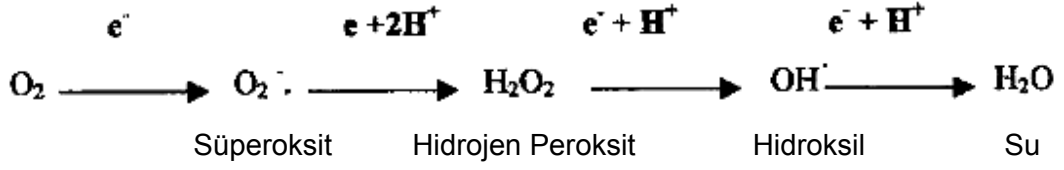
### **2.3. Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistemler**

#### **2.3.1. Serbest Radikaller**

##### **2.3.1.1. Genel Bilgi**

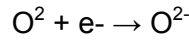
Serbest radikaller, dış orbitalinde tek sayıda elektron bulunan atom veya moleküllerdir. Eğer elektron çiftleşmemiş ise molekül daha reaktif duruma gelir ve kararsızlaşır. Reaktif oksijen molekülleri, tek elektronunu bir başka moleküle verebilenler (radikaller) ve elektron eksikliği olmadığı halde başka moleküller ile radikallerden daha zayıf bir şekilde birleşebilenler (radikal olmayanlar) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. Canlılarda toksik olan moleküler oksijenin tam olmayan indirgenmesi ile oluşan oksijen radikalleridir.

Normal koşullar altında biyolojik sistemlerde var olan moleküler oksijenin çoğu aerobik glikoliz ile ATP üretmek amacıyla bir dizi reaksiyon sonucunda suya indirgenir. Bu olaylar sırasında bir miktar moleküler oksijende kaçak meydana gelmektedir. Bu oksijenin redüksiyonu ile  $O^-$ ,  $H_2O_2$  ve  $OH^-$  gibi reaktif ürünler açığa çıkmaktadır.  $O_2$ 'e enerji ilavesi, tekli oksijen ( $O_2$ ) molekülünü meydana getirir.  $O^-$  ise  $O_2$ 'ye tek bir elektronun ilavesi sonucu oluşur.  $O^-$  radikali, SOD enzimi tarafından katalitik olarak  $H_2O_2$  indirgenir.  $H_2O_2$  düşük toksisiteye sahiptir, fakat kolayca hücrel membranlara penetre olabilir. Özellikle geçiş-metal iyonlarının (Fe, bakır) varlığında  $O^-$  ve  $H_2O_2$  yüksek derecede reaktif  $O^-$  oluşumu ile ilgilidir. Bu reaksiyon "Fenton Reaksiyonu" olarak bilinir (30).

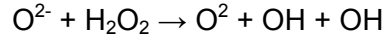


**Şekil 5.** Moleküler oksijenden reaktif ara ürünlerin oluşumu.

**2.3.1.1.a. Süperoksit Radikali:** Aerobik organizmalarda oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit anyon radikali ( $O_2^-$ ) meydana gelir.

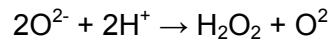


Diğer radikallere göre reaktivitesi daha azdır ve oluşumlarına neden olduğu diğer radikallerle birlikte organizmada genel bir oksitleyici gibi davranmaktadır. Haber-Weiss (Fenton) reaksiyon sonucunda hidroksil radikalının oluşması, süperoksit anyon radikallerinin doku hasarına yol açmasında esas tehlikeli mekanizmadır.



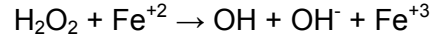
$O_2^-$  radikali, ortam pH'sının düşük olduğu durumlarda bir proton alarak daha reaktif olan perhidroksil radikaline ( $HO_2^-$ ) dönüşebilir. Ancak ortamın pH'sı fizyolojik sınırlarda iken oluşan perhidroksil formu % 1'in altındadır (31).

**2.3.1.1.b. Hidrojen Peroksit:**  $H_2O_2$ , membranlardan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi süperoksidin dismutasyonu ile olmaktadır. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar.



Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri içerisinde yer alır ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zararlı serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturmak üzere yıkılabilmesi ona bu önemi vermiştir (32).

**2.3.1.1.c. Hidroksil Radikali:** OH<sup>-</sup>, hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle meydana gelir. Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucu da hidroksil radikali oluşabilmektedir. Yarılanma ömrü çok kısadır ve oluştuğu yerde büyük hasara neden olabilmektedir.



Bu reaksiyon demir iyonlarının katalizlediği bir reaksiyondur ve Haber-Weiss (Fenton) reaksiyonu olarak ta bilinmektedir.

### **2.3.1.2. Serbest Radikallerin Etkileri**

**2.3.1.2.a. Proteinlere Etkileri:** Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğu için; triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metyonin, sistein gibi aminoasitleri içeren proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Glutatyon redüktaz ve gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz gibi reaktiviteleri için yukarıdaki aminoasitlere bağımlı olan enzimler, serbest radikallerden kolaylıkla etkilenerek inhibe edilirler (33,34). Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerde fragmantasyon ve çapraz bağlanmalar meydana gelebilir. Bunlar da protein fonksiyonlarında bozulmalara yol açabileceği gibi, immun sistemi uyaraabilecek antijenik değişiklikler de oluşturabilirler.

**2.3.1.2.b. Nükleik Asitlere ve DNA'ya Etkileri:** DNA yapısında oksidatif hasara yol açan birçok faktör vardır. Bunlar (iyonize radyasyon, çeşitli kimyasallar) aşırı derecede serbest radikaller meydana getirip direkt olarak DNA'da hasara yol açabilirler. Direkt etkinin yanında DNA'da tamir defektleri oluşturup da hasara yol açabilirler. Oluşan bu serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyonlara ve ölüme yol açarlar. Sitotoksisite büyük oranda ya nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozomal değişikliklere, ya da DNA'daki diğer bozukluklara bağılıdır (35).

**2.3.1.2.c. Membran Lipidlerine Etkileri:** Hücre membranı serbest radikaller için kritik bir bariyerdir, çünkü serbest radikaller hücre komponentleri ile etkileşim için bu bariyeri geçmek zorundadırlar. Lipit peroksidasyonu serbest radikallerin en önemli etkilerindedir. Lipit peroksidasyonu kuvvetli yükseltgeyici bir radikalın

etkisiyle başlayan ve membran yapısındaki doymamış yağ asitlerinin yıkımıyla sonuçlanan kimyasal bir olaydır. Lipit peroksidasyonu lipit hidroksiperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesiyle son bulur. Bu ürünlerden başlıcaları olan malondialdehit ve hidroksinonenal, proteinlere ve DNA'ya bağlanarak kalıcı değişiklikler oluştururlar.

### **2.3.2. Antioksidan Savunma Sistemleri**

#### **2.3.2.1. Genel Bilgi**

Reaktif oksijen türlerinin düzeylerini ve bunların meydana getirdiği hasarı sınırlandırmak için canlılarda antioksidan savunma sistemleri geliştirilmiştir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipit peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar, doğal (endojen kaynaklı) ve ekzojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirler. Antioksidanların değişik şekillerde sınıflandırılması mümkündür. Serbest radikalın meydana gelişini engelleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde bir sınıflama olabileceği gibi, enzim yapısında olanlar ve olmayanlar şeklinde de bir sınıflandırma yapılması mümkündür (36).

#### **2.3.2.2. Antioksidan Etki Tipleri**

Antioksidan etki dört tiptir. a. Toplayıcı etki, b. Bastırıcı etki, c. Onarıcı etki, d. Zincir kırıcı etkidir. SOR'ları etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine "toplayıcı etki" denir. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya "bastırıcı etki" denir. Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak (hemoglobin gibi) zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye "zincir kırıcı etki" denmektedir. Temelde üç çeşit antioksidan vardır.

**2.3.2.2.a. Doğal Antioksidanlar:** Doğal antioksidanların sınıflandırılması Tablo 4'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.** Doğal antioksidanların sınıflandırılması.

<b>Enzimler</b>	<b>Enzim Olmayanlar</b>	
SOD	<b>Lipit fazdakiler</b>	A-tokoferol, β- karoten
CAT		
GSH-Px	<b>Sıvı fazdakiler (sitozol veya plazma)</b>	Askorbat, urat, sistein, seruloplazmin, transferin, laktoferrin, miyogloblin, hemoglobin, albumin, bilirubin, ferritin, glutatyon.
Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi		
GSH-S-transferaz		
	<b>Sıvı ve lipit fazdakiler</b>	Melatonin

**2.3.2.2.b. Ekzojen Antioksidanlar:** Ekzojen antioksidanların sınıflandırılması Tablo 5'te gösterilmiştir.

**Tablo 5.** Ekzojen antioksidanların sınıflandırılması

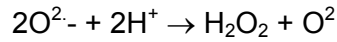
<b>Antioksidasyon Mekanizması</b>	<b>Başlıca Yer Alan İlaçlar</b>
Ksantin oksidaz inhibitörleri	Allopürinol, oksipürinol, folik asit, pterin aldehit
Soya fasülyesi inhibitörleri	Ksantin dehidrogenazın proteolitik etki sonucu ksantin oksidaza dönüşümünü inhibe eder.
NADPH Oksidaz İnhibitörleri	Lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar.



**2.3.2.2.c. Gıda Antioksidanları:** Butile hidroksitoluen, butile hidroksiyanisol, sodyum benzoat, etoksikuin, propil galat, Fe-SOD.

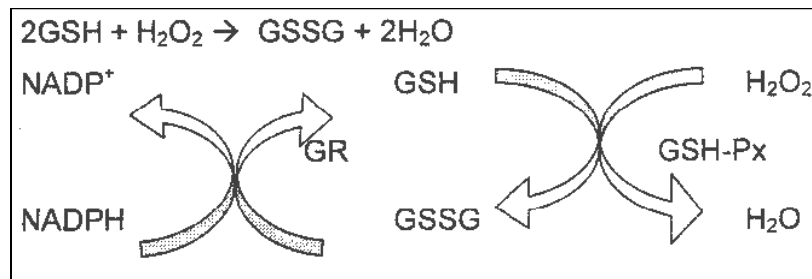
### 2.3.2.3. Antioksidan Enzimler

**2.3.2.3.a. Süperoksit Dismutaz:** SOD enzimi,  $O_2^{\cdot-}$ 'nin  $H_2O_2$  ve  $O_2$  dönüşümünü katalizlemektedir. SOD enzimi, süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli bir rol üstlenmektedir (37). Katalizlediği reaksiyon şu şekildedir:



Enzimin primer fonksiyonu, hücreleri süperoksit radikalinin zararlı etkilerinden korumaktır. Bu şekilde hücrelerdeki lipit peroksidasyonu da inhibe edilmiş olur (88). SOD, fagosite edilen bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynamaktadır. Bu nedenle, SOD granülosit fonksiyonu için çok önemlidir.

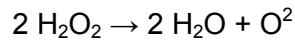
**2.3.2.3.b. Glutasyon Peroksidaz:** Glutasyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Tetramerik yapıdadır ve dört selenyum (Se) içerir. Diyetteki Se desteği enzim aktivitesini modüle eder. Enzim aktivitesi heksoz monofosfat yolunda üretilen NADPH'a bağımlıdır. Düşük konsantrasyonlardaki  $H_2O_2$ , öncelikle GSH-Px tarafından temizlenir. Bu enzim, redükte glutasyonun okside glutatyona çevrildiği ortamda hidrojen peroksidi yüksek spesifite ile detoksifiye etmektedir. Redükte GSH okside glutasyon (GSSG) haline dönüştüğü reaksiyonda GSH-Px enzimiyle hidrojen peroksit suya indirgenmiş olur. Daha sonra glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile NADPH harcanarak, okside glutasyon redükte hale dönüştürülür. Oluşan reaksiyonlar şu şekildedir:



**Şekil 6.** Glutasyonun okside ve redükte formları arasındaki dönüşümü.

GSH-Px'in, fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller. GSH-Px aktivitesi düşük olan makrofajlarda başlatılan solunum patlamasını takiben, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> salınımının arttığı gösterilmiştir (39). Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar (40).

**2.3.2.3.c. Katalaz:** Glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Enzimin molekül ağırlığı 240.000 daltondur. Her biri ferriprotoporfirin grubu içeren dört adet alt üniteden oluşmuştur. Ferriprotoporfirin, prostetik grubunda +3 değerlikli Fe atomu bulunan protoporfirin IX halkasıdır. Eritrositler yüksek oranda CAT içermekte olup, CAT aktivitesinin %98'den fazlasını sağlarlar (41).CAT enzim aktivitesinin en yüksek olduğu dokular karaciğer ve böbrek dokularıdır. Enzim dokularda başlıca mitokondri ve peroksizom partiküllerine bağlı olarak bulunmaktadır. Bundan başka endoplazmik retikulum ve sitoplazmada da aktivite göstermektedir. CAT, okside edici enzimlerin etkisiyle ortamda oluşan hidrojen peroksidi direkt olarak suya dönüştürür. Ortamdaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (GSH-Px) devreye girerek hidrojen peroksidi ortamdaki uzaklaştırırlar. Aynı etkileri gösteren CAT ve GSH-Px enzimleri, hücre içi yerleşimleri ve etki yerleri bakımından farklılıklar gösterirler. CAT enzimi peroksizomlarda daha etkin iken, GSH-Px enzimi başlıca sitozol ve mitokondride etkindir. Katalizlediği reaksiyon şu şekildedir:



CAT'ın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ve metil-etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine ise etki etmez. (1).

### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada; 15 haftalık ve ağırlıkları 200–320 gram arasında olan 30 adet Wistar-Albino cinsi erkek ratlar kullanıldı. Ratlar Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan alındı. Çalışma için SDÜ Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 20.02.2008 tarih ve 11 sayılı kararıyla onay alındı.

#### 3.1.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması

Deney mekanı SDÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı tarafından oluşturuldu. Kullanılan laboratuvar; 12 saat gece 12 saat gündüz olan, havalandırılabilen, nemi ve ısı ratların ideal şekilde yaşaması için ayarlanmıştı. Deneyde gerekli olan rat yemi, rat kafesi, rat suluğu kullanıldı. Ratlar; Grup 1 Kontrol (K, n:10), Grup 2 Doksorubisin (D, n:10) ve Grup 3 “doksorubisin + N-asetilsistein” (DN, n:10) olarak üç gruba ayrıldı. Rat grupları ve uygulanan ilaçlar Tablo 6'da gösterildi.

**Tablo 6.** Rat grupları ve uygulanan ilaçlar.

Gruplar (n) →	Kontrol (n:10)	Doksorubisin (n:10)	Doksorubisin + N-asetilsistein (n:10)
Intraperitoneal enjeksiyon içeriği	serum fizyolojik	Doksorubisin, 20 mg/kg	Doksorubisin, 20 mg/kg
Gavaj içeriği	serum fizyolojik	serum fizyolojik	N-asetilsistein, 140 mg/kg
Deney başlangıcındaki ortalama rat ağırlığı (gram)	258 ± 34.14	261.10 ± 28.07	256.50 ± 20.65

**1. grup: Kontrol (K) grubu:** Bu gruba nazogastrik (NG) yolla 0. ve 24. saatlerde steril koşullarda 1 mililitre (ml) serum fizyolojik (SF) ile 48. saatte intraperitoneal (İP) yolla yine SF verildi. Gavajla SF uygulamasına 24 saatlik aralıklarla çalışma sonuna dek devam edildi.

**2. grup: Doksorubisin (D) grubu:** Bu gruba steril koşullarda 0. ve 24. saatlerde NG ile 1 ml SF, 48. saatte doksorubisin (20 mg/kg dozda, 1 ml distile su ile sulandırılarak) İP yolla uygulandı. Doksorubisin (Adriblastina® flakon 10 mg, Carlo Erba İlaç Sanayi ve Ticaret A.ř.) uygulamasından sonra 24 saat aralarla gavajla 1 ml SF verildi.

**3. grup: Doksorubisin + N-asetilsistein (DN) grubu:** alışmanın 0. ve 24. saatlerinde eşme suyu ile hazırlanan NAC 140 mg/kg dozunda (Asist® Pediatrik süspansiyon, 60 gr/150 ml, Hüsnü Arsan İlaçları A.ř.) gavajla verildi. Bu gruba 48. saatte steril koşullarda doksorubisin (20 mg/kg dozda, 1 ml distile su ile sulandırılarak) İP yolla uygulandı. Sonra gavajla 24 saat aralarla çalışma sonuna dek SF verildi.

### **3.1.3. Anestezi**

Sakrifikasyon sevofuran ile gaz anestezisini takiben tam anestezi gerçekleştikten sonra gerçekleştirildi. Ratların göğüs kafesi açıldıktan sonra evre dokulardan arındırılarak kalbe ulaşıldı. Apikal kesi ile kalp durdurularak serbestleştirildi ve yerinden çıkarıldı. Dokular biyokimyasal çalışma için fosfat tamponu konulmuş ependorf içinde -20°C'de derin dondurucuya yerleştirildi. Histopatolojik alışma için de % 10'luk nötral formole konuldu. Yirmidört saat sonra biyokimyasal ve histopatolojik çalışmalar yapıldı.

### **3.2. Deneyde Kullanılan Cihazlar**

Soğutmalı santrifüj eppendorf MR 5415 (Almanya), derin dondurucu Facis (Fransa), hassas terazi Scaltec (İsviçre), Vorteks (karıştırıcı) Nüve NM 100 (Türkiye), otomatik pipetler Gilson (Fransa), eppendorf, ultraviyole spektrofotometre Shimadzu UV 1601 (Japonya), homojenizatör Ultra Turrax T25 (Almanya), Viva (ilaç düzeyi ölçüm cihazı) Dade Dehring (Almanya- ABD).

### 3.3. SOD, GSH-Px ve Katalaz için Dokuların Homojenizasyonu

Doku örnekleri önce kanı uzaklaştırmak için soğuk distile suyla yıkandı. Dokular hassas terazide tartılıp, 1/10 oranında fosfat tamponu ile dilüe edildi. Daha homojenizör (Ultr-Turrax T25, Ika labor Technik, Almanya) ile 9600 devir/dk'da 30 saniye süreyle soğuk zincirde mekanik olarak homojenize edildi. Burada parçalanmış numuneler 30 saniye süreyle sonifikasyon işlemine (Bandelin Sonoplus, HD2070, Almanya) tabi tutuldular. Bu süre sonunda elde edilen % 10'luk homojenatlar, +4°C'de 10 dakika süreyle 5000 g'de santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Bu süpernatantlarda protein, MDA düzeyleri ile GSH-Px, SOD ve CAT aktiviteleri çalışıldı.

### 3.4. Dokularda Biyokimyasal Analizler

#### 3.4.1. SOD Aktivitesinin Ölçümü

**Deneyin prensibi:** Sun ve arkadaşlarının metoduna dayanmaktadır (89). SOD çeşitli yollarla ortaya çıkan süperoksit radikalinin  $H_2O_2$ 'ye dismutasyonu reaksiyonunu katalizler. Ksantin-ksantin oksidaz (XOD) sistemi tarafından üretilen süperoksit radikallerinin, 2-(4-iyodofenil)-3-(4-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolyum klorit (INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazon boyasının, 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanmaktadır. Bu reaksiyona dayanan optik dansitedeki azalmadan yararlanarak, reaksiyonun % inhibisyonu belirlendi.

**Deneyin Yapılışı:** Yirmibeş µl homojenattan alındı ve % inhibisyonun % 30-60 arasında olması için örnekler dilüe edilmedi. 0.025 ml homojenata, 0.850 ml 0.05 mM ksantin çözeltisi (0.025 mM INT içeren) ve 40 mM'lık CAPS (0.94 mM'lık EDTA içeren) ilave edildi. 0.125 ml ksantin oksidaz (80 U/L) ilave edildikten hemen sonra 505 nm'de 37 °C'de 30 saniyelik gecikme fazının ardından, havaya karşı başlangıç absorbansı (A1) ve 3 dakika sonra da son absorbans (A2) okundu. Aynı işlemler köre karşı denemeyle de tekrarlandı. Standart (5.2 U/mL) çalışılarak hazırlanan % inhibisyon-konsantrasyon grafiğinden yararlanılarak konsantrasyonlar saptandı. Enzim aktivitesi U/ml olarak bulundu. Bu değerler homojenizasyon

sırasındaki dilüsyon katsayısı ile çarpılıp dokunun protein değerine bölünerek U/gr birimi şeklinde sonuçlar verildi.

### 3.4.2. GSH-Px Aktivitesinin Ölçümü

**Deneyin prensibi:** Paglia ve Valentine'nin metoduna dayanmaktadır (90). Glutasyon peroksidaz, kümen hidroperoksid ile glutasyonun oksidasyonunu katalizler. Okside glutasyon, NADPH varlığında glutasyon redüktaz tarafından indirgenir. Bu arada NADPH, NADP+' ye oksitlenir. Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat'ın azalmasına bağlı olarak 340 nm'de meydana gelen absorbans değişimi ölçülerek enzim aktivitesi hesaplandı. Deneyin yapılışı: Bir deney tüpünde 1 ml; glutasyon (4 mM), glutasyon redüktaz ( $\geq 0.5$  U/L) ve  $\beta$ -NADPH (0.34 mM) çözeltilerini içeren reaktif ile 20  $\mu$ l numune karıştırılıp, ölçümden hemen önce 40  $\mu$ l kümen hidroperoksit (0.18 mM) ilave edildi. Enzim aktivitesini ölçmek için 340 nm'deki absorbans değişimi hesaplandı. U/L cinsinden bulunan enzim aktivitesi, homojenizasyon esnasındaki dilüsyon katsayısı ile çarpıldıktan sonra doku protein değerine bölünerek sonuçlar U/gr birimi olarak ifade edildi.

### 3.4.3. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü

**Deneyin prensibi:** Aebi metoduna dayalı olarak yapıldı (91). Hidrojen peroksidin CAT tarafından parçalanması timeline dayalı UV spektrofotometrik yöntem ile CAT aktiviteleri tayin edilmiştir. Hazırlanan homojenat, fosfat tamponuyla 10 kat dilüe (0.2 ml homojenat + 1.8 ml fosfat tamponu) edildi. 2 ml'lik bu dilüe homojenat üzerine taze hazırlanan ve 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren fosfat tampon çözeltilisinden 1 ml eklendi. 240 nm'de ilk 30 saniye içinde 15'er saniyelik absorbans azalması bulunarak, k değeri aşağıdaki şekilde hesaplandı:

$$k = 2.3 / \Delta t \times (\log A1/A2) \times (a / b)$$

A1: 240 nm deki başlangıç absorbansı (t1=0), A2: 240 nm deki 15. sn'deki absorbansı (t2=15), a: dilüsyon faktörü, b: homojenatın protein miktarı

#### **3.4.4. MDA Aktivitesinin ve Protein Düzey Ölçümü**

MDA: HPLC ile dokuda MDA analizi Mateos ve ark. metodu ile çalışıldı (92). Protein: Otoanalizör ile Lowry ve ark. (93) metoduna göre ticari kitle çalışılmıştır (DC Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, California, USA).

#### **3.5. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

##### **3.5.1. SOD Tayini İçin Kullanılanlar**

Potasyum dihidrojen fosfat, Merck (Almanya), Disodyum hidrojen fosfat dihidrat, Merck (Almanya), CAPS, Sigma (Almanya), Iodonitrotetrazolyum violet, Sigma (Almanya), Ksantin, Merck (Almanya)X Ksantin oksidaz, Sigma (Almanya), Titripleks III, Merck (Almanya).

##### **3.5.2. GSH-Px Tayini İçin Kullanılanlar:**

Potasyum dihidrojen fosfat, Merck (Almanya)X Disodyum hidrojen fosfat dihidrat, Merck (Almanya)X Glutasyon redüktaz, Fluka (İsviçre),  $\beta$ -NADPH, Sigma (Almanya), Glutasyon-redükte, Sigma (Almanya), Kümen hidroperoksit, Sigma (Almanya), Titripleks III, Merck (Almanya).

##### **3.5.3. Katalaz Tayini İçin Kullanılanlar**

Potasyum dihidrojen fosfat, Merck (Almanya), Disodyum hidrojen fosfat dihidrat, Merck (Almanya), Hidrojen peroksit, Merck (Almanya).

##### **3.5.4. MDA ve Protein Tayini için Kullanılanlar**

MDA: ThermoFinnigan Spectra High Performance Liquid Chromatograph with Diode Array Detector San Jose, California, USA. Protein: Aeroset Automated Analyzer, Abbott Laboratories, Illinois, USA.

### 3.6. Kullanılan Çözeltiler

#### 3.6.1. SOD Tayini İçin Kullanılanlar

- CAPS tamponu (pH: 10.2), 40 mM: 8.85 gr CAPS tartılıp 400 ml distile suda çözülüp pH'ı 10.2'ye ayarlandıktan sonra hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. 0.94 mM EDTA (0.36 gr) tartılıp CAPS tamponuna katıldı.

- Ksantin çözeltisi (0.05 mM): 7.6 mg ksantin tartıldı ve hacmi 40 mM CAPS tamponu (0.94 mM EDTA içeren; pH: 10.2) ile 1000 ml'ye tamamlandı. Çözelti, 0.025 mM 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorür (INT) içermektedir ve +2 / +8°C'de muhafaza edildiğinde 10 gün süreyle kararlıdır.

- Ksantin oksidaz çözeltisi (80 U/L): 56 µl ksantin oksidaz standardından alınır, 10 ml distile su ile seyreltilir. Çözelti, günlük hazırlanır.

#### 3.6.2. GSH-Px Tayini için Kullanılanlar

- Kümen hidroperoksit çözeltisi (0.18 mM): Kümen hidroperoksitten 1.62 µl alınır, 50 ml distile su ile seyreltilir. Çözelti, günlük hazırlanır.

- Glutasyon çözeltisi (4 mM): 0.0614 gr glutasyon tartılır ve hacmi 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.2 olan ve 4.3 mM EDTA içeren) ile 50 ml'ye tamamlanır.

- Glutasyon redüktaz ( $\geq 0,5$  U/L): 10 µl glutasyon redüktaz alınır, 10 ml distile su ile seyreltilir. Bundan 50 µl çekilip, 50 mM fosfat tamponu (4.3 mM EDTA içeren ve pH: 7.2 olan) ile 50 ml'ye seyreltilir. Çözelti, günlük hazırlanır.  $\beta$ -NADPH çözeltisi (0.34 mM): 0.0116 gr  $\beta$ -NADPH tartılıp hacmi 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.2 olan ve 4.3 mM EDTA içeren) ile 50 ml'ye tamamlanır.

#### 3.6.3. Katalaz Tayini İçin Kullanılanlar:

- 50 mM fosfat tamponu: 2.7218 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 5.3397 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  tartılarak 500 ml distile suya tamamlandı..

- 30 mM hidrojen peroksit için: 0.34 ml % 30'luk hidrojen peroksit, 100 ml fosfat tamponu ile dilüe edildi.



### 3.6.4. MDA Tayini için Kullanılanlar

Tartılan dokular pH 7.16 olan fosfat tamponuna kondu ve alındıktan hemen sonra -20°C'ye saklandı. Numuneler çalışılacakları zaman eritildi ve 500 ppm BHT ilavesinden sonra bu tamponda Ultra Turrax T25 Homogenizer ile 2500 rpm'de +4°C sıcaklıkta homojenize edildi. Homojenatlar 10,000 X g'de 30 dakika boyunca +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatantlardan 250 µL eppendorf tüplere alındıktan sonra üzerine 6M 50 µL NaOH solüsyonu eklenerek final hacim 300 µL'ye çıkarıldı. Alkali süpernatantlar daha sonra 60°C su banyosunda 30 dakika inkübe edildi (proteine bağlı MDA'nın hidrolizi). Numuneler soğutulduktan sonra %35'lik (v/v) perklorik asit ilavesiyle proteinlerin presipitasyonu sağlandı. Karışım 2800 X g'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatantlardan 250 µL eppendorf tüplere aktarıldı ve üzerine 25 µL dinitro fenil hidrazin (DNPH, 5mM) eklenerek vorteksledi. 30 dakika karanlıkta türevlenmeye bırakılan numunelerden 50 µL HPLC sistemine enjekte edildi.

### Kromatografik koşullar

Kolon : 5µm, 125x4mm Nucleosil 100C18 RP

Mobil Faz (Izokratik): Acetonitrile/H<sub>2</sub>O/Acetic Acid (38/62/0,2 –v/v/v)

Akım Hızı : 0.6 mL/min

Isı : 23°C

UV λ : 310 nm

### 3.7. Histolojik Değerlendirme

Çıkarılan kalp dokusu örnekleri, % 10'luk nötral formaldehit çözeltisinde immersiyon fiksasyon tekniği kullanılarak sabitlendi ve rutin histolojik doku takibi uygulanarak parafin bloklar hazırlandı. Hazırlanan parafin bloklardan, Leica tipi kızaklı mikrotom ile dört mikron kalınlığında kesitler alındı ve elde edilen kesitler, Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Boyanan örnekler, Olympus BX-50 tipi ışık mikroskopunda incelendi ve kesitlerin fotoğrafı çekildi. Histopatolojik değerlendirmede ödem, enflamasyon, vakuolizasyon, hemoraji, nekroz ve dağılma parametreleri kullanıldı. Her bulgu, negatiften (-) üç pozitif (+, ++, +++) kadar değişen şekilde derecelendirildi ve yarı nitel değerlendirme yapıldı. Her gruptan kaç ratta bu bulguların görüldüğü kaydedildi. Ayrıca, hazırlanan kalp dokusu kesitlerinde

sol ventrikül duvarında miyofibril kalınlığı 10 farklı alanda oküler mikrometre ile ölçüldü ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. Miyofibril kalınlıklarına göre de kardiyomiyopatinin olup olmadığına bakıldı.

### **3.8. İstatistik Çalışma**

Doku örneklerinin istatistik analizinde, Graphpad Prism 4.0 yazılımı kullanıldı. Çoklu grup karşılaştırmaları için tek yönlü ANOVA ve Tukey testleri, gruplar arası ikili karşılaştırmalarda çift yönlü t testleri ve yarı nitel değerlendirme içinse Ki-kare testi kullanıldı. Elde edilen sonuçlara göre, 0.05'in altındaki p değerleri istatistik açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Biyokimyasal Bulgular

Alınan doku örneklerinden yapılan biyokimyasal analiz sonucunda, grupların enzim etkinlik seviyelerine göre karşılaştırılmaları ve p değerleri Tablo-7'de ve Şekil 7-10'da verildi. Kontrol grubuyla D grubu arasında MDA, SOD, CAT ve Gsh-Px enzim etkinlik seviyelerinin anlamlı şekilde farklı olduğu bulundu ( $p<0.05$ ). Doksorubisin ve DN grupları arasında MDA, SOD, CAT ve Gsh-Px enzim etkinlik seviyeleri yönünden farklılık yoktu ( $p>0.05$ ). Yine K ve DN grupları arasında da farklılık olmadığı gözlemlendi ( $p>0.05$ ).

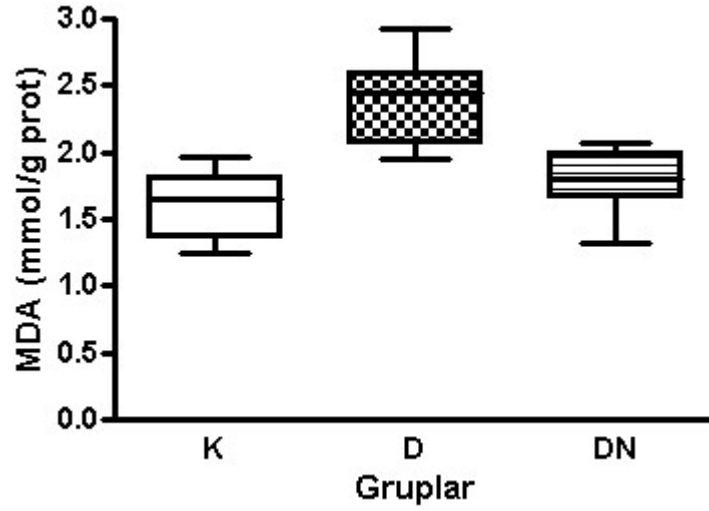
Ratların çalışma başlangıcında ve bitiminde ölçülen ortalama ağırlıkları ve p değerleri Tablo-8'de, Şekil 11,12'de gösterildi. Çalışma başlangıcında ölçülen ortalama ağırlık değerleri yönünden gruplar arasında herhangi bir fark bulunmazken, çalışma bitiminde K grubuyla diğer iki gruba kıyaslandığında anlamlı farklılık olduğu görüldü ( $p<0.05$ ).

**Tablo 7.** Grupların enzim etkinlik seviyelerine göre karşılaştırılması ve p değerleri.

		Malondialdehid (mmol/g)	Süperoksid Dismutaz (u/g)	Katalaz (u/g)	Glutasyon Peroksidaz (u/g)
Gruplar	Kontrol (K)	1.61 ± 0.24	882.31 ± 102.06	2.32 ± 0.41	80.76 ± 37.03
	Dokso rubisin (D)	2.38 ± 0.31	682.80 ± 16.67	1.78 ± 0.09	72.22 ± 33.16
	Dokso rubisin N-asetilsistein (DN)	2.08 ± 0.21	710.70 ± 53.09	1.87 ± 0.13	75.27 ± 35.96
Grupların karşılaştırılması ve p değerleri	K-D	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05
	K-DN	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05
	D-DN	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05

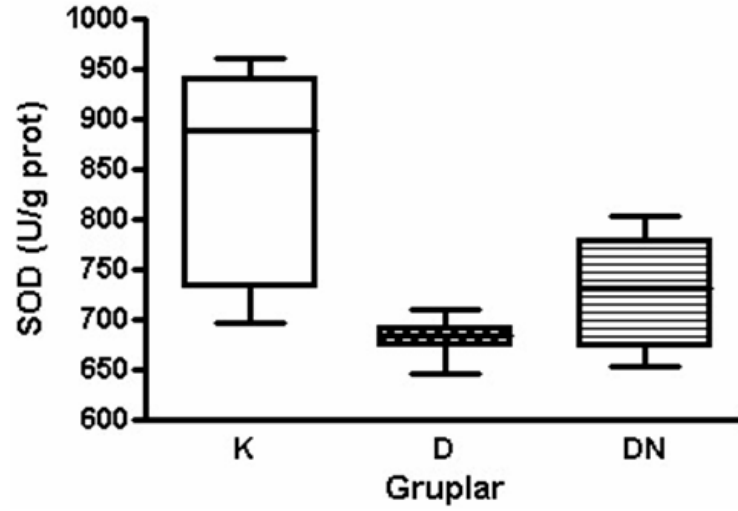
**Tablo 8.** Grupların rat ağırlıklarına göre karşılaştırılması ve p değerleri.

		Çalışmanın başlangıcında (gram)	Çalışmanın bitişinde (gram)
Gruplar	Kontrol (K)	258 ± 34.14	255.6 ± 31.96
	Dokso rubisin (D)	261.1 ± 28.07	183.0 ± 12.11
	Dokso rubisin N-asetilsistein (DN)	256.5 ± 20.65	216.3 ± 12.82
p değerleri	K-D	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> < 0.05
	K-DN	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> < 0.05
	D-DN	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05



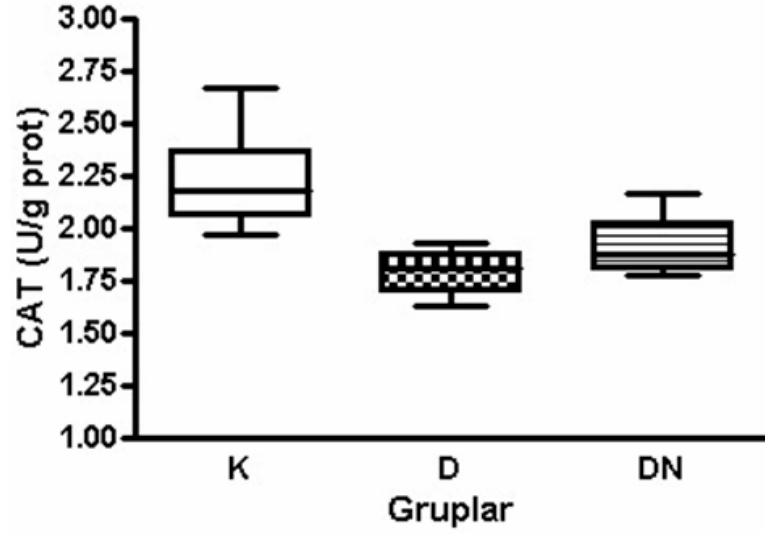
**Şekil 7.** Deney gruplarında kalp dokusu ortalama Malondialdehid (MDA) enzim aktiviteleri.

**K:** Kontrol grubu, **D:** Dokсорubisin grubu, **DN:** Dokсорubisin + N-asetilsistein grubu.  
**MDA:** Kalp dokusu malondialdehid düzeyi (mmol/g protein)

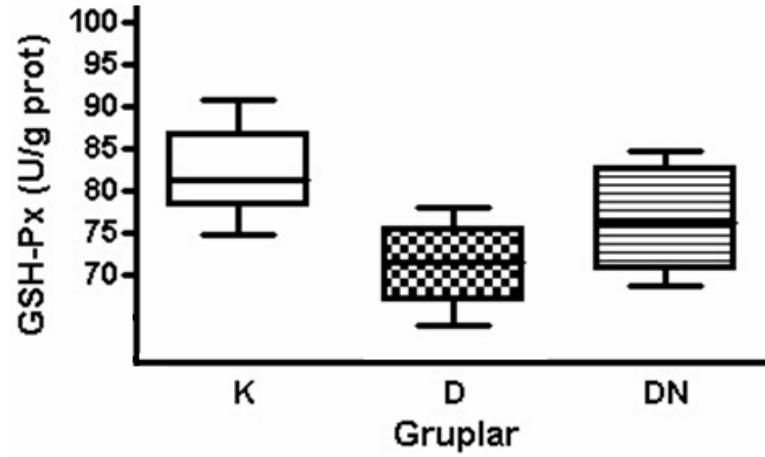


**Şekil 8.** Deney gruplarında kalp dokusu ortalama Süperoksid Dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri.

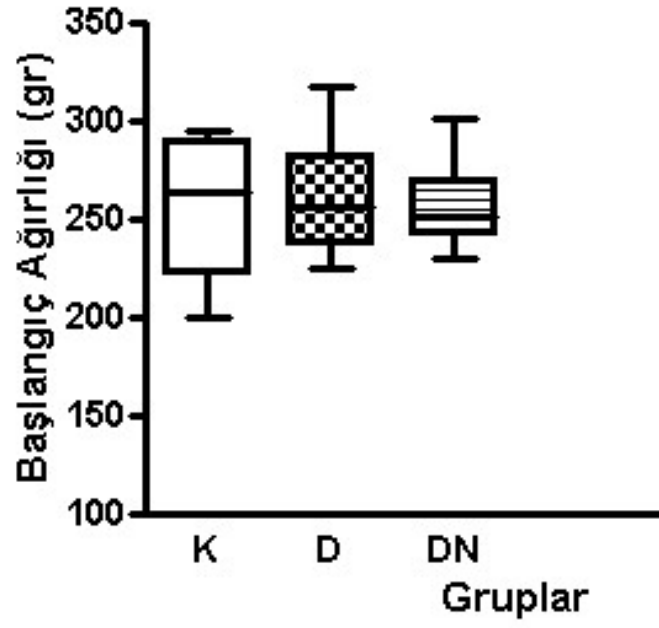
**K:** Kontrol grubu, **D:** Dokсорubisin grubu, **DN:** Dokсорubisin + N-asetilsistein grubu.  
**SOD:** Kalp dokusu süperoksid dismutaz düzeyi (U/g protein).



**Şekil 9.** Gruplarda kalp dokusu ortalama Katalaz (CAT) enzim aktiviteleri.  
**K:** Kontrol grubu, **D:** Dokсорubisin grubu, **DN:** Dokсорubisin + N-asetilsistein grubu.  
**CAT:** Kalp Dokusu Süperoksid Dismutaz Düzeyi (U/g protein).

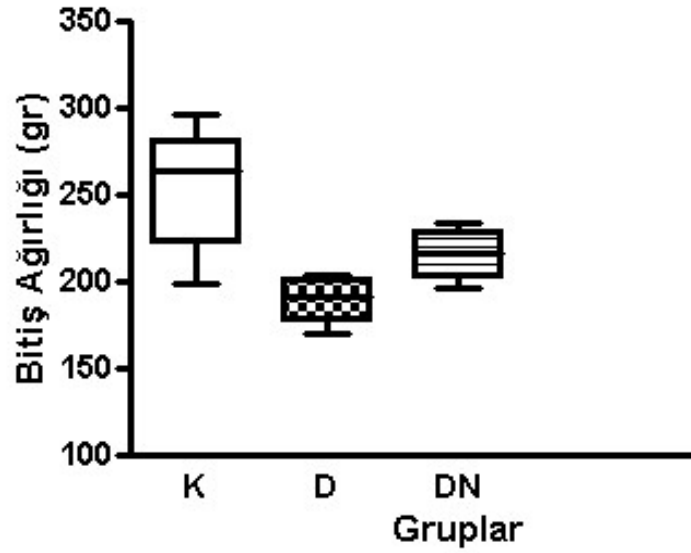


**Şekil 10.** Gruplarda kalp dokusu ortalama Gsh-Px (Glutasyon Peroksidaz) enzim aktiviteleri.  
**K:** Kontrol grubu, **D:** Dokсорubisin grubu, **DN:** Dokсорubisin + N-asetilsistein grubu.  
**Gsh-Px:** Kalp Dokusu Glutasyon Peroksidaz Düzeyi (U/g protein).



**Şekil 11.** Ratların deney başlangıcındaki vücut ağırlıkları.

**K:** Kontrol grubu, **D:** Doksorubisin grubu, **DN:** Doksorubisin + N-asetilsistein grubu.



**Şekil 12.** Ratların deney sonunda vücut ağırlıkları.

**K:** Kontrol grubu, **D:** Doksorubisin grubu, **DN:** Doksorubisin + N-asetilsistein grubu.

## 4.2. Histolojik Bulgular

Gruplarda kalp dokusunun histolojik parametrelere göre yarı nitel olarak değerlendirilmesi ve p değerleri sonucunda tespit edilen bulgular Tablo 9'da gösterildi. Doksorubisin grubunun (Resim 1) miyokard tabakası incelendiğinde, kontrol grubuna (Resim 3) göre bazı yapısal değişikliklerin ortaya çıktığı izlendi. Bu değişiklikler ödem, enflamasyon, vakuolizasyon, hemoraji, nekroz ve dağılma şeklindeydi ve istatistik açıdan anlamlıydı ( $p < 0.05$ ). "Doksorubisin + N-asetilsistein" grubunun (Resim 2) miyokard tabakaları aynı parametreler açısından K grubuyla karşılaştırıldı ve (Resim 3) farklı olduğu görüldü ( $p < 0.05$ ). Doksorubisin grubuna ait sol ventrikül duvarı miyofibril kalınlıklarının da K grubuna göre arttığı görüldü ( $p < 0.05$ ) (Tablo 10). "Doksorubisin + N-asetilsistein" grubunun kalp dokusu miyofibril kalınlıkları K grubuyla karşılaştırıldı ve anlamlı fark bulunamadı ( $p > 0.05$ ).

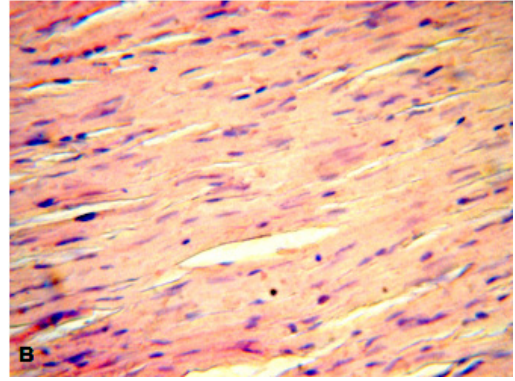
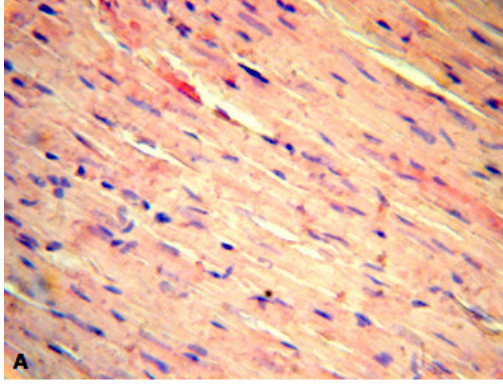


**Tablo 9.** Grupların histopatolojik parametrelere göre değerlendirilmesi ve p değerleri.

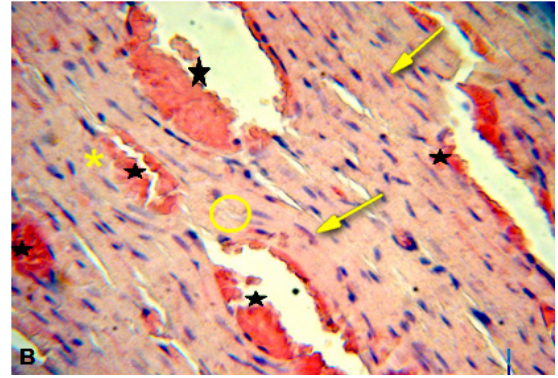
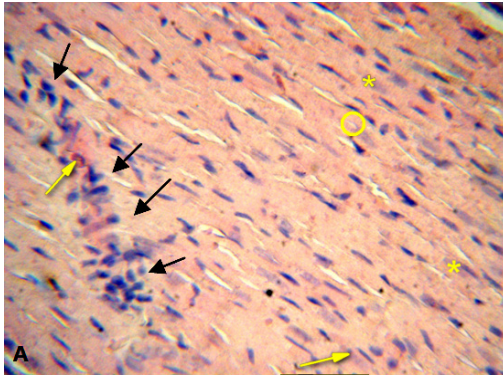
		Kontrol (K)				Doksorubisin (D)				Doksorubisin N-asetilsistein (DN)			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Puanlama Derecesi	Ödem (a)	9	1	0	0	0	0	2	8	7	2	1	0
	Enflamasyon (b)	9	1	0	0	0	0	1	9	8	1	1	0
	Vakuolizasyon (c)	10	0	0	0	0	0	3	7	8	1	1	0
	Hemoraji (d)	10	0	0	0	0	0	2	8	5	3	1	1
	Nekroz (e)	10	0	0	0	0	0	1	9	7	2	1	0
	Dağılma (f)	10	0	0	0	0	0	3	7	6	3	1	0
p değerleri		a		b		c		d		e		f	
	K-D	$p < 0.05$		$p < 0.05$		$p < 0.05$		$p < 0.05$		$p < 0.05$		$p < 0.05$	
	K-DN	$p > 0.05$		$p > 0.05$		$p > 0.05$		$p > 0.05$		$p > 0.05$		$p > 0.05$	
	D-DN	$p < 0.05$		$p < 0.05$		$p < 0.05$		$p < 0.05$		$p < 0.05$		$p < 0.05$	

**Tablo 10.** Grupların sol ventrikül duvarı miyofibril kalınlıklarına göre karşılaştırılması ve p değerleri.

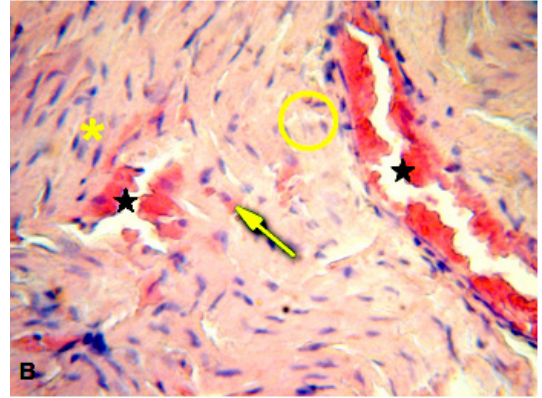
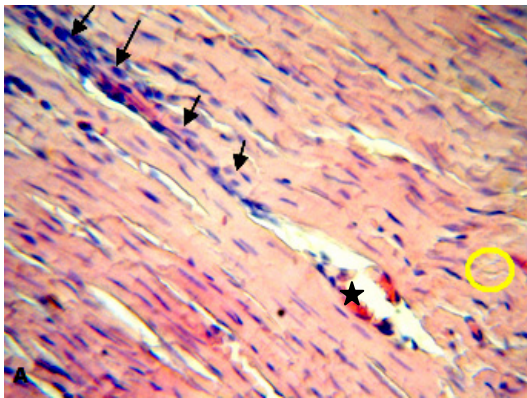
		Sol ventrikül duvarı miyofibril kalınlığı (µm)	Grupların karşılaştırılması		
Gruplar	Kontrol (K)	10.75 ± 1.43	p değerleri	K-D	$p < 0.05$
	Doksorubisin (D)	13.10 ± 1.74		K-DN	$p > 0.05$
	Doksorubisin N-asetilsistein (DN)	11.90 ± 1.26		D-DN	$p > 0.05$



**Resim 1:** Kontrol grubuna ait miyokard tabakası (Normal histolojik bulgular) (Ax400, Bx400) (H-E).



**Resim 2:** Dokсорubisin grubuna ait miyokard tabakası: **A.** Mononükleer hücre infiltrasyonları (siyah ok), hücre şişmesi (sarı yıldız), vakuolizasyon (sarı halka), nekrotik hücreler (sarı ok), dağılıma. **B.** Vakuolizasyon (sarı ok), hücre şişmesi (sarı yıldız), hemorajik alanlar (siyah yıldız), nekrotik hücreler (sarı ok), dağılıma. (Ax400, Bx400) (H-E).



**Resim 3:** Dokсорubisin – N-asetilsistein grubuna ait miyokard tabakası: **A.** Vakuolizasyon (sarı halka), mononükleer hücre infiltrasyonları (siyah ok), hemorajik alanlar (siyah yıldız), dağılıma. **B.** Vakuolizasyon (sarı halka), hücre şişmesi (sarı yıldız), hemorajik alanlar (siyah yıldız), nekrotik hücreler (sarı ok), dağılıma.

## 5. TARTIŞMA

Doksorubisin hücre döngüsüne nonspesifik etki eden anti-tümör bir ilaçtır (94). Birçok kullanım alanı olmasına rağmen kardiyotoksik yan etkisi bu kullanımı kısıtlayan önemli ve en temel nedendir. Toksik yan etkilerinden serbest oksijen radikalleri (SOR) sorumludur (81,82). Doksorubisine bağlı olarak meydana gelen kardiyotoksisitenin patogenezi tam açıklanamamakla birlikte, oluşan SOR'lar eğer temizlenemezse hücrede hasara yol açtığı bilinmektedir (83,95). Kardiyotoksisite gelişmesinde serbest radikallerin açığa çıkmasının ve antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimin temel rol oynadığı ortaya konulmuştur (96). Bazı çalışmalarda doksorubisine bağlı olarak oluşan oksidatif stresin vitamin E, aspirin, dexrazoksane (ICRF-187) gibi antioksidanlarla ve desferroksamin gibi maddelerle azaltılabileceği bildirilmektedir (97,98). Doksorubisinin 550 mg/m<sup>2</sup> kümülatif dozunda insanda akut kardiyotoksisite geliştiği bilinmektedir (99). Bizim çalışmamızda ratlar için doksorubisinin akut kardiyak toksik dozu olan 20 mg/kg uygulandı. Uyguladığımız kümülatif doksorubisin dozu da literatürdeki çalışmalarla aynı idi (100,101). İlacın kardiyak hasarından korunmak için de antioksidan etkisi bilinen ve yapısındaki tiyol sayesinde GSH üretimine aktif katılan N-asetilsistein de literatürde önerilen antioksidan dozda (140 mg/kg) uygulandı (102,103).

Venditti ve ark.<sup>104</sup> oksidatif hasar yatkınlığının organlara göre değiştiğini belirtmiştir. Antioksidan kapasiteye göre organları karaciğer, kan, kalp, kas olarak sıralamıştır. Bu araştırmacılara göre, ömürleri kısa olan ve oluştukları dokuda etkin olan antioksidan enzimlerin ve serbest radikallerin doku düzeylerinin saptanması, tanısal değer bakımından plazma değerlerinden daha kıymetlidir. Plazma antioksidan enzim aktivitelerinin doku enzim aktiviteleri ile paralellik göstermediğini, bu bulgunun antioksidan kapasitenin organlara göre farklılık göstermesine bağlı olabileceğini ortaya koymuşlar ve bu tür çalışmalarda doku enzim aktivitesinin çalışılmasının daha güvenli olacağını savunmuşlardır. Ancak klinikte plazma değeri belirlenmesinin doku değerlerinin belirlenmesinden daha pratik olabileceğini de belirtmişlerdir. Bu nedenlerden dolayı plazma antioksidan enzim aktivitelerinin, doksorubisin kardiyotoksisitesini belirlemede kullanılamayacağını vurgulamışlardır. Aynı yaklaşımla literatürdeki bazı çalışmalar doku antioksidan ve lipid peroksidasyon kapasitesine bakmışlardır (103-107). Benzer düşüncüyü biz de paylaştığımız için

çalışmamızda plazma düzeyleri yerine, kalp dokusunda GSH-Px, SOD, MDA ve CAT düzeylerini belirlemeyi tercih ettik.

Doksozubisine bağlı kardiyotoksisitenin patofizyolojisinden kalp dokusundaki MDA düzeylerinde yükselmenin sorumlu tutulduğunu gösteren çok sayıda çalışma bildirilmiştir (105-109). Çeşitli antioksidan ajanların da MDA düzeylerinde azalma sağlayarak doksozubisin kardiyotoksisitesini önlediği gösterilmiştir (20). Demirkaya'nın<sup>72</sup> çalışmasında, yüksek ve düşük doz kümülatif doksozubisin uygulamasından yedi gün sonra bakılan MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı değişme tespit etmemiştir. İliskovic ve ark.<sup>105</sup> doksozubisinin son dozundan üç hafta sonra kalp dokusunda MDA düzeyinde anlamlı artış saptadıklarını bildirmişlerdir. Luo ve ark.<sup>111</sup> 10 mg/kg tek doz doksozubisin verilen ratlarda plazma ve doku MDA düzeylerindeki yükselmenin ikinci saatte pik yaptığını, 24. saatte plazma MDA düzeyinin başlangıç düzeyine döndüğünü, ancak dokuda MDA yüksekliğinin devam ettiğini göstererek, doksozubisinin ilk dozunun MDA veya benzer başka sitotoksik maddelerin salınımını indükleyerek kardiyotoksisiteyi başlattığını ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda doksozubisin grubunda MDA enzim etkinlik düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığını tespit ettik. "Doksozubisin+NAC" grubunda ise MDA düzeyindeki artışın doksozubisin grubundan daha az olduğu, ancak doksozubisin ile "doksozubisin+NAC" grubu arasında fark olmadığı gözlemlendi. Bu sonuçlar doksozubisin uygulamasının dokuda lipid peroksidasyonunu artırdığını ve doku hasarından sorumlu olduğunu, ancak N-asetilsisteinin biyokimyasal düzeyde koruyucu etkinliğinin olmadığını göstermektedir. Park ve ark.<sup>103</sup> ratlarda doksozubisin ile deneysel toksisite oluşturup NAC ve selenyumun koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmada kalp, testis, böbrek, karaciğer ve beyin dokusunu değerlendirmişler, MDA düzeyinin doksozubisin verilen grupta yükseldiğini, tedavi gruplarında ise düştüğünü tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda doksozubisin grubundaki doku MDA düzeyindeki artış ta literatürle benzerlik gösteriyordu. Lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'nın doksozubisin ve "doksozubisin+NAC" gruplarındaki artışı kontrol grubuna göre yüksek bulundu (Tablo 7). Bu sonuç, lipid peroksidasyonu sonrasında açığa çıkan MDA'nın doksozubisinin kardiyotoksik etkisine aracılık ettiği görüşünü desteklemektedir. Çalışmamızda NAC uygulaması sonrasında doksozubisine bağlı yükselmiş olan MDA değerlerinin düşmediği gözlemlendi ve bu bulgu da literatürdeki çoğu çalışma ile benzerlik gösteriyordu (100,103,106,108,110,112). Bu çalışmalardan sadece Park

ve ark.'ın<sup>103</sup> çalışmasında doku MDA düzeyinin “doksorubisin+NAC” grubunda düşük bulunduğu görülmektedir. Ancak bu farklılığın kullandıkları doksorubisin dozunun düşük olmasına ve daha dirençli olduğu bilinen sprague dawley cinsi ratlar kullanılmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Aerobik organizmalarda oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit anyon radikali meydana gelir. Oluşumlarına neden olduğu diğer radikallerle birlikte organizmada genel bir oksitleyici gibi davranmaktadır. Süperoksit anyon radikallerinin doku hasarına yol açmasında asıl tehlikeli olan mekanizma, Haber-Weiss (Fenton) reaksiyonu sonucunda hidroksil radikalinin oluşmasıdır. Süperoksit dismutaz enzimi bunun parçalanmasını sağlayarak hücreyi koruyucu bir rol üstlenir (81). Kardiyomiyositleri SOR'lara karşı koruyan antioksidan enzimlerden biri GSH-Px' dir. GSH-Px kalp için koruyucu olan en önemli antioksidan enzimdir (113). Katalaz da hücrede yer alan önemli bir antioksidan enzim ve serbest oksijen radikal temizleyicisidir. N-asetilsistein yapısındaki tiyol grubuyla glutatyonun sentezine katılması ve enzimin kofaktörü gibi davranması da olası mekanizmalar arasındadır. İliskoviç ve ark.<sup>105</sup> deneysel çalışmalarında doksorubisinin son dozundan üç hafta sonra kalp dokusunda Gsh-Px düzeyinde azalma ile birlikte, kalp dokusu MDA düzeyinde anlamlı artış, “doksorubisin+probukol” grubunda ise kalp dokusu Gsh-Px düzeyinde artış, MDA seviyesinde azalma saptamışlardır. Doroshov ve ark.<sup>114</sup> ratlara NAC ile birlikte doksorubisini 20 mg/kg kümülatif dozunda ve aralıklı olarak vererek dokudaki doksorubisin ve metabolitlerinin konsantrasyonlarına bakmışlar, kalp dokusunda ölçtükleri nonprotein sülfidril içeriğini N-asetilsistein grubunda doksorubisin grubuna göre yüksek bulmuşlardır. Narin ve ark.<sup>112</sup> genç tavşanlarda yaptıkları çalışmada kümülatif total doz 15 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal doksorubisin vermişler, doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinde miyokardiyal antioksidan enzimlerde azalma, serbest radikallerde ve lipid peroksidasyon ürünlerinde artmanın rol oynayabileceğini tespit etmişlerdir. Demir ve ark.<sup>107</sup> doksorubisin verilen tavşanlarda miyokardiyal MDA'nın yükseldiği, Gsh-Px'in düştüğünü, “doksorubisin+melatonin” grubunda ise SOD ve Gsh-Px düzeyinin yükseldiğini saptamışlardır ve doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinde miyokardiyal lipid peroksidasyonunda artış ve antioksidan sistemlerdeki azalmanın rol oynayabileceğini göstermişlerdir. Fadillioğlu ve ark.<sup>100</sup> sprague dawley cinsi ratlar üzerinde doksorubisin ile oluşturulan kardiyotoksisitede CAPE'nin koruyucu etkilerini incelemişler, “doksorubisin+CAPE” grubunda

doksorubisin grubuna göre Gsh-Px, CAT aktivitesinde artış tespit etmişler ve CAPE'nin antioksidan etkiyle doksorubisinin kardiyotoksik etkilerinden koruyabileceği sonucuna varmışlardır. Villani ve ark.<sup>47</sup> ratlarda yaptıkları çalışmada sülfidril komponenti olan glutasyon ve N-asetilsisteinin doksorubisin kardiyotoksitesine etkisini invitro ve invivo modelle test etmişler, her iki koruyucu ajanın da doksorubisinin sol atriumda oluşturduğu negatif inotropik etkisine karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermişlerdir. Bu etki ile de miyokardiyal non-protein sülfidril konsantrasyonu arasında doğru orantı olduğunu tespit etmişlerdir. Xu ve ark.<sup>119</sup> sprague dawley cinsi ratlarda doksorubisin ve deferipion uyguladıkları çalışmada sol atrium dokusunda biyokimyasal olarak SOD, suksinat dehidrogenaz (SDH) ativitesinde doksorubisin uygulanan grupta düşme, MDA düzeyinde artış göstermiştir. Nagi ve ark.<sup>121</sup> ratlarda doksorubisinin kardiyotoksitesinden korunmak için timokinonu kullandıkları çalışmasında 15 mg/kg dozda doksorubisin tek seferde vermişler. Süperoksit anyon radikalının doksorubisin tek başına uygulanan grupta arttığını, timokinonun kardiyotoksiteyi engellediğini göstermişlerdir. Chularojmontri ve ark.<sup>46</sup> rat kardiyak hücre kültüründe yaptıkları biyokimyasal çalışmada doksorubisinin verdiği hasarda hücrelerin antioksidan kapasitesini ve bunun vit-E ve vit-C ile değişimini araştırmışlar, doksorubisin verilen grupta SOD, CAT, GSH aktivitelerini kontrol grubuna göre düşük, vit-C ve vit-E gruplarında yüksek olarak bulmuşlardır. Bolaman ve ark.<sup>83</sup> tek seferde 10 mg/kg doksorubisin verilerek akut kardiyotoksite meydana getirilen erkek Wistar cinsi ratlarda amifostinin koruyucu etkilerini araştırmışlar, doksorubisin uygulaması sonrası kalp dokusunda MDA düzeyinin arttığını, diğer antioksidan enzim düzeylerinin ise anlamlı olarak düştüğünü tespit ederek amifostinin doksorubisin kardiyotoksitesini azaltabileceği sonucuna varmışlardır.

Bizim çalışmamızda doksorubisin uygulaması sonrası rat miyokard dokusu SOD, CAT, Gsh-Px enzim etkinlik seviyelerinde azalma tespit edildi ve bu enzimlerin etkinlik seviyelerindeki azalma kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bulundu. Bu bulgularımız literatürdeki birçok çalışmayla da uyumluluk gösteriyordu (47,72,73,83,100,105,106,115,118,120-131). N-asetilsistein uygulandıktan sonra ise SOD, CAT, Gsh-Px enzim etkinlik seviyelerinde anlamlı yükselme gözlenmedi. Benzer çalışmalardan farklı olarak biz akut doksorubisin kardiyotoksitesini tek seferde verdiğimiz 20 mg/kg dozla değerlendirdik. N-asetilsistein verildikten sonra antioksidan enzim ve lipid peroksidasyon ürünlerinin sonuçlarının farklı çıkmasını da

uyguladığımız yöntemin farklılığına bağlıyoruz. Ayrıca doksorubisin grubundaki ratların vücut ağırlıklarında % 30' a yakın kayıp olması nedeniyle, olaya renal ve metabolik sorunların da eklendiğini düşünüyoruz. Nitekim histolojik incelemeyle doksorubisin verilen ratların böbrek dokularında böbrek yetersizliği bulguları ile ince bağırsak dokularında ciddi villus atrofisi oluştuğunu saptadık. Böylece gavajla verilen NAC emiliminin kısıtlanarak etkinliğinin azalmış olacağını düşündük. Çalışmamızda doksorubisin uygulaması sonrası ortaya çıkan kardiyotoksisite modelinde antioksidan enzim aktivitelerinin düşmesi ve lipid peroksidasyon ürünlerinin artmasının rolü de dikkati çekmektedir. Biyokimyasal olarak NAC ile koruyucu etkinlik gösterilememiştir. N-asetilsisteinin oral olarak yüksek dozda veya parenteral uygulanmasıyla akut kardiyotoksisitedeki koruyucu etkinliğinin biyokimyasal olarak ta gösterilmesi mümkün olacaktır.

Doksorubisinin toksik etkilerini inceleyen bazı çalışmalarda utrastrüktürel olarak miyofibril harabiyeti ve mitokondriyal dejenerasyon yanında diskus interkalarislerde de yapısal değişimler olduğunu bildirilmiştir. Doksorubisinin hasarladığı kalp kasının ışık mikroskopu ile tespit edilebilen morfolojik bulguları miyokardiyal fibrillerde hipertrofi, ödem, vakuolizasyon, interstisyel ödem, hemoraji, dağılma ve nekrozdur (38). Pek çok çalışmada doksorubisin kullanımı ile miyofibrillerde harabiyet ve kayıp olduğu gösterilmiştir. Doksorubisinin antitümör aktivitesinin protein ve nükleik asit sentezini inhibe etmesine bağlı olarak oluştuğu bilinmektedir. Singal ve ark.<sup>126</sup> bu mekanizmanın miyofibril kaybı ve diğer hücresel değişikliklere de neden olduğunu söylemiştir. Doksorubisin ile tedavi sonrası oluşan etkileri ışık mikroskobunda inceleyen çalışmalarda da kardiyomiyositlerde atrofi, dejenerasyon, sitoplazmik vakuolizasyon ile miyofibrillerde düzensizlik bildirilmiştir. (132-134). Demir<sup>73</sup> new zeland white cinsi tavşanlarda yaptığı çalışmada histopatolojik bulguları kardiyomiyopati skorlaması yaparak değerlendirmiş, L-triptofan ve pentoksiflinin ağır kardiyomiyopatiyi önlediğini tespit etmiştir. Doroshov ve ark.<sup>114</sup> elektron mikroskopisiyle doksorubisin sonrası sitoplazmik ve mitokondriyal ödem, kardiyomiyositlerde yıkılma, sarkoplazmik retikulumda parçalanma ve mitokondriyal kristalarda dağılma bulmuş, "doksorubisin+NAC" grubunda ise ağır kardiyomiyopati bulgularının olmadığını göstermişlerdir. Narin ve ark.<sup>112</sup> genç tavşanlarda dokuları ışık mikroskopisiyle incelemiş, pentoksiflinin doksorubisinle oluşan ağır kardiyomiyopatiyi önlediğini göstermişlerdir. Demir ve ark.<sup>107</sup> tavşanlarda ışık mikroskopisi ile miyokard liflerinde şişme, interstisyel ödem, dağılma, nekroz,

vakuolizasyon parametrelerine var/yok olarak bakmışlar ve doksorubisin verilen grupta ağır kardiyomiyopati, melatonin verilen grupta ise hafif kardiyomiyopati geliştiğini göstererek melatonin ile kardiyomiyopatının ortadan kalkmadığını ancak ağırlık derecesinin azaldığını tespit etmişlerdir. Fadillioğlu ve ark.<sup>100</sup> sprague dawley cinsi ratlar üzerinde doksorubisin ile oluşturulan kardiyotoksistide caffeic acid phenethyl ester'in (CAPE) koruyucu etkilerini incelemişler, elektron mikroskopisinde doksorubisin verilen grupta mitokondriyal şişme, kristalarda düzleşme, CAPE verilen grupta ise bu bulgularda düzelme olduğunu bulmuşlar ve CAPE'nin antioksidan etkisinin kardiyotoksisteyi önleyeceği sonucuna varmışlardır. Öz ve ark.<sup>116</sup> Wistar cinsi ratlarda doksorubisin ile deneysel kardiyotoksiste oluşturup, melatoninin koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmada doku glutatyon ve MDA düzeyi ile birlikte çalışma gruplarının kalp morfolojilerini kıyaslamışlar. Elektron mikroskopisinde hücresel ödem, mitokondriyal bozulma, azalmış glikojen depoları ve bozulmuş miyofibriler yapı tespit etmişler.

Doku örneklerinin ultrastrüktürel analizlerini Li ve ark.'nın<sup>134</sup> skorlama sistemine göre skorlayan çalışmacılar, doksorubisinin oluşturduğu bulguları çeşitli antioksidanların hafiflettiğini tespit etmişlerdir. Xu ve ark.<sup>119</sup> sprague dawley cinsi ratlarda doksorubisin ve deferipion uyguladıkları çalışmada sol atrium dokusunu izole etmişler, doksorubisin uygulamasıyla mitokondrielerde oluşan değişimlerin (kontraktilitenin azalması, mitokondriyal şişme, mitokondriyal kristalların kayıpları ve matrikste azalmış elektron dansiteler) antioksidan uygulanan grupta görülmediğini elektron mikroskopisiyle tespit etmişlerdir. Zeidan ve ark.<sup>136</sup> dişi sprague dawley cinsi ratlarda doksorubisin ile kalpte ve karaciğerde ortaya çıkan hasarda L-karnitinin koruyucu etkisini incelemişler, elektron mikroskopisiyle miyokardiyal hücre kaybı, parçalanma, mitokondriyal şişme ve yoğunlaşma tespit etmişlerdir. Doksorubisin verilen grupta ortaya çıkan bu bulguların, "L-karnitin+doksorubisin" grubunda olmadığını, dolayısıyla L-karnitinin ağır kardiyomiyopati bulgularını geriletmediğini göstermişlerdir. Park ve ark.<sup>103</sup> sprague dawley cinsi ratlarda, 7.5 mg/kg doksorubisin ile deneysel toksiste oluşturup N-asetilsistein ve selenyumun koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmada kalp, testis, böbrek ve karaciğer, beyin değerlendirilmişler, N-asetilsistein ve selenyum ile histopatolojik bir düzelme gösterememişlerdir. Ballı'nın<sup>139</sup> çalışmasında Wistar-albino cinsi ratlara 15 mg/kg kümülatif dozda doksorubisin verilerek miyokard dokusunda hem ışık hem de elektron mikroskopik inceleme yapılmış, ışık mikroskopisinde kalp kası hücrelerinde



yer yer dejeneratif değişikliklerin olduğu, miyofibrillerin düzenli diziliminin bozulduğu ve yer yer miyofibrillerin paręalandıęını tespit edilmiştir. Elektron mikroskopisinde ise mitokondrial dejenerasyon ve vakuoleşme, dev mitokondrialar, hücre içi lipid damlacığı, hücre organellerinde kayıp, sarkomer düzensizlik, sarkolemmal hasarlanma, miyofibriler paręalanma ve litik alanlar, Z ęizgisinde bilirginleşme, hücreler arası kapillerde harabiyet, diskus interkalarislerde bozulma gibi değişikliklerin olduğu gösterilmiştir.

Bizim ęalıřmamızda doksorubisin uygulaması sonrası kalp kası histomorfolojisinden elde ettiğimiz ışık mikroskopisi bulguları hüresel ödem, interstisyel ödem, enflamasyon, miyofibriler hipertrofi, vakuolizasyon, hemoraji, nekroz ve dağılma ile karakterize doksorubisinin oluşturduğu kardiyomiyopati bulguları saptandı. Bu bulgular literatürdeki bulgularla uyumluluk gösteriyordu (135-139). Ayrıca histolojik parametreleri hem tek tek hem de şiddetine göre yaptığımız “yarı-nitel” değerlendirme sistemiyle gruptaki kardiyomiyopatiyi de kıyasladık. Bu sisteme göre doksorubisin grubundaki bulguların, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde kötü olduğunu tespit ettik. Kontrol grubu ve ęalıřma gruplarındaki histolojik bulgular kıyaslandığında doksorubisin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak kötüleşme olduğunu (ağır kardiyomiyopati), “doksorubisin+NAC” grubunda ise bu bulguların anlamlı olarak düzelme gösterdiğini ve kontrol grubu ile arasında fark olmadığını tespit ettik (Tablo 9). Doksorubisinle oluştuğunu gösterdiğimiz kardiyomiyopati bulgularının, “doksorubisin+NAC” grubunda görülmediğini belirledik. Literatürdeki ęalıřmalarla benzerlik gösteren bulgularımız N-asetilsisteinin doksorubisinle oluşan hasarlanmayı önleyebileceğini de histopatolojik olarak göstermektedir.

Kanser tedavisinde yeni gelişmelerin beklendiği günümüzde antrasiklinler halen önemli bir yere tutmaktadır. Bu nedenle ęoęu solid tümörlerin ve lösemilerin tedavisinde alternatifsiz gibi görünen antrasiklinlerin yan etkilerinin azaltılmasına yönelik ęalıřmalar da oldukęa önemli ve anlamlı olarak kabul edilmektedir. Ancak özellikle kalp dokusundaki hasarın antioksidan maddelerin kullanımıyla azaltılmasını hedefleyen ęalıřmalar, bu maddelerin pratikte kullanımlarına yansıtacak dzeyele ulaşabilmiş değildir. Biz de bu ęalıřma ile hasarlanmış kalp dokusunda N-asetilsistein uygulanması sonrasında biyokimyasal düzeyde iyileşme gösteremedik. Ancak elde ettiğimiz sonuçlar ve histopatolojik olarak saptadığımız iyileşme

bulguları, kullanılan oral N-asetilsistein dozununun artırılması veya parenteral yolla verilmesiyle biyokimyasal parametrelerde de iyileşme sağlanabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda N-asetilsisteinin kalp dokusunda doksorubisinin toksik etkilerini önlediği histolojik olarak gösterildi ve anlamlı bulundu. Elde ettiğimiz bu bulgu doksorubisinin kardiyak yan etkilerini azaltmak üzere N-asetilsisteinin ümit verici bir ajan olduğunu vurgulamaktadır. Sonuç olarak kalp dokusunda N-asetilsisteinle sağlanan ve histopatolojik değerlendirmeyle gösterdiğimiz koruyucu etkinin önemli olduğunu vurgulamakla birlikte, çalışmamızın bu konuda yapılacak yeni deneysel çalışmalara da ışık tutacağını düşünüyoruz.

## ÖZET

### **Doksorubisin ile oluşturulan deneysel kardiyotoksisite üzerine N-asetilsisteinin biyokimyasal ve histopatolojik düzeylerdeki koruyucu etkilerinin araştırılması**

Doksorubisin geniş spektrumlu antineoplastik etkisi sayesinde gerek erişkin, gerekse çocukluk çağı kanserlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Doksorubisinin klinik kullanımını kısıtlayan en önemli yan etkisi kardiyotoksisitedir. Kardiyotoksisiteyi önlemek için bir çok ajan denenmiş, ancak etkin ve güvenilir bir ajan bulunamamıştır. Bu çalışmada doksorubisinin kalp dokusunda oluşturduğu toksisiteye karşı antioksidan bir ajan olan N-asetilsistein'in (NAC) koruyucu etkileri araştırıldı.

Ratlar "kontrol" (n:10), "doksorubisin" (n:10) ve "doksorubisin + NAC" (n:10) grupları olmak üzere üç gruba ayrıldı. Kontrol grubuna 0. ve 24. saatlerde gavajla serum fizyolojik (SF) ile 48. saatte intraperitoneal SF; doksorubisin grubuna 0. ve 24. saatlerde gavajla SF ile 48. saatte intraperitoneal doksorubisin (20 mg/kg); "doksorubisin + NAC" grubuna 0. ve 24. saatlerde gavajla NAC (140 mg/kg) ile 48. saatte intraperitoneal doksorubisin (20 mg/kg) uygulandı. Deney yedinci günde sonlandırılarak kalp dokusunda biyokimyasal ve histopatolojik analizler yapıldı. Kontrol grubuna göre; doksorubisin grubunda MDA yüksek ( $p<0.05$ ), SOD, CAT ve GSH-Px değerleri anlamlı olarak düşük bulundu ( $p<0.05$ ), "doksorubisin + NAC" grubuna ait enzim değerlerinde ise fark yoktu ( $p>0.05$ ).

Doksorubisin uygulanan ratların kalp dokularında, kontrol grubunda görülmeyen ödem, enflamasyon, vakuolizasyon, hemoraji, nekroz ve dağılma şeklinde histolojik değişiklikler saptandı ( $p<0.05$ ). Doksorubisin grubundaki histopatolojik bozulmaların "doksorubisin + NAC" grubunda görülmediği belirlendi ( $p<0.05$ ). Doksorubisin grubunda sol ventrikül duvarı miyofibril kalınlıklarının, kontrol grubuna göre arttığı ( $p<0.05$ ), "doksorubisin + NAC" grubuyla kontrol grubu arasında ise fark bulunmadığı görüldü ( $p>0.05$ ).

Bu bulgular doksorubisinin lipid peroksidasyonu ve serbest oksijen radikallerinin sentezini artırıp, antioksidan enzim etkinliğini azaltarak kardiyotoksisiteye yol açtığı, NAC'nin histopatolojik düzeyde kardiyotoksisiteyi önlediğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Serbest radikal hasarı, doksorubisin, kardiyotoksisite, N-asetilsistein.

## SUMMARY

### **Investigation of the protective effect of N-acetylcysteine on doxorubicine-induced experimental cardiotoxicity: a biochemical and histopathological study**

Doxorubicin is an antineoplastic agent which is widely used in the treatment of both childhood and adulthood cancer. Cardiotoxicity is the most important side effect of doxorubicin which has been restricted its clinical usage. Although many agents are employed to prevent cardiotoxicity, an efficient and a safe agent has not been found. In this study, we investigated the protective effect of N-acetylcysteine (NAC), an antioxidant agent, against doxorubicin-induced cardiotoxicity on the heart tissue.

Rats were divided into three groups as control (n:10), doxorubicin (n:10) and doxorubicin + NAC (n:10). The control group was administered physiological saline (PS) by gavage at 0. and 24. hours and intraperitoneal PS was given at 48. hour; the doxorubicin group was administered PS by gavage at 0. and 24. hours and intraperitoneal doxorubicin (20 mg/kg) was administered at 48.hour; the doxorubicin+ NAC group was administered NAC by gavage (140 mg/ kg) at 0.and 24. hours and intraperitoneal doxorubicin (20 mg/ kg) was administered at 48. hour. The experiment lasted seven days and then biochemical and histopathologic analysis were made on heart tissue. Compared to the control group; MDA was high ( $p<0.05$ ) and SOD, CAT and GSH-Px values were significantly low in the doxorubicin group ( $p<0.05$ ) and there was no difference in the enzyme values of the doxorubicin+NAC group ( $p>0.05$ ).

Unlike the control group; there were histological changes ( $p<0.05$ ) such as edema, inflammation, vacuolization, hemorrhage, necrosis and disorganization in the heart tissues of rats administered doxorubicin. The histopatologic degenerations in the doxorubicin group did not occur in the doxorubicin+NAC group ( $p<0.005$ ). An increase was observed in the myofibril thickness of the left ventricle wall of the doxorubicin group compared to the control group ( $p>0.05$ ); and no difference was observed between the doxorubicin+NAC group and the control group ( $p>0.05$ ). These results show that increasing the synthesis of free oxygen radicals and lipid peroxydation and decreasing the antioxidant enzyme efficacy, doxorubicin causes cardiotoxicity and NAC prevents cardiotoxicity by histopathological evaluation.

**Key Words:** Free radical damage, doxorubicin, cardiotoxicity, N-acetylcysteine.

## KAYNAKLAR

1. Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Mol Cell Biochem.* 2000;207:77-85.
2. Kayaalp SO, Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar, Kayaalp SO, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Cilt I, IX. Baskı, Hacettepe-TAŞ, 2002:394-5.
3. Küçükhüseyin C. Kanser kemoterapisi. Özüner Z. Temel ve Klinik Farmakoloji. 3. baskı Barış Kitabevi, İstanbul, 1995:1116-7.
4. Cottin Y, Ribout C, Maupoil V, Godin D, Arnold L, Brunotte F, Rochette L. Early incidence of adriamycin treatment on cardiac parameters in the rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 1994;72:140-5.
5. Chabner BA, Myers CE, Coleman N, Johns DG. The clinical pharmacology of antineoplastic agents (second of two parts). *New Eng J Med.* 1975;292:1159-68.
6. Muggia FM, Green MD. New anthracycline antitumor antibiotics. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1991;11:43-64.
7. Hideg K, Kálai T. Novel antioxidants in anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol.* 2007;7:160-4.
8. Bolis FM, Holcenberg JS, Poplack DG. General Principles of Chemotherapy. In: Pizzo PA, Poplack DG (eds) Principle and Practice Pediatric Oncology. J.B. Lippincott Company, USA, 2001:186-9.
9. Schimmel KJM, Richel DJ, van den Brink RBA, Guchelaa HJ. Complications of treatment cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev.* 2004;30:181-191.
10. Venkatesan N, Punithavathi D, Arumugam V. Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats. *Br J Pharmacol.* 2000;129:231-4.
11. Bryant J, Picot J, Levitt G, Sullivan I, Baxter L, Clegg A. Cardioprotection against the toxic effects of anthracyclines given to children with cancer: a systematic review. *Health Technol Assess.* 2007;11:1-84.
12. Ergül PB. Erken antrasiklin kardiotoxisitesinin renkli doppler ekokardiografi ile izlemi ve karnitinin kardioprotektif etkisinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanlık Tezi. İstanbul-2001.
13. Ferrans VJ. Anthracycline cardiotoxicity. *Adv Exp Med Biol.* 1983;161:519-32.
14. Aubel-Sadron G, Londos-Gagliardi D. Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie.* 1984;66:333-52.
15. Lipshultz SE, Alvarez JA, Scully RE. Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Heart.* 2008;94:525-33.
16. Lipshultz SE, Cohen H, Colan SD, Herman EH. The relevance of information generated by in vitro experimental models to clinical doxorubicin cardiotoxicity. *Leuk Lymphoma.* 2006;47:1454-8.
17. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007;49:330-52.
18. Belham M, Kruger A, Mephram S, Faganello G, Pritchard G. Monitoring left ventricular function in adults receiving anthracycline-containing chemotherapy. *Eur J Heart Fail.* 2007;9:409-14.
19. Menna P, Salvatorelli E, Minotti G. Cardiotoxicity of antitumor drugs. *Chem Res Toxicol.* 2008;21:978-89.

20. Gutteridge JM. Anthracycline toxicity, iron and oxygen radicals and chelation therapy. *J Lab Clin Med.* 1993;122:228-9.
21. Basser RL, Green MD. Strategies for prevention of anthracycline cardiotoxicity. *Cancer Treat Rev.* 1993;19:57-77.
22. Corna G, Santambrogio P, Minotti M, Cairo G. Doxorubicin paradoxically protects cardiomyocytes against iron-mediated toxicity: role of reactive oxygen species and ferritin. *J Biol Chem.* 2004;279:13738-45.
23. Holmberg SR, Williams AJ. Patterns of interaction between anthraquinone drugs and the calcium-release channel from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circulation Res.* 1990;67:272-83.
24. Rahman AM, Yusuf SW, Ewer MS. Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *Int J Nanomedicine.* 2007;2:567-83.
25. Outomuro D, Grana DR, Azzato F, Milei J. Adriamycin-induced myocardial toxicity: New solutions for an old problem? *Int J Cardiol.* 2007;117:6-15.
26. Biner B. Çocukluk çağı akut lösemilerinde erken ve geç dönem antrasiklin kardiyotoksitesinin tanısında kardiyak troponin T ve ekokardiyografi. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Yandal Uzmanlık Tezi. İstanbul-2000.
27. Broeyer FJ, Osanto S, Ritsema van Eck HJ, van Steijn AQ, Ballieux BE, Schoemaker RC, Cohen AF, Burggraaf J. Evaluation of biomarkers for cardiotoxicity of anthracycline-based chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008 Mar 15 [Epub ahead of print].
28. Germanakis I, Kalmanti M, Parthenakis F, Nikitovic D, Stiakaki E, Patrianakos A, Vardas PE. Correlation of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels with left ventricle mass in children treated with anthracyclines. *Int J Cardiol.* 2006;108:212-5.
29. Berg SL, Balu FM, Poplack DG. Cancer chemotherapy. Nathan DG, Oski SH. *Hematology of infancy and childhood.* 5<sup>th</sup> edition, W.B. Saunders Company 1998:1218-9.
30. Reiter RJ. Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *Eur J Endocrinol.* 1996;134:412-20.
31. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza yayınları, Konya-1995.
32. Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology.* 1995;104:129-40.
33. Erden M, Bor NM. Changes of reduced glutathione, glutathione peroxidase after radiation in guinea pigs. *Biochem Med.* 1984;31:217-27.
34. Mitchell JB, Russo A. The role of glutathione in radiation and drug induced cytotoxicity. *Br J Cancer.* 1987;55:96-104.
35. Blakely WF. Hydrogen peroxide induced base damage in DNA. *Radiat Res.* 1990;121:338-43.
36. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* 1993;49:479-80.
37. Marklund SL. Analysis of extracellular superoxide dismutase in tissue homogenates and extracellular fluids. *Methods Enzymol.* 1990;186:260-5.
38. Niwa Y, Ishimoto K, Kanoh T. Induction of superoxide dismutase in leukocytes by paraquat: correlation with age and possible predictor of longevity. *Blood.* 1990;76:835-41.

39. Spallholz JE. Selenium and glutathione peroxidase: Essential nutrient and antioxidant component of the immune system. *Adv Exp Med Biol.* 1990;262:145-58.
40. Forslid J, Björkstén B, Hagersten K, Hed J. Erythrocyte mediated scavenging of reactive oxygen metabolites generated by human polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. *Inflammation.* 1989;13:543-51.
41. De Bleecker J, Lison D, Van Den Abeele KV, Willems J, De Reuck J. Acute and subacute organophosphate poisoning in the rat. *Neurotoxicology.* 1994;15:341-8.
42. Larsen RL, Jakacki RI, Vetter VL, Meadows AT, Silber JH, Barber G. Electrocardiographic changes and arrhythmias after cancer therapy in children and young adults. *Am J Cardiol.* 1992;70:73-4.
43. Prout MN, Richards MJ, Chung KJ, Joo P, Davis HL Jr. Adriamycin cardiotoxicity in children: case reports, literature review, and risk factors. *Cancer.* 1977;39:62-5.
44. Porea TJ, Dreyer ZE, Bricker JT, Mahoney DH Jr. Evaluation of left ventricular function in asymptomatic children about to undergo anthracycline-based chemotherapy for acute leukemia: an outcome study. *J Ped Hematol Oncol.* 2001;23:420-3.
45. Steinherz LJ, Steinherz PG, Tan C. Cardiac failure and dysrhythmias 6-19 years after anthracycline therapy: a series of 15 patients. *Med Pediatr Oncol.* 1995;24:352-61.
46. Chularojmontri L, Wattanapitayakul SK, Herunsalee A, Charuchongkolwongse S, Niumsakul S, Srichairat S. Antioxidative and cardioprotective effects of *Phyllanthus urinaria* L. on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biol Pharm Bull.* 2005;28:1165-71.
47. Villani F, Galimberti M, Monti E, Piccinini F, Lanza E, Rozza A, Favalli L, Poggi P, Zunino F. Effect of glutathione and N-acetylcysteine on in vitro and in vivo cardiac toxicity of doxorubicin. *Free Radic Res Commun.* 1990;11:145-51.
48. Schmitt-Gräff A, Scheulen ME. Prevention of adriamycin cardiotoxicity by niacin, isocitrate or N-acetyl-cysteine in mice. A morphological study. *Pathol Res Pract.* 1986;181:168-74.
49. Olson RD, MacDonald JS, vanBoxtel CJ, Boerth RC, Harbison RD, Slonim AE, Freeman RW, Oates JA. Regulatory role of glutathione and soluble sulfhydryl groups in the toxicity of adriamycin. *J Pharmacol Exp Ther.* 1980;215:450-4.
50. Kayaalp OS. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe Taş. Ankara, 10. Baskı, Eylül, 2002.
51. Rodenstein D, DeCoster A, Gazzaniga A. Pharmacokinetics of oral acetylcysteine: absorption, binding and metabolism in patients with respiratory disorders. *Clin Pharmacokinet.* 1978;3:247-54.
52. Ziment I. Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic. *Biomed Pharmacother.* 1988;42:513-9.
53. Moldeus P, Cotgreave JA, Berggren M: Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. *Respiration* 1986;50; 31-42.5. Moldeus P, Cotgreave JA, Berggren M: Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. *Respiration.* 1986;50:31-42.
54. Flora S, Bennicelli C, Camoirano A, Serra D, Romano M, Rossi GA, Morelli A, Flora A: In vivo effects of N-acetylcysteine on glutathione metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and/or mutagenic compounds. *Carcinogenesis.* 1985;6:1735-45.
55. Meyer A, Buhi R, Magnausen H: The effect of oral N-acetylcysteine on lung glutathione levels in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Eur Respir.* 1994;7:431-6.

56. Fırat S. Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon S transferaz, düzeyleri ve N-asetilsisteinin bu sistem üzerindeki etkisi. Gazi Üniversitesi Biyokimya AD, Uzmanlık tezi. Ankara 1997.
57. Bolis FM, Holcenberg JS, Poplack DG. General Principles of Chemotherapy. In: Pizzo PA, Poplack DG (eds) Principle and Practice Pediatric Oncology. J.B. Lippincott Company, USA, 1989:186-9.
58. William E, Evans et al. Clinical pharmacology of cancer chemotherapy in children, anthracyclines. Saunders, Pediatr Clin North Am, Clinical Pharmacology. 1989;36:1206-9.
59. Çetinkaya Y, Kabakçı MG, Aydemir K, et al. Antrasiklinler ve kalp. İlaç ve Tedavi Dergisi. 1995;8:214-8.
60. Park MK, Troxler RG. Pediatric Cardiology Practitioners. Mosby. Fourth Edition. USA. Part V. Chapter 18, Primary Myocardial Disease. Doxorubicine Cardiomyopathy. 2002.
61. Karagoz B, Suleymanoglu S, Uzun G, Bilgi O, Aydinoz S, Haholu A, Turken O, Onem Y, Kandemir EG. Hyperbaric oxygen therapy does not potentiate doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2008;102:287-92.
62. Mordente A, Meucci E, Martorana GE, Giardina B, Minotti G. Human heart cytosolic reductases and anthracycline cardiotoxicity. IUBMB Life. 2001;52:83-8.
63. Robert J, Gianni L,. Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. Cancer Surveys. 1993;17:219-52.
64. Woo MH, Evans WE, Relling MV. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. In: Pui C-H (ed), Childhood Leukemias, Cambridge University 1999:275-6.
65. Colon SD, Speuak PJ, Parness IA. Cardiomyopaties. In: Fyler DC (ed) Nadas Pediatric Cardiology. Second edition Mosby Year Book. Boston. 1992:329-62.
66. Hale JP, Lewis IJ. Anthracyclines: cardiotoxicity and its prevention. Arch Dis Childhood. 1994;71:457-62.
67. Leondro J, Dyck J, Poppe D, Shore R, Airhart C, Greenberg M et al. Cardiac dysfunction late after cardiotoxic therapy for childhood cancer. The Am J Cardiol. 1994;74:1152-6.
68. Lipshultz SE. Exposure to anthracyclines during childhood causes cardiac injury. Semin Oncol. 2006;33:S8-14.
69. Iarussi D, Indolfi P, Casale F, Martino V, Di Tullio MT, Calabrò R. Anthracycline-induced cardiotoxicity in children with cancer: strategies for prevention and management. Paediatr Drugs. 2005;7:67-76.
70. Evans WE, Petros WP, Relling MV, Crom WR, Madden T, Rodman JH, Sunderland M. Clinical pharmacology of cancer chemotherapy in children. Pediatr Clin North Am. 1989;36:1199-230.
71. Bryant J, Picot J, Levitt G, Sullivan I, Baxter L, Clegg A. Cardioprotection against the toxic effects of anthracyclines given to children with cancer: a systematic review. Health Technol Assess. 2007;11:1-84.
72. Demirkaya E. Doksorubisine bağlı kardiyak toksisitenin önlenmesinde bitkisel antioksidanların etkinliklerinin in-vivo araştırılması. Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi. Askeri Tıp Fakültesi. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD Uzmanlık Tezi. Ankara-2003.
73. Demir F. Doksorubisin ile oluşturulmuş deneysel kardiyotoksosite üzerine melatonin, L-triptofan ve pentoksifilin etkileri. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Uzmanlık Tezi. Kayseri-2004.



74. Mitra MS, Donthamsetty S, White B, Latendresse JR, Mehendale HM. Mechanism of protection of moderately diet restricted rats against doxorubicin-induced acute cardiotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;225:90-101.
75. Pihkolo J, Sariola H, Saarinen UM. Myocardial function and postmortem myocardial histology in children given anthracycline therapy for cancer. *Pediatr Hematol Oncol.* 1994;11:259-69.
76. Hortobagyi GN. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs.* 1997;54:1-7.
77. Sutherland ER, Crapo JD, Bowler RP. N-acetylcysteine and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *COPD.* 2006;3:195-202.
78. Cotgreave IA. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol.* 1997;38:205-27.
79. Sehirli AO, Sener G, Satiroglu H, Ayanoglu-Dulger G. Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Nephrol.* 2003;16:75-80.
80. Webb WR. Clinical evaluation of new mucolytic agent, acetyl-cysteine. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1962;44:330-43.
81. Deng S, Wojnowski L. Genotyping the risk of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol.* 2007;7:129-34.
82. Green PS, Leeuwenburgh C. Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1588:94-101.
83. Bolaman Z, Cicek C, Kadikoylu G, Barutca S, Serter M, Yenisey C, Alper G. The protective effects of amifostine on adriamycin-induced acute cardiotoxicity in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2005;207:249-53.
84. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:6-20.
85. Ronis MJ, Butura A, Sampey BP, Shankar K, Prior RL, Korourian S, Albano E, Ingelman-Sundberg M, Petersen DR, Badger TM. Effects of N-acetylcysteine on ethanol-induced hepatotoxicity in rats fed via total enteral nutrition. *Free Radic Biol Med.* 2005;39:619-30.
86. Zaragoza A, Diez-Fernandez C, Alvarez AM, Andres D, Cascales M. Mitochondrial involvement in cocaine-treated rat hepatocytes: effect of N-acetylcysteine and deferoxamine. *Br J Pharmacol.* 2001;132:1063-70.
87. Tarçın O, Avşar K, Demirtürk L, Gültepe M, Oktar BK, Özdoğan OC, Tarçın Ö, Baloğlu HN, Gürbüz AK. In vivo inefficiency of pentoxifylline and interferon-alpha on hepatic fibrosis in biliary-obstructed rats: assessment by tissue collagen content and prolidase activity. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:437-44.
88. Niwa Y, Ishimoto K, Kanoh T. Induction of superoxide dismutase in leukocytes by paraquat: correlation with age and possible predictor of longevity. *Blood.* 1990;76:835-41.
89. Sun Y, Larry WO, Ying Li. Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988;34:497-500.
90. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967;70:158-69.
91. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
92. Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress, application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatog B.* 2005;827:76-82.

93. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
94. Havelka AM, Berndtsson M, Olofsson MH, Shoshan MC, Linder S. Mechanisms of action of DNA-damaging anticancer drugs in treatment of carcinomas: is acute apoptosis an "off-target" effect? *Mini Rev Med Chem.* 2007;7:1035-9.
95. Berthiaume JM, Wallace KB. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. Cell Biol Toxicol.* 2007;23:15-25.
96. Ferreira AL, Yeum KJ, Matsubara LS, Matsubara BB, Correa CR, Pereira EJ, Russell RM, Krinsky NI, Tang G. Doxorubicin as an antioxidant: maintenance of myocardial levels of lycopene under doxorubicin treatment. *Free Radic Biol Med.* 2007;43:740-51.
97. Bryant J, Picot J, Levitt G, Sullivan I, Baxter L, Clegg A. Cardioprotection against the toxic effects of anthracyclines given to children with cancer: a systematic review. *Health Technol Assess.* 2007;11:1-84.
98. Bast A, Haenen GR, Bruynzeel AM, Van der Vijgh WJ. Protection by flavonoids against anthracycline cardiotoxicity: from chemistry to clinical trials. *Cardiovasc Toxicol.* 2007;7:154-9.
99. Ferrans VJ. Overview of cardiac pathology in relation to anthracycline cardiotoxicity. *Cancer Treat Rep.* 1978;62:955-61.
100. Fadillioglu E, Oztas E, Erdogan H, Yagmurca M, Sogut S, Ucar M, Irmak MK. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *J Appl Toxicol.* 2004;24: 47-52.
101. Falcone G, Filippelli W, Mazarella B, Tufano R, Mastronardi P, Filippelli A, Berrino L, Rossi F. Cardiotoxicity of doxorubicin: effects of 21-aminosteroids. *Life Sci.* 1998;63:1525-32.
102. Robert J. Preclinical assessment of anthracycline cardiotoxicity in laboratory animals: predictiveness and pitfalls. *Cell Biol Toxicol.* 2007;23:27-37.
103. Park ES, Kim SD, Lee MH, Lee HS, Lee IS, Sung JK, Yoon YS. Protective effects of N-acetylcysteine and selenium against doxorubicin toxicity in rats. *J Vet Sci.* 2003;4:129-36.
104. Venditti P, balestrieri M, De Leo T, Di Meo S. Free radical involvement in doxorubicin induced electrophysiological alterations in rat papillary muscle fibres. *Cardiovasc Res.* 1998;38:695-702.
105. Iliskovic N, Hasinoff BB, Malisza KL, Li T, Danelisen I, Singal PK. Mechanisms of beneficial effects of probucol in adriamycin cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem.* 1999;196:43-49.
106. Siveski-Iliskovic N, Kaul N, Singal PK. Probuco promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Circulation.* 1994;89:2829-35.
107. Demir F, Narin F, Akgün H, Üzümlü K, Saraymen R, Baykan A, Köklü E. Doksorubisin ile oluşturulmuş deneysel kardiyotoksisite üzerine melatoninin etkisi. *Çocuk Sağ Hast Derg.* 2004;47:260-8.
108. Luo X, Reichetzer B, Trines J, Benson LN, Lehotay DC. L-carnitine attenuates doxorubicin-induced lipid peroxidation in rats. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:1158-65.
109. Arafa HM, Abd-Allah MF, Hafez HF. Abatement by naringenin of doxorubicin-induced cardiac toxicity in rats. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2005;17:291-300.
110. Saad SY, Najjar TA, Al-Rikabi AC. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacol Res.* 2001;43:211-8.

111. Luo X, Evrovsky Y, Cole D, Trines J, Benson LN, Lehotay DC. Doxorubicin-induced acute changes in cytotoxic aldehydes, antioxidant status and cardiac function in the rat. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1360:45-52.
112. Narin F, Demir F, Akgün H, Baykan A, Üzüm K, Kuzugüden S, Köklü E. Doxorubicin-induced experimental cardiotoxicity and effect of pentoxphylline on cardiotoxicity. *Türk Kardiyol Dern Arş*. 2004;32:279-87.
113. Li T, Singal PK. Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol. *Circulation* 2000;24:2105-10.
114. Doroshov JH, Locker GY, Ifrim I, Myers EC. Prevention of doxorubicin cardiac toxicity in the mouse by n-acetylcysteine. *J Clin Invest*. 1981;1053-64.
115. Karim S, Bhandari U, Kumar H, Salam A, Siddiqui MAA, Pilla KK. Doxorubicin induced cardiotoxicity and its modulation by drugs. *Indian J Pharmacol*. 2001;33:203-7.
116. Öz E, Erbaş D, Sürücü HS, Düzgün E. Prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity by melatonin. *Mol Cell Biochem*. 2006;282:31-7.
117. Dresdale AR, Barr LH, Bonow RO, Mathisen DJ, Myers CE, Schwartz DE, d'Angelo T, Rosenberg SA. Prospective randomized study of the role of N-acetyl cysteine in reversing doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Am J Clin Oncol*. 1982;5:657-63.
118. Buyukokuroglu ME, Taysi S, Buyukavci M, Bakan E. Prevention of acute adriamycin cardiotoxicity by dantrolene in rats. *Hum Exp Toxicol*. 2004;23:251-6.
119. Xu LJ, Jin L, Pan H, Zhang AZ, Wei G, Li PP, Lu WY. Deferiprone protects the isolated atria from cardiotoxicity induced by doxorubicin. *Acta Pharmacol Sin*. 2006;27:1333-9.
120. Kanter MM, Hamlin RL, Unverferth DV, Davis HW, Merola AJ. Effect of exercise training on antioxidant enzymes and cardiotoxicity of doxorubicin. *J Appl Physiol*. 1985;59:1298-303.
121. Nagi MN, Mansour MA. Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. *Pharmacol Res*. 2000;41:283-9.
122. Mohamed HE, Asker ME, Ali SI, el-Fattah TM. Protection against doxorubicin cardiomyopathy in rats: role of phosphodiesterase inhibitors type 4. *J Pharm Pharmacol*. 2004;56:757-68.
123. Sacco G, Giampietro R, Salvatorelli E, Menna P, Bertani N, Graiani G, Animati F, Goso C, Maggi CA, Manzini S, Minotti G. Chronic cardiotoxicity of anticancer anthracyclines in the rat: role of secondary metabolites and reduced toxicity by a novel anthracycline with impaired metabolite formation and reactivity. *Br J Pharmacol*. 2003;139:641-51.
124. Zhou S, Starkov A, Froberg MK, Leino RL, Wallace KB. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. *Cancer Res*. 2001;15:771-7.
125. Xu MF, Tang PL, Qian ZM, Ashraf M. Effects by doxorubicin on the myocardium are mediated by oxygen free radicals. *Life Sci*. 2001;68:889-901.
126. Singal PK, Deally CM, Weinberg LE. Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. *J Mol Cell Cardiol*. 1987;19:817-28.
127. Mortensen SA, Olsen HS, Baandrup U. Chronic anthracycline cardiotoxicity: haemodynamic and histopathological manifestations suggesting a restrictive endomyocardial disease. *Br Heart J*. 1986;55:274-82.
128. Torti FM, Bristow MM, Lum BL, Carter SK, Howes AE, Aston DA, Brown BW Jr, Hannigan JF Jr, Meyers FJ, Mitchell EP, et al. Cardiotoxicity of epirubicin and doxorubicin: assessment by endomyocardial biopsy. *Cancer Res*. 1986;46:3722-7.

129. Tong J, Ganguly PK, Singal PK. Myocardial adrenergic changes at two stages of heart failure due to adriamycin treatment in rats. *Am J Physiol.* 1991;260:909-16.
130. Nicolay K, Fok JJ, Voorhout W, Post JA, Kruijff B. Cytofluorescence detection of adriamycin-mitochondria interactions in isolated, perfused rat heart. *Biochim Biophys Acta.* 1986;887:35-41.
131. Ahmed HH, Mannaa F, Elmegeed GA, Doss SH. Cardioprotective activity of melatonin and its novel synthesized derivatives on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Bioorg Med Chem.* 2005;13:1847-57.
132. Xu MF, Ho S, Qian ZM, Tang PL. Melatonin protects against cardiac toxicity of doxorubicin in rat. *J Pineal Res.* 2001;31:301-7.
133. Hirano S, Wakazono K, Agata N, Iguchi H, Tone H. Comparison of cardiotoxicity of pirarubicin, epirubicin and doxorubicin in the rat. *Drugs Exp Clin Res.* 1994;20:153-60.
134. Li ZR, Reiter RJ, Fujimori O, Oh CS, Duan YP. Cataractogenesis and lipid peroxidation in newborn rats treated with buthionine sulfoximine: Preventive actions of melatonin. *J Pineal Res.* 1997;22:117-23.
135. Herman EH, Ferrans VJ, Myers CE, Van Vleet JF. Comparison of the effectiveness of ( $\pm$ )-1,2-Bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane (ICRF-187) and N-acetylcysteine in preventing chronic doxorubicin cardiotoxicity in beagles. *Cancer Res.* 1985;45:276-81.
136. Zeidán Q, Strauss M, Porras N, Anselmi G. Differential long-term subcellular responses in heart and liver to adriamycin stress. Exogenous L-carnitine cardiac and hepatic protection. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2002;34:315-21.
137. Germain E, Bonnet P, Aubourg L, Grangeponde MC, Chajès V, Bougnoux P. Anthracycline-induced cardiac toxicity is not increased by dietary omega-3 fatty acids. *Pharmacol Res.* 2003;47:111-7.
138. Yagmurca M, Fadillioglu E, Erdogan H, Ucar M, Sogut S, Irmak MK. Erdosteine prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Pharmacol Res.* 2003;48:377-82.
139. Ballı E. Doksorubisinin oluşturduğu karditotoksisitede melatoninin etkisi. Çukurova Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi. Adana-2003.