

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ASTAKSANTİN'İN SIÇANLARDA SİKLOFOSFAMİD KAYNAKLI KALP
HASARINA KARŞI ETKİLERİNİN HİSTOLOJİK VE FLOW SİTOMETRİK
OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Tuğba ZENGİN

TRABZON- 2020

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ASTAKSANTİN'İN SIÇANLARDA SİKLOFOSFAMİD KAYNAKLI KALP
HASARINA KARŞI ETKİLERİNİN HİSTOLOJİK VE FLOW SİTOMETRİK
OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Tuğba ZENGİN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU

TRABZON- 2020

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimimin ve tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle, ilgi ve desteğini eksik etmeyen danışman hocam Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU hocama, geniş bilgi, deneyim ve imkanlarından faydalandığım çok değerli Prof. Dr. Engin YENİLMEZ, Prof. Dr. Esin YULUĞ, Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Derya ÖZTÜRK OKATAN hocalarıma, tez deneyimin gerçekleşmesinde büyük katkıları olan çok değerli arkadaşlarım Uzm. Dr. Gökşen Derya REİS KÖSE, Uzm. Dr. Neziha Senem ARI, Uzm. Dr. Oğuzhan KESKİN, Arş. Gör. Dr. Tuğba ARICI, Arş. Gör. Dr. Dilan ÇETİNAVCI, Arş. Gör. Dr. Ayşe Firuze BIYIK, Arş. Gör. Dr. Abdülkadir KUTLU, Arş. Gör. Dr. Gülten AYDIN, Arş. Gör. Dr. Elif ALVUROĞLU, Uzm. Dr. Ahmet Uğur AKMAN, Biyolog Ali KULABER, Biyolog Birgül GÜR KUTLU ve tüm bölüm arkadaşlarıma, tez çalışmamı TTU-2018-7645 no'lu proje olarak destekleyen KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür eder, saygılarımı sunarım. Ayrıca benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve her zaman yanımda olan sevgili annem Fatma Sertkaya'ya, eşim Eren Zengin'e ve biricik oğlum Yağız Ege Zengin'e teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

Dr. Tuğba ZENGİN

ÖZET

Astaksantin'in Sıçanlarda Siklofosfamid Kaynaklı Kalp Hasarına Karşı Etkilerinin Histolojik ve Flow Sitometrik Olarak Değerlendirilmesi

Amaç: Bu çalışmada sitotoksik etkileri olan siklofosfamid (CP)'in neden olduğu erişkin sıçan kalp hasarına karşı kuvvetli bir antioksidan olan astaksantin (AST)'in koruyucu etkisi araştırılmıştır. Bu amaç için ağırlık ölçümleri, histopatolojik ve flow sitometrik yöntemler kullanılmıştır.

Metotlar: Araştırmada kullanılmak üzere 18 adet Sprague Dawley ırkı erişkin dişi sıçan kontrol, CP ve CP+AST adlı rastgele 3 eşit gruba ayrıldı. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmazken, CP grubuna deneyin 7. günü 200 mg/kg tek doz CP (2.5 ml serum fizyolojik içinde çözölmüş, i.p.) ve CP+AST grubuna deneyin ilk 7 günü 25 mg/kg/gün AST (350 µl zeytinyağı içinde çözölmüş, oral) ve deneyin 7. günü 200 mg/kg tek doz CP (2.5 ml serum fizyolojik içinde çözölmüş, i.p.) uygulandı. Deneyin 8. günü sıçanlar sakrifiye edildi ve kalp dokuları diseke edildi. Diseksiyon sonrası kalp dokuları SF ile yıkandıktan sonra tartılarak ağırlıkları kaydedildi. Dokuların bir yarısında Hematoksilen & eozin (H&E), Masson Trichrome ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama yöntemleriyle histopatolojik incelemeler yapıldı; diğer yarısında ise flow sitometrik olarak Anneksin V ve Anti-NOX2/gp91phox analizleri yapıldı.

Bulgular: Kalp ağırlığı ölçömlerinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Siklofosfamid grubuna ait kalp kesitlerinin histolojik incelemesinde; kardiyomiyositlerde dejenerasyon, hipereozinofili, piknotik çekirdekler, dalgalı lifler, perinökleer ödem, vakuolizasyon, kontraksiyon bantları, kas liflerinde ayrılma, vasküler konjesyon ve PAS (+) boyanmada artış izlendi. Bu bulgular, CP+AST grubunda CP grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştı. Masson Trikrom boyamada kollajen birikimi açısından gruplar arasında bir farklılık görölmeydi. Flow sitometrik olarak CP grubunda Anneksin V ve Anti-NOX2/gp91phox bağlanmış hücre düzeylerinde artış mevcuttu. Astaksantin ön muamelesi ile CP grubuna kıyasla CP+AST grubunda Anneksin V ve Anti-NOX2/gp91phox bağlanmış hücre düzeyi belirgin düşüş gösterdi.

Sonuçlar: Elde edilen bulgular ışığında CP'nin erişkin sıçan kalbi üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğu, AST uygulamasının CP'nin bu olumsuz etkilerini önlediği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Astaksantin, Siklofosfamid, Toksisite, Kalp, Flow Sitometri.



SUMMARY

Histological and Flow Cytometric Evaluation of Astaxanthin's Effects Against Cyclophosphamide Induced Heart Injury in Rats

Background: In this study, the protective effect of astaxanthin (AST), which is a strong antioxidant against adult rat heart damage caused by cyclophosphamide (CP), which has cytotoxic effects, was investigated. For this purpose, weight measurements, histopathologic and flow cytometric methods were used.

Methods: Eighteen Sprague Dawley adult female rats were randomly divided into 3 equal groups as control, CP and CP+AST in the study. While no application is made to the control group, on the 7th day of the experiment, 200 mg/kg single dose of CP (dissolved in 2.5 ml physiologic saline, i.p.) was administered to CP group. On the first 7 days of the experiment, 25 mg/kg/day of AST (dissolved in 350 µl of olive oil, oral) and on the 7th day of the experiment, 200 mg/kg single dose of CP (dissolved in 2.5 ml physiologic saline, i.p.) was administered to the CP+AST group. On the 8th day of the experiment, the rats were sacrificed and the heart tissues were dissected. After dissection and washing the heart tissues with physiologic saline, they were weighed and recorded. Histopathological examinations were performed in one half of the tissues by Hematoxylin & Eosin (H&E), Masson Trichrome and Periodic Acid-Schiff (PAS) staining methods; In the other half, Annexin V and Anti-NOX2/gp91phox analyzes were performed by flow cytometry.

Results: There was no significant difference between the groups in heart weight measurements. In histological examination of the heart sections belonging to the CP Group; degeneration in cardiomyocytes, hypereosinophilia, pycnotic nuclei, wavy fibers, perinuclear edema, vacuolization, contraction bands, separation in muscle fibers, vascular congestion and increased PAS (+) staining were observed. These findings were significantly reduced in the CP+AST group compared to the CP group. Masson Trichrome staining did not differ between the groups in terms of collagen accumulation. There was an increase in Annexin V and Anti-NOX2/gp91phox bound cell levels in CP group in flow cytometrically. With the AST pretreatment, compared to the CP group, in the CP+AST group Annexin V and Anti-NOX2/gp91phox bound cell level showed a marked decrease.

Conclusions: In the light of the findings obtained, it can be said that CP affects the adult rat heart negatively and AST application prevents these negative effects of CP.

Key Words: Astaxanthin, Cyclophosphamide, Toxicity, Heart, Flow Cytometry.



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET.....	ii
SUMMARY	iv
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
RESİMLER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kalp Morfolojisi	3
2.1.1. Kalp Anatomisi	3
2.1.2. Kalp Embriyolojisi.....	10
2.1.3. Kalp Histolojisi	12
2.2. Siklofosfamid.....	15
2.2.1. Siklofosfamid Kardiyotoksitesi.....	17
2.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Hasar	18
2.4. Apoptoz.....	19
2.5. Astaksantin.....	21
3. MATERYAL VE METOT	23
3.1. Etik Kurul Onayı ve Finansal Destek	23
3.2. Deney Hayvanları, Gruplar ve Deneysel Çalışma Planı	23
3.3. Doku Numunelerinin Toplanması	25
3.4. Histolojik İşlemler	26
3.4.1. Formalin Tespit Solüsyonunun Hazırlanması.....	26
3.4.2. Işık Mikroskopik İnceleme için Kalp Dokularının Hazırlanması	27
3.4.3. Hematoksilen Eozin Boyama Yöntemi.....	28
3.4.4. Periyodik Asit-Schiff Boyama Yöntemi.....	29
3.4.5. Masson Trikrom Boyama Yöntemi	31
3.5. Flow Sitometrik Analiz.....	32
3.5.1. PE Annexin V Apoptosis Detection Kit Analizi	32
3.5.2. Anti-NOX2/gp91phox Antikor Kit Analizi	33

3.6. İstatistiksel Analiz.....	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. Morfolojik Bulgular.....	36
4.1.1. Hematoksilen & Eozin Boyalı Kalp Kesitlerinin Histopatolojik Değerlendirilmesi	36
4.1.1.1. Kontrol Grubu.....	36
4.1.1.2. CP Grubu	36
4.1.1.3. CP+AST Grubu	36
4.1.2. Periyodik Asit-Schiff Boyalı Kalp Kesitlerinin Histopatolojik Değerlendirilmesi.....	58
4.1.3. Masson Trikrom Boyalı Kalp Kesitlerinin Histopatolojik Değerlendirilmesi.....	70
4.2. Kalp Ağırlıkları.....	81
4.3. Flow Sitometrik Analizler	82
4.3.1. PE Annexin V Apoptosis Detection Kit Analizi	82
4.3.2. Anti-NOX2/gp91phox Antikor Kit Analizi.....	83
5. TARTIŞMA	84
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	90
7. KAYNAKLAR	91

KISALTMALAR DİZİNİ

4HCP	: 4-hidroksisiklofosamid
µl	: Mikrolitre
a	: Arteria
AI	: Apoptotik indeks
APO-B	: Apolipoprotein B
APOP	: Advanced protein oxidation product
ark.	: Arkadaşlarının
AST	: Astaksantin
AV	: Nodus atrioventricularis
Ca⁺⁺	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
cm	: santimetre
Cl⁻	: Klor
CP	: Siklofosamid
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dk	: Dakika
FCS	: Fetal calf serum
g	: Gram
G1	: Gap 1
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
HDL	: High Density Lipoprotein
H&E	: Hematoksilen & eozin
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HOCl	: Hipoklor
Ig G	: İmmünglobulin G
Ig M	: İmmünglobulin M
IL1-β	: İnterlökin 1 β
ip.	: İntraperitoneal
K	: Kontrol

kaspaz	: Sistein aspartik proteaz
kg	: Kilogram
KTÜ	: Karadeniz Teknik Üniversitesi
LDL	: Low Density Lipoprotein
m	: Musculus
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MPO	: Miyeloperoksidaz
n.	: Nervus
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NO	: Nitrik oksit
NOX2	: NADPH oksidaz 2
°C	: Santigrat derece
O₂⁻	: Süperoksit
OH	: Hidroksil
Ort.	: Ortalama
PAS	: Periyodik asit-Schiff
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
PG E-2	: Prostaglandin E -2
PS	: Fosfaditilserin
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
S	: Sentez
SA	: Nodus sinuatrialis
SD	: Standart sapma
SF	: Serum fizyolojik
SOD	: Süperoksit dismutaz
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
TNF-α	: Tümör nekrotizan faktör alfa
TUNEL	: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt) Deoxyuridine Triphosphate Nick End Labeling Assay

UV : Ultraviyole

v : Vena

Vv. : Venae



TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1: Kalbin Komşulukları	4
Tablo 2: Doku Takibi Prosedürü	27
Tablo 3: Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü	28
Tablo 4: Miyokardiyal Skorelama Sistemi.....	29
Tablo 5: Periyodik Asit-Schiff Boyama Prosedürü	30
Tablo 6: Masson Trikrom Boyama Prosedürü.....	31
Tablo 7: PE Annexin V Apoptosis Detection Kit Çalışma Prosedürü	32
Tablo 8: Anti-NOX2/gp91phox Antikor Kit Çalışma Prosedürü.....	34
Tablo 9: Miyokardiyal Hasar Skoru	37
Tablo 10: Kalp ağırlıklarının karşılaştırması	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1: Siklofosfamid'in Metabolizması	16
Şekil 2: Astaksantin'in kimyasal yapısı.....	21
Şekil 3: Deney süreci ve gruplar.....	25
Şekil 4: Flow sitometrik Anneksin V histogramları.....	82
Şekil 5: Flow Sitometrik AI değerleri	82
Şekil 6: Flow sitometrik Anti-NOX2/gp91phox histogramları.....	83
Şekil 7: Flow sitometrik Anti-NOX2/gp91phox (+) hücre yüzdeleri	83



RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

Resim 1:	Sıçanların Barındırıldığı Standart Tip III Kafesler	24
Resim 2:	A) Oral gavaj, B) İntraperitoneal enjeksiyon uygulaması.....	25
Resim 3:	Kalplerin Çıkartılması	26
Resim 4:	Kontrol Grubuna Ait Kalp Dokusu, H&E, X40.....	38
Resim 5:	Kontrol Grubuna Ait Kalp Dokusu, H&E, X100.....	39
Resim 6:	Kontrol Grubuna Ait Kalp Dokusu, H&E, X200.....	40
Resim 7:	Kontrol Grubuna Ait Kalp Dokusu, H&E, X400.....	41
Resim 8:	CP Grubuna Ait Kalp Dokusu, H&E, X40	42
Resim 9:	CP Grubuna Ait Kalp Dokusu, H&E, X100	43
Resim 10:	CP Grubuna Ait Kalp Dokusu, H&E, X100	44
Resim 11:	CP Grubuna Ait Kalp Dokusu, H&E, X200	45
Resim 12:	CP Grubuna Ait Kalp Dokusu, H&E, X200	46
Resim 13:	CP Grubuna Ait Kalp Dokusu, H&E, X200	47
Resim 14:	CP Grubuna Ait Kalp Dokusu, H&E, X400	48
Resim 15:	CP Grubuna Ait Kalp Dokusu, H&E, X400	49
Resim 16:	CP Grubuna Ait Kalp Dokusu, H&E, X400	50
Resim 17:	CP Grubuna Ait Kalp Dokusu, H&E, X400	51
Resim 18:	CP+AST Grubuna Ait Kalp Dokusu, H&E, X40	52
Resim 19:	CP+AST Grubuna Ait Kalp Dokusu, H&E, X100	53
Resim 20:	CP+AST Grubuna Ait Kalp Dokusu, H&E, X200	54
Resim 21:	CP+AST Grubuna Ait Kalp Dokusu, H&E, X200	55
Resim 22:	CP+AST Grubuna Ait Kalp Dokusu, H&E, X200	56
Resim 23:	CP+AST Grubuna Ait Kalp Dokusu, H&E, X400	57
Resim 24:	CP+AST Grubuna Ait Kalp Dokusu, H&E, X400	58
Resim 25:	Kontrol Grubuna Ait Kalp Dokusu, PAS, X40.....	59
Resim 26:	Kontrol Grubuna Ait Kalp Dokusu, PAS, X100.....	60
Resim 27:	Kontrol Grubuna Ait Kalp Dokusu, PAS, X200.....	61
Resim 28:	Kontrol Grubuna Ait Kalp Dokusu, PAS, X400.....	62
Resim 29:	CP Grubuna Ait Kalp Dokusu, PAS, X40	63

Resim 30: CP Grubuna Ait Kalp Dokusu, PAS, X100	64
Resim 31: CP Grubuna Ait Kalp Dokusu, PAS, X200	65
Resim 32: CP Grubuna Ait Kalp Dokusu, PAS, X400	66
Resim 33: CP+AST Grubuna Ait Kalp Dokusu, PAS, X40.....	67
Resim 34: CP+AST Grubuna Ait Kalp Dokusu, PAS, X100.....	68
Resim 35: CP+AST Grubuna Ait Kalp Dokusu, PAS, X200.....	69
Resim 36: CP+AST Grubuna Ait Kalp Dokusu, PAS, X400.....	70
Resim 37: Kontrol Grubuna Ait Kalp Dokusu, Masson Trikrom, X40	71
Resim 38: Kontrol Grubuna Ait Kalp Dokusu, Masson Trikrom, X200	72
Resim 39: Kontrol Grubuna Ait Kalp Dokusu, Masson Trikrom, X400	73
Resim 40: CP Grubuna Ait Kalp Dokusu, Masson Trikrom, X40.....	74
Resim 41: CP Grubuna Ait Kalp Dokusu, Masson Trikrom, X100.....	75
Resim 42: CP Grubuna Ait Kalp Dokusu, Masson Trikrom, X200	76
Resim 43: CP Grubuna Ait Kalp Dokusu, Masson Trikrom, X400	77
Resim 44: CP+AST Grubuna Ait Kalp Dokusu, Masson Trikrom, X40	78
Resim 45: CP+AST Grubuna Ait Kalp Dokusu, Masson Trikrom, X100	79
Resim 46: CP+AST Grubuna Ait Kalp Dokusu, Masson Trikrom, X200	80
Resim 47: CP+AST Grubuna Ait Kalp Dokusu, Masson Trikrom, X400	81

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alkilleyici ilaçlar uzun süreden beri en fazla kullanılan antineoplastik ilaç grubudur. Bu grupta ise en fazla kullanılan ilaç siklofosfamiddir. İmmünsupresif, antiinflamatuvar, antineoplastik, sitotoksik ve sitostatik etkili, alkile edici bir ajan olan CP küçük hücreli ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri, multiple skleroz, mikroskobik polianjitis, sistemik lupus eritematozis, Wegener granülomatozisi, romatoid artrit, Behçet hastalığı, glomerülonefrit gibi inflamatuvar ve neoplastik hastalıklarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (1-7).

Siklofosfamidin metabolik aktivasyonu için karaciğerde gerçekleşen reaksiyonlar sonunda fosforamid hardalı, akrolein gibi bazı sitotoksik metabolitler oluşur. Akrolein sıklıkla CP tedavisi sırasında görülen yan etkilerden sorumlu iken, fosforamid hardalı antitümör etkilerden sorumludur (8-9). Oluşan bu toksik metabolitler nedeniyle de bu kadar yaygın kullanım alanı olan CP'nin pek çok istenmeyen yan etkisi görülür. Sıklıkla karşılaşılan yan etkileri arasında kemik iliği depresyonu, mide bulantısı, kusma, alopesi bulunurken, organ spesifik yan etki olarak üriner sistem toksisitesi (özellikle hemorajik sistit, mesane kanseri), pulmoner ve kardiyak toksisite görülmektedir. Uzun dönem yan etkileri arasında ise reproduktif, onkojenik ve teratojenik etkileri bulunmaktadır (9). Kalp üzerinde özellikle miyosit hasarı, proteinlerde modifikasyonlar ve miyokard hasarıyla konjestif kalp yetmezliğine sebep olduğu gösterilmiştir. Bunların yanında vasküler geçirgenlikte artış ve ödeme de neden olabilir (10).

Astaksantin nutrasötik, gıda, kozmetik ve yem endüstrisinde kullanılan mikroalg, mantar, kompleks bitkiler, deniz ürünleri, flamingo ve bıldırcınlarda bulunan ksantofil karotenoid özellikte önemli bir pigmenttir (11,12). Daha çok deniz canlılarında bulunan AST'nin bu hayvanlarda serbest radikallere karşı savunma mekanizmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Astaksantin'in aktivitelerinin, test edilen diğer karotenoidlere, yani zeaksantin, lutein, tunaksantin, kantaksantin ve B karotene'e göre yaklaşık 10 kat ve bir tokoferol'e göre ise 100 kat daha güçlü olduğu görülmektedir. Aktif oksijen formlarının neden olduğu lipid peroksidasyonuna karşı güçlü inhibitör etki göstermektedir. Tüm bu sonuçlara dayanarak bazı kaynaklarda "Süper Vitamin E" olarak adlandırılmıştır (13).

Astaksantin'in çok güçlü antioksidan özelliklerinin yanında; UV ışık fotooksidasyonuna karşı koruyucu, anti-inflamatuvar, antikanser, antidiyabetik, Helikobakter piloriye bağlı ülserle karşı koruyucu, immünomodülatuvar, yaşlanma ve yaşla ilişkili hastalıklar veya karaciğer, kalp, göz, eklem ve prostat üzerinde iyileştirici birçok özelliği olduğu düşünülmektedir (11). Kalp üzerinde yapılan deneysel bazı çalışmalarda ise AST'nin anti-inflamatuvar, antioksidan ve lipid peroksidasyonunu azaltıcı özellikleri sayesinde kalp kasına karşı korucuyu etkileri olduğu gösterilmiştir (12).

Tüm bu bilgilerin ışığında, çalışmamızda CP'nin oluşturmuş olduğu kardiyak hasara karşı koruyucu etki gösterebilecek bir antioksidan olan AST'nin etkilerini histopatolojik ve flow sitometrik açıdan değerlendirmeyi amaçladık. Bu konuda yapılacak olan çalışmanın hem toplumda sık kullanılan bir ilacın komplikasyonlarına karşı elde edilebilecek bir koruyucu etkiyle insan sağlığı ve tedavi maliyeti bakımından olumlu sonuçlar doğurabileceğini hem de literatürde bu konudaki eksikliklerin giderilmesine katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalp Morfolojisi

Dolaşım sistemi kardiyovasküler sistem ve lenfatik sistem olarak iki bölümden oluşmaktadır. Lenfatik sistem dalak, timus, tonsillalar, lenf nodları ve nodüllerini, kardiyovasküler sistem ise esas olarak kalp ve damarları içermektedir.

Kardiyovasküler sistem kapalı sirküler bir sistemdir ve bu sistem içinde kalpten pompalanan kan; sırasıyla arterler, kapillerler, venlerden geçip sonra tekrar kalbe geldiğinden devamlı ve sirküler bir döngü halindedir. Ancak bazen kanın bir kısmı kapillerler duvarından geçip hücreler arasındaki doku sıvısına katılır ve buradan ya direkt olarak ya da lenfatik sistem aracılığıyla kardiyovasküler sisteme geri döner. Kalp ise tüm bu akış esnasında damarların ihtiyaç duyduğu gücü sağlayan pompa görevini üstlenir (14).

Dolaşım sistemi içerisinde ventriküller kalbin kanı pompalayan bölümüdür. Vücuttan v. cava superior ve inferior'la kalbe dönen kan ilk olarak sağ atrium'a ve sonrasında sağ ventriküle geçer. Buradan da truncus pulmonalis aracılığıyla oksijenlenmek üzere akciğerlere pompalanır. Kan akciğerlerde oksijenlendikten sonra v. pulmonalis'ler ile sol atrium'a ulaşır. Bu dolaşıma, küçük dolaşım veya akciğer dolaşımı denilir. Küçük dolaşım esnasında oksijenize olan kan sol atriumdan sol ventriküle geçiş yapar. Bu kan sol ventrikül tarafından, vücudun diğer taraflarına gönderilmek üzere aorta'ya pompalanır. Oksijenize kan dokuları besledikten sonra, venler (v. cava superior ve inferior) aracılığıyla sağ atrium'a dönüş yapar. Bu dolaşıma ise büyük dolaşım veya sistemik dolaşım denir (15).

2.1.1. Kalp Anatomisi

Kalp koni şeklinde, yetişkin bir insanda yaklaşık 250-300 g ağırlığında olan bir organdır. Toraks boşluğunda, akciğerlerin arasında, orta mediastinumda yer alır. Apex cordis denilen tepesi sola ve aşağıya; midsternal hattın 8 cm solunda 5. interkostal aralığa doğru uzanır. Apeks ve sağ ventrikül birlikte diyaframın üzerine oturur. Basis

cordis denilen tabanı ise sternumun arkasında 2. interkostal aralıkta oblik olarak konumlanmaktadır (15,16).

Tablo 1. Kalbin Komşulukları (16).

Sağ ve solda	Akciğerlerin mediastinal yüzleri
Altta	Diyafram
Önde	Sternum, kıkırdak kostalar, timus artıkları ve kısmen akciğerler
Arkada	Özofagus

Kalbin dış yüzü

Kalp sağ ve sol atriyum, sağ ve sol ventrikül olmak üzere 4 boşluktan oluşur. Bu boşlukları birbirlerinden ayıran bölmelerin, dış duvara tutunduğu yerlerde oluklar bulunur. Bu oluklardan atriyumlarla ventrikülleri birbirinden ayıran ve içinde kalbi besleyen damarların ana bölümleri ile sinus coronarius bulunan kısma sulcus coronarius denilir. Ventrikülleri ayıran sulcus interventricularis anterior, kalbin ön yüzündedir ve sol kenarına daha yakındır. Sulcus interventricularis posterior ise, kalbin alt yüzündedir ve sağ kenarına daha yakındır. Ventrikülleri ayıran bu iki sulkus apex cordis'in biraz sağ tarafında birbirleriyle birleşirler. Sulkuslar kalbi besleyen koroner kan damarlarını içerirler (15, 17).

Anatomik pozisyondaki kalbin facies diaphragmatica (inferior), facies sternocostalis (anterior), facies pulmonalis dexter ve facies pulmonalis sinister isimli dört yüzü ve margo dexter, margo sinister, margo superior, margo inferior isimli dört kenarı bulunmaktadır. Anterior yüzey çoğunlukla sağ ventrikülden oluşur, ancak sağda sağ atriyumun, solda ise sol ventrikülün bir kısmı bulunur. Diaphragma'nın centrum tendineum'una oturan inferior yüzeyi, sol ventrikül ve sağ ventrikülün küçük bir bölümünden oluşur. Sol akciğer yüzeyi sol ventrikül ve sol atriyumun bir bölümünden oluşurken, sağ akciğer yüzeyi sağ atriyumdan oluşur (16,18).

Kalbin Odaları

Kalbin içi dört bölümden oluşmaktadır. Üstteki odacıklara sağ atriyum ve sol atriyum, alttaki iki odacığa ise sağ ventrikül ve sol ventrikül adı verilir. İşlevsel olarak ise bir bölme ile ayrılmış iki pompadan oluşur. Sağ pompa vücuttan deoksijene kanı alıp akciğerlere gönderirken, sol pompa akciğerlerden oksijenlenmiş kanı alıp vücuda

gönderir. Her pompa, bir kapak ile birbirinden ayrılan bir atriyum ve bir ventrikülden oluşur. Atriyumlar kalbe gelen kanı almakla görevli olup, duvarları ventriküler duvarlara kıyasla incedir. Kalpten kanı pompalayan ventriküllerin duvarları ise nispeten daha kalındır. Sol ventrikülün kas kitlesi ise, sağ ventrikülden daha fazladır. Çünkü vücuda kan pompalanmak için gereken kuvvet akciğerlere kan pompalamak için gerekenden çok daha fazladır (18).

Sağ atriyum

Sağ ve sol atriyumlar septum interatriyale ile birbirinden ayrılır. Sağ atriyum sol atriyumun hem ön hem de sağındadır. Sağ atriyuma baş, boyun ve kollardan kanı getiren v. cava superior, bacaklardan ve karından kanı getiren v. cava inferior, kalbin venöz dönüşünü sağlayan kardiyak venler ve koroner sinüs açılır. Ön kısımda aurikula adı verilen, aorta ascendens ile üst üste gelen, geniş, üçgen ve piramidal bir uzantısı bulunur. Bu uzantı atriyumun venöz komponenti ile bağlantı oluşturur ve hacmini arttırır. Atriyumun iç kısımda, ön duvarında krista terminalis adlı dikey bir sırt bulunur. Bu kristadan itibaren görülen, musculi pectinati isimli kas çıkıntıları sola doğru devam eder ve aurikulaya uzanır. Arka duvar nispeten düzdür, ancak fossa ovalis adında sığ bir çukura sahiptir. Fossa ovalis, fetal dönemde sağdan sol atriyuma kan akışına izin veren foramen ovale'nin olduğu bölgededir. Vena cava superior sağ atriyuma üst kısmından girerken, v. cava inferior inferoposterior kısmına açılır. İki v. cava arasında uzanan sulkus terminalis denilen bir oluk bulunur. Sulkus terminalis, atriyumun iç yüzeyinde, pektinat kasların başlangıç yeri olan crista terminalise karşılık gelir. Koroner sinüs ise koroner sulkusun arka kısmı boyunca uzanıp, atrioventriküler açıklığın yakınında sağ atriyumda son bulur. Bazı kalp damarları da sağ atriyuma bağımsız olarak girer (17,19,20)

Sol Atriyum

Sol atriyum kalbin tabanını oluşturur ve sağ atriyumun arkasına doğru uzanır. Küçük, bükülmüş sol aurikula, sol atriyumun üst sol köşesinden çıkıntı yapar ve öne doğru uzanır. Ağzlarında kapakçık bulunmayan dört adet pulmoner ven simetrik olarak sol atriyuma girer. Sol atriyum boşluğu auricula sinistra dışında düz duvarlıdır. Auricula sinistra auricula dextra'dan daha uzun, dar, kavislidir ve atriyum sinistrum ile aralarında olan bağlantı deliği de daha dardır. Sol atriyumu sol ventriküle bağlayan ostium atrioventriculare sinistrum adlı delikte valva atrioventricularis sinistra (valva

mitralis) bulunur. Biküspid (iki kapakçıklı) olan valva mitralis iki parmağın ucunu andırır. Kapakçıklar anterior ve posterior kapakçık olarak adlandırılır. Anterior kapakçığın tabanı fibröz atriyoventriküler halkanın kenarının üçte birine, posterior kapakçık ise kalan üçte ikisine bağlanır; ancak bazen karşı karşıya gelemezler ve bu durumda küçük bir aksesuar kapakçık aralarındaki boşluğu doldurur. Musculi pectinati'ler ise sağ atriyumda nispeten daha az bulunurlar ve auricula sinistra civarında görülürler (15, 21).

Sağ Ventrikül

Sağ ve sol ventriküller, birbirlerinden septum interventriculare ile ayrılır. Sağ ventrikül, sağ atriyumdan apex'e kadar uzanır. Sağ atriyum ile arasında ostium atrioventriculare dextrum ve buraya ait, üç adet kapakçığı olan valva atrioventricularis dextra (valva tricuspidalis) bulunur. Truncus pulmonalis ile arasında ise ostium trunci pulmonalis ve bu deliğe ait, üç adet kapakçığı olan valva trunci pulmonalis yer alır. Arka üst duvarda kanın sağ ventriküle giriş çıkış yerlerini ayıran crista supraventricularis bulunur. Bu kristanın üst kısmından valva trunci pulmonalis'e kadar uzanan düz ventriküler alana conus arteriosus denir. Crista supraventricularis'in altında bulunan ventrikül miyokardının düzensiz kıvrımları ve çıkıntılarına ise trabekula carnea adı verilir. Bu çıkıntıların büyük ve koni şeklinde olanlarına m. papillaris denir. Musculus papillaris'lerin tepesinden başlayıp, valva tricuspidalis'in kapakçıklarının serbest kenarlarına tutunan iplikçiklere ise chordae tendineae adı verilir. Valva tricuspidalis, m. papillaris ve chordae tendineae'lar birlikte kanın pompalama odacığına geri dönmesini engellerler. Septal duvar üzerinden ön duvara doğru uzanan modifiye trabecula carnea olan trabecula septomarginalis'in içinde kalbin iletim sistemine ait fasciculus atrioventricularis'in crus dextrum'unun dalları seyredir (16,17).

Sol Ventrikül

Sol ventrikül sol atriyumun önüne uzanır ve sağ ventrikülden daha uzun ve daha koniktir. Kalpteki en kalın miyokard tabakasına sahiptir. Kalbin anterior, inferior ve sol pulmoner yüzeylerine katkıda bulunur ve apeksi oluşturur. Sol ventriküldeki trabeculae carnea'lar, genel itibariyle sağ ventriküldekilere benzemekle beraber kısmen daha ince ve hassastır. Valva mitralis'e tutunan chorda tendinea'lar sağ ventriküldekilerden daha kalın, kuvvetli fakat daha az sayıdadırlar. Valva mitralis'in

ön, sağ tarafında ostium aortae ve bu deliğe ait, üç adet semilunar kapakçığa sahip, valva aortae bulunur. Semilunar kapakçıklar ile aorta ascendens'in duvarı arasında cep benzeri sinüs aortae'lar bulunur. Sağ ve sol koroner arterler de sağ ve sol aort sinüslerinden kaynaklanır. Kan, sol atriyoventriküler delikten ventriküle girip apekse doğru akar. Sağ ventrikülün infundibulumunun arkasındaki, düzgün yüzeyli bir duvara sahip olan, kanın dışarıya akış yoluna vestibulum aortae denir. Bu vestibül aorta ascendens ile devamlılık gösterir (15,18).

Sağ ve sol ventrikül arasındaki septum interventriculare iki bölümden oluşmaktadır:

- Pars muscularis
- Pars membranacea

Pars muscularis kalın ve septumun büyük kısmını oluştururken, pars membranacea septumun ince yapıdaki üst kısmıdır (18).

Kalbin İskeleti

Ventriküler taban, atriyoventriküler kapaklar ve aortik açıklık ile yakından ilişkili membranöz, tendinöz ve fibroareolar uzantıları olan, yoğun kollajenden oluşan kompleks bir yapıdır (20). Atriyoventriküler, aort ve truncus pulmonalis deliklerini anulus fibrosus adı verilen fibröz halkalar çevreler. Halkalar trigonum fibrosum isimli ek fibröz bir bağ dokusu aracılığıyla birbirlerine bağlanır. Bu fibröz destek yapıları kalbin iskeletini oluşturur. Fibröz iskelet sadece kalp kası ve kapaklara destek olmakla kalmaz, aynı zamanda atriyum ve ventrikülleri ayıran septayı oluşturmaya da yardımcı olur (14).

Valva mitralis'i çevreleyen halkaya anulus fibrosus sinister, valva tricuspidalis'i çevreleyene anulus fibrosus dexter denilir. Trigonum fibrosum sinistrum, ostium aorticum ile ostium atrioventriculare sinistrum arasındadır. Trigonum fibrosum dextrum ise ostium aorticum ile ostium atrioventriculare sinistrum ve dextrum arasındadır (16). Atriyum fibröz iskeletin sağ tarafına, ventrikül ise soluna uzanır ve ikisi arasında kas liflerinin devamlılığı yoktur. Fibröz halka boyunca aralarındaki tek fizyolojik bağlantı atriyoventriküler iletim demetidir. İnterventriküler septumun membranöz kısmı ve triküspid, mitral ve aort kapaklarının yaprakçıklarının hepsinin bir araya geldikleri bölgeye ise santral fibröz cisim adı verilir (21).

Kalbin damarları ve İnnervasyonu

Miyokardiyum, kalpten çıktığı yerde aortadan dallanan a. coronaria dextra ve sinistra'dan bolca kan desteği almaktadır. Sulcus coronarius adlı oluk içerisinde seyreden koroner arterler kanlarını, ventriküler diyastol sırasında, valva aortae'nın kapakçıklarının arkasındaki sinüslerden alırlar. Koroner arterler kalbin arka yüzünde anastamozlaşırlar. Sol koroner arter sol atriyoventriküler olukta seyrederek ve ramus interventricularis anterior ve ramus circumflexus dallarına ayrılır. Sağ koroner arter de sağ atriyoventriküler oluk içinde arkaya doğru seyrederek ve ramus interventricularis posterior dalını verir (14,22).

Koroner arterlerden gelen kan, geniş bir kapiller ağdan geçtikten sonra, arterlere paralel seyreden kardiyak venlere girer. Bu kardiyak venler (v. interventricularis anterior, v. coronaria sinistra v. coronaria dextra, v. interventricularis posterior, v. ventriculi sinistri posterior, v. obliqua atrii sinistri, vv. atrioventriculares) daha geniş bir damar şekli olan, kalbin arka yüzünde, atriyum ve ventriküllerin arasındaki sulcus coronarius'da seyreden sinus coronarius'a drene olurlar. Bu sinüs sol ventrikül miyokard kanının çoğunu drene ettikten sonra sağ atriyuma boşalır. Kalbin venlerinin az bir kısmı (v. ventriculi dextri anterior, vv. cardiae minimae-Thebesius venleri) ise doğrudan sağ atriyuma kanı boşaltırlar. Thebesius venleri en küçük kalp damar grubu olup, farklı olarak kanı kalbin dört odasına da boşaltır. Sağ atriyumda ve sağ ventrikülde çok sayıdadır, sol atriyum ve sol ventrikülde ise nispeten sayıca daha azdır. Sonuçta kardiyak venlerle deoksijenize olmuş kan tekrar oksijenlenmek için pulmoner dolaşıma dönmüş olur (14,18).

Kardiyak lenfatik damarlar subendokardiyal, miyokardiyal ve subepikardiyal pleksusları oluştururlar. Bu pleksuslardan oluşan lenfatik damarlar da atriyoventriküler olukta birleşip tek bir damar halinde pulmoner arter ile sol atriyum arasında yükselir ve genellikle nodi lymphatici tracheobronchiales inferiores'de sona erer. Lenfatik damarların bir kısmı da solda brakioyosefalik lenf nodunda biter (20).

Kalbin innervasyonu otonom sistemle gerçekleşir. Parasempatikleri n. vagus'un, sempatikleri ise truncus sympathicus'un dallarıdır. Buralardan gelen kardiyak dallar bifurcatio trachea'nın önünde, arcus aortae'nın arkasında yer alan plexus cardiacus'u oluştururlar. Sempatik lifler uyarıldığında kalp hızlanır ve koroner

arterler genişler; buna karşı parasempatik lifler kalbi yavaşlatır ve koroner arteriyel daralmaya neden olur (15).

Kalbin İletim Sistemi

Kasılmak için nöral stimülasyona ihtiyaç duyan iskelet kasının aksine, kalp kası nöral uyarım olmadan da kasılabilir. Atriyum ve ventrikül miyokardının eksitasyonu ve kontraksiyonu kalp iletim sistemini oluşturan özelleşmiş kalp kası hücreleri tarafından gerçekleştirilir. Spontan olarak aksiyon potansiyelleri üretebilen bu özelleşmiş kalp kası hücrelerinden oluşan nodus sinuatriyalis (SA), nodus atrioventricularis (AV), atriyoventriküler demet (His), sağ ve sol demet dalları ve Purkinje lifleri kalbin iletim sistemini oluşturur (23).

Nodus sinuatriyalis sağ atriyumun üst duvarında, v. cava superior açıklığının yanında, crista terminalisin üst ucunda yer alır ve kalbin pacemaker'ı olarak işlev görür. Yani kalbin kasılması için gerekli aksiyon potansiyelleri buradan başlar ve sağ ve sol atriyumlara yayılır. SA nodülü kalbin diğer bölgelerine nispeten daha hızlı aksiyon potansiyeli üretir ve daha fazla Ca^{+2} kanalı vardır.

Nodus atrioventricularis sağ atriyumun alt kısmında, sinus coronarius açıklığı ile triküspit kapağın septal kapakçığı arasında yer alır. SA nodülünden AV nodüle gelen impulslar yavaş bir şekilde atriyoventriküler demet adındaki özelleşmiş kalp kası grubuna yayılır. AV nodüldeki bu yavaş iletim, aksiyon potansiyelleri ventriküllere iletilmeden önce atriyumların kasılmalarının tamamlanmasına olanak sağlar. Aksiyon potansiyelleri His demeti üzerinden hızlı bir şekilde iletdikten sonra His demeti, interventriküler septumun altına uzanan sağ ve sol dallara ayrılır. Bu dalların uçlarındaki iletken doku, hızlı aksiyon potansiyelleri oluşturabilen özelleşmiş kalp kası liflerinden oluşan ve ventriküler kalp kasına yayılan Purkinje lif demetini oluşturur. Sonuçta tüm bu sistem sayesinde aksiyon potansiyelleri ventriküler kalp kasının tamamına hızla ulaşmış ve kardiyak kontraksiyon gerçekleşmiş olur. Bu kasılma tamamlandıktan sonra ventriküller gevşemeye başlar ve gevşeme tamamlanınca SA nodülde, bir sonraki aksiyon potansiyeli oluşur. Böylece bir sonraki kalp döngüsü başlamış olur (22,23).

2.1.2. Kalp Embriyolojisi

Kardiyojenik Bölgenin, Kalp Tüpünün ve Halkasının Oluşumu

Endometriyumdan difüzyonla beslenen embriyoda üçüncü haftanın ortasında kalp ve damar sistemi gelişmeye başlar. Kardiyak progenitör hücrelerin kökeni primitif çizginin lateralindeki epiblast tabakasıdır. Primitif çizgi boyunca göç eden hücreler orofaringeal membranın rostralinde, lateral plak mezoderminin splanknik mezodermine (kardiyojenik mezoderm) yerleşirler. Geç presomit dönemde (18. gün) bu hücreler faringeal endodermle indüklenerek kardiyak miyoblastlara dönüşürler. Splanik mezodermde endotelle çevrili kan hücreleri de oluşmaya başlar. Sonuçta iki lateral splanik mezodermde iki ayrı tüp şeklinde oluşmaya başlayan kalp içi endotel hücreleri dışı miyoblastlarla çevrelenmiş durumdadır ve bu yapı kalp tüpü (endokardiyal tüp) adını alır, bu bölgeye ise kardiyojenik bölge denir. Orofaringeal membranın rostralinde bulunan kardiyojenik bölge zamanla önce servikal sonra torakal bölgeye iner. Embriyonun hem sefalokaudal hem lateral yönlerden katlanmasıyla iki kalp tüpü birbirine yaklaşp ortada birleşerek tek bir tüp (22. gün) halini alır (24,25). Miyokard tarafından kalp jölesi olarak da bilinen kalın bir ekstraselüler matriks tabakası 21-22. günden sonra salgılanır ve bu tabaka miyokardı endokardiyal tüpten ayırır. Epikardiyum ise miyokardın dış yüzeyine göç eden mezodermal hücreler ve septum transversumda bulunan mezodermal hücrelerden oluşur. Böylelikle içte endotelyal tabaka, ortada miyokardiyum ve dışta epikardiyum tabakaları oluşmuş olur (26).

Kan, kalp tüpünde bir dizi odacık boyunca akar. Tübüler yapıdaki kalp uzamaya, genişlemeye, bazı alanlarda daralmaya başlar ve venöz uçtan arteriyal uça doğru sinüs venosus, atriyum, ventrikül, bulbus kordis ve aortik keseden oluşur (27,28). Yirmi üçüncü gün bulbus kordis inferior, anterior ve sağa doğru hareket eder. Primitif ventrikül sola dönerken, primitif atriyum ile sinüs venosus superior ve posteriora hareket eder. Bu bükülme 28. güne kadar sürer ve sonunda kardiyak halka oluşur. Başlangıçta perikardiyumun dışında iki eş parçadan oluşan atriyal bölümler birleşerek tek bir atriyumu oluşturur ve perikardiyumun içine girer (25,29). Bulbus kordis'in proksimal 1/3'ü sağ ventrikülü oluşturur. Truncus arteriosus isimli distal kısmı aort kökünü ve aortae ascendens'i oluşturur. Konus kordis isimli orta kısmı ise

primitif sağ ventrikülü truncus arteriosus'a bağlar ve sağ ve sol ventriküllerin akım çıkış kanallarını oluşturur. Primitif ventrikülden de sol ventrikül gelişir. İnterventriküler sulkus sağ ve sol ventrikülleri ayırır. Miyokardın merkezden uzağa doğru büyümesi ve ventriküle trabeküler görünüm kazandıran i  duvarların divertik  lasyonu ile ventriküller gelişir (30).

Sinüs Venozusun Gelişimi

Tüm venöz kan, sinüs venozus yolu ile sağ atri yuma girer. Sinüs venozus eşit ebatlı sağ ve sol sinüs boynuzlarına sahiptir. Kanın soldan sağa şantının sonucu olarak 4. haftada sağ boynuz büyür ve sol boynuz koroner sinüsü oluşturacak bir kola dönüşür. Zamanla atriyum b  y d k  , sağ sinüs boynuzunu dorsal duvarına dahil eder ve burası sağ atriyumun düz duvarlı bölümünü oluşturur. Başta tek olan pulmoner ven sol atriyuma açılır. Atriyum genişledik  , bu pulmoner veni ve dört kolunu kendi duvarlarına dahil ederek sol atriyumun düz duvarlı bölgesini oluşturmuş olur (31). Sinüs venozus ve sağ atriyum arasındaki sinuatriyal orifisin iki yanında sağ ve sol venöz kapaklar vardır. Bu kapaklar dorsokraniyal tarafta birleşerek septum spurium t  mseğini oluştururlar. Sol venöz kapak zamanla atriyal septuma karışırken, sağ venöz kapağın alt parçasından v. cava inferior ve koroner sinüs kapağı gelişir. Bu dönemde septum spurium ve sağ venöz kapağın üst kısmı birlikte crista terminalisi oluşur (25,31).

Kalbin B  lmelenmesi

Kalbin septumları 27-37. günlerde, karşılıklı duvarlarda büyüyen dokuların birbirlerine yaklaşıp birleşmesi ya da bir duvardan gelişen dokunun diğer duvarla birleşmesi ile oluşur. Endotel hücrelerinin kalp j  lesine g    ederek oluşturdukları endokardiyal yastıklardan dorsal ve ventral yastıkların ortaya doğru büyüyüp birleşmesi ile atriyoventriküler kanal sağ ve sol olmak üzere ikiye ayrılır. Sonrasında ise endokardiyal yastıklardan aşağıya uzanan membranöz septum ile miyokardiyumdan yukarıya uzanan müsküler septum birleşerek interventriküler septumu oluşturur (24).

Atriyal septum; septum sekundum, septum primum ve atriyoventriküler yastıkların katkısıyla oluşur. Septum primum, 5. haftada atriyumun dorsal duvarından gelişir, atriyoventriküler yastıklara doğru büyür. Geçici interatriyal geçit olan foramen primum (ostium primum) septum primumun alt kısmında olup, gelişimin 6. haftasında

septum primum endokardiyal yastıklarla kaynaştığı için kapanır. Fakat bu kapanmadan önce septum primumun üst kısmında delikler görülmeye başlar ve foramen sekundumu (ostium sekundum) oluşturmak üzere birleşirler. Septum primumun sağ tarafında, kalın, kaslı, septum sekundum da endokardiyal yastıklara doğru hilal şeklinde büyür ve foramen ovale isimli bir deliği çevreler. Vena cava inferior içindeki oksijenden zengin kan foramen ovale'ye yönelir ve septum sekundumdan septum primumu iterek sol atriyuma geçer. Doğumdan sonra sol atriyal basıncın artmasıyla bu delik kapanarak fossa ovalise dönüşür (32,33).

Semilunar kapaklar, aort ve truncus pulmonalis deliklerinin çevresindeki dokudaki 3 tümsekten zamanla çukurlaşır yeniden şekillenerek gelişir. Atriyoventriküler kapaklar da AV kanalların etrafındaki dokudan gelişir (28).

Kalbin İleti Sisteminin Oluşumu

Başta asenkron kasılan kardiyomiyositlerin bulunduğu kalpte pacemaker aktivitesi, geçici bir sol SA düğüm bölgesinin yeniden konumlandırılmasıyla gelişen sağ SA düğüm bölgesinden başlar. Sonuçta v. cava superior ve sağ atriyum geçişinde bulunan hücreler farklılaşarak kontraktıl, pacemaker özellikte SA düğümü oluşturur. Bundan kısa süre sonra, endokardiyal yastığa bitişik atriyoventriküler bileşkedeki hücrelerden, ikinci pacemaker merkezi, AV düğüm oluşur. AV düğüm gelişimine, özelleşmiş iletim hücrelerinden oluşan, His demetinin gelişimi eşlik eder (26). AV düğüm ve His demeti, sinus venozusun sol duvarı ve atriyoventriküler kanaldaki hücrelerden gelişir (25).

2.1.3. Kalp Histolojisi

Kalp dört odadan oluşan müsküler pompa işlevi olan bir organdır. İki atriyum sistemik ve pulmoner venöz dolaşımlardan kan almakla görevliyken, diğer iki oda, ventrikül, kanı sistemik ve pulmoner arteriyal dolaşıma gönderir. Kalp odaları ile akım çıkış yolları arasında ise kanın geriye akmasını engelleyen kalp kapakları bulunur (34). Kalp fonksiyonel olarak kanı pompalayan kalp kası, kapaklar ve kapakların tutunduğu fibröz iskelet ve impulsları ileten iletici sistemden oluşur (35).

Kalp Kası

Çok çekirdekli iskelet kasının aksine, rejenerasyon özelliği olmayan ve istemsiz kasılan kalp kası hücreleri merkezde, soluk boyanmış oval bir çekirdeğe ve bunun etrafında eozinofilik sarkoplazmaya sahiptir. Sarkoplazmada Golgi kompleksi ile glikojen ve lipid damlacıkları, miyofibriller ve büyük mitokondriyonlar bulunur. Hücrelerin etrafında kılcak damardan zengin endomisyum bulunmaktadır. Kalp kası hücreleri birbirine daha karmaşık bağlantılarla bağlanırlar. Bir kalp kası lifi dallanarak komşu liflere bağlanır ve karakteristik bir kontraksiyon dalgası sağlayacak biçimde iç içe geçmiş, sıkı bir şekilde örülmüş hücre demetlerini oluşturur. Hücrelerin birleşim yerlerindeki diskus interkalaris adlı koyu renkli enine çizgilerin varlığı ayırt edici bir özelliktir (36,37). Bu diskuslar; ince filamentleri bağlayıp hücreleri birbirine tutturun fasya adherens, sağlam bir şekilde tutunmayı sağlayan makula adherens (desmosom) ve hücrelerarası iletişimi sağlayan gap junctionları içerir. İskelet kasıyla benzer şekilde enine çizgilenme gösteren kalp kası hücrelerinde sarkoplazmik retikulum terminal sisternası bulunmaz ve sarkoplazmik retikulumun son bölümü ile T tübül diyard yapısını oluşturur (38).

Atriyumun kardiyomiyositleri osmiyofilik granüller içerir. Atriyal natriüretik polipeptid ve beyin natriüretik faktör (natriürezis, diürezis) içeren granüler atriyal hücreler endokrin fonksiyonları nedeniyle miyoendokrin hücreler ismiyle de anılır (38,39). His demeti içindeki iletim için özelleşmiş, modifiye kalp kası hücreleri olan Purkinje lifleri ise soluk, geniş ve mitokondriyondan zengindir. Diğer hücrelerle bağlantı oluştururlar fakat tipik diskus interkalaris yapısını içermezler (40).

Kalp Duvarları

Kalbin duvarı içten dışa doğru; endokardiyum, miyokardiyum ve epikardiyumdan oluşmaktadır. Endokardiyum içte endotel, ortada düz kas hücreleri ve kollajen lifler içeren subendotelyal tabaka, en derinde ise damarlar, sinirler ve kalbin iletim sisteminin bulunduğu gevşek bağ dokusundan oluşan subendokardiyal tabakadan oluşur (35). Miyokardiyum kalp kasından oluşan tabakadır. Bu tabaka ventriküllerde, kanı vücuda pompalayabilmek fazla kuvvet gerektirdiği için atriyumlara göre daha kalındır. Epikardiyum ise aslında seröz perikardiyumun visseral tabakasıdır. En dışta yüzeyi kayganlaştıran bir sıvı salgılayan tek katlı mezotel, bunun

altında ince fibroelastik bağ dokusu, bu dokunun altında ise koroner kan damarları, sinir ve adipoz doku içeren subepikardiyal tabaka bulunur (35,41,42).

Kalp Kapakları ve İnterventriküler Septum

İnterventriküler septum membranöz kısmı haricinde tamamında kalp kası içerir ve endokardiyumla kaplıdır. İnteratriyal septum ise interventriküler septumdan çok daha ince olup, bazı alanları hariç, merkezinde kalp kası ve her kalp odasına bakan yüzünde bir endokard örtüsü vardır.

Kalp kapakları, üzeri endokardiyum ile kaplı bağ dokusundan oluşur. Kapaklar, fibröz halkaları oluşturan ve kapak açıklıklarını çevreleyen düzensiz sıkı bağ dokusundan oluşan kalbin iskeletine tutunurlar. Her kapak; kapağın merkezini oluşturan düzensiz sıkı bağ dokusu yapısındaki *fibroza*, kapakların üst kısmındaki gevşek bağ dokusu yapısındaki *spongiyoza*, kapakların alt kısmındaki sıkı bağ dokusu içeren ve endotel ile kaplı olan *ventrikülaris* tabakalarından oluşur. Kapaklar tabanlarındaki küçük kan damarları haricinde avaskülerdirler ve yüzeylerindeki kandan difüzyonla beslenirler (41). Atriyoventriküler kapakların ventriküler yüzeyinden başlayan bağ dokusu korda tendineaları oluşturur. Korda tendinealar ventrikül içerisinde uzanan papiller kaslara tutunurlar ve mitral kapakta triküspit kapağa göre daha az fakat daha büyük boyuttadırlar (43,44).

Kalbin İleti Sistemi

Kalbin koordine bir şekilde kasılması modifiye kalp kası liflerinden oluşan özelleşmiş bir iletim sistemi tarafından gerçekleştirilir (45). Bu sisteme ait Purkinje lifleri diskus interkalarisleri olmayan, desmosomlar tarafından birleştirilen hücre zincirleri şeklindedir. Bu hücreler tipik kardiyak miyositlerden daha kısadır ve daha büyük bir çapa sahiptir. Purkinje lifini oluşturan her hücre, bol glikojen içeren şeffaf sitoplazmayla çevrelenmiş merkezi bir çekirdeğe sahiptir. Miyofibrilleri liflerin periferinde ve az miktardadır. AV düğümde ve SA düğümdeki pacemaker aktivitesine sahip nodal miyositler tek çekirdekli dar, yuvarlak, silindirik veya poligonal hücrelerdir. AV demetin kök ve ana dallarında bulunan miyositlerde ise iletim daha yavaştır ve kalp miyositlerine göre daha dar hücrelerdir (46).

Sağ atriyal duvarda v. cava superior girişine yakın konumlanan SA düğümde oluşan impulsar otonomik sinir sistemi tarafından kontrol edilir. SA düğümde gelen impuls, sağ ve sol atriyum kasından geçerek kasılmalarını sağlar ve interatriyal

septumun tabanında, triküspit kapak halkasının üzerindeki sağ atriyumun medial duvarındaki AV düğüme ulaşır. Bu nodal hücreler spontan olarak depolarize olur ve dakikada yaklaşık 70 atımlık bir kalp atışını başlatmak için impulsler üretirler. AV düğümünden gelen impuls, AV demet boyunca iletilerek ventriküle yönlendirilir. Purkinje lifleri de impulsun ventriküller etrafında yayılmasını sağlar (45,47,48).

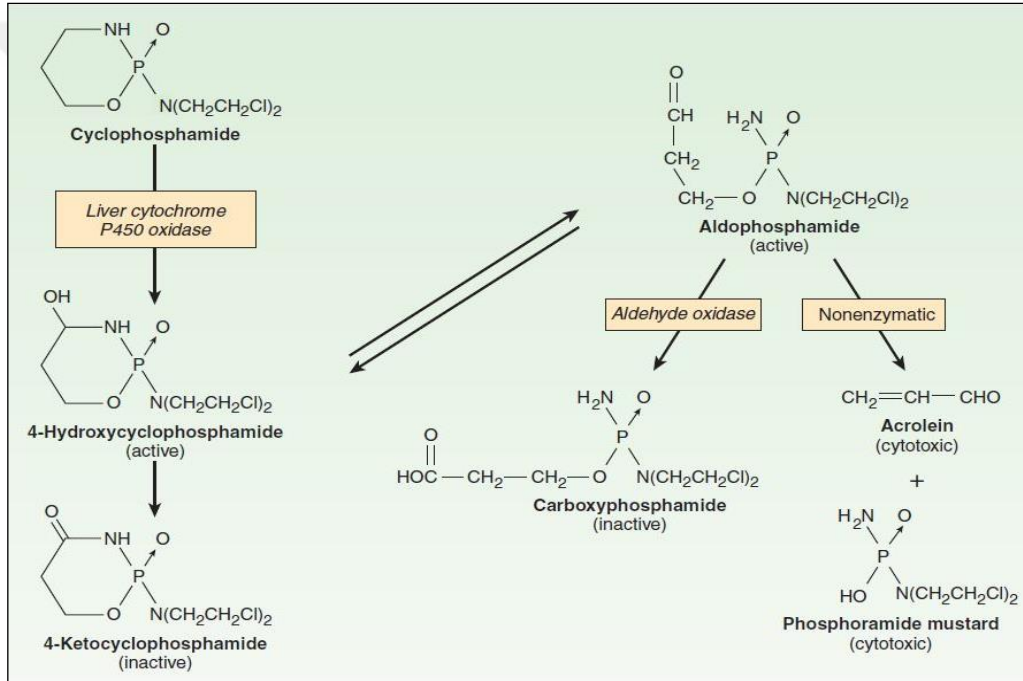
2.2. Siklofosfamid

Kimyasal silah olarak da kullanılmış olan azotlu hardal (nitrojen mustard) aynı zamanda hayvan deneylerinde model olarak da kullanılmış ve yapılan çalışmalar sonucunda ilk olarak 1948 yılında bir azotlu hardal olan, mekloretoamin adı verilen kanser kemoterapi ilacı geliştirilmiştir. Günümüzde ise alkilleyici ilaçlar olarak adlandırılan bu ilaç grubu hala en sık kullanılan kemoterapötiklerdendir. Sıklıkla G₁ ve S dönemlerine etki etmekle beraber, hücre döngüsünün herhangi bir dönemine de etki edebilirler (8).

Siklofosfamid, en çok kullanılan alkilleyici ilaçlardan olup azotlu hardallar grubunda yer almaktadır. Mekloretoamin'in siklik bir fosfamid esteri olan CP metabolik olarak aktive olduktan sonra, Deoksiribonükleik asit (DNA)'i alkiler ve çapraz bağlar oluşturur (8,49). Sitotoksik ve sitostatik etkileri olan CP antineoplastik, anti-inflamatuvar ve immünsupresif olarak kullanılmaktadır (50-52). Anti-inflamatuvar ve immünsupresif etkileriyle sistemik lupus eritematozus, Wegener granülomatozu, mikrobik polianjitis, Churg-Strauss sendromu, romatoid artrit, pemfigus, immün trombositopenik purpura, Behçet hastalığı, glomerülonefrit, multipl sklerozis gibi pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (53-59). Ayrıca aplastik anemi tedavisinde ve immünsupresan olarak organ transplantasyonunda kullanılmaktadır (60,61). Siklofosfamid antineoplastik etkileriyle de akut ve kronik lenfositik lösemi, hodgkin lenfoma, non-hodgkin lenfoma, multipl myelom, nöroblastom, akciğer, meme, serviks, over, testis kanseri, Wilm's tümörü, yumuşak doku sarkomu tedavilerinde yer almaktadır (62).

Yüksek oral biyoyararlanımı olan CP hem oral hem intravenöz yollarla uygulanabilir. Ana formunda aktif olmadığı için karaciğer mikrozomal enzimleriyle (sitokrom P450) aktive edilerek 4-hidroksisiklofosfamid'e (4HCP) dönüştürülür (63).

Bu aktif metabolit, aktif olmayan 4-ketosiklofosfamid'e okside edilebilir veya bir başka aktif metabolit olan aldofosfamid'e dönüşebilir. Aldofosfamid ise aldehit oksidaz ile inaktif metaboliti karboksifosfamid'e okside edilebilir veya toksik metabolitler olan akrolein ve fosforamid hardalına dönüşebilir (64). Fosforamid hardalı antitümör etkilerden sorumluyken, normal hücrelerde DNA hasarına ve çeşitli organlarda toksisitelere yol açan akrolein, oksidatif strese neden olur. Akrolein hücre içi reaktif oksijen türlerini (ROS) ve nitrik oksit (NO) üretimini aktive eder ve peroksinitrit oluşumuna yol açarak sonuçta hücre içindeki lipidleri, proteinleri ve DNA'yı hasarlar (62,65).



Şekil 1. Siklofosfamid'in Metabolizması (63)

Siklofosfamid toksisitesiyle kemik iliği, mesane, akciğerler, gastrointestinal sistem, overler ve testisler gibi pek çok farklı organ etkilenebilir. Kalp, böbrek ve karaciğer üzerindeki etkileriyle ciddi morbidite ve bazen mortalite görülmektedir (9,66-68). Fırsatçı enfeksiyonlarla beraber kemik iliği toksisitesi (özellikle miyelosupresyon), hemorajik sistit, geçici infertilite, bulantı, kusma ve saç dökülmesi sık görülen yan etkilerindendir (49,69). Siklofosfamid tedavisinin sık görülen yan etkilerinden olan hemorajik sistit ve mesanenin diffüz inflamasyonu, gross hematüri

ve refraktör hemoraji ile görülebilir ve bu yan etki CP metabolize olurken oluşan akroleinle bağlantılıdır (70,71). Diğer organ spesifik yan etkileri arasında hepatik enzim yüksekliğiyle seyreden karaciğer hasarı, kolestatik sarılık, kolelitiazis veya masif hepatik nekroz, pnömoni, pulmoner fibrozis ve ellerde ve ayaklarda eritemle seyreden eritrodisestezi sendromu görülebilmektedir (72-76). Hastalıkların CP ile uzun süreli tedavisi gonadal toksisiteye yol açarak infertiliteye neden olabilir. Erkeklerde bozulmuş gonadotropin salınımı, testiküler hasar ve beraberinde sperm sayısında azalma ve DNA'sında hasarlanmaya; kadınlarda ise amenoreyle seyreden over yetmezliğine yol açabilir (77-79). Böbrekte de peroksitatif hasara neden olan ROS üretimine neden olur. Tübüler ve epitelyal dejenerasyon, konjesyon, nekrozisle beraber BUN ve kreatinin yüksekliğinin görüldüğü nefrotoksisiteye neden olabilir (80).

2.2.1. Siklofosfamid Kardiyotoksisitesi

Yüksek doz CP tedavisinin konjestif kalp yetmezliği, hemorajik miyokardit, aritmiler, kardiyak tamponad ve perikardiyomiyopati gibi ölümcül komplikasyonlara yol açan akut kardiyotoksisiteye neden olabildiği bilinmektedir (81-83). Şiddetli kalp yetmezliğine, kardiyomegali, pulmoner vasküler konjesyon ve perikardiyal efüzyonların elektrokardiyografik bulguları eşlik edebilir. Patolojik olarak hemorajik miyokardiyal nekroz, sol ventrikül duvarında kalınlaşma, fibröz perikardit, endotel hasarı görülebilir (84). Ayrıca interstisyumda ekstravaze eritrositler ve fibrin şeritler; multiple kontraksiyon bantları ve hücre içi fibrin birikintileri olan nekrotik kas hücreleri; fibrin ve trombosit içeren mikrotrombüsler de CP bağımlı kardiyak hasarda görülebilen bulgulardandır (85).

Siklofosfamid metabolitlerinin oksidatif strese ve protein, eritrosit ve toksik metabolitlerin ekstravazasyonu ile sonuçlanan endotelial kapiller hasara neden olduğu düşünülmektedir. Toksik metabolitler nedeniyle endotel hücrelerinin dökülmesi; ödem, interstisyel hemoraji ve mikrotrombüs oluşumu ile sonuçlanan miyokarda ve kan damarlarında hasarlanmaya neden olur. Ayrıca oluşan trombüsler nedeniyle multifokal miyokardiyal nekroz; fibrin birikimi, interstisyel ödem ve hemoraji nedeniyle duvar kalınlaşması ve diyastolik disfonksiyon geliştiğine inanılmaktadır.

Tüm bunlar klinik olarak akut kalp yetmezliği ve aritmiler şeklinde kendini göstermektedir (86). Kalp üzerinde görülen bu toksik etkiler, doz bağımlı olarak 4HCP ve akroleinin sebep olduğu ROS üretimi, glutatyon (GSH) tükenmesi ve azalmış aldehit dehidrojenaz aktivitesi ile ilişkilidir (87).

2.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Hasar

Serbest radikaller, dış yörüngesinde tek bir eşleşmemiş elektrona sahip kimyasal ürünlerdir. Bu kararsız konfigürasyonla oluşan enerji, inorganik veya organik kimyasallarla ve hücre membranları ve çekirdeklerinin ana bileşenleri olan proteinler, lipidler, karbonhidratlar, nükleik asitlerle reaksiyona neden olur. Serbest radikaller otokatalitik reaksiyonları başlatır ve reaksiyona girdikleri moleküllerin kendilerini de serbest radikallere dönüştürür, bu da hasarın yayılmasına neden olur (88). Reaktif oksijen türleri ise hücre hasarındaki rolleri iyi bilenen, oksijen kaynaklı serbest radikallerdir. İskemi reperfüzyon hasarı, kimyasal hasar ve radyasyon hasarı, oksijen ve diğer gazların toksik etkileri, hücre yaşlanması, mikropların fagositlerce öldürülmesi ve inflamatuvar hücrelerin sebep olduğu doku hasarı gibi pek çok hücrel hasarlanmanın temelinde serbest radikaller yer almaktadır (89).

Reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türlerinin (RNT, örn. NO), hem zararlı hem faydalı etkileri olduğu bilinmektedir. Reaktif oksijen türleri ve RNT, NO sentaz ve NADPH oksidaz izoformları tarafından sentezlenir. Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi oksidatif stresle sonuçlanır; bu da hücre yapılarının hasarlanmasına neden olabilir. Tersine, ROS/RNT'nin düşük/orta konsantrasyonlarda yararlı etkileri ortaya çıkar ve hasara karşı hücrel yanıtta fizyolojik rol oynar. Çeşitli ROS aracılı olaylar aynı zamanda "redoks dengesi" nin sürdürülmesine de katkıda bulunur (90).

Üç ana ROS; süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil (OH) radikalleridir. Reaktif oksijen türleri üretimi başlıca mitokondri ve bir plazma membran enzimi olan NADPH oksidaz aracılığıyla gerçekleşir ve hücrel ROS'ların yaklaşık %85'i normal oksidatif fosforilasyonun bir alt ürünüdür. Oksijen endoplazmik retikulum, mitokondri, plazma membranı, peroksizom ve sitoplazmada oksidatif enzimlerle (P-450 ve b-5 oksidaz, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, miyeloperoksidaz [MPO]) O_2^- 'e dönüştürülür. O_2^- radikali oksitleyici veya indirgeyici

bir ara maddedir ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından H_2O_2 'ye dönüştürülür. H_2O_2 ise katalaz (CAT) ya da glutatyon peroksidaz (GSH-Px) tarafından suya indirgenen kan ve dokularda en yüksek konsantrasyonda bulunan ROS'dur. H_2O_2 , demir varlığında gerçekleşen bir Fenton reaksiyonu ile en reaktif ve zarar verici ROS olan OH radikali haline dönüştürülebilir. Ayrıca makrofajlardaki MPO enzimiyle de H_2O_2 ile Cl^- reaksiyonu katalizlenerek bir başka ROS olan hipoklor radikali oluşabilir (91-93).

Serbest radikallerin öncelikli hedefleri nükleik asitler ve hücre zarlarıdır. Çekirdekte DNA fragmentasyonu, hücre ve mitokondriyal membranlarda lipid peroksidasyonu ve proteinlerde çapraz bağlanmaya neden olur. Plazma membranı permeabilitesinin artışına bağlı sitozolik Ca^{++} artışı; mitokondriyal membran hasarıyla apoptoza neden olan sitozolik sitokrom c artışı meydana gelir (89,94). A, E, C vitaminleri, SOD, CAT, GSH ise serbest radikallere karşı hücrenin temel koruyucu mekanizmalarıdır (95).

NADPH oksidaz ailesi (NOX'lar) biyolojik membranlardan elektronları transfer ederek oksijene bir elektron aktarır, O_2^- oluşumuna neden olan enzim ailesidir. ROS'ların üretimine aracılık eden NADPH oksidazın katalitik çekirdeği sitokrom b558'dir ve bu yapı gp91-phox (NOX2) ve p22-phox olarak adlandırılan iki alt birimden oluşur. NADPH oksidaz ayrıca 4 tane düzenleyici sitozolik alt birime (p40phox, p47phox, p67phox ve Rac) sahiptir (96,97).

2.4. Apoptoz

Apoptoz, gelişim ve yaşlanma sürecinde fizyolojik hücre döngüsüne katkıda bulunan, hasarlı veya yetersiz hücrelerin atılmasını sağlayan programlı hücre ölümü mekanizmasıdır (98). Apoptozun inhibisyonu neoplaziler gibi hücre birikimiyle sonuçlanırken, artan apoptoz doku atrofisi gibi durumlara neden olabilen hücre kaybı ile sonuçlanır. Bu nedende doku boyutunun korunması için apoptoz oranı, hücresel bölünme oranı ile denk olmalıdır (99).

Embriyogenez sırasında hücrelerin yok edilmesi, hormon bağımlı dokuların hormon eksikliğinde involüsyonu (menstruasyonla endometriyal hücrelerin dökülmesi, menopoz sonrası ovaryan foliküllerde atrezi), çoğalan hücre

popölasyonlarındaki hücre kaybı (kemik iliği ve timusta immatür lenfositler, intestinal kriptlerde epitel hücreleri), kendi dokularına karşı reaksiyon gösterebilecek lenfositlerin yok edilmesi, inflamatuvar yanıtta nötrofiller ve immün yanıt sonunda lenfositler gibi konakçı hücrelerin ölümü gibi durumlar fizyolojik apoptozise örnektir. DNA hasarı, yanlış katlanmış proteinlerin birikimi, enfeksiyonlar, duktal obstrüksiyon sonrası kanallı organlarda patolojik atrofi gibi durumlar ise patolojik apoptozu örnek olarak gösterilebilir (100).

Apoptoz enerji bağımlı bir olay olup, hiçbir inflamatuvar reaksiyon ortaya çıkarmaz. Morfolojik olarak hücrede küçölme, sitoplazmik eozinofili, kromatin yoğunlaşması (piknozis), nükleer fragmentasyon (karyorheksis) ve hücre membranında tomurcuklanma görülür. Sonuçta hücre, membranla kaplı sitoplazma ve organellerden oluşan apoptotik veziküllere ayrılır (93,101).

Zarar verici uyaranlar (serbest radikaller, radyasyon, toksinler ve büyüme faktörleri veya hormonların yetersizliği), FAS gibi hücre yüzey reseptörlerini, strese karşı mitokondriyal yanıtı ve sitotoksik T lenfositleri tetiklerler. Apoptozun ekstrinsik yolağına, tümör nekroz faktör reseptör ailesinin bir üyesi olan FAS hücre yüzey reseptörleri aracılık eder. Bu yol, FAS ligandı gibi, kaspazların (Sistein aspartik proteaz) aktivasyonunu sağlayan moleküllerin sinyalleşmesi ile başlar. Ölüm sinyalleri, sistein proteazlar olan kaspaz zincirinden oluşan bir proteolitik kaskad içinde iletilir (102).

İntrinsik (mitokondriyal) yolakta ise hasarlanan hücrede BCL-2'nin inaktive olmasıyla süreç başlar. BCL-2 gen ailesi dış mitokondriyal membranda bulunan apoptoz düzenleyicileridir ve apoptozun hem aktivatörlerini (BAX ve BAD) hem de inhibitörlerini (BCL-XL) içerir. BCL-2 ailesinin yanı sıra p53 molekölü de apoptozu indükleyebilmektedir. BCL-2 gen ailesinde anti-apoptotiklerin inaktive, pro-apoptotiklerin aktive olması sitokrom-C'nin mitokondriyal matriksten sitoplazmaya sızmasını ve kaspazların aktive olmasını sağlar (103,104).

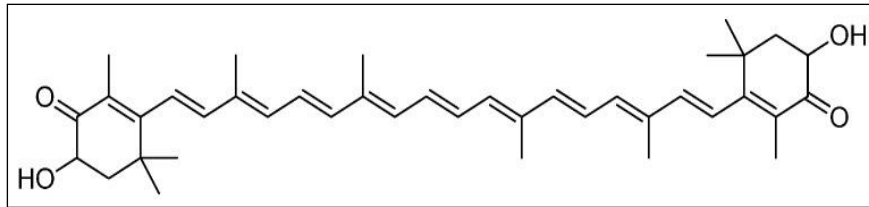
Apoptozun tetiklenmesiyle ilk olarak kaspaz 8/9 gibi öncü kaspazlar aktive olur, bu da hedef hücrenin bozulmasına neden olan aktif öldürücü kaspazların (kaspaz 3/6) oluşumuna öncölük eder. Kaspaz-3, DNA'ları parçalayan DNAaz'ı aktive eder. Bu durum agaroz jel elektroforezde merdiven paterni olarak gözlemlenir. Sonuçta

çekirdek küçülür (piknozis) ve parçalanır (karyorheksis). Hücre küçülür ancak plazma membranı intacttır ve bu durum fagositozu hızla indükler (102,105,106).

Apoptotik hücrelerin temizlenmesi için fagositleri çekebilecek bir 'ye beni' sinyali olan membran fosfolipidi 'fosfaditilserin' gereklidir. Fosfaditilserin normalde, bir flippaz enzimi yardımıyla plazma membranının iç yaprakçığında yer alırken; apoptoz durumunda, bir scramblaz enzimi ile dış yaprakçığa doğru ilerler. Bu da apoptotik hücrelerin fagositlerce tanınip hızla yok edilmesini sağlar (107).

2.5. Astaksantin

Astaksantin, 3,3'-dihidroksi- β,β -karoten-4,4'-dion, serbest radikalleri veya diğer oksidanları nötralize eden, klinik olarak çok çeşitli yararlı etkilere sahip, ksantofil karotenoid yapıda, kırmızı-turuncu renge sahip bir besindir (108,109). Gıda, yem, nutrasötik ve kozmetik uygulamalarda kullanılan AST; çeşitli algler, mayalar, somon, alabalık, kırmızı çupra, balık yumurtası, kril, karides, istakoz ve kerevit gibi deniz canlılarında, flamingo ve bıldırcınlarda doğal olarak bulunmaktadır. Özellikle *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella zofingiensis*, *Chlorococcum*, *Phaffia rhodozyma* gibi mikroorganizmalar AST içermektedir (11,110).



Şekil 2. Astaksantin'in kimyasal yapısı (111).

Deniz canlılarında serbest radikallere karşı savunma mekanizması olarak görev yaptığı düşünülen AST'nin en önemli özelliklerinden biri, antioksidan kapasitesinin karotenoidler ve tokoferolden fazla olmasıdır. Astaksantin aktivitelerinin zeaksantin, lutein, tunaksantin, kantaksantin ve B karotene'e göre yaklaşık 10 kat ve bir tokoferol'e göre ise 100 kat daha güçlü olduğu görülmektedir. Bu güçlü antioksidan özelliği nedeniyle bazı kaynaklarda "Süper Vitamin E" olarak adlandırılmaktadır (13,112).

Astaksantin, serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonunu inhibe ederek antioksidan etki göstermektedir (113). Astaksantin'in çok güçlü antioksidan özelliğiyle beraber iyileştirici pek çok etkisi bulunmaktadır. Cilt kanserine neden olabilen UV radyasyonun neden olduğu DNA hasarına karşı koruyucu etkisi bulunmaktadır. Ağız, mesane, kolon karsinogenezisi, lösemi, hepatoselüler kanser, akciğer ve meme kanserinde; hücre proliferasyonunu, invazyonunu ve anjiyogenezisi inhibe etme, apoptozu indüklemeye gibi yollarla anti-kanser etkiler göstermektedir (114,115). Anti-inflamatuvar etkilerini ise NO, PGE-2 ve TNF- α ve IL1- β gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltarak göstermektedir. Helikobakter pylori ve buna bağlı gastrik inflamasyona karşı antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (116-118). Pankreasta hipergliseminin neden olduğu oksidatif stresi azaltıp, pankreatik- β hücrelerine karşı yararlı etkiler oluşturarak anti-diyabetik etki göstermektedir (119). T lenfosit sayısında ve plazma IgG, IgM konsantrasyonlarında artışa ve mononükleer hücre proliferasyonuna neden olarak hücrel ve humoral bağışıklık yanıtını artırıp immünomodulatuvar etkinin oluşmasını sağlamaktadır (120). Ayrıca deneysel çalışmalarda; osteoartritte kıkırdak hasarını azalttığı, nöroprotektif, anti-aterosklerotik, yaşlanma karşıtı, hepatoprotektif ve göz ve prostat üzerine iyileştirici etkileri olduğu gösterilmiştir (121-127).

Diğer antioksidanların aksine prooksidan aktivite göstermeyen AST'nin kardiyovasküler sistem üzerinde de yararlı etkileri bulunmaktadır. Yapılan hayvan deneylerinde miyokardiyal enfarktüs alanını küçülttüğü, sistolik kan basıncını düşürdüğü, aterom plaklarında makrofaj infiltrasyonunu azalttığı ve plak stabilitesini sağladığı görülmüştür (128-131). Bazı klinik çalışmalarda ise serum HDL-kolesterol ve adiponektinini artırıp, trigliserit, LDL kolesterol ve APO-B düzeyini azalttığı ve lipid peroksidasyonunu azaltarak antioksidan etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (132-134).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Etik Kurul Onayı ve Finansal Destek

Çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ), Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı alınarak başlandı (Tarih: 14/03/2018; Protokol No: 2018/09). Bu çalışma KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklendi (Proje No: TTU-2018-7645).

3.2. Deney Hayvanları, Gruplar ve Deneysel Çalışma Planı

Araştırma için yaşları 2-3 ay ve ağırlıkları 200-250 g arasında değişen Sprague Dawley ırkı 18 tane dişi sıçan kullanıldı. Tamamı KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden sağlanan sıçanlar, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda, sınırsız beslenme şartlarında muhafaza edildi. İçme suyu olarak çeşme suyu kullanıldı ve beslenme için standart sıçan yemi (pellet yem) verildi. Sıcaklık $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, nem $50\pm 5\%$ olacak şekilde ayarlandı. Sıçanlar çalışma boyunca standart Tip III kafeslerde barındırıldı (Resim 1). Uyum problemini önlemek ve çevresel stres faktörlerini ekarte etmek amacıyla sıçanların bakımı, tüm deney uygulamaları ve sıçanların sakrifiye edilmesi KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkez'inde yapıldı. Sakrifikasyon sonrası çalışmalar KTÜ Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.



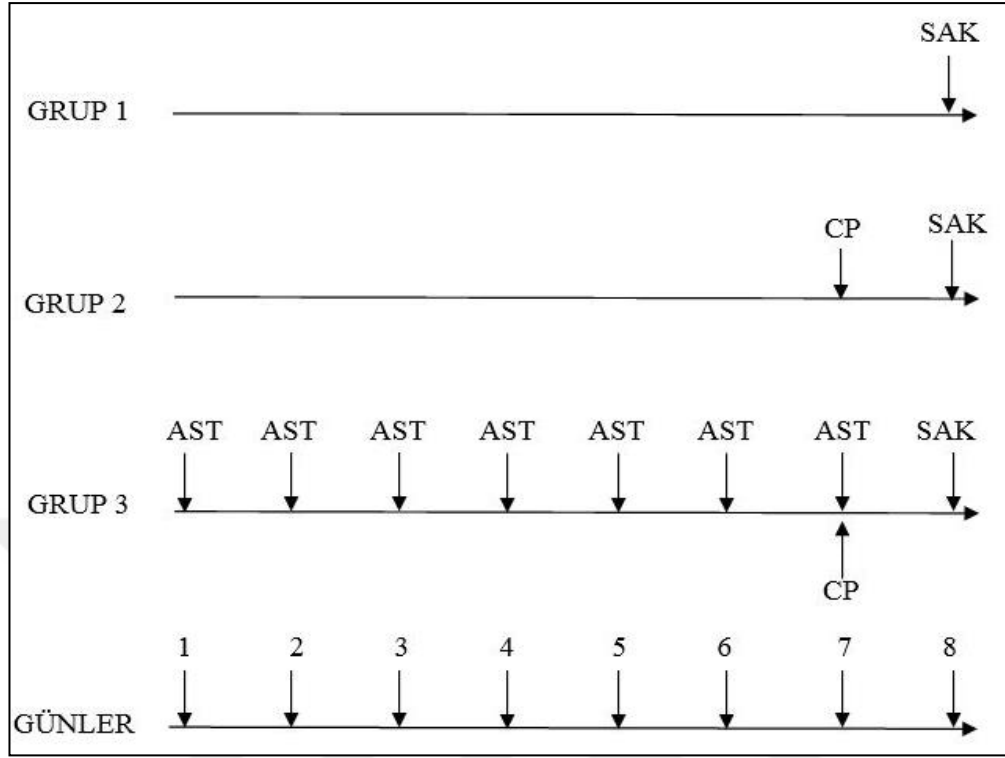
Resim 1. Sıçanların Barındırıldığı Standart Tip III Kafesler

Astaksantin'in CP kardiyotoksitesisi üzerine etkilerini incelemek için, sıçanlar her grupta altı sıçan olacak şekilde üç gruba ayrıldı (şekil 3);

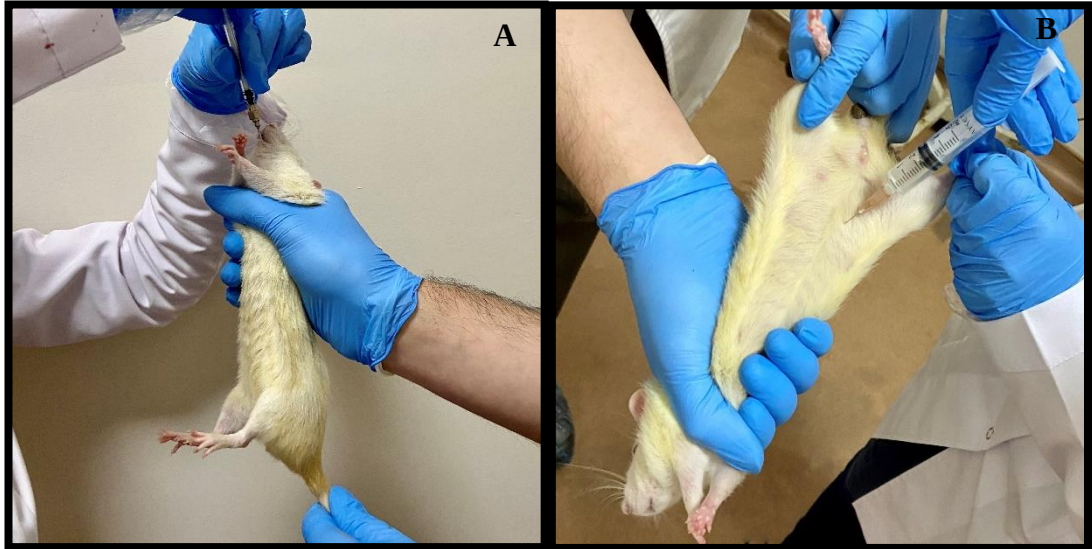
Grup 1: Kontrol Grubu, 6 adet sıçana herhangi bir uygulama yapılmadan laboratuvar ortamında sakrifikasyon gününe kadar takip edildiler.

Grup 2: CP Grubu, 6 adet sıçana deneyin 7. günü (09:00-10:00 saatleri arası) intraperitoneal enjeksiyon yoluyla 200 mg/kg/gün CP, her bir sıçan için 2.5 ml SF ile çözülerek uygulandı (135) (Resim 2A).

Grup 3: AST+CP Grubu, 6 adet sıçana 1-7. günlerde, her gün aynı saatte (09:00-10:00 saatleri arası) 25 mg/kg/gün AST, her bir sıçan için yaklaşık 350 µl zeytinyağında çözülerek hazırlandı; oral gavaj yoluyla ve deneyin 7. günü son AST uygulamasından 1 saat sonra, 200 mg/kg/gün CP intraperitoneal enjeksiyon yoluyla uygulandı (136, 137) (Resim 2 A-B).



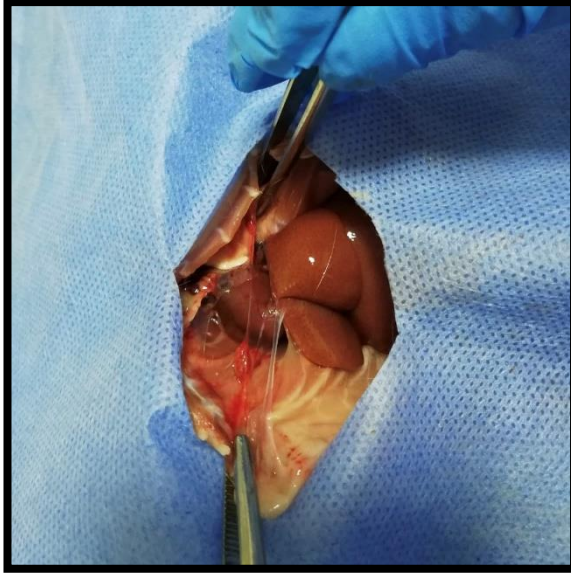
Şekil 3. Deney süreci ve gruplar



Resim 2. A) Oral gavaj, B) İntraperitoneal enjeksiyon uygulaması

3.3. Doku Numunelerinin Toplanması

Deney gruplarındaki tüm sıçanlara deney süresinin sonunda (8. gün), 90 mg/kg i.p ketamin enjeksiyonu ile derin anestezi uygulamasından sonra periumblikal bölgeden vertikal kesi uygulandı. Kesi torasik bölgeye uzatılarak, sternum kesilip göğüs kafesi açıldı ve sonrasında kalp çıkartılarak kansızlaştırma yoluyla sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrasında çıkarılan kalp dokuları %0,9 'luk serum fizyolojikte (SF) yıkandıktan sonra filtre kağıdı ile kurutulup, tartıldı. Kalpler anatomik pozisyonda basis cordis'ten apex cordis' e doğru ikiye ayrıldı. Bu dokunun yarısı histolojik değerlendirmeler için %10'luk formalin solüsyonunda tespit işlemine tabi tutuldu. Diğer yarısının ½'si flow sitometrik analiz için PBS'ye (fosfat tampon çözeltisi) alınıp +4°C'de muhafaza edildi.



Resim 3. Kalplerin Çıkartılması

3.4. Histolojik İşlemler

3.4.1. Formalin Tespit Solüsyonunun Hazırlanışı

Dokuların tespitinde kullanılan Formalin solüsyonu aşağıdaki şekilde hazırlandı (138);

- Formaldehit (%37): 10 ml
- Distile su : 90 ml

3.4.2. Işık Mikroskopik İnceleme için Kalp Dokularının Hazırlanması

Dokuların takibi, kesit alma ve boyama işlemleri KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Her gruptan alınan kalp dokuları, dört gün boyunca ışık almayan, oda sıcaklığındaki ortamda, %10'luk formalin solüsyonunda tespit edilip doku takip cihazında (Thermo Scientific Excelsior AS, İngiltere) tablo 2'de belirtilen doku takip basamaklarından geçirildi. Doku gömme cihazı (Leica HistoCare Arcadia H, Çin) yardımıyla 58 °C'de erimiş halde bulunan parafin içine gömülerek elde edilen parafin bloklar tam otomatik mikrotom cihazı (Leica RM 2255, Almanya) yardımıyla önce 20 µm kalınlığında kesitlerle trimlendi ve blok üzerinde dokuya ulaşıldığında dokudan 5 µm kalınlığında ince kesitler alındı. Kesitler kırışıklarının açılması için 45 °C' de doku su banyosu (APEX instruments) içindeki sıcak su üzerinde bekletilerek lam üzerine alındı. Hematoksilen & Eozin, Masson Trikrom ve PAS boyamaları için her bloktan 3 lam'a seri kesitler alındı (139).

Tablo 2. Doku Takibi Prosedürü

Sıra	İşlem	Süre
1.	%70'lik alkol	1 gün
2.	%90'lık alkol	1 gün
3.	%96'lık alkol	1 gün
4.	%100'lük alkol	1 gün
5.	%100'lük alkol	1 saat
6.	Ksilen I	5 dakika
7.	Ksilen II	5 dakika
8.	Ksilen III	5 dakika
9.	Eritilmiş parafin içerisinde 58 °C'de etüvde	15 dakika
10.	Eritilmiş parafin içerisinde 58 °C'de etüvde	15 dakika
11.	Eritilmiş parafin içerisinde 58 °C'de etüvde	15 dakika

12.	Eritilmiş parafin içerisinde 58 °C’de etüvde	2 saat
13.	Dokular bloklandı	-

3.4.3. Hematoksilen Eozin Boyama Yöntemi

Lam üzerine alınan dokular H&E boyaması için zembile yerleştirilerek deparafinize edilmesi amacıyla bir saat 58°C etüvde bekletildi ve daha sonra otomatik boyama cihazında (Leica Autostainer XL, Almanya) tablo 3’te gösterilen rutin histolojik boyama prosedüründen geçirildi (140).

Tablo 3. Hematoksilen Eozin Boyama Prosedürü

Sıra	İşlem	Süre
1.	Ksilen	5 dakika
2.	Ksilen	5 dakika
3.	%100’lük alkol	5 dakika
4.	%96’lık alkol	5 dakika
5.	%70’lik alkol	5 dakika
6.	Distile su	2-3 dakika
7.	Hematoksilen	2,5 dakika
8.	Musluk suyu	5 dakika
9.	Asit alkol	Batır-çıkar
10.	Distile su	1 dakika
11.	Amonyaklı su	10 saniye
12.	Distile su	1 dakika
13.	Eozin Y	1,4 dakika
14.	Distile su	1 dakika
15.	%70’lik alkol	5 dakika
16.	%96’lık alkol	5 dakika
17.	%100’lük alkol	5 dakika
18.	Ksilen	5 dakika
19.	Ksilen	5 dakika
20.	Entellan ve lamel ile kapatma	-

Kesitlerde ışık mikroskobu ile kalpte; miyosit hasarı, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, vakuolizasyon, miyokardiyal doku ayrılması, interstisyel hemoraji, ödem ve diğer histolojik bulgular değerlendirildi ve skorlandı.

Kalp dokusunun değerlendirmesinde elde edilen histopatolojik bulgular dikkate alınarak yarı kantitatif skorlama yapıldı. Miyokardiyal hücre dejenerasyonu açısından tablo 4'te belirtilen kriterlere göre 0-3 arasında skorlandı (135, 141).

Tablo 4. Miyokardiyal Skorlama Sistemi

Derece	Bulgu
0 (normal)	Miyositlerde dejenerasyon yok
1 (hafif)	Birkaç dejenere miyosit veya hafif inflamasyon,
2 (orta)	%50 civarında miyosit dejenerasyonu / inflamasyon / doku ayrılması / vakuolizasyon,
3 (şiddetli)	%50'nin üzerinde miyosit dejenerasyonu / diffüz inflamasyon / doku ayrılması / vakuolizasyon.

3.4.4. Periyodik Asit-Schiff Boyama Yöntemi

Parafinin dokudan uzaklaştırılması amacıyla preparatlar 58°C'lik etüvde 1 saat bekletildi. Daha sonra üretici firmanın (Atom Scientific) tablo 5'te belirtilen tavsiyeleri doğrultusunda PAS boyama prosedürü gerçekleştirildi.

Tablo 5. Periyodik Asit-Schiff Boyama Prosedürü

Sıra	İşlem	Süre
1.	Ksilen	5 dakika
2.	Ksilen	5 dakika
3.	%100'lük alkol	5 dakika
4.	%96'lık alkol	5 dakika
5.	%70'lik alkol	5 dakika
6.	Distile su	2-3 dakika
7.	Periyodik Asit	5 dakika
8.	Distile su ile yıkama	Birkaç kez
9.	Schiff reaktifi	20 dakika (dokular kırmızı olana kadar)
10.	Akan suda yıkama	5-10 dakika
11.	Hematoksilen	5 dakika
12.	Distile su	1 dakika
13.	Asit alkol	Batır-çıkar
14.	Distile su	1 dakika
15.	Amonyaklı su	10 saniye
16.	Distile su	1 dakika
17.	%70'lik alkol	5 dakika
18.	%96'lık alkol	5 dakika
19.	%100'lük alkol	5 dakika
20.	Ksilen	5 dakika
21.	Ksilen	5 dakika
22.	Entellan ve lamel ile kapatma	-

Periyodik asit-Schiff boyalı kesitlerde ışık mikroskobu ile kalpte glikojen birikimi değerlendirildi.

3.4.5. Masson Trikrom Boyama Yöntemi

Parafinin dokudan uzaklaştırılması amacıyla preparatlar 58°C'lik etüvde 1 saat bekletildi. Daha sonra üretici firmanın (Atom Scientific) tablo 6'da belirtilen tavsiyeleri doğrultusunda Masson Trikrom boyama prosedürü gerçekleştirildi.

Tablo 6. Masson Trikrom Boyama Prosedürü

Sıra	İşlem	Süre
1.	Ksilen	5 dakika
2.	Ksilen	5 dakika
3.	%100'lük alkol	5 dakika
4.	%96'lık alkol	5 dakika
5.	%70'lik alkol	5 dakika
6.	Distile su	2-3 dakika
7.	Weigert Hematoksilen A ve B karıştırılır	-
8.	Distile su ile yıkama	Birkaç kez
9.	Asit alkol	Batır-çıkar
10.	Distile su	1 dakika
11.	Ponceau Fuchsin	5 dakika
12.	Distile su	1 dakika
13.	Fosfotungustik asit	5-15 dakika
14.	Metilen mavisi	5-10 dakika
15.	Distile su	1 dakika
16.	Kurut	-
17.	%100'lük alkol	5 dakika
18.	Ksilen	5 dakika
19.	Ksilen	5 dakika
20.	Kurutulup entellan ve lamel ile kapatma	-

Masson Trikrom boyalı kesitlerde ışık mikroskobu ile kalpte bağ dokusu (kollajen yoğunluğu) değerlendirildi.

Hazırlanan preparatlarda kalp dokusunun histolojik değerlendirmesi, KTÜ Tıp Fakóltesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Görüntüleme Laboratuvarında bulunan dijital kameralı (Olympus, DP 71, Japonya) ışık mikroskopunda (Olympus, BX51, Japonya) Analysis 5 Research (Olympus Soft Imaging Solution, Almanya) programı kullanılarak yapıldı.

3.5. Flow Sitometrik Analiz

3.5.1. PE Annexin V Apoptosis Detection Kit Analizi

Fosfatidilserinin plazma membranının iç yaprakçığından dış yaprakçığına ilerlemiş olduğu apoptotik hücrelerin değerlendirilmesi için kalp dokusu; fosfatidilserine yüksek afinitesi olan ve Ca^{+2} bağımlı bir fosfolipid bağlayıcı protein olan Annexin V ile muamele edildi. Hücre apoptozu PE Annexin V, 7-AAD ve Annexin V Binding Buffer içeren kit kullanılarak ve üretici firmanın (BD Pharmingen™) tablo 7’da belirtilen tavsiyeleri doğrultusunda çalışıldı. Hazırlanan hücre süspansiyonunun flow sitometrik analizi KTÜ Tıp Fakóltesi, Temel Tıp Bilimleri Laboratuvarında bulunan BD Accuri™ C6 Cytometer cihazında gerçekleştirildi ve flow sitometri bilgisayarına aktarıldı. Flow sitometri histogramlarından elde edilen apoptoz piki yüzdelik oranları BD Accuri™ C6 Cytometer Software analiz programı ile değerlendirildi.

Tablo 7: PE Annexin V Apoptosis Detection Kit Çalışma Prosedürü

Sıra	İşlem	Süre
1.	Diseksiyonla alınan dokular PBS içinde yıkanır ve ayrı ayrı petrilere aktarılır.	-
2.	Petrideki dokulara, bistüri ucu yardımıyla çamur kıvamına gelene kadar mekanik parçalama işlemleri yapılır.	-
3.	Petrideki materyale 0,5-1 ml distile su eklenip bir pipet yardımıyla tüplere aktarılır.	-

4.	Doku süspansiyonu naylon bir DNA mesh'den (Spectramesh-nylon, 50 mikron, Backman-Coulter) geçirilip süzülerek yabancı ve büyük partiküllerin uzaklaşması sağlanır ve santrifüj tüpüne aktarılır.	-
5.	Hücre süspansiyonu üzerine soğuk PBS ekleyip ve 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant atılır, pellet üzerine tekrar soğuk PBS eklenir ve santrifüj edilerek 2. yıkama yapılır. Süpernatant uzaklaştırılır.	10 dk
6.	1X Binding buffer eklenir (1 x 10 ⁶ hücre/ml)	-
7.	100 µl solüsyonu (1 x 10 ⁵ hücre) 5 ml'lik eppendorf tüplere transfer edilir.	-
8.	5 µm PE Annexin V ve 5 µm 7-AAD ekleyip pipetaj yapılır ve karanlıkta 25 °C'de inkübe edilir.	15 dakika
9.	400 µl 1X Binding buffer eklenir.	-
10.	1 saat içinde flow sitometri cihazında analiz edilir.	-

3.5.1. Anti-NOX2/gp91phox Antikor Kit Analizi

Kalp dokusunda meydana gelen oksidatif hasar düzeyini belirleyebilmek için hücreler gp91-phox antikoruna ile muamele edildi. Oksidatif hasar anti-NOX2/gp91phox antikoruna, % 0.09 sodyum azide, % 2 sükröz ve PBS içeren kit kullanılarak ve üretici firmanın (abcam, ab80508) tablo 8'de belirtilen tavsiyeleri doğrultusunda çalışıldı. Hazırlanan hücre süspansiyonunun flow sitometrik analizi KTÜ Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Laboratuvarında bulunan BD Accuri™ C6 Cytometer cihazında gerçekleştirildi ve flow sitometri bilgisayarına aktarıldı. Flow sitometri histogramlarından elde edilen oksidatif hasar piki yüzdelik oranları BD Accuri™ C6 Cytometer Software analiz programı ile değerlendirildi.

Tablo 8. Anti-NOX2/gp91phox Antikor Kit Çalışma Prosedürü

Sıra	İşlem	Süre
1.	Diseksiyonla alınan dokular PBS içinde yıkanır ve ayrı ayrı petrilere aktarılır.	-
2.	Petrideki dokulara bistüri ucu yardımıyla çamur kıvamına gelene kadar mekanik parçalama işlemi yapılır.	-
3.	Petrideki materyale 0,5-1 ml distile su eklenip bir pipet yardımıyla tüplere aktarılır.	-
4.	Doku süspansiyonu naylon bir DNA mesh'den (Spectramesh-nylon, 50 mikron, Backman-Coulter) geçirilip süzülerek yabancı ve büyük partiküllerin uzaklaşması sağlanır ve santrifüj tüpüne aktarılır.	-
5.	Hücre süspansiyonu üzerine soğuk PBS ekleyip ve 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant atılır, pellet üzerine tekrar soğuk PBS eklenir ve santrifüj edilerek 2. yıkama yapılır. Süpernatant uzaklaştırılır.	10 dk
6.	Fiksasyon için hücre pelleti üzerine 100 µl paraformaldehit eklenerek +4°C'de bekletilir.	15 dk
7.	Permeabilizasyon için 1 ml soğuk metanol eklenir, karıştırılıp -20°C'de 5-10 dk bekletilir.	10 dk
8.	İki kez yıkama işlemi yapılır (5. basamak)	10 dk
9.	Hücre pelletinin üzerine 1 ml soğuk PBS, %10 FCS, %1 sodyum azide karışımı eklenir ve pipetaj yapılır.	-
10.	Hücre süspansiyonundan yeni bir tüpe 100 µl alınır, üzerine 1-2 µl primer antikor eklenip pipetaj yapılır, 30 dk, +4°C'de ve karanlık ortamda inkübe edilir.	30 dk
11.	İki kez yıkama işlemi yapılır (5. basamak)	10 dk
12.	Tüpte kalan hücre pelletine 100 µl soğuk PBS ve 0.5 µl sekonder antikor eklenip pipetaj yapılır, 30 dk, +4°C'de ve karanlık ortamda inkübe edilir.	30 dk

13.	İki kez yıkama işlemi yapılır (5. basamak)	10 dk
14.	Tüpte kalan hücre pelletine 1 ml soğuk PBS, %10 FCS, %1 sodyum azide karışımı eklenir, karıştırılır ve analiz edilene kadar +4°C’de ve karanlık ortamda bekletilir.	-
15.	16 saat içinde flow sitometri cihazında analiz edilir.	-

3.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 23, SSPS Inc., Chicago, IL, USA) programı ile değerlendirildi. Histolojik skorlama ile elde edilen nitel verilerin değerlendirilmesinde ki-kare testi ve gruplar arası kalp ağırlıklarının değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Anlamlı grupların ikili karşılaştırmaları Bonferroni ve Mann-Whitney U testleri ile yapıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlılık düzeyi $p<0,05$; düzeltme testlerinde ise anlamlılık düzeyi $p<0,016$ olarak kabul edildi. Gruplara ait veriler ortalama (Ort.) $\pm$ standart sapma (SD) ve yüzdelik olarak verildi.

4. BULGULAR

4.1. Morfolojik Bulgular

4.1.1. Hematoksilen Eozin Boyalı Kalp Kesitlerinin Histopatolojik Değerlendirilmesi

4.1.1.1. Kontrol Grubu

Kontrol Grubuna ait kalp kesitlerinin histolojik incelemesinde, kardiyomiyositler merkezi yerleşimli tek çekirdekli, düzgün seyirli sarkolemma ile sınırlı, interstisyel alan ve vasküler yapılar normal yapıda izlendi ve herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı (Resim 4-7).

4.1.1.2. CP Grubu

CP Grubuna ait kalp kesitlerinin histolojik incelemesinde; kardiyomiyositlerde dejenerasyon, hipereozinofili, piknotik çekirdekler, dalgalı lifler, perinükleer ödem, vakuolizasyon, kontraksiyon bantları, kas liflerinde ayrılma ve vasküler konjesyon izlendi (Resim 8-17).

4.1.1.3. CP+AST Grubu

CP+AST Grubuna ait kalp kesitlerinin histolojik incelemesinde normal yapıda kardiyomiyositlerin yanında; kardiyomiyositlerde dejenerasyon, hipereozinofili, piknotik çekirdekler, dalgalı lifler, perinükleer ödem, vakuolizasyon, kontraksiyon bantları, kas liflerinde ayrılma ve vasküler konjesyon gibi bulgular gözlemlendi (Resim 18-24). CP Grubu ile kıyaslandığında bu histopatolojik bulgularda gerileme görüldü.

Miyokardiyal hasar skorlaması istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Kontrol Grubu'nda: 3 hasarsız, 3 hafif hasarlı, CP Grubu'nda: 1 orta - 5 ağır hasarlı, CP+AST Grubu'nda: 6 orta hasarlı sıçan tespit edildi ($p<0,001$); CP ve CP+AST gruplarında

miyokardiyal hücre dejenerasyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0.007$, $p<0.002$). CP+AST grubunda ise miyokardiyal hücre dejenerasyonunda CP grubuna göre anlamlı ölçüde azalma görüldü ($p<0.003$) (Tablo 9).

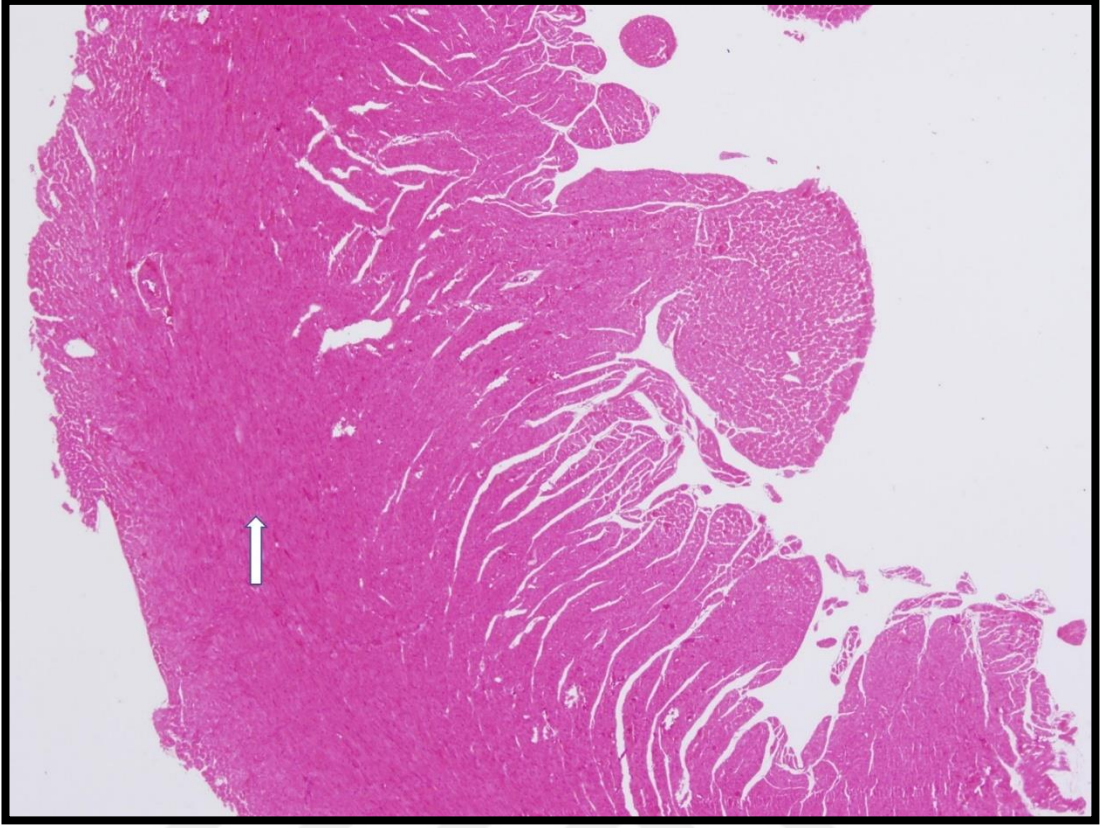
Tablo 9. Miyokardiyal Hasar Skoru

	Kontrol		CP		CP+AST		P değeri
	n	%	n	%	n	%	
Miyokardiyal Hasar							
Hiç Yok	3	16,7	0	0	0	0	P<0,001
Hafif	3	16,7	0	0	0	0	
Orta	0	0	1	5.6	6	33,3	
Ağır	0	0	5	27.8	0	0	
Toplam	6	33,3	6	33,3	6	33,3	

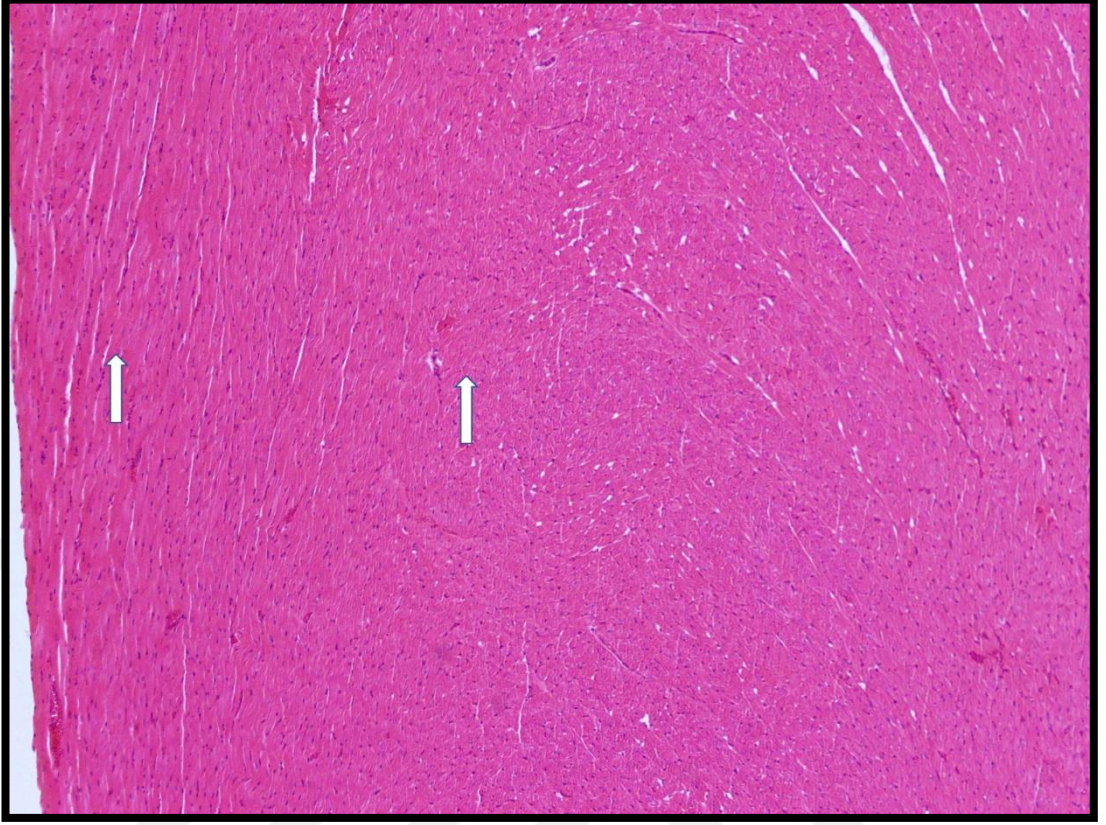
Veriler yüzdelik olarak verildi. Her grupta n:6

CP ve CP+AST gruplarında miyokardiyal hücre dejenerasyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0.007$, $p<0.002$).

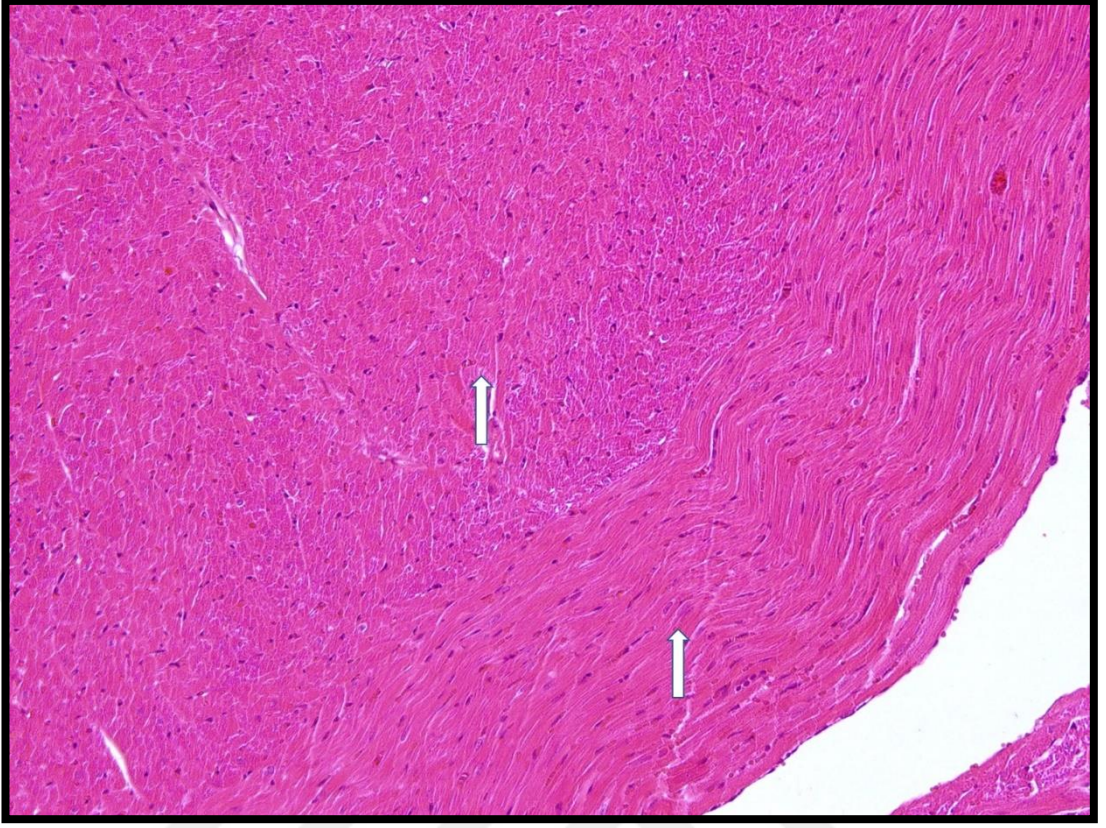
CP+AST grubunda miyokardiyal hücre dejenerasyonunda CP grubuna göre anlamlı ölçüde azalma görüldü ($p<0.003$)



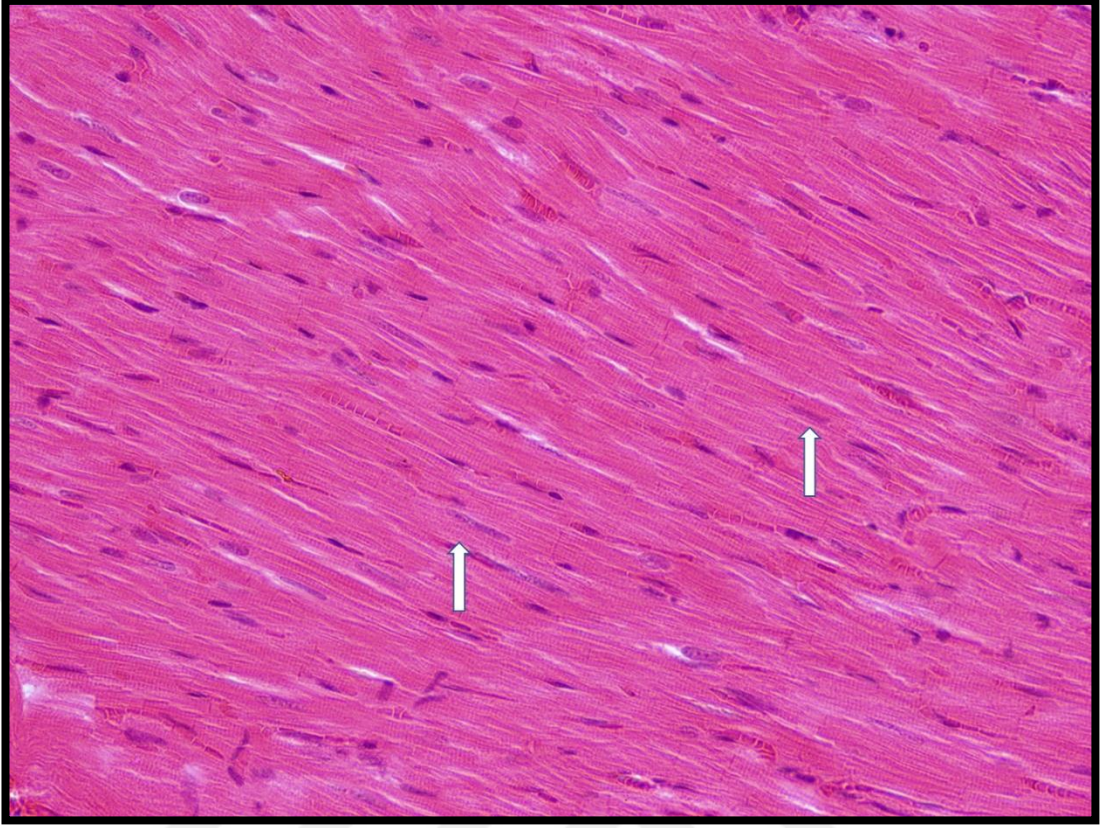
Resim 4. Kontrol Grubuna Ait Kalp Dokusu. Normal yapıda kas lifleri (yukarı ok) izlenmektedir (H&E, X40).



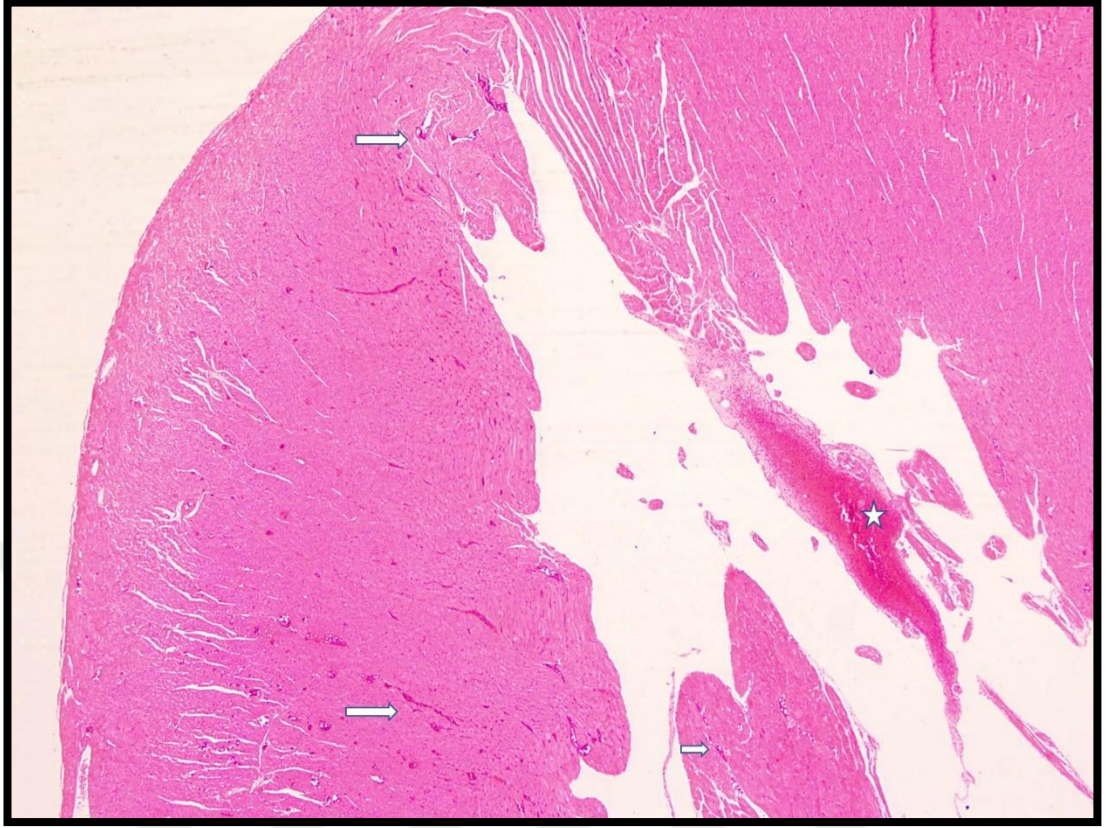
Resim 5. Kontrol grubuna ait kalp dokusu. Normal yapıda kas lifleri (yukarı ok) izlenmektedir (H&E, X100).



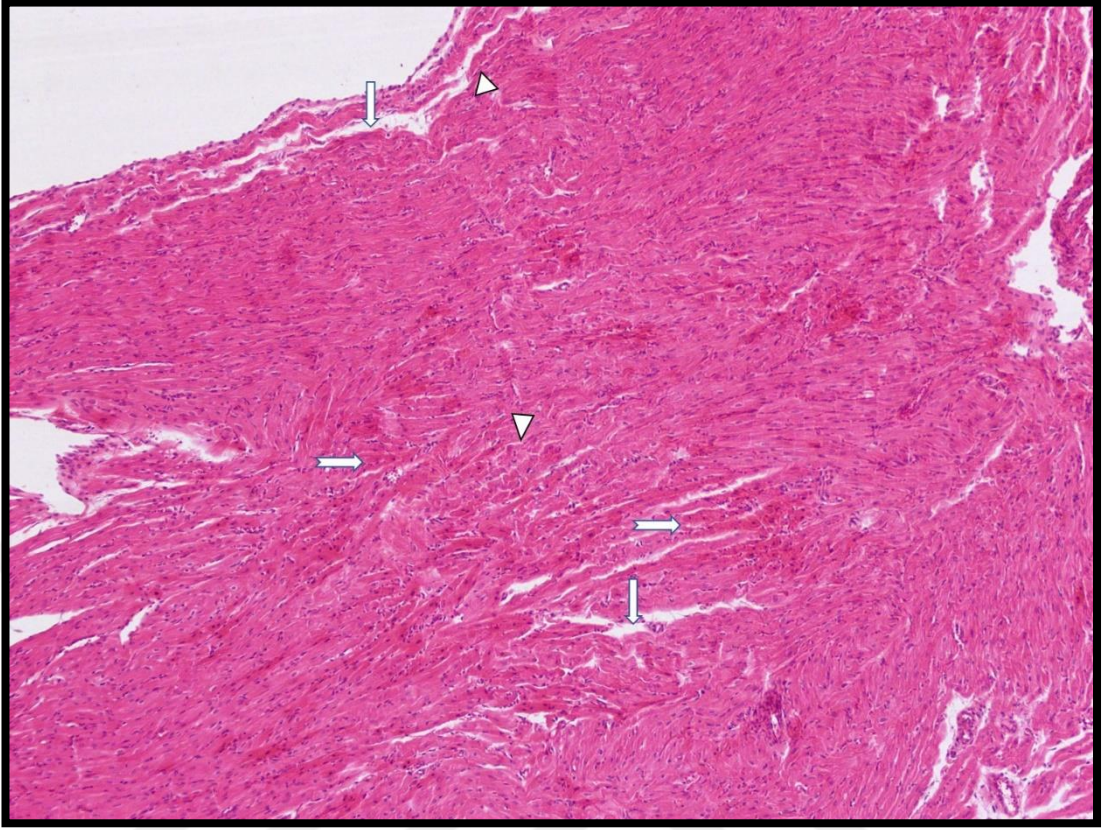
Resim 6. Kontrol grubuna ait kalp dokusu. Merkezi yerleşimli nükleusa sahip, normal yapıda kas lifleri (yukarı ok) izlenmektedir (H&E, X200).



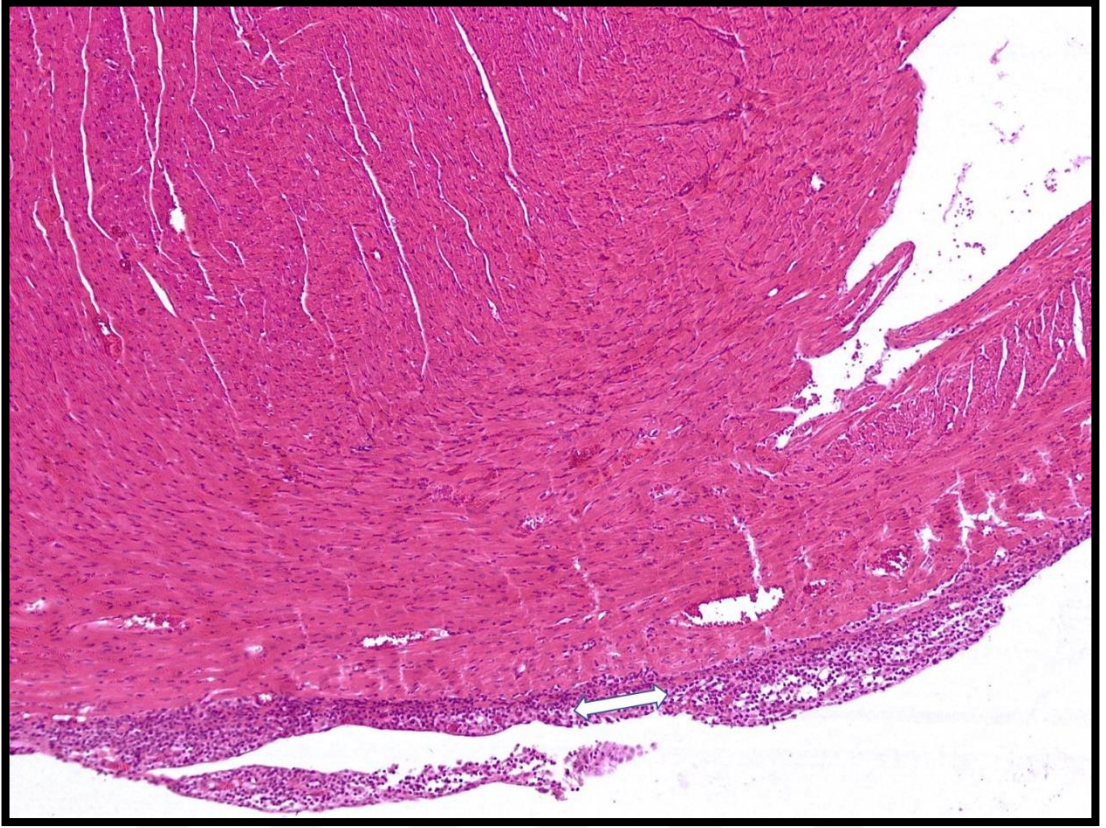
Resim 7. Kontrol grubuna ait kalp dokusu. Merkezi yerleşimli nükleusa sahip, normal yapıda kas lifleri (yukarı ok) izlenmektedir (H&E, X400).



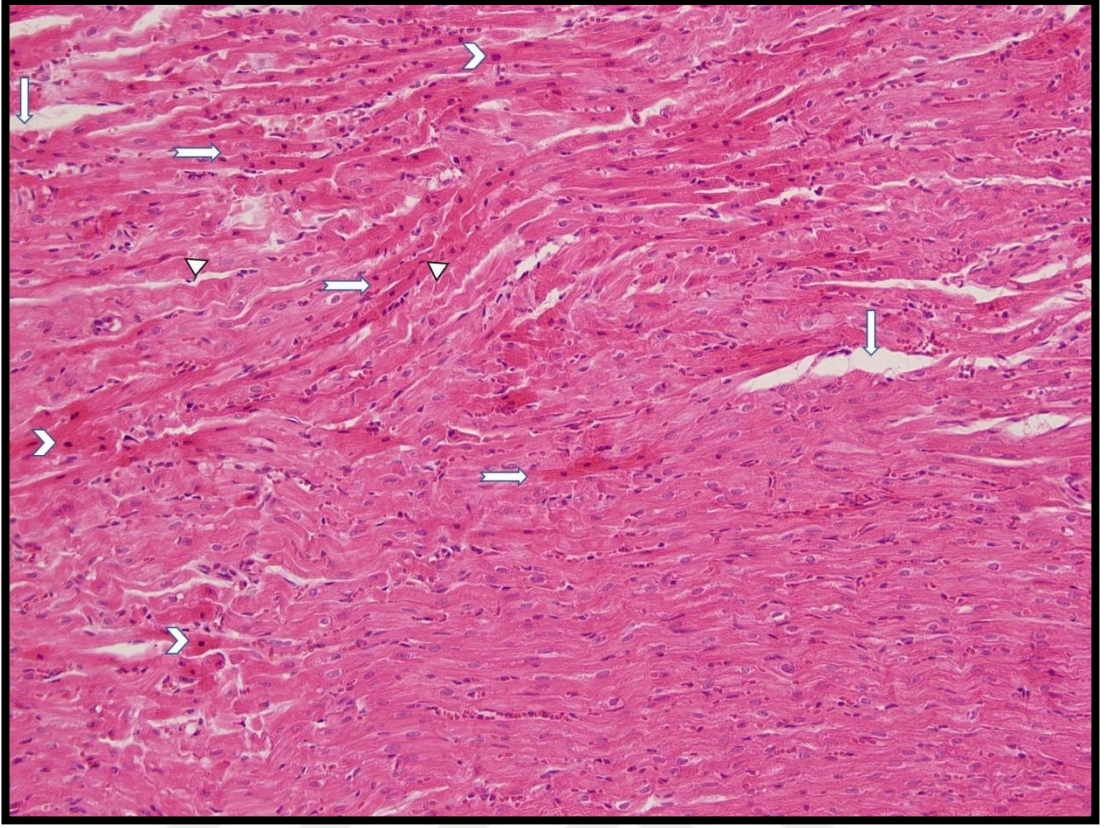
Resim 8. CP grubuna ait kalp dokusu. Vasküler konjesyon (sağ ok), şiddetli hemoraji (beyaz yıldız) izlenmektedir (H&E, X40).



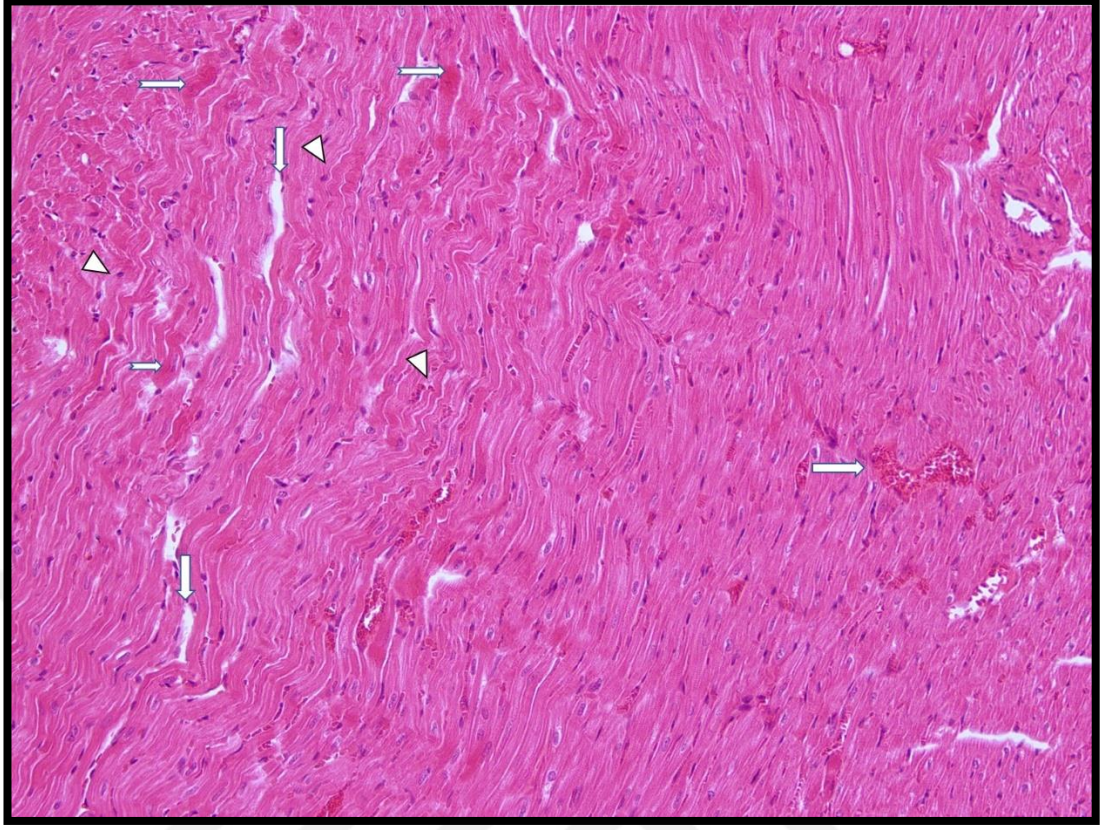
Resim 9. CP grubu kalp dokusu. Hipereozinofilik kas lifleri (çentikli sağ ok), dalgalı lifler (ok başı), kas liflerinde ayrılma (aşağı ok) izlenmektedir (H&E, X100).



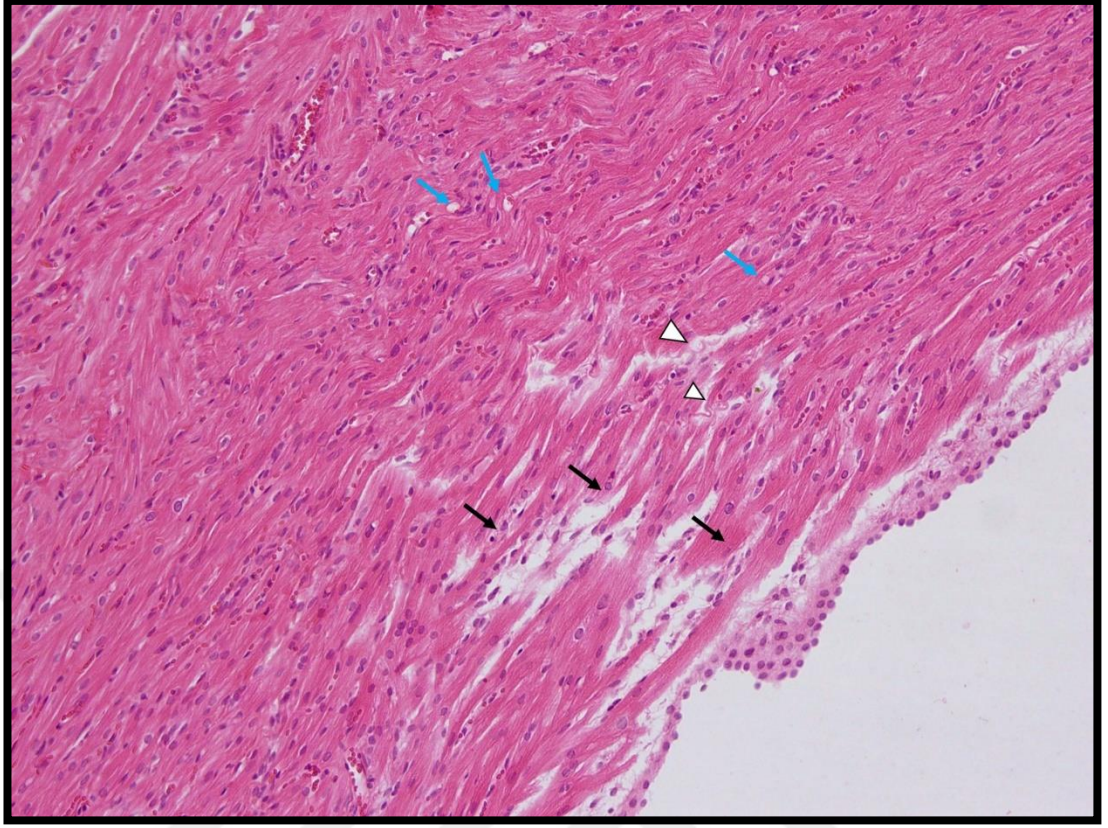
Resim 10. CP grubu kalp dokusu. Perikardiyal lenfositik infiltrasyon (sol sağ ok) izlenmektedir (H&E, X100).



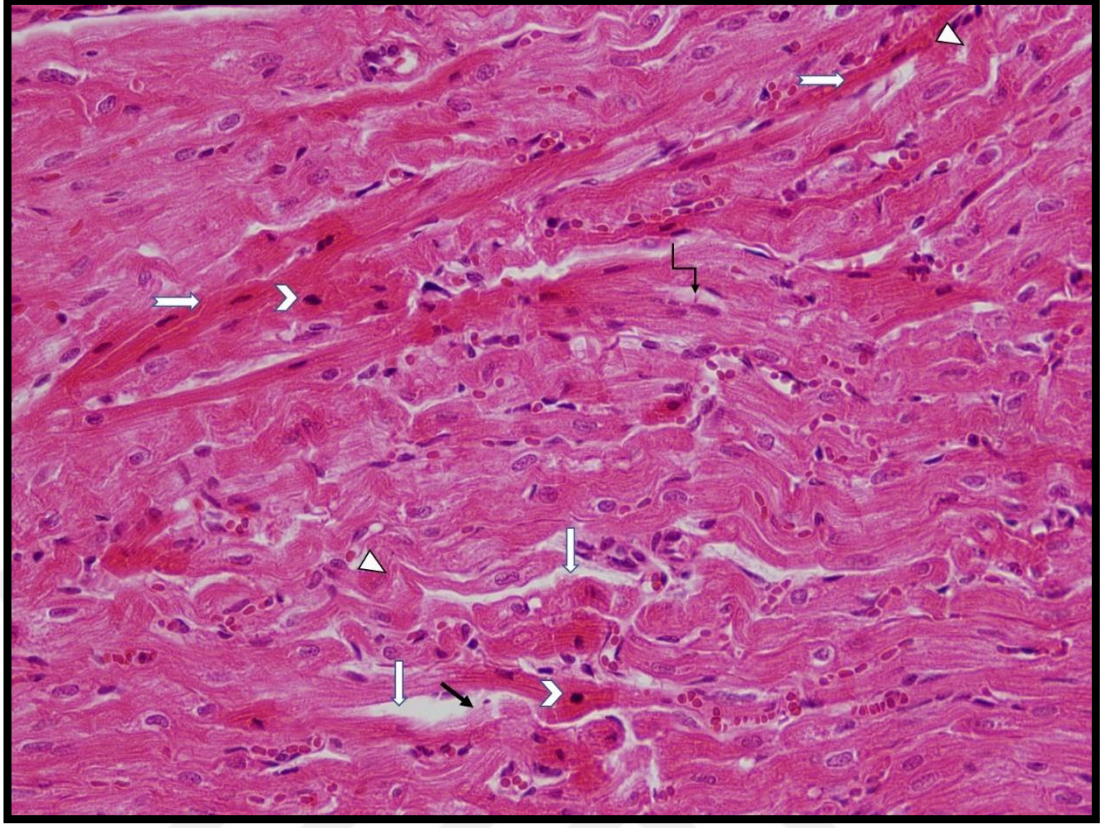
Resim 3. CP grubu kalp dokusu. Hipereozinofilik kas lifleri (çentikli sağ ok), piknotik çekirdekler (çentikli ok başı), dalgalı lifler (ok başı), kas liflerinde ayrılma (aşağı ok) izlenmektedir (H&E, X200).



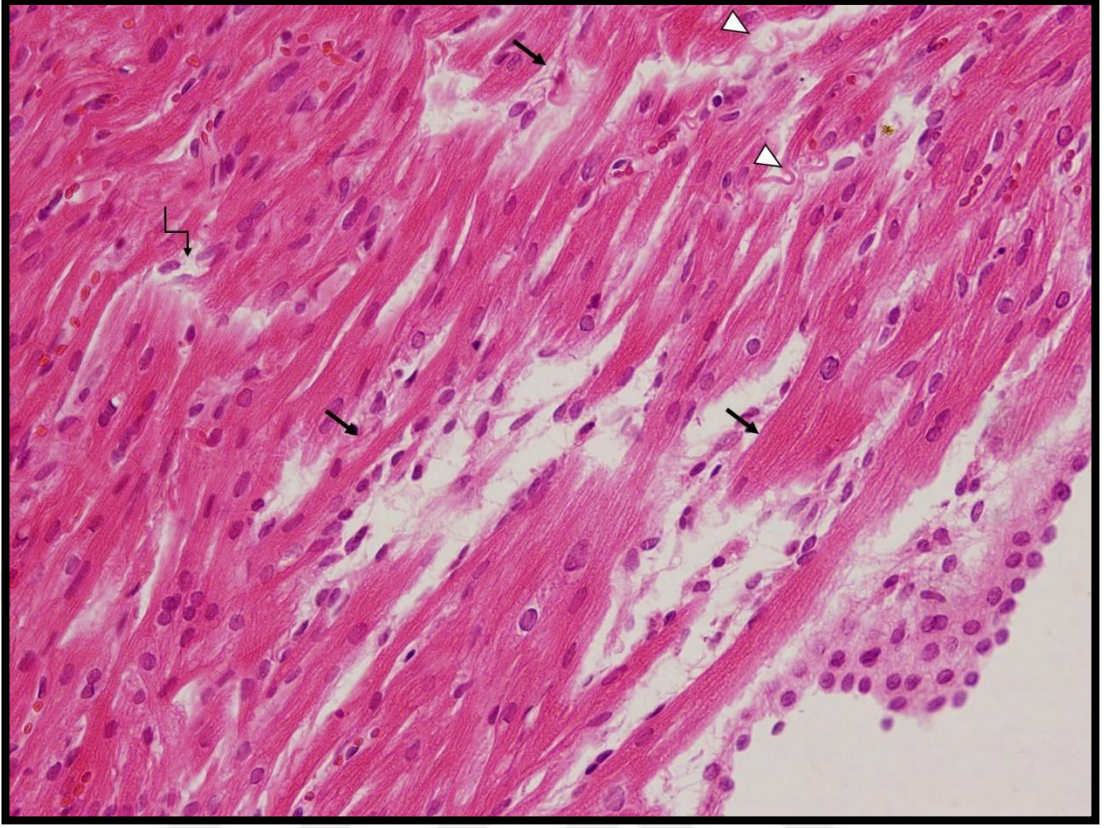
Resim 12. CP grubu kalp dokusu. Vasküler konjesyon (sağ ok), kas liflerinde ayrılma (aşağı ok), hipereozinofilik kas lifleri (çentikli sağ ok), dalgalı lifler (ok başı) izlenmektedir (H&E, X200).



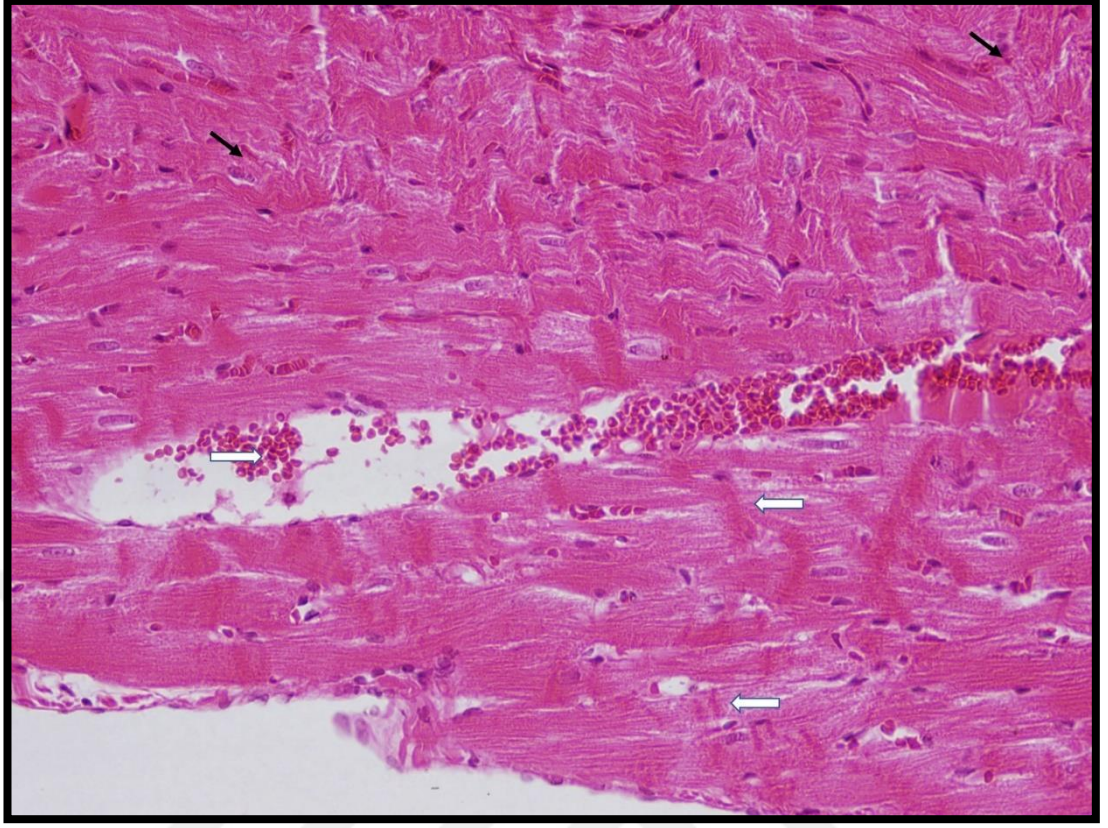
Resim 13. CP grubu kalp dokusu. Kas liflerinde dejenerasyon (siyah ok), dalgalı lifler (ok başı), vakuolizasyon (mavi ok) izlenmektedir (H&E, X200).



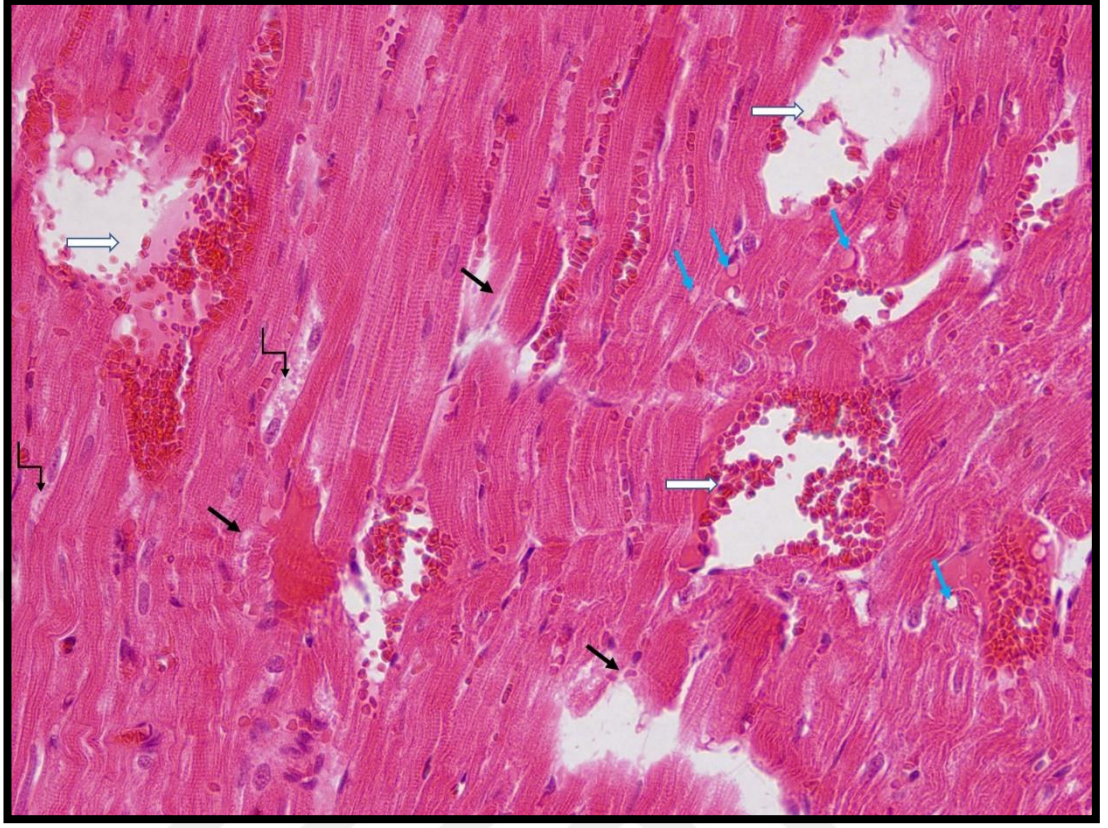
Resim 14. CP grubu kalp dokusu. Hipereozinofilik kas lifleri (çentikli sağ ok), piknotik çekirdekler (çentikli ok başı), dalgalı lifler (ok başı), perinükleer ödem (dirsek ok) kas liflerinde dejenerasyon (siyah ok), kas liflerinde ayrılma (aşağı ok) izlenmektedir (H&E, X400).



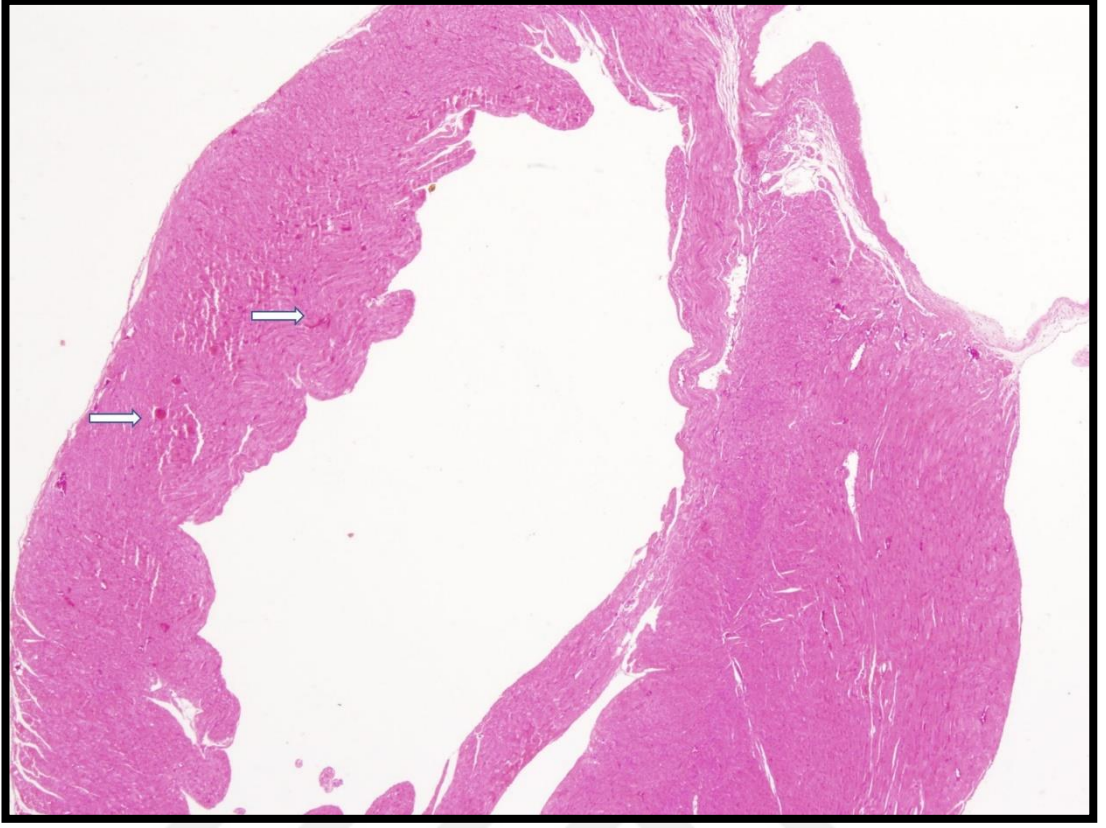
Resim 15. CP grubu kalp dokusu. Kas liflerinde dejenerasyon (siyah ok), dalgalı lifler (ok başı), perinükleer ödem (dirsek ok) izlenmektedir (H&E, X400).



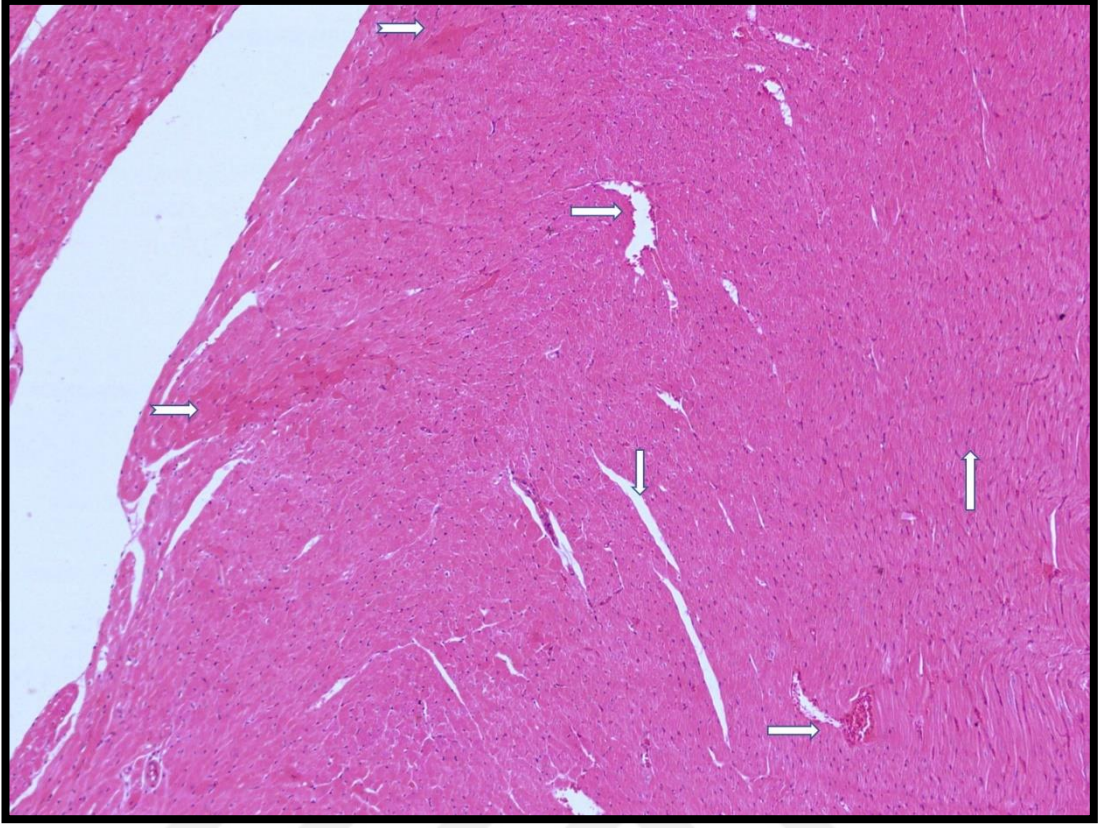
Resim 16. CP grubu kalp dokusu. Kas liflerinde dejenerasyon (siyah ok), kontraksiyon bantları (sol ok), vasküler konjesyon (sağ ok) izlenmektedir (H&E, X400).



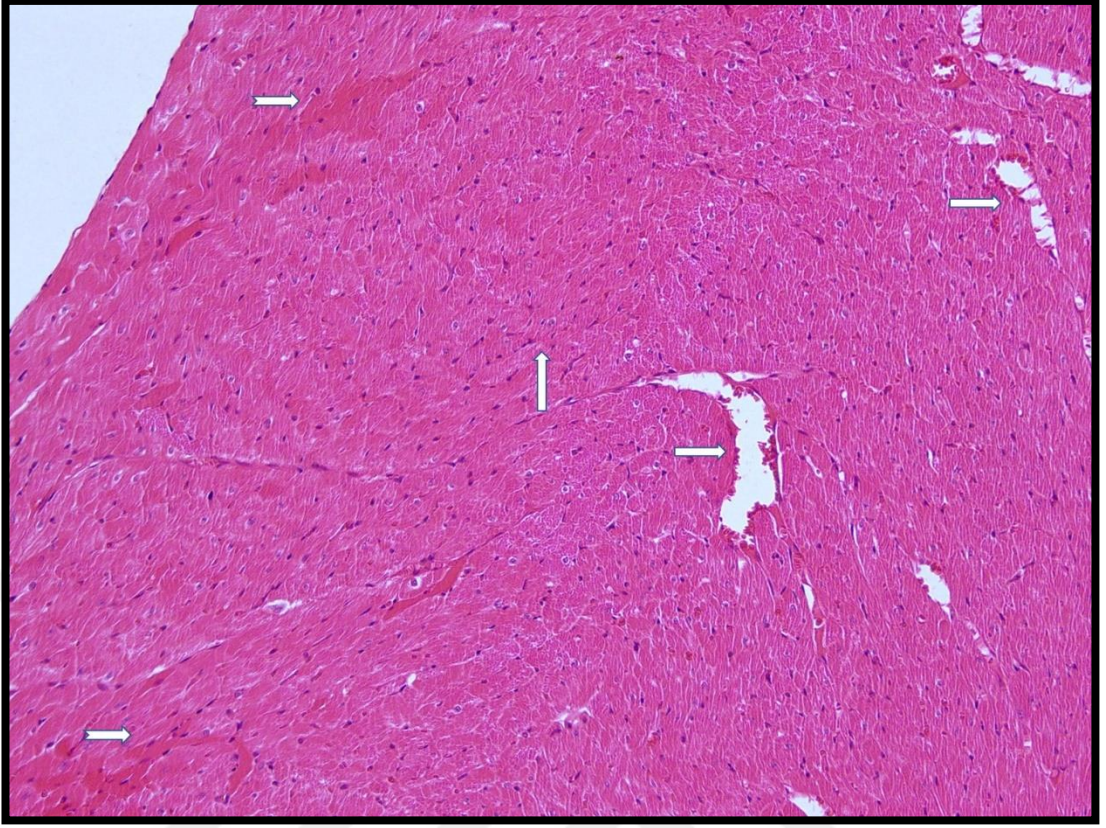
Resim 17. CP grubu kalp dokusu. Kas liflerinde dejenerasyon (siyah ok), vakuolizasyon (mavi ok), perinükleer ödem (dirsek ok), vasküler konjesyon (sağ beyaz ok) izlenmektedir (H&E, X400).



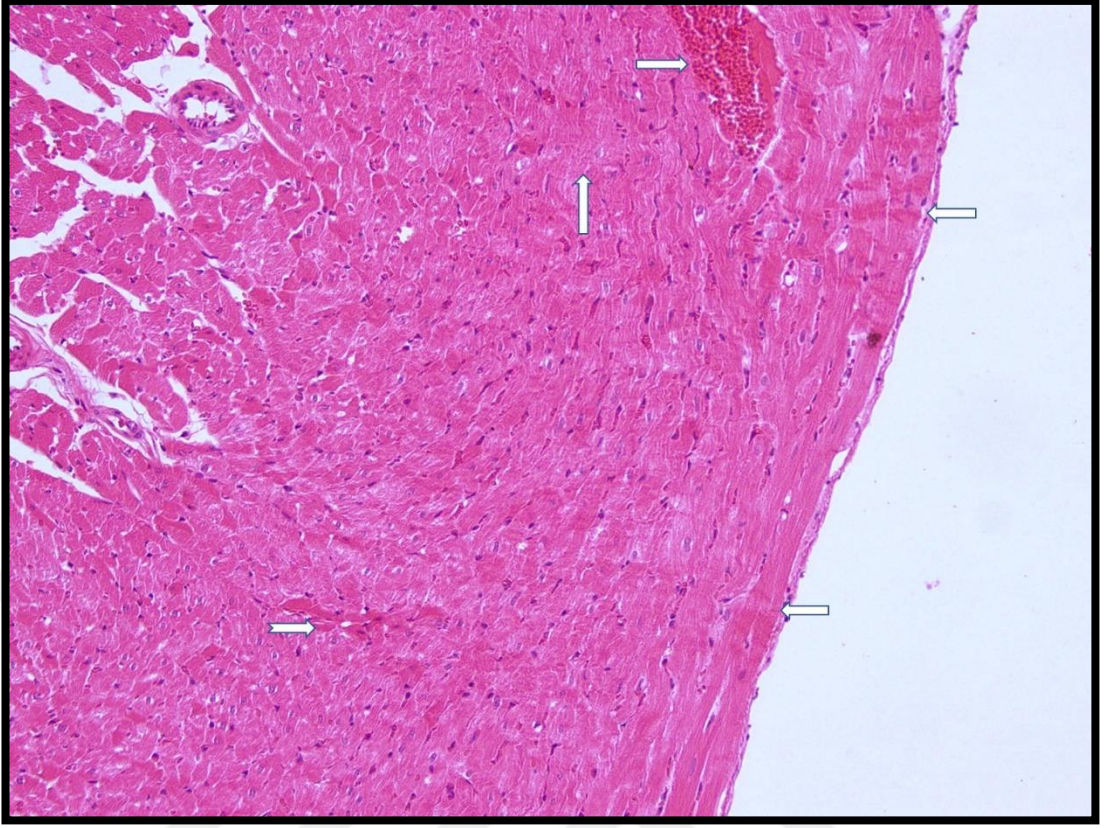
Resim 18. CP+AST grubuna ait kalp dokusu. Vasküler konjesyon (sağ ok) izlenmektedir (H&E, X40).



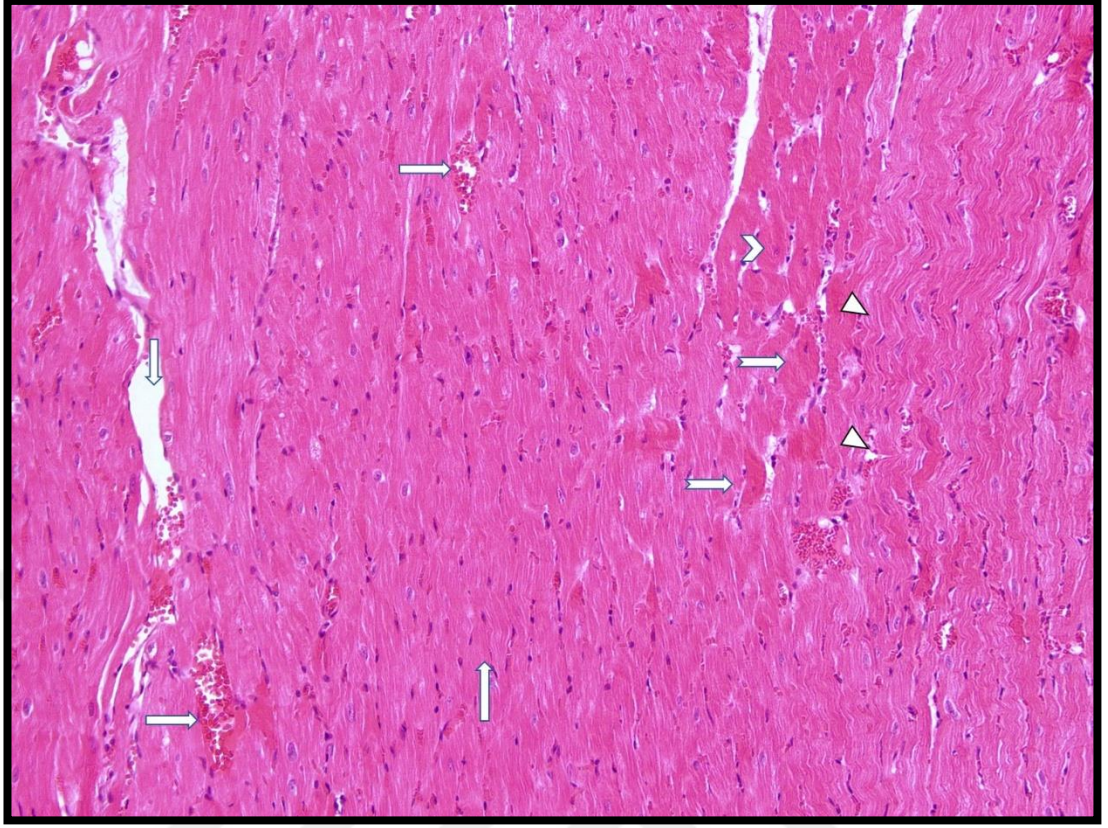
Resim 19. CP+AST grubu kalp dokusu. Normal yapıda kas lifleri (yukarı ok), hipereozinofilik kas lifleri (çentikli sağ ok), kas liflerinde ayrılma (aşağı ok), vasküler konjesyon (sağ ok) izlenmektedir (H&E, X100).



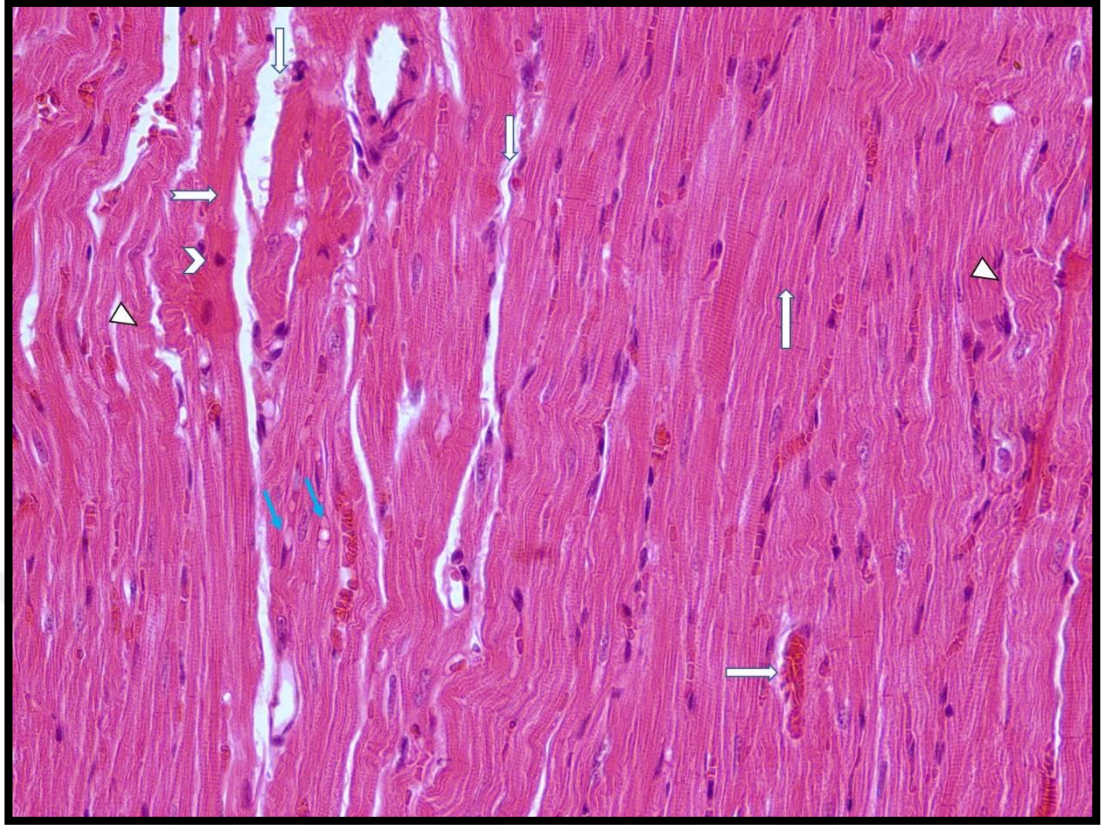
Resim 20. CP+AST grubu kalp dokusu. Normal yapıda kas lifleri (yukarı ok), hipereozinofilik kas lifleri (çentikli sağ ok), vasküler konjesyon (sağ ok) izlenmektedir (H&E, X200).



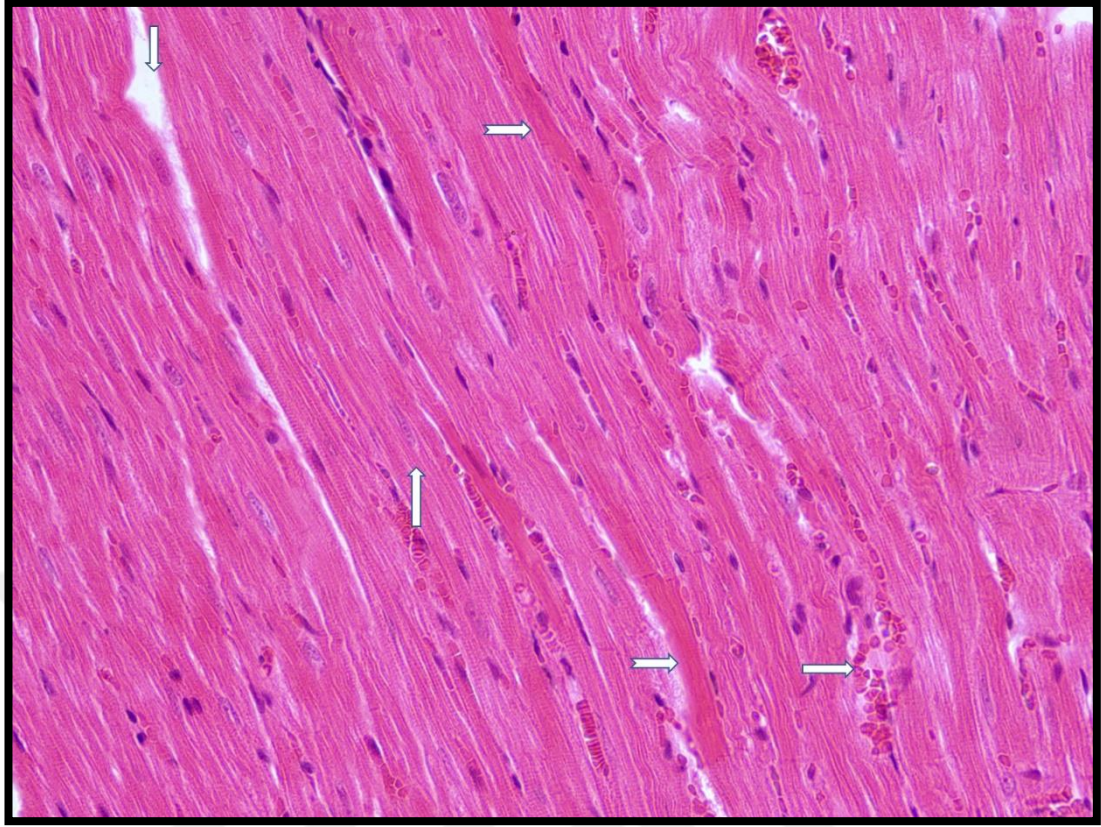
Resim 21. CP+AST grubu kalp dokusu. Normal yapıda kas lifleri (yukarı ok), hipereozinofilik kas lifleri (çentikli sağ ok), vasküler konjesyon (sağ ok), kontraksiyon bantları (sol ok) izlenmektedir (H&E, X200).



Resim 22. CP+AST grubu kalp dokusu. Normal yapıda kas lifleri (yukarı ok), hipereozinofilik kas lifleri (çentikli sağ ok), piknotik çekirdek (çentikli ok başı), dalgalı lifler (ok başı), kas liflerinde ayrılma (aşağı ok), vasküler konjesyon (sağ ok) izlenmektedir (H&E, X200).



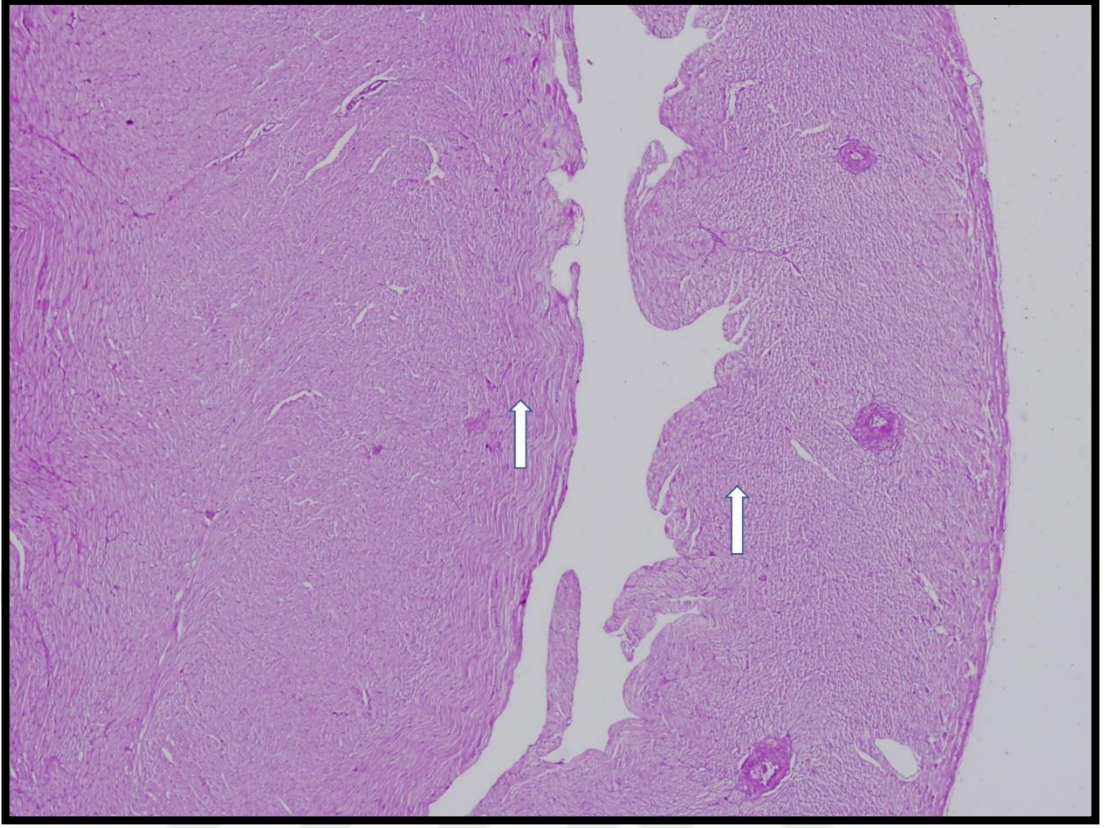
Resim 23. CP+AST grubu kalp dokusu. Normal yapıda kas lifleri (yukarı ok), hipereozinofilik kas lifleri (çentikli sağ ok), piknotik çekirdekler (çentikli ok başı), dalgalı lifler (ok başı), vakuolizasyon (mavi ok), kas liflerinde ayrılma (aşağı ok), vasküler konjesyon (sağ ok) izlenmektedir (H&E, X400).



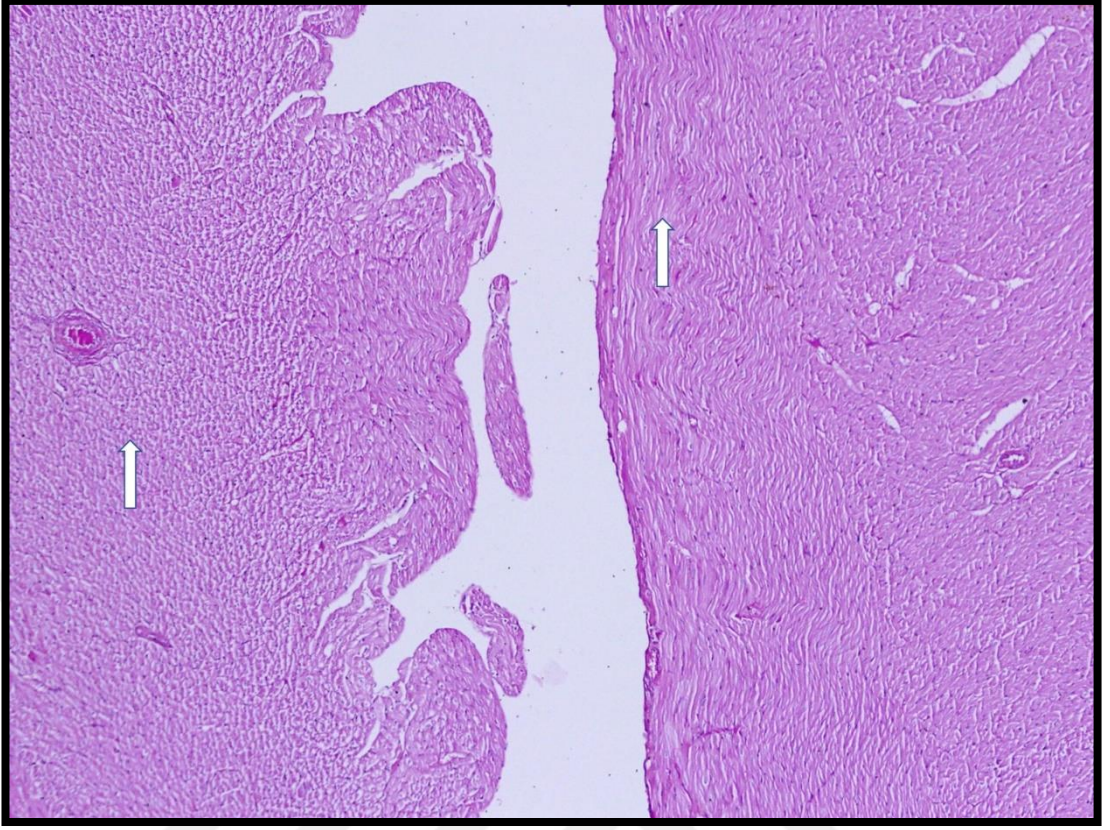
Resim 24. CP+AST grubu kalp dokusu. Normal yapıda kas lifleri (yukarı ok), hipereozinofilik kas lifleri (çentikli sağ ok), kas liflerinde ayrılma (aşağı ok), vasküler konjesyon (sağ ok) izlenmektedir (H&E, X400).

4.1.2. Periyodik Asit-Schiff Boyalı Kalp Kesitlerinin Histopatolojik Değerlendirilmesi

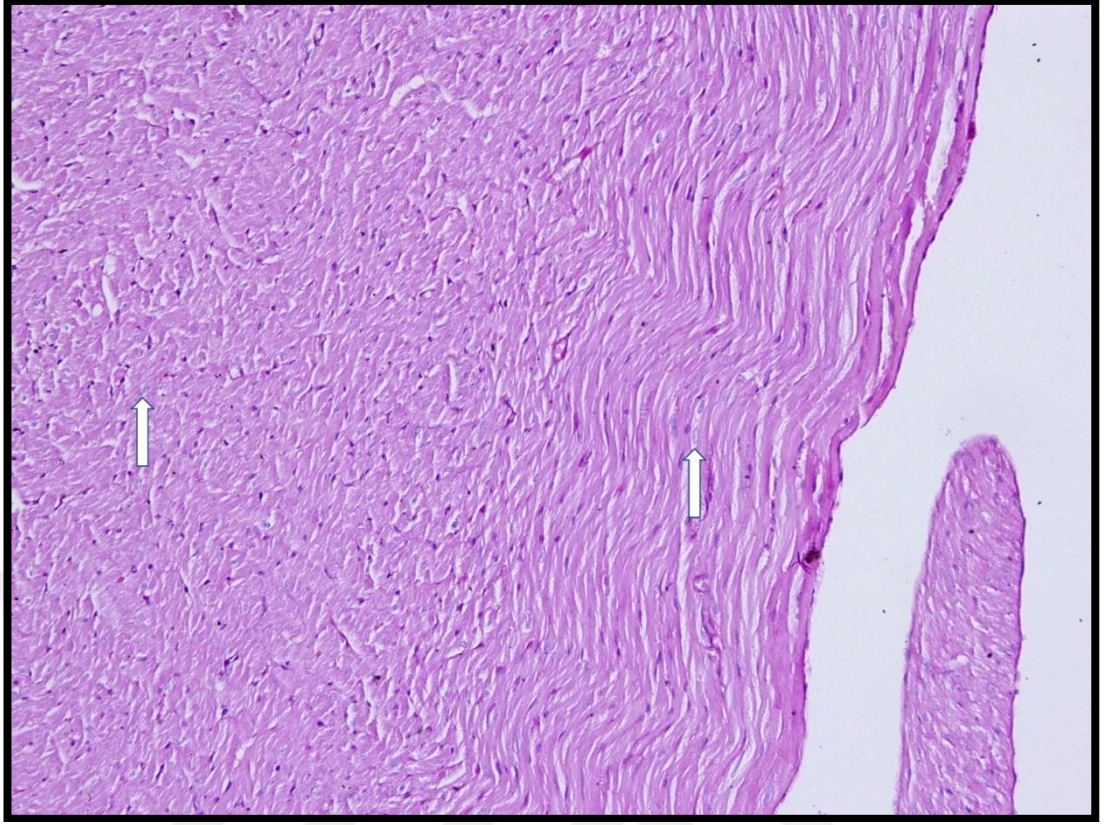
Periyodik asit-Schiff boyalı kontrol grubuna ait kalp kesitlerinin incelemesinde normal yapıda kardiyomiyositler, interstisyel alan ve vasküler yapılar görüldü. Diskus interkalaris ve sarkolemma hattı boyunca normal miktarda glikojen izlendi (Resim 25-28). CP Grubuna ait kalp kesitlerinde H&E boyalı kesitlerde gözlenen bulgulara ek olarak diskus interkalaris ve sarkolemma hattı boyunca glikojen miktarında artış gözlemlendi (Resim 29-32). CP+AST Grubuna ait kalp kesitlerinde de H&E boyalı kesitlerde gözlenen bulgulara ek olarak diskus interkalaris ve sarkolemma hattı boyunca glikojen miktarında artış gözlemlendi (Resim 33-36). CP Grubu ile kıyaslandığında CP+AST Grubunda glikojen birikiminde azalma tespit edildi.



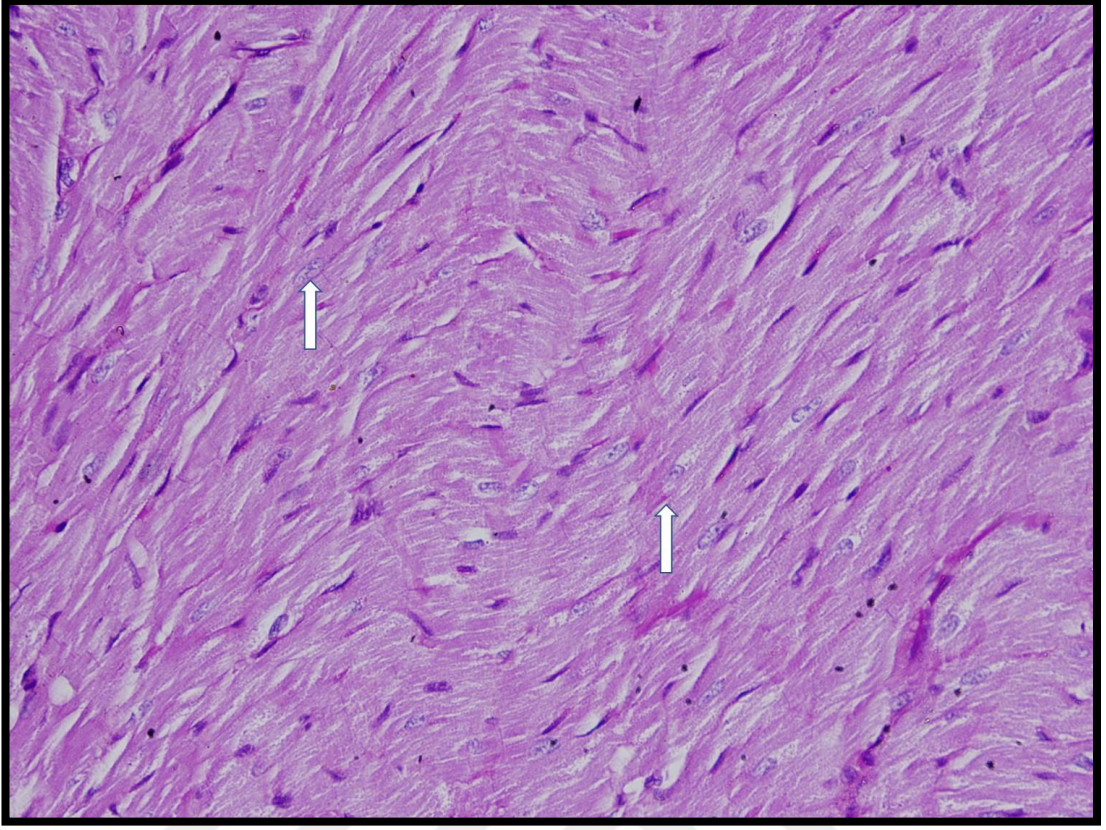
Resim 25. Kontrol grubuna ait kalp dokusu. Normal yapıda kas lifleri (yukarı ok) izlenmektedir (PAS, X40).



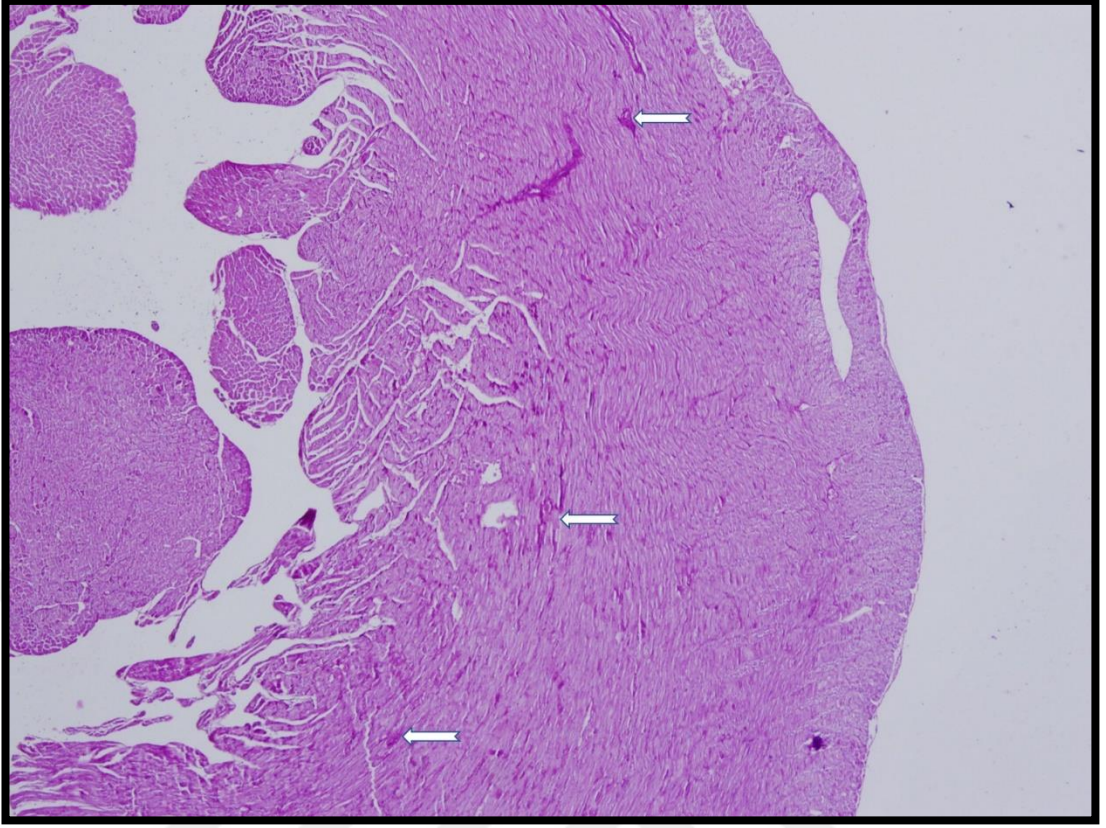
Resim 264. Kontrol grubuna ait kalp dokusu. Normal yapıda kas lifleri (yukarı ok) izlenmektedir (PAS, X100).



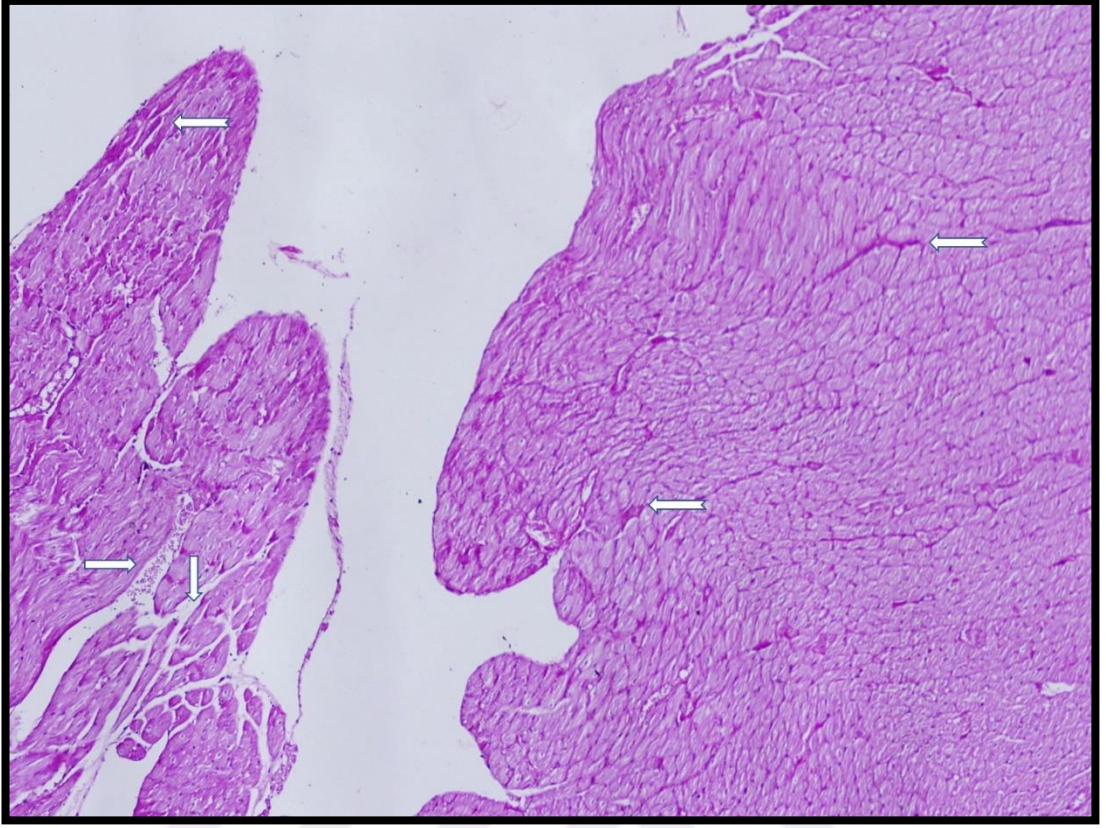
Resim 27. Kontrol grubuna ait kalp dokusu. Sarkolemma boyunca normal miktarda glikojen birikimi olan ve merkezi yerleşimli nükleusa sahip, normal yapıda kas lifleri (yukarı ok) izlenmektedir (H&E, X200).



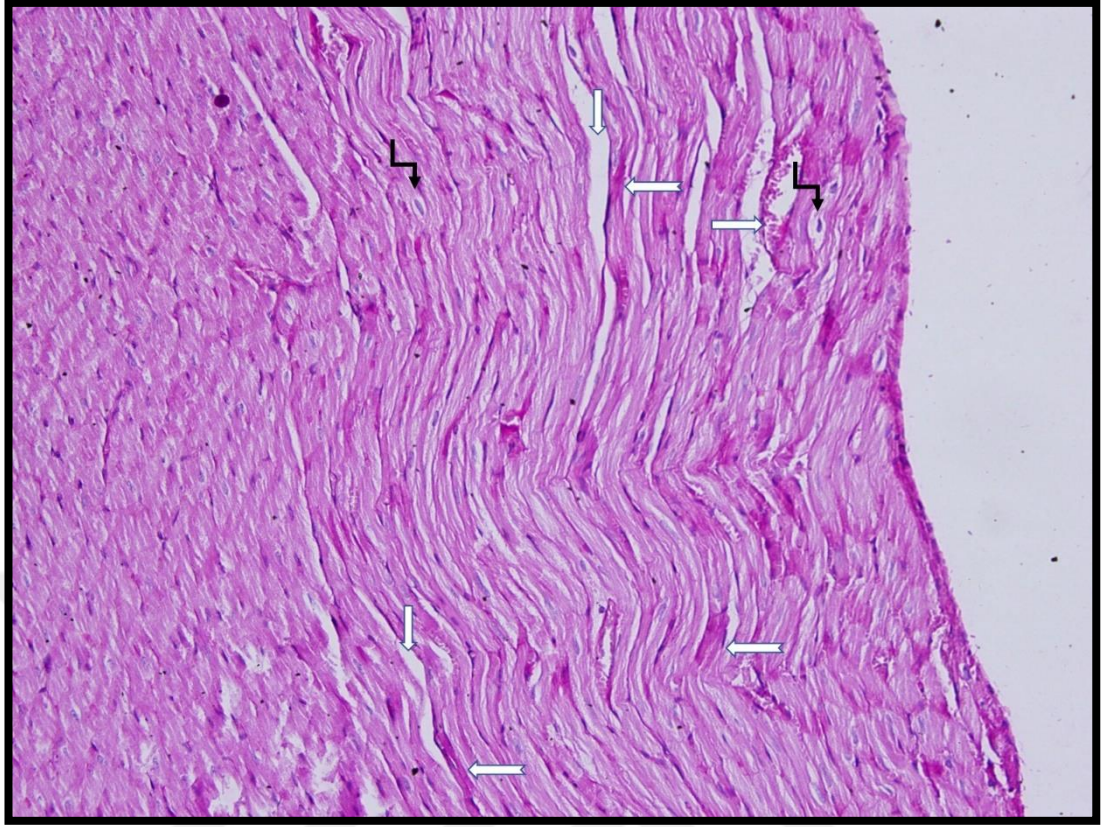
Resim 28. Kontrol grubu kalp dokusu. Sarkolemma boyunca normal miktarda glikojen birikimi olan ve merkezi yerleşimli nükleusa sahip normal yapıda kas lifleri (yukarı ok) izlenmektedir (PAS, X400).



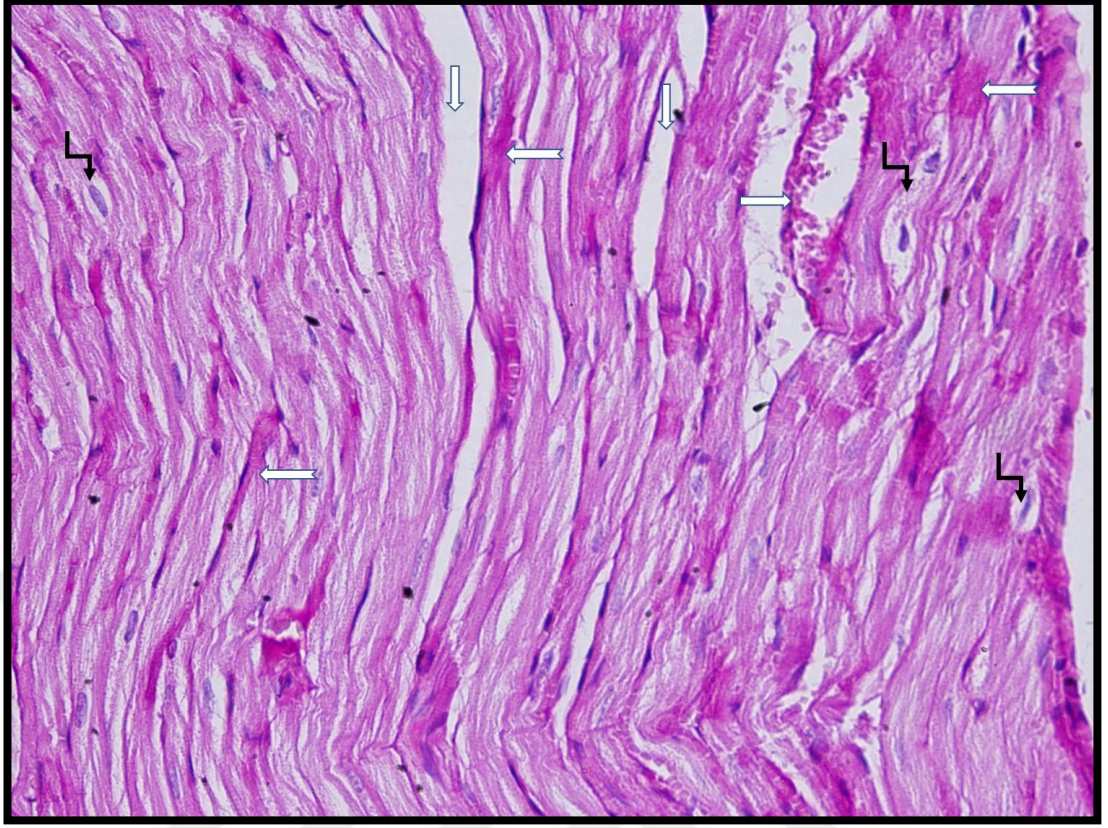
Resim 29. CP grubuna ait kalp dokusu. Anormal glikojen birikimi (çentikli sol ok) izlenmektedir (PAS, X40).



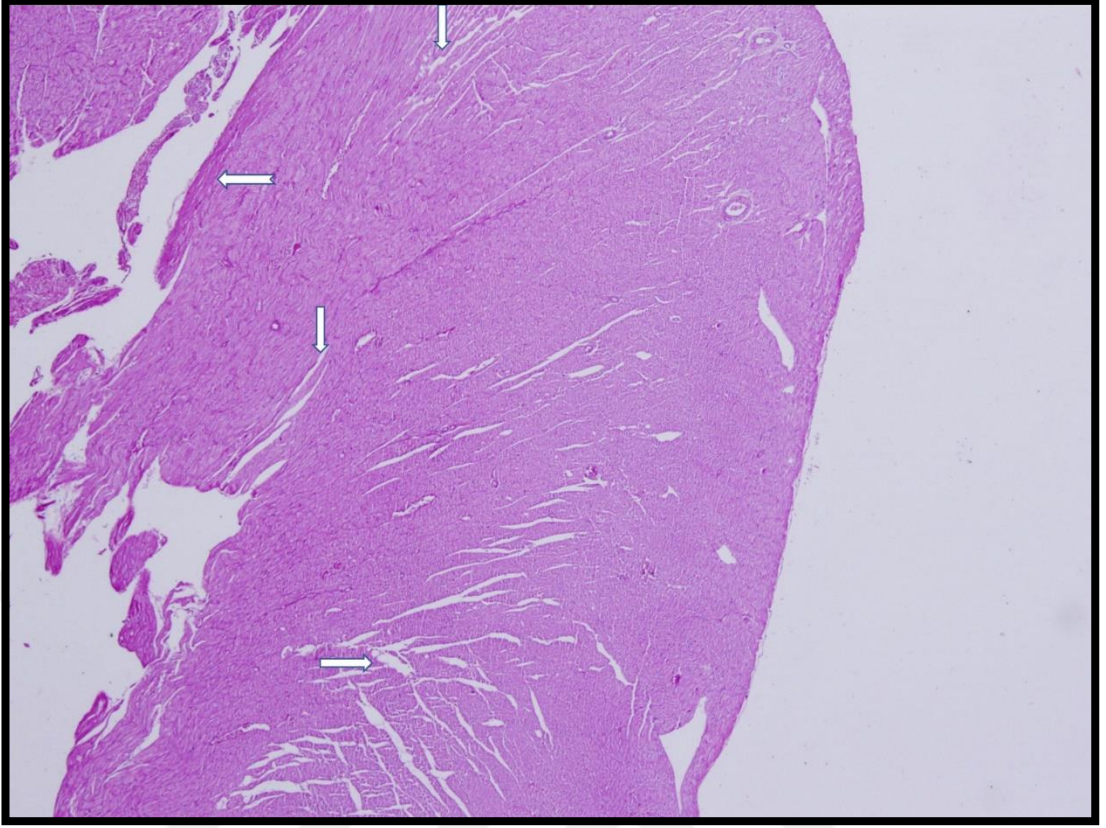
Resim 30. CP grubuna ait kalp dokusu. Anormal glikojen birikimi (çentikli sol ok), vasküler konjesyon (sağ ok), kas liflerinde ayrılma (aşağı ok) izlenmektedir (PAS, X100).



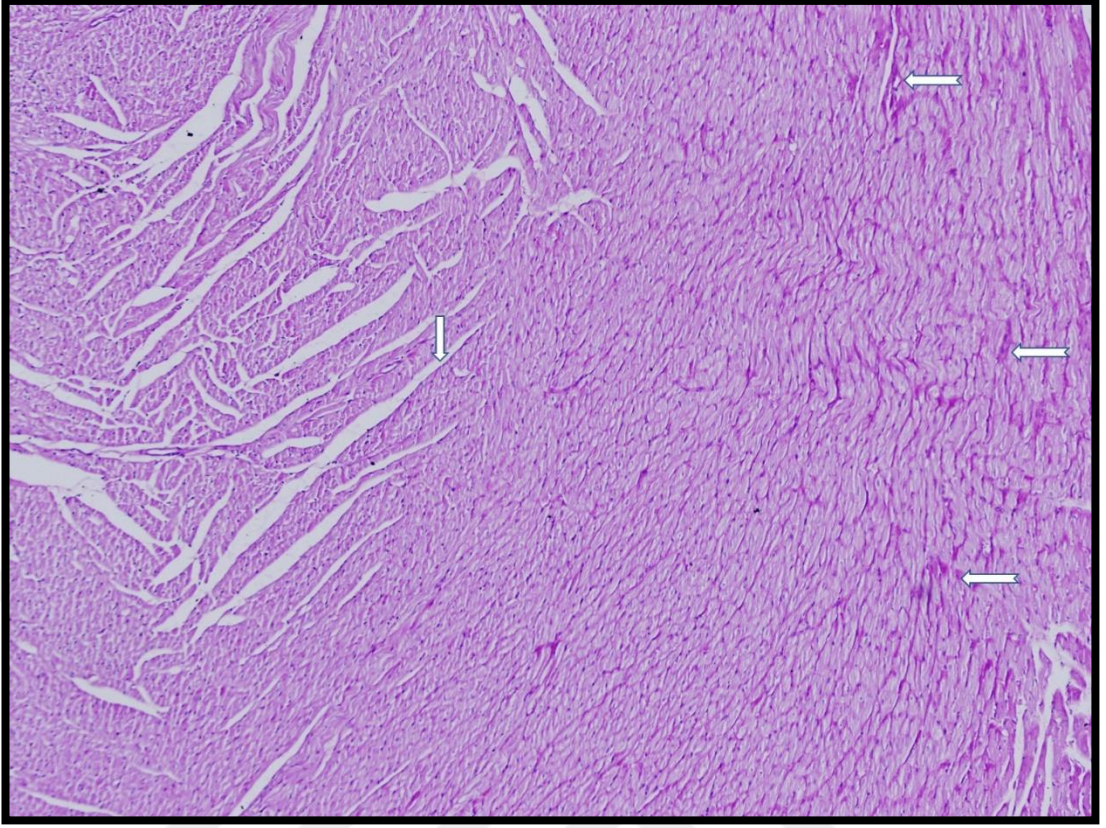
Resim 31. CP grubuna ait kalp dokusu. Anormal glikojen birikimi (çentikli sol ok), vasküler konjesyon (sağ ok), kas liflerinde ayrılma (aşağı ok), perinükleer ödem (dirsek ok) izlenmektedir (PAS, X200).



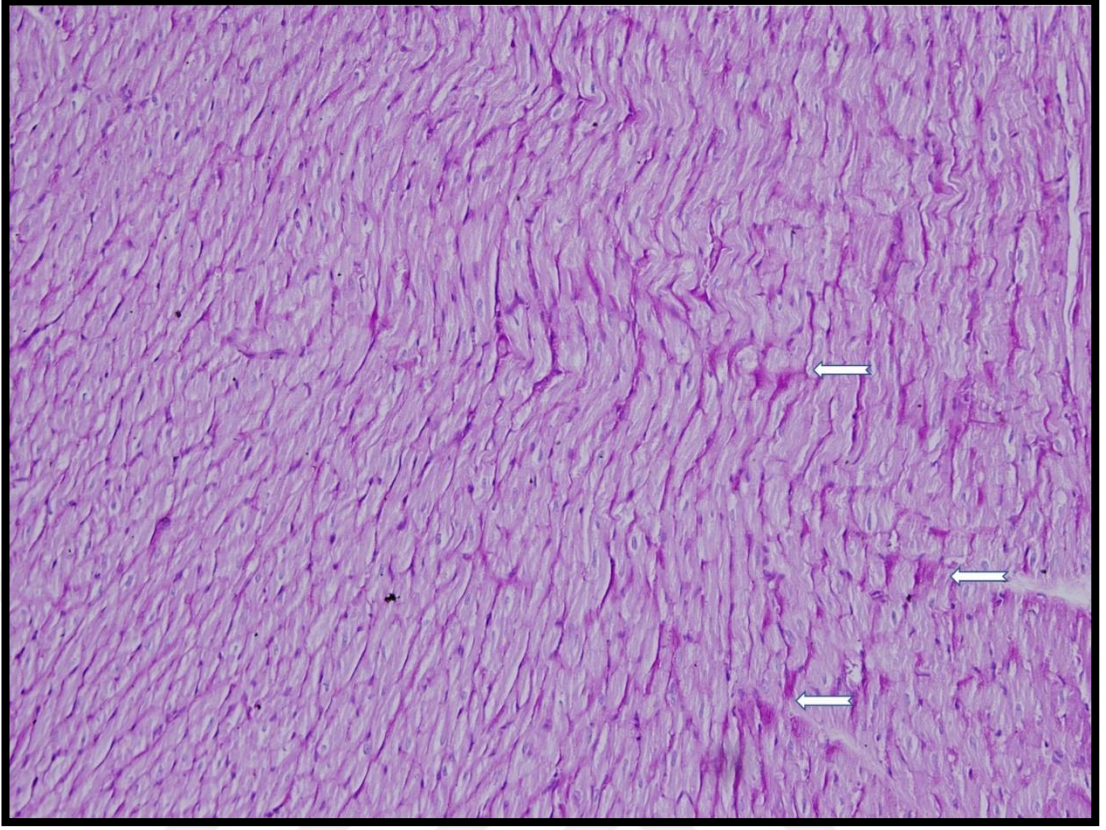
Resim 32. CP grubuna ait kalp dokusu. Anormal glikojen birikimi (çentikli sol ok), perinükleer ödem (dirsek ok), vasküler konjesyon (sağ ok), kas liflerinde ayrılma (aşağı ok) izlenmektedir (PAS, X400).



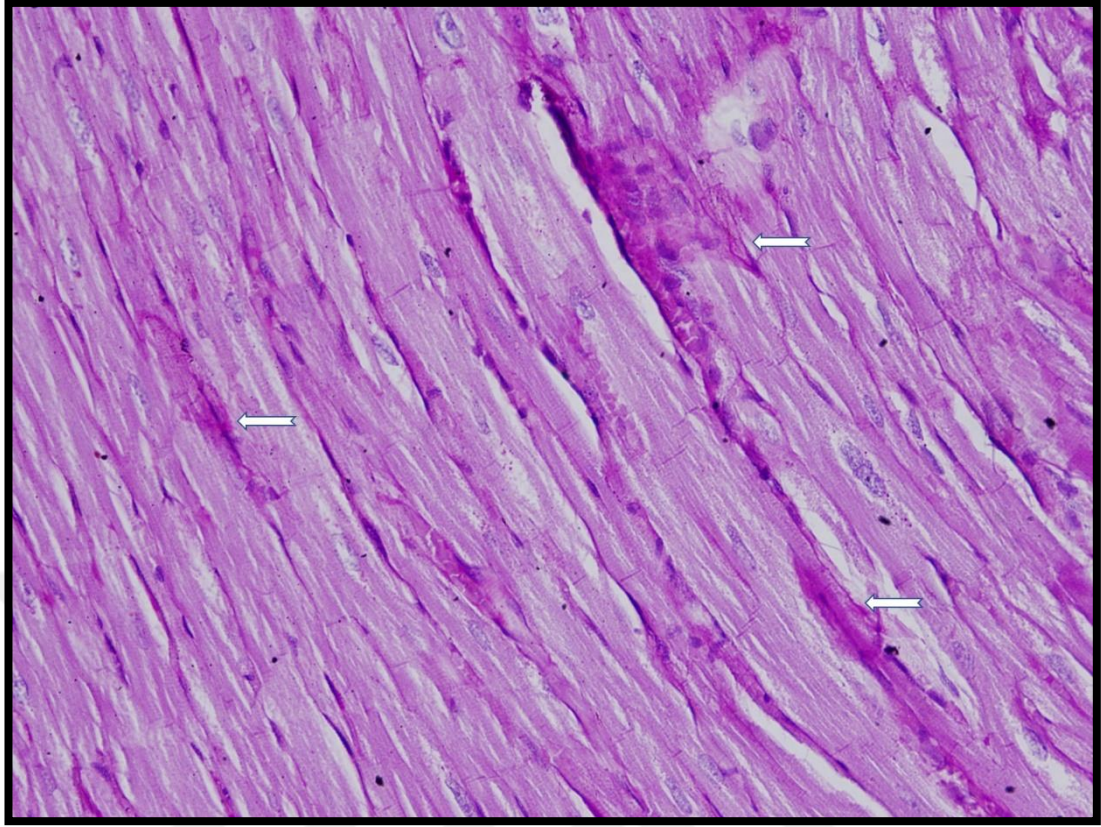
Resim 33. CP+AST grubuna ait kalp dokusu. Hafif glikojen birikimi (çentikli sol ok) izlenmektedir (PAS, X40).



Resim 34. CP+AST grubuna ait kalp dokusu. Hafif glikojen birikimi (çentikli sol ok), kas liflerinde ayrılma (aşağı ok) izlenmektedir (PAS, X100).



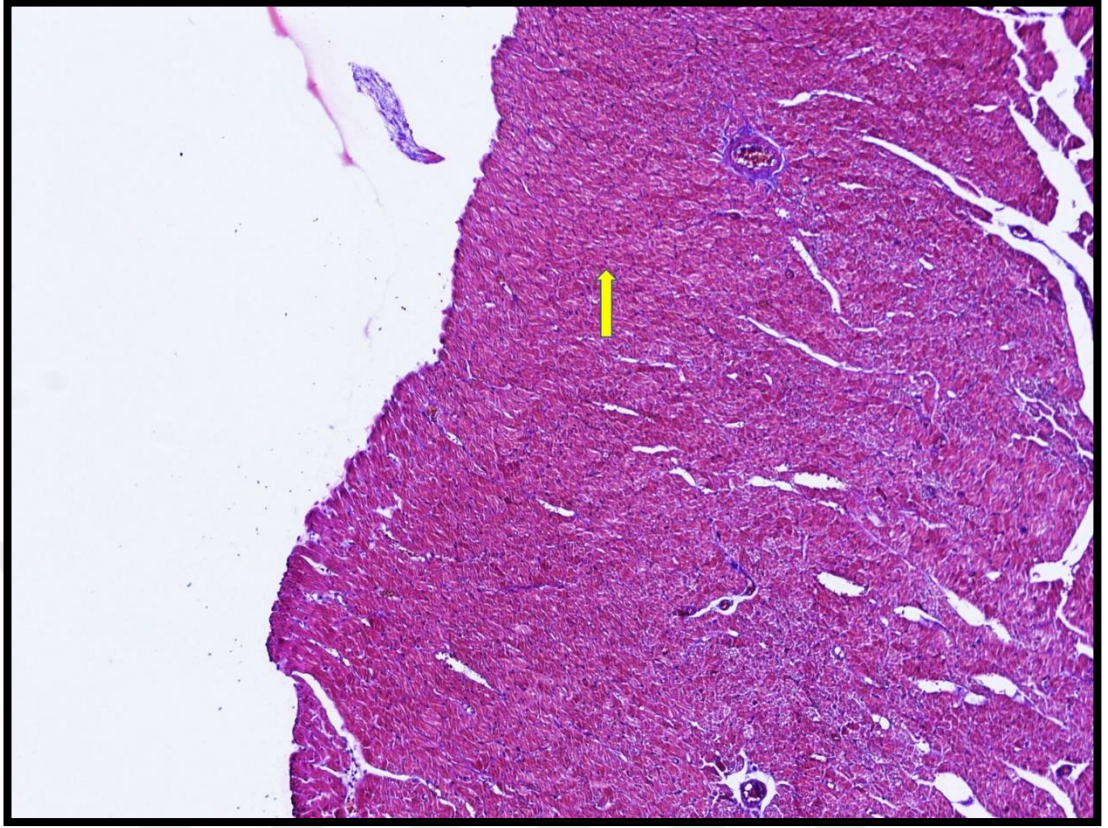
Resim 35. CP+AST grubuna ait kalp dokusu. Hafif glikojen birikimi (çentikli sol ok) izlenmektedir (PAS, X200).



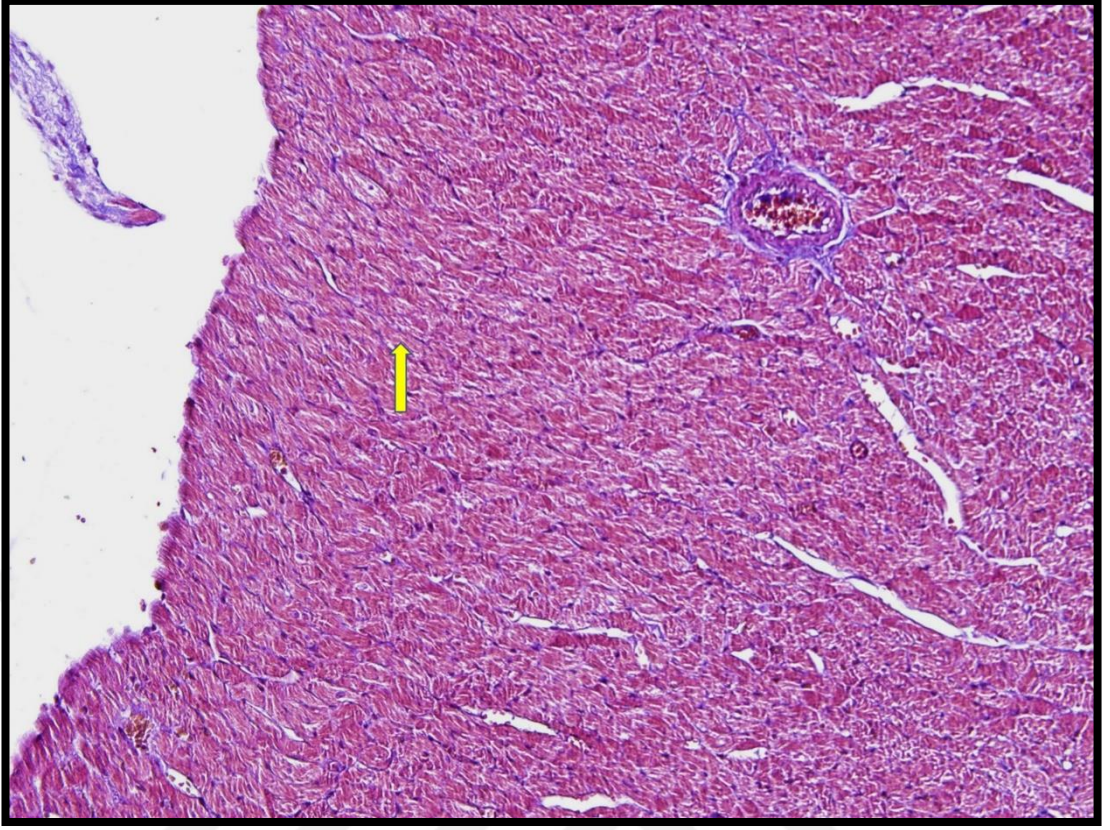
Resim 36. CP+AST grubuna ait kalp dokusu. Hafif glikojen birikimi (çentikli sol ok) izlenmektedir (PAS, X400).

4.1.3. Masson Trikrom Boyalı Kalp Kesitlerinin Histopatolojik Değerlendirilmesi

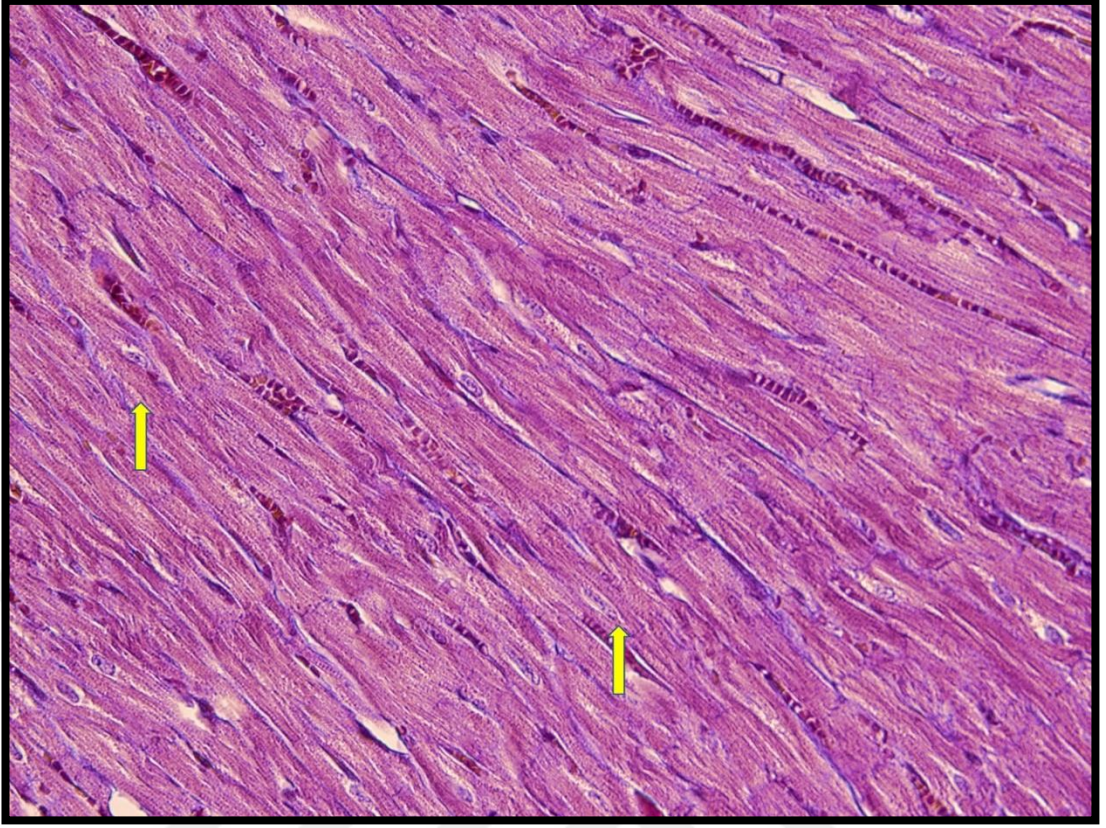
Masson Trikrom boyalı kontrol grubuna ait kalp kesitlerinin incelemesinde normal yapıda kardiyomiyositler, interstisyel alan ve vasküler yapılar görüldü. İnterstisyel alanda patolojik bir kollajen artışı görülmedi (Resim 37-39). CP ve CP+AST Gruplarına ait kalp kesitlerinde H&E boyalı kesitlerde gözlenen bulgular dışında kollajen miktarında artışı gösteren ek bir bulguya rastlanmadı (Resim 40-47).



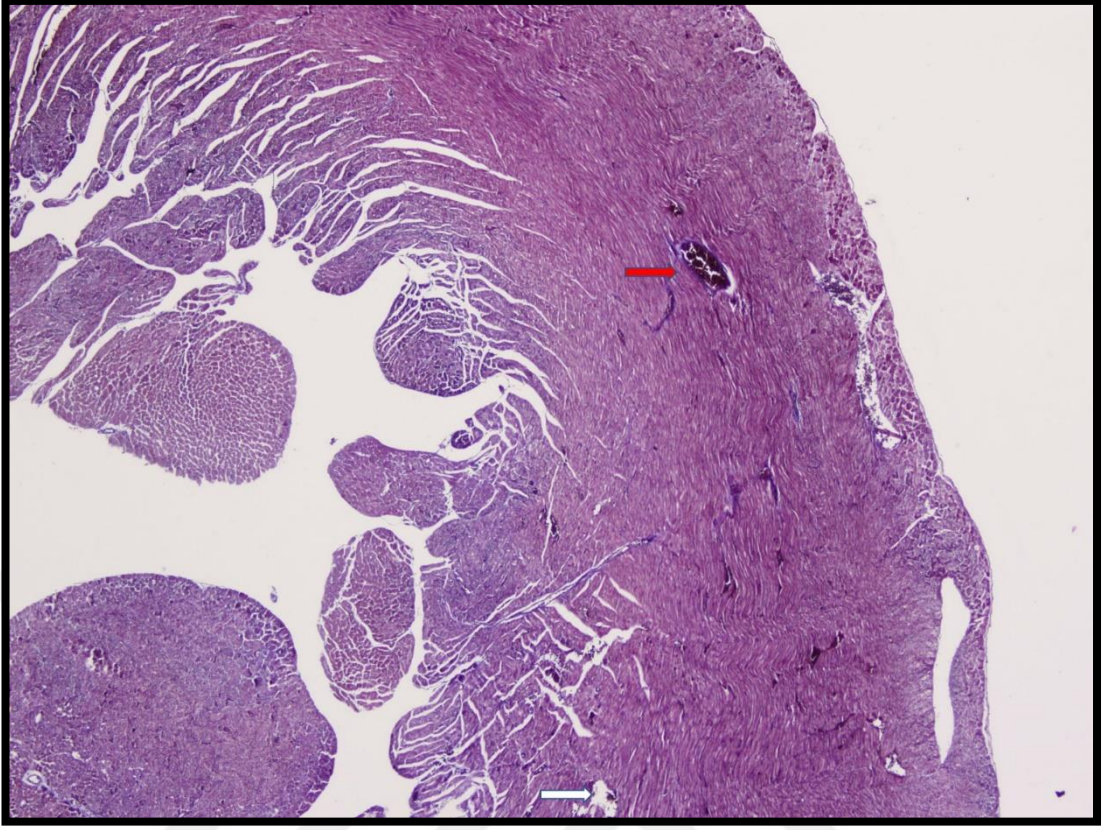
Resim 37. Kontrol grubuna ait kalp dokusu. Normal yapıda kas lifleri (yukarı ok) izlenmektedir (Masson Trikrom, X40).



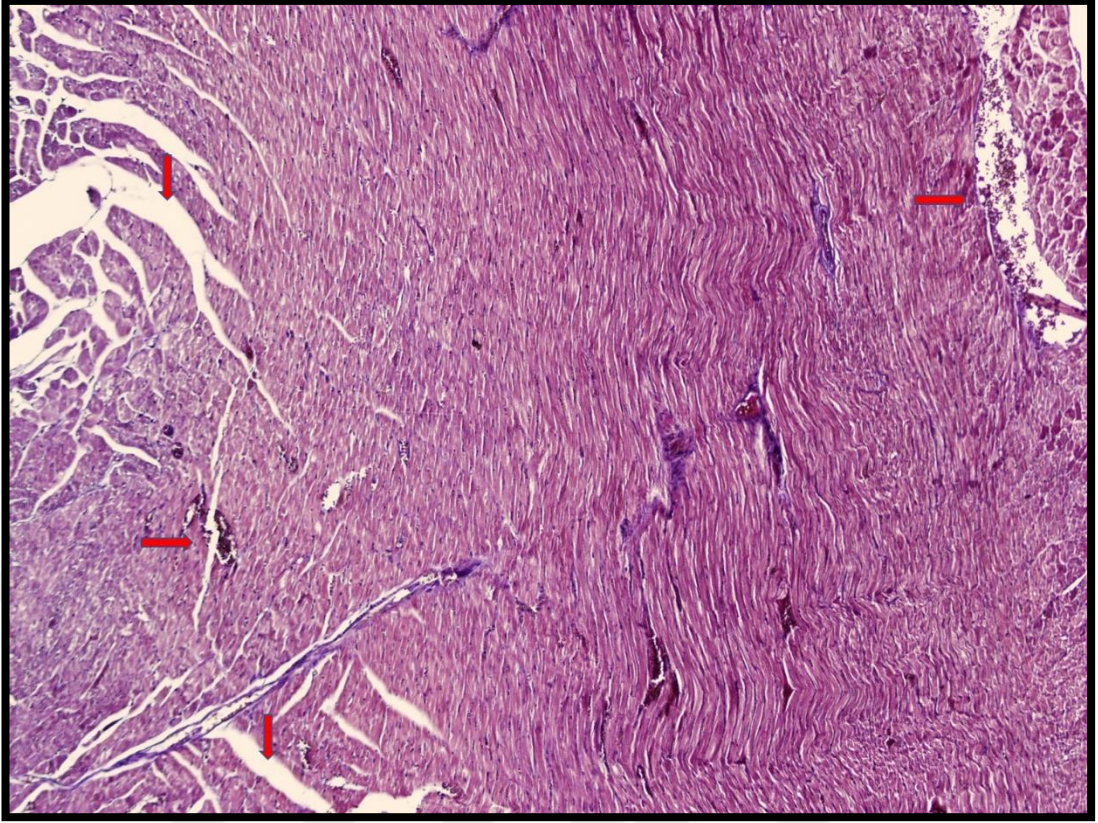
Resim 38. Kontrol grubuna ait kalp dokusu. Merkezi yerleşimli nükleusa sahip, normal yapıda kas lifleri (yukarı ok) izlenmektedir (Masson Trikrom, X200).



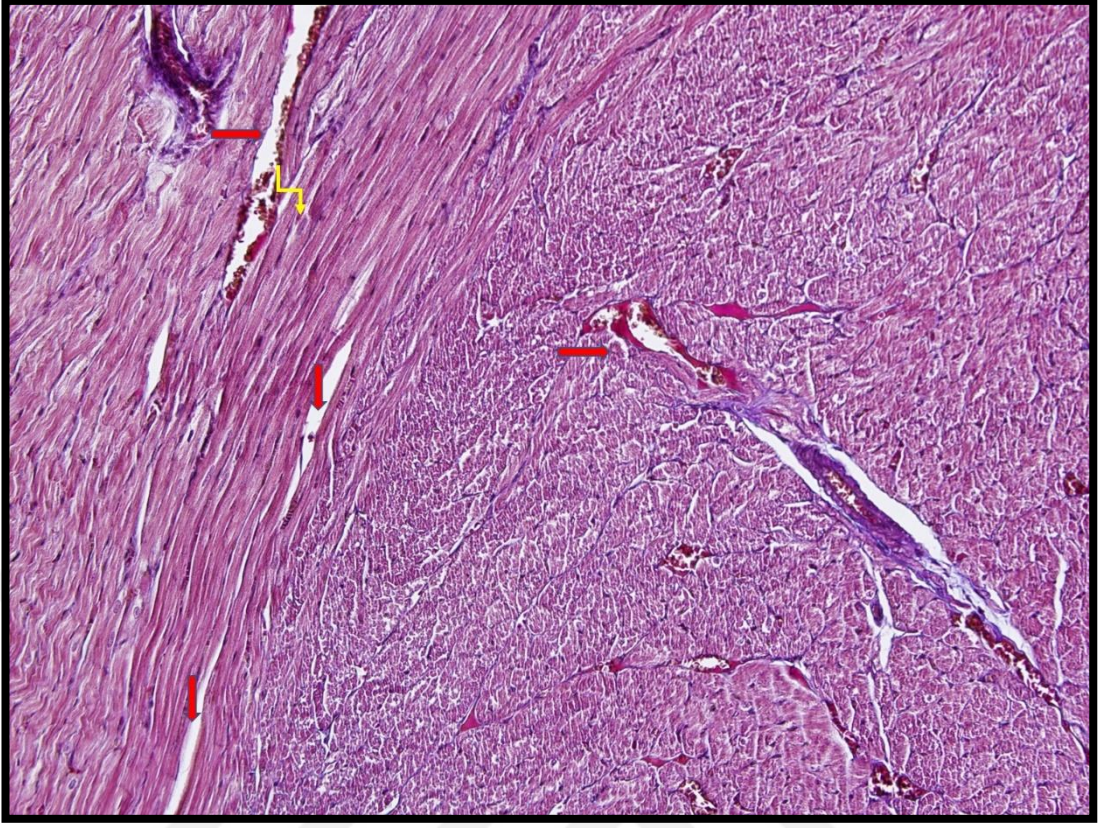
Resim 39. Kontrol grubuna ait kalp dokusu. Merkezi yerleşimli nükleusa sahip, normal yapıda kas lifleri (yukarı ok) izlenmektedir (Masson Trikrom, X400).



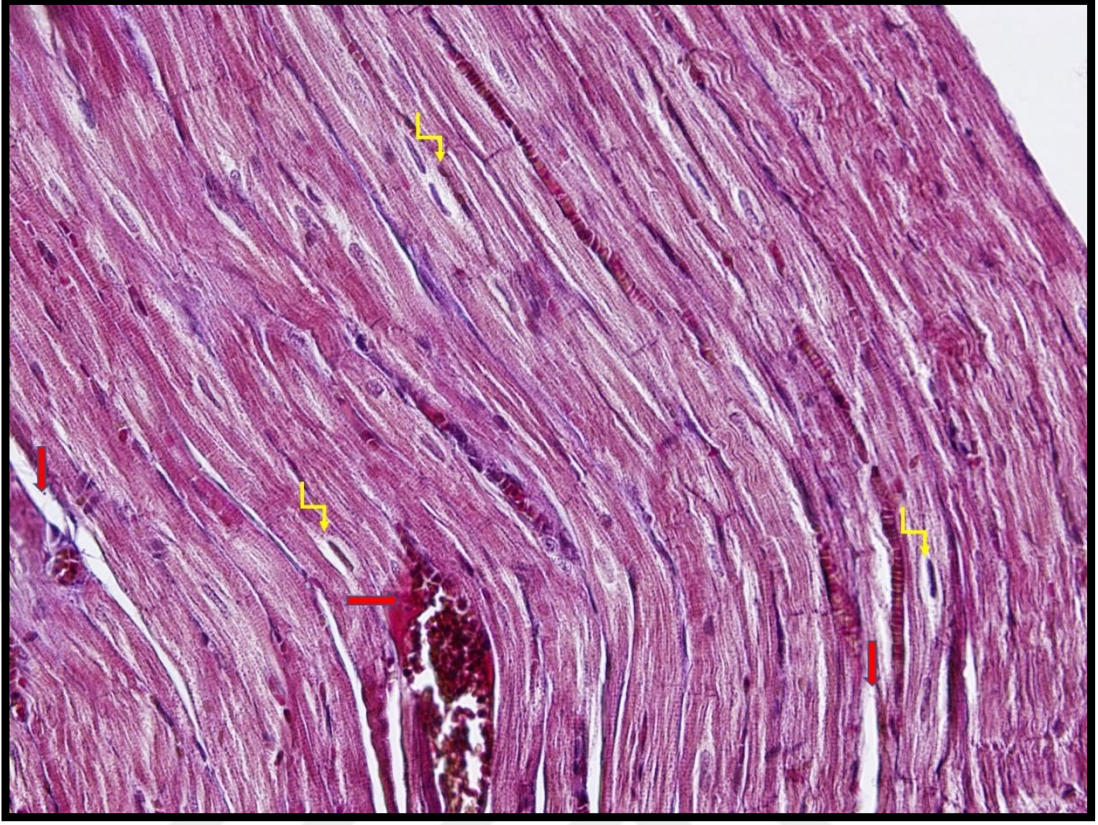
Resim 40. CP grubuna ait kalp dokusu. Vasküler konjesyon (sağ ok) izlenmektedir (Masson Trikrom, X40).



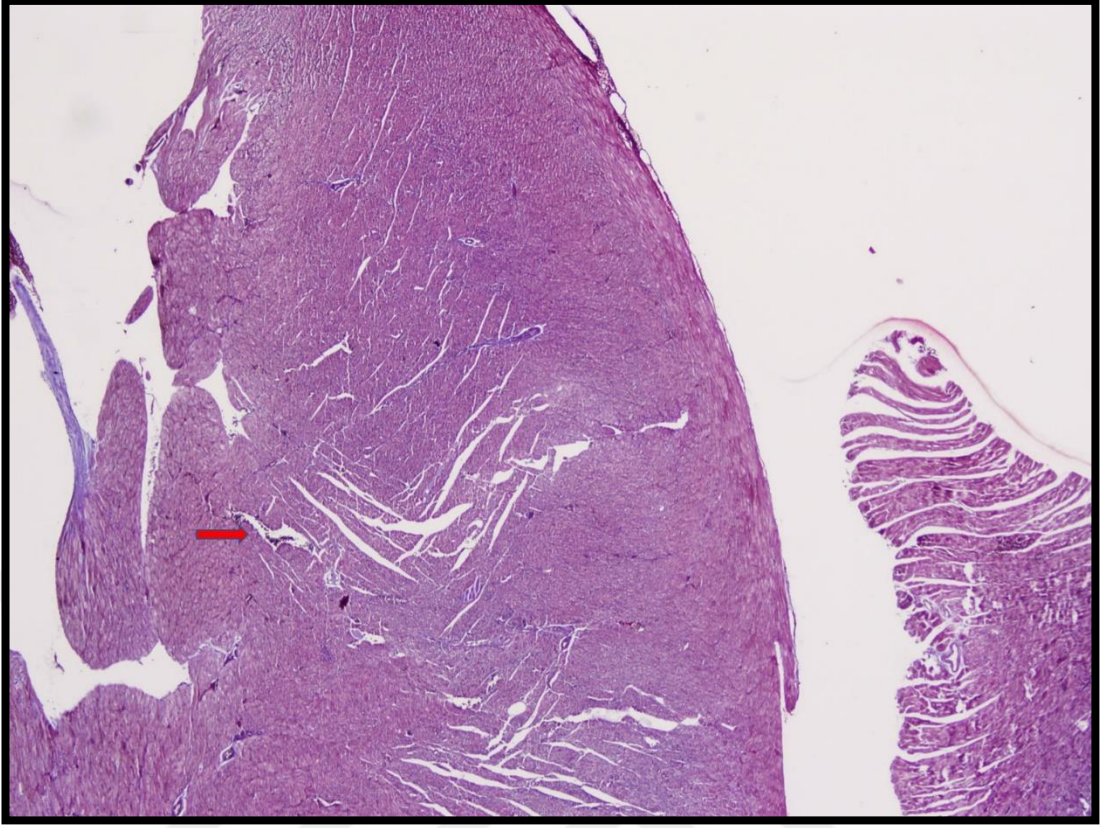
Resim 41. CP grubuna ait kalp dokusu. Vasküler konjesyon (sağ ok), kas liflerinde ayrılma (aşağı ok) izlenmektedir (Masson Trikrom, X100).



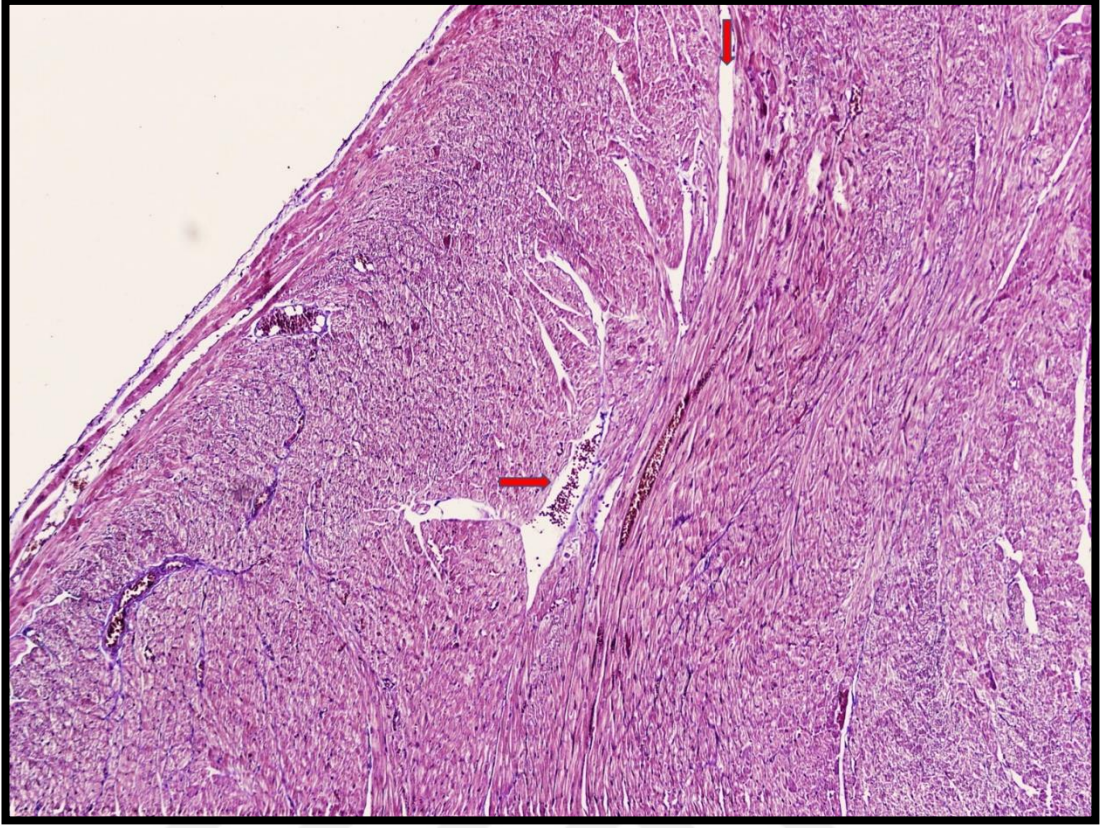
Resim 42. CP grubuna ait kalp dokusu. Vasküler konjesyon (sağ ok), kas liflerinde ayrılma (aşağı ok), perinükleer ödem (dirsek ok) izlenmektedir (Masson Trikrom, X200).



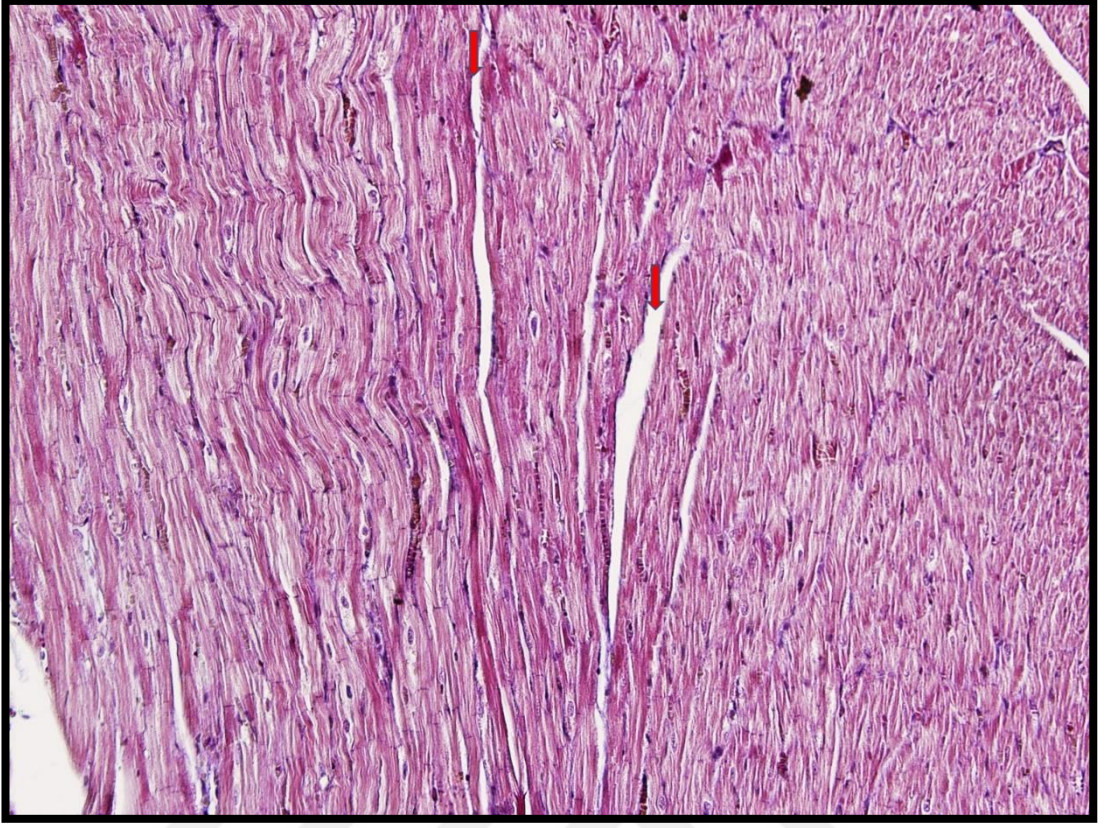
Resim 43. CP grubuna ait kalp dokusu. Vasküler konjesyon (sağ ok), kas liflerinde ayrılma (aşağı ok), perinükleer ödem (dirsek ok) izlenmektedir (Masson Trikrom, X400).



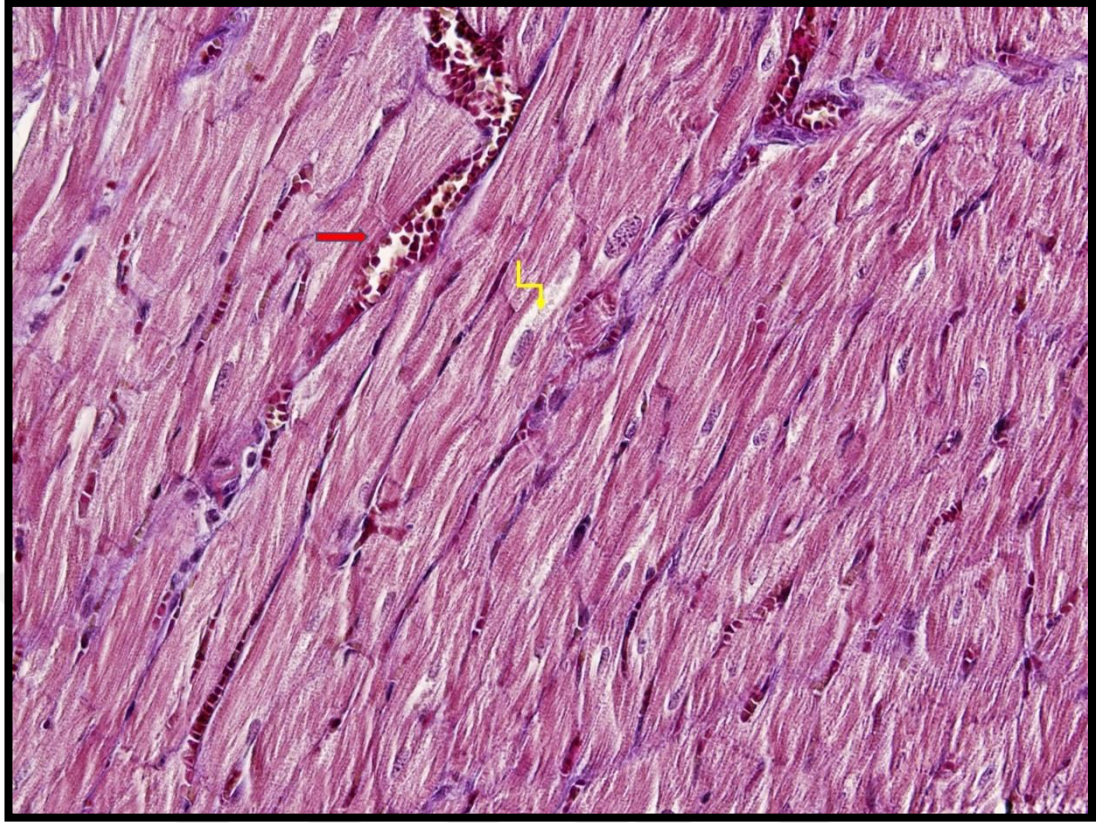
Resim 44. CP+AST grubuna ait kalp dokusu. Vasküler konjesyon (sağ ok) izlenmektedir (Masson Trikrom, X40).



Resim 45. CP+AST grubuna ait kalp dokusu. Vasküler konjesyon (sağ ok), kas liflerinde ayrılma (aşağı ok) izlenmektedir (Masson Trikrom, X100).



Resim 46. CP+AST grubuna ait kalp dokusu. Kas liflerinde ayrılma (aşağı ok) izlenmektedir (Masson Trikrom, X200).



Resim 47. CP+AST grubuna ait kalp dokusu. Vasküler konjesyon (sağ ok), perinükleer ödem (dirsek ok) izlenmektedir (Masson Trikom, X200).

4.2. Kalp Ağırlıkları

Sakrifikasyon sonrası diseke edilen kalplerin ağırlıkları bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark yoktu. CP ve CP+AST gruplarında kalp ağırlıkları kontrol grubuna göre bir miktar artmış olsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 10).

Tablo 10. Kalp ağırlıklarının karşılaştırması

	Kontrol Ort.±SD	CP Ort.±SD	CP+AST Ort.±SD	P Değeri
Kalp Ağırlığı (g)	0.78 ± 0,77	0,80 ± 0,94	0.82 ± 0,43	p<0.484*

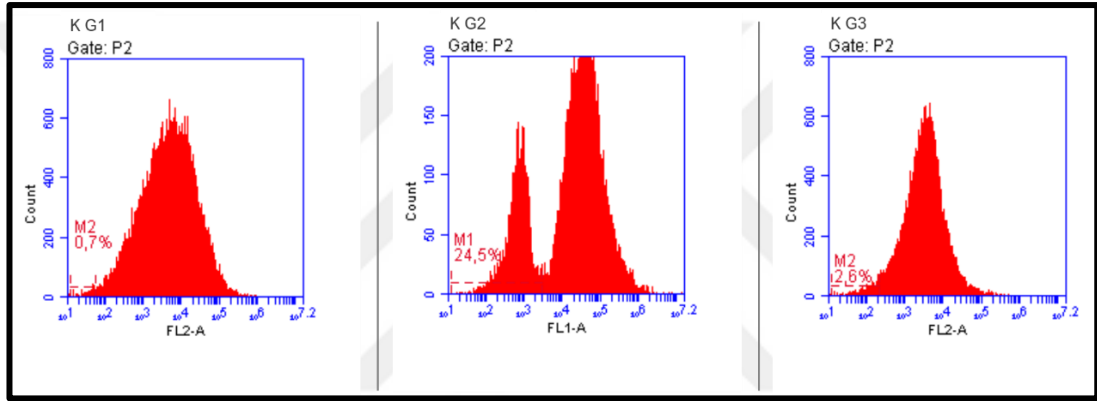
Veriler ortalama ve standart sapma (Ort.±SD) olarak verildi. Her grupta n:6

*Gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi (p<0.484)

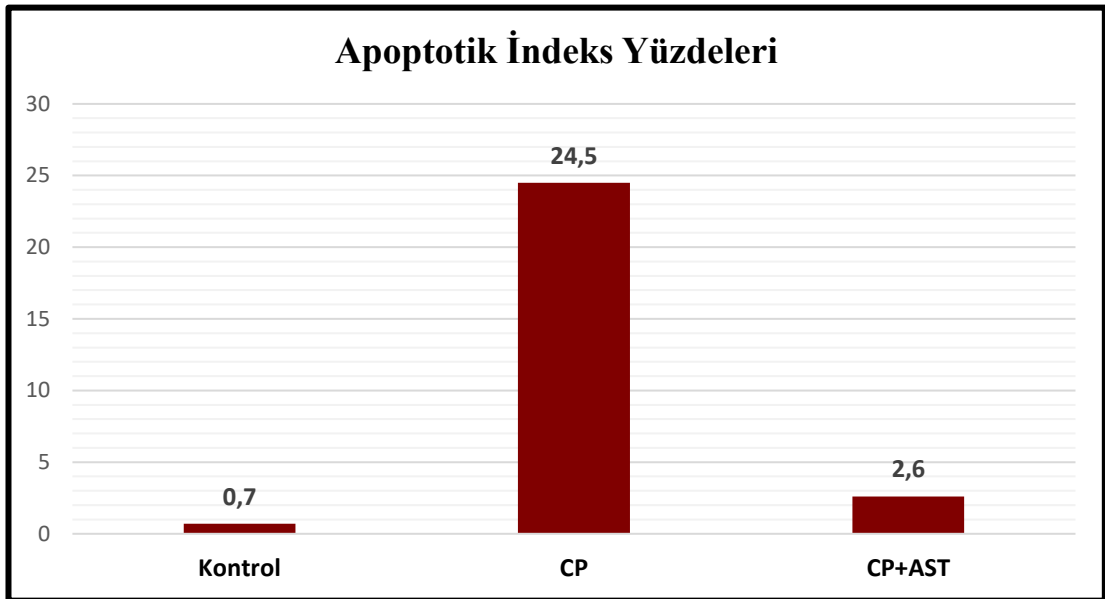
4.3. Flow Sitometrik Analizler

4.3.1. PE Annexin V Apoptosis Detection Kit Analizi

Anneksin V yöntemi ile değerlendirilen deney gruplarına ait kalp dokularının apoptotik indeks değerleri şekil 6 'da verildi. Siklofosfamid grubunda kontrol ve CP+AST gruplarına göre apoptotik hücre sayısında artış gözlemlendi. Astaksantin ön muamelesi CP+AST grubunda apoptotik hücre sayısında belirgin azalmaya neden oldu.



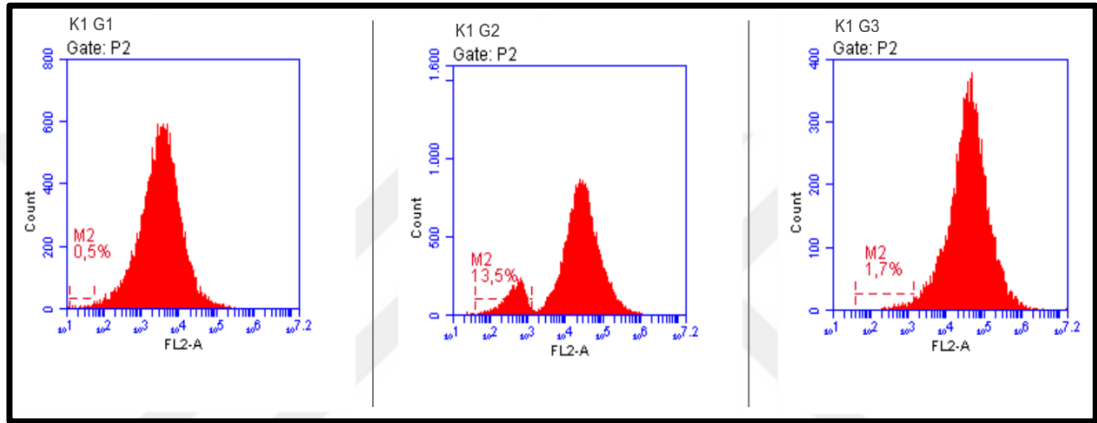
Şekil 4: Flow sitometrik Anneksin V histogramları. G1; Kontrol, G2; CP, G3; CP+AST



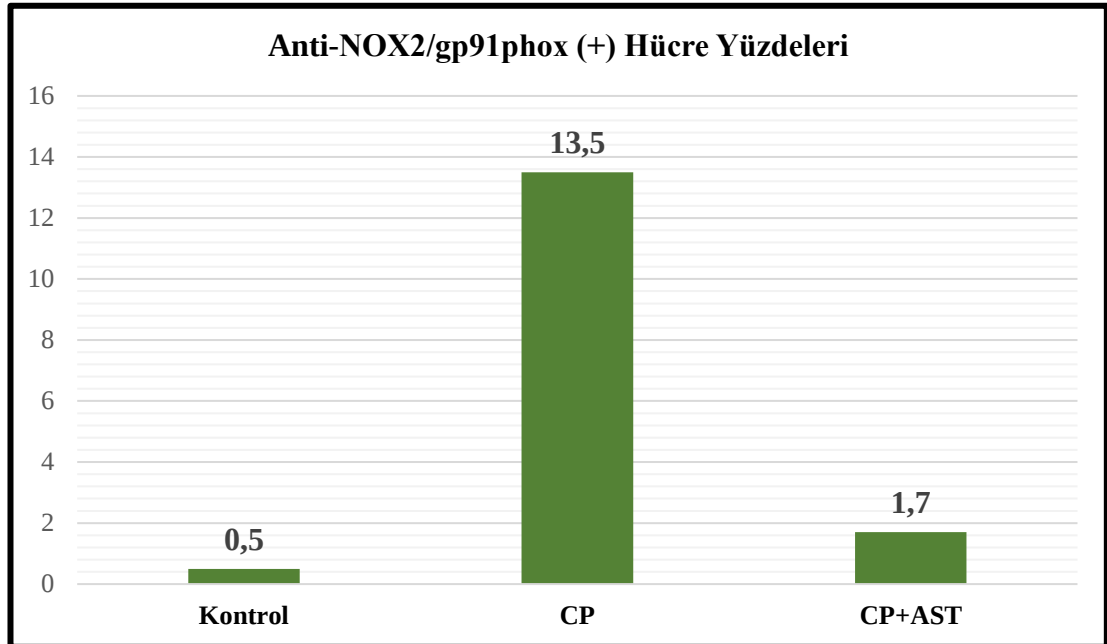
Şekil 5: Flow Sitometrik AI değerleri

4.3.2. Anti-NOX2/gp91phox Antikor Kit Analizi

Anti-NOX2/gp91phox antikor kiti ile değerlendirilen kalp dokularının oksidatif stres değerleri şekil 8 'de verildi. Elde edilen verilere göre CP grubunda kontrol ve CP+AST gruplarına göre Anti-NOX2/gp91phox (+) hücre sayısında artış gözlemlendi. Astaksantin ön muamelesi CP+AST grubunda Anti-NOX2/gp91phox (+) hücre sayısında belirgin azalmaya neden oldu.



Şekil 6: Flow sitometrik Anti-NOX2/gp91phox histogramları. G1; Kontrol, G2; CP, G3; CP+AST



Şekil 7: Flow sitometrik Anti-NOX2/gp91phox (+) hücre yüzdeleri. G1; Kontrol, G2; CP, G3; CP+AST

5. TARTIŞMA

Siklofosfamid azotlu hardallar grubunda yer alan uzun yıllardır en çok kullanılan alkilleyici ajanlardan biridir. Antineoplastik, antiinflamatuvar ve immünsupresif etkileri bulunan CP sistemik lupus eritematozus, Wegener granülomatozu, romatoid artrit, pemfigus, immün trombositopenik purpura, Behçet hastalığı, glomerülonefrit, multipl sklerozis, aplastik anemi, lösemi, lenfoma, multipl myelom, nöroblastom, meme, over ve akciğer kanseri, Wilm's tümörü gibi pek çok hastalıkta kullanılmaktadır (8, 53-60, 62).

Etkilerini metabolik aktivasyonu sırasında oluşturduğu metabolitleri aracılığıyla DNA'yı alkilleyerek ve çapraz bağlar oluşturarak gerçekleştirir. Bu metabolitlerden akrolein ise ilacın toksik etkilerinden sorumludur ve normal hücrelerde DNA hasarına ve oksidatif strese neden olarak organ toksisitelerine yol açar. Bu toksik etkiler 4HCP ve akroleinin sebep olduğu ROS üretimi, GSH tükenmesi ve azalmış aldehit dehidrojenaz aktivitesi ile ilişkilidir (62,65). Siklofosfamid toksisitesiyle kemik iliği, mesane, akciğerler, gastrointestinal sistem, overler ve testisler, kalp, böbrek ve karaciğer gibi pek çok farklı organ üzerindeki etkileriyle ciddi morbidite ve bazen mortalite görülmektedir (66, 67, 71, 75, 78, 79, 142).

Yüksek doz CP tedavisinin kardiyomegali, pulmoner vasküler konjesyon ve perikardiyal efüzyon gibi bulguların eşlik ettiği konjestif kalp yetmezliği, hemorajik miyokardit, aritmiler, kardiyak tamponad ve perikardiyomiyopati gibi ölümcül komplikasyonlara yol açan akut kardiyotoksositeye neden olabildiği bilinmektedir (81-84). Histopatolojik olarak hemorajik miyokardiyal nekroz, sol ventrikül duvarında kalınlaşma, fibröz perikardit, endotel hasarı, interstisyumda ekstravaze eritrositler ve fibrin şeritler; multiple kontraksiyon bantları ve hücre içi fibrin birikintileri olan nekrotik kas hücreleri; fibrin ve trombosit içeren mikrotrombüsler de CP bağımlı kardiyak hasarda görülebilen bulgulardandır (84, 85).

Astaksantin, algler, mayalar, somon, alabalık, kırmızı çupra, balık yumurtası, kril, karides, ıstakoz ve kerevit gibi deniz canlılarında, flamingo ve bıldırcınlarda bulunan ksantofil karotenoid yapıda bir besindir (11,110). Serbest radikalleri veya diğer oksidanları nötralize ederek, serbest radikallerin neden olduğu lipid

peroksidasyonunu inhibe ederek klinik olarak pek çok iyileştirici etkilere sahiptir (113).

Astaksantin'in antioksidan kapasitesi diğer karotenoidler ve tokoferolden daha fazladır. Bu güçlü antioksidan özelliği ile diğer pek çok antioksidanın aksine prooksidan etki göstermemekle beraber anti-kanser, anti-inflamatuvar, antimikrobiyal, anti-diyabetik, DNA hasarına karşı koruyucu ve immünomodulatuvar etkileri bulunmaktadır (112, 114-120, 128).

Astaksantin'in kardiyovasküler sistem üzerinde yararlı etkileri bulunmaktadır. Gönüllüler üzerinde yapılan çalışmalarda AST takviyesinin; lipid peroksidasyonunu azalttığı, HDL-kolesterol ve adiponektinini artırıp, trigliserit, LDL kolesterol ve APO-B düzeyini azalttığı, total antioksidan kapasiteyi arttırdığı, kan basıncını azalttığı görülmüş ve bu etkiler neticesinde kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde faydalanılabileceği öne sürülmüştür (130, 132, 133). Yapılan hayvan deneylerinde de miyokardiyal enfarktüs alanını küçülttüğü, sistolik kan basıncını düşürdüğü, aterom plaklarda makrofaj infiltrasyonunu azalttığı ve plak stabilitesini sağladığı görülmüştür (128-131). Astaksantin'in sayılan bu etkileri, CP tedavisinin kalp üzerinde oluşturduğu istenmeyen yan etkilere karşı da koruyucu olabilir.

Kardiyotoksisite CP'nin en önemli yan etkilerinden biridir. Klinik olarak ilk doz sonrası 1-10 gün içinde kardiyak bulgular görülebilmektedir (143, 144). Deneysel çalışmalarda da benzer şekilde ilk doz uygulandıktan 24 saat sonrasında kardiyotoksisiteye ait bulgular histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle tespit edilmiştir (145-147). Literatürde CP kardiyotoksisitesinin önlenmesi amacıyla pek çok antioksidan maddenin kullanıldığı görülmektedir, ancak AST'nin bu hasar üzerindeki etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle biz de çalışmamızda CP'nin kalp üzerindeki akut toksik etkilerini ve buna karşı AST'nin olası koruyuculuğunu görmek için; herhangi bir uygulama yapmadığımız kontrol grubu ile 7. gün CP uyguladığımız CP grubu ve ilk 7 gün AST ile ön muamele yapıp 7. gün CP uyguladığımız CP+AST grubunu, 8. gün gerçekleştirdiğimiz sakrifikasyon işleminden sonra elde ettiğimiz dokular üzerinden histolojik ve flow sitometrik açıdan karşılaştırdık.

Siklofosamid'in doku hasarı oluşturmada öne sürülen mekanizmalardan biri CP kaynaklı endotel hasarı ve buna bağlı toksik metabolitlerin transüdayonu ile

gelişen kardiyomiyosit hasarındır (148). Todorova ve ark. (2009) yaptığı çalışmada glutatyonun 200 mg/kg CP uygulanarak kardiyotoksisite oluşturan sıçanlar üzerindeki etkileri incelenmiş ve CP enjeksiyonundan 24 saat sonra yapılan sakrifikasyonla alınan kalp dokusunda histopatolojik olarak koagülatif değişiklikler ve kontraksiyon bant nekrozu ile dejenere miyositler gözlenmiştir (145). Güneş ve ark. (2017) çalışmasında 150 mg/kg CP uygulamasıyla kardiyomiyositlerde hipereozinofili, çekirdeklerde küçülme ve koyu boyanma gibi histopatolojik bulgular görülmüştür (147). Gado ve ark. (2013) yaptığı çalışmada ise 150 mg/kg tek doz CP uygulanmasından 48 saat sonra diseke edilen kalp dokularında kardiyomiyositlerde koagülatif değişiklikler, kontraksiyon bant nekrozu, ödem ve inflamasyon tespit edilmiştir. Gözlenen bu değişiklikler miyokardiyal hasarın erken bulgularındandır (149, 150). Biz de çalışmamızda literatüre benzer şekilde CP ve CP+AST gruplarında (CP grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla) hipereozinofili, piknotik çekirdekler ve kontraksiyon bantları izledik.

Miyokardiyal hasarın bir diğer erken bulgusu olan dalgalı lifler, akut miyokardiyal iskemi, akut adrenerjik kardiyak hasar ve dilate kardiyomiyopati gibi durumlarında görülmektedir (150-152). Omole ve ark. (2018) çalışmasında 3 gün boyunca 50 mg/kg/gün CP uygulanan sıçanlarda dalgalı lifler, vakuolizasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, miyofibril kaybı ve miyofibrillerde hipertrofi gözlenmiştir (153). Biz de benzer şekilde CP grubunda, CP+AST grubuna göre anlamlı bir şekilde daha fazla dalgalı lif izledik. CP+AST grubundaki bu düşüşün AST'nin muhtemel antioksidan ve antiapoptotik etkisinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Siklofosamid oksidatif stres ve DNA hasarıyla hücreler üzerinde zararlı etkiler göstererek doku morfolojisinde bozulmalara neden olabilir. Agamy ve ark. (2017) çalışmasında 200 mg/kg CP uygulanmış ve miyofibriler çizgilenme kaybı, vasküler konjesyon, hemoraji, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, nekroz ve ödem tespit edilmiştir (154). Mangiferin'in CP ile indüklenen kardiyotoksisite üzerine etkilerini inceleyen bir çalışmada ise kardiyomiyositlerde vakuolizasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, miyokardiyal doku ayrılması ve miyofibril kaybı izlenmiştir (138). Benzer şekilde Moirangthem ve ark. (2017) çalışmasında miyokardiyal kapillerlerde hiperemi, miyofibril kaybı, nekrozis, ödem, vakuolizasyon görülmüştür (155).

Literatürdeki bir başka çalışmada 200 mg/kg CP enjeksiyonundan 10 gün sonra yapılan sakrifikasyonla elde edilen kalp dokularında eozinofilik sitoplazma, vakuolizasyon, miyofibrillerde ayrılma, piknotik ve eksantrik yerleşimli nükleus, vasküler konjesyon görülmüştür (156). El-Sheikh ve ark. (2020) çalışmasında da 200 mg/kg CP uygulamasıyla kalp dokusunda nekroz, vasküler konjesyon, kapiller endotelial hasar, perinükleer vakuolizasyon, miyokardiyal dejenerasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlenmiştir (157). Biz de elde ettiğimiz kalp dokularında literatürdeki bulgularla uyumlu olarak kas liflerinde ayrılma, vasküler konjesyon, sitoplazmik vakuolizasyon ve perinükleer ödem gözlemledik. Bu bulgular CP+AST grubunda CP grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur.

Her ne kadar akut enerji ihtiyacında artışa bağlı tüketim artışı sebebiyle iskemik miyokardiyal hasarda ve glikojen sentaz kinaz 3 β 'nın indüklenmesiyle gelişen glikojen üretiminde azalmaya bağlı CP bağımlı kardiyotoksistide, glikojen miktarında azalma olduğu biliniyor olsa da oksidatif hasar bağımlı lipid peroksidasyonu gibi durumlarda kalp dokusunda glikojenlerin, glikoproteinlerin ve/veya glikokonjugatların arttığı da literatür araştırmalarında görülmektedir (158-162). Nojiri ve ark. (2006) yaptığı çalışmada genetiği değiştirilerek kalp spesifik oksidatif hasar oluşturulan farelerin kalplerinde PAS boyama ile glikojen artışı olduğu gösterilmiştir (161). Upaganlawar ve ark. (2012) çalışmasında ise isopreteranol ile indüklenmiş kalp hasarında lipid profili ve glikoprotein/glikokonjugat içeriği incelemiş ve oksidatif hasar bağımlı artış olduğu sonucuna varılmıştır (162). Bir başka çalışmada ise CP ile indüklenmiş karaciğer hasarında PAS boyamada hepatositlerde glikojen artışı olduğu gösterilmiştir (163). Biz de bu çalışmada kontrol grubuna kıyasla CP ve CP+AST grubunda PAS (+) boyanmada artış saptadık. Bu artışın CP ile oluşan oksidatif hasar kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz. Ancak AST'nin muhtemel antioksidan etkisi ile CP+AST grubunda PAS (+) boyanmadaki bu artışın daha düşük olduğu görüldü.

Siklofosfamid ile indüklenen apoptoz oksidatif stres kaynaklıdır ve bu da kalp yetmezliği gelişiminde rol oynayabilir. Asiri'nin (2010) yaptığı çalışmada 200 mg/kg CP uygulanmasından 1 hafta sonra elde edilen kalp dokularında CP'nin p53 ve Bax'ın mRNA ekspresyonunu arttırıp, Bcl2'ninkini azalttığı ayrıca GSH-Px, CAT ve SOD'u da azalttığı gösterilmiştir (164). Igubal ve ark. (2019) farelere üzerinde yapmış olduğu

bir başka çalışmada 200 mg/kg CP enjeksiyonundan 1 hafta sonra diseke edilen kalp dokularında pNF- κ B, p65 ve kaspaz 3 artışı tespit edilerek CP'nin apoptozu indüklediği sonucuna varılmıştır (165). Avcı ve ark. (2017) silmarin ve curcumin'in CP ile indüklenen kardiyotoksisiteye etkisini gösterdikleri çalışmada ise 7 gün boyunca 30 mg/kg/gün CP uygulanmış ve alınan kalp dokularında apoptoz ve DNA hasarını değerlendirmek için yapılan immünohistokimyasal analizde TUNEL ve kaspaz 3 (+) hücre sayısında, γ H2AX protein ekspresyonunda belirgin bir artış; Bcl-2 (+) hücrelerde ise azalma görülmüştür (166). Çalışmamızda apoptozu değerlendirmek için kullandığımız Anneksin V, apoptotik bir sinyal olan membran fosfolipidi 'fosfatidilserin'e yüksek afiniteli bir fosfolipid bağlayıcı proteindir (167). Yapmış olduğumuz bu değerlendirme sonucunda apoptotik indeksin kontrol ve CP+AST gruplarına kıyasla CP grubunda anlamlı derecede artmış olduğunu ve CP+AST grubunda AST ön muamelesinin apoptozu belirgin olarak azalttığını tespit ettik.

Siklofosfamidin kalp üzerinde görülen toksik etkileri, doz bağımlı olarak 4HCP ve akroleinin sebep olduğu ROS üretimi, GSH tükenmesi ve azalmış aldehit dehidrojenaz aktivitesi ile ilişkilidir (87). Reaktif oksijen türlerinin üretimine aracılık eden enzimlerden biri de NADPH oksidaz'dır ve gp91-phox (NOX2) bu enzimin alt birimlerindendir (96, 97). Kalp yetmezliği ile artmış NADPH oksidaz aktivitesini inceleyen bir klinik çalışmada kalp yetmezliği olan transplantasyon hastalarından eksplante edilen kalp dokuları ile kalp yetmezliği dışı sebeplerle ölen hastalardan alınan kalp dokuları karşılaştırılmıştır. Kalp yetmezlikli hasta dokularında gp91-phox seviyesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (168). Vázquez-Medina ve ark. (2013) yapmış oldukları deneysel çalışmada ise obez sıçan kalplerinde anjiyotensin II tip 1 reseptörleriyle ilişkili Nox2 kaynaklı oksidatif hasarda artış olduğu gösterilmiştir (169). Biz de çalışmamızda Anti-NOX2/gp91phox (+) hücre sayısının kontrol ve CP+AST gruplarına kıyasla CP grubunda anlamlı derecede artmış olduğunu ve CP+AST grubunda AST ön muamelesinin Anti-NOX2/gp91phox (+) hücre sayısını düşürdüğünü flow sitometrik analiz yoluyla gösterdik.

Literatürde AST'nin antioksidan ve antiapoptotik etkilerini gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Tripathi ve ark. (2010) çalışmasında CP ile oluşturulan sıçan karaciğer hasarına karşı 3 gün boyunca 25 mg/kg/gün uygulanan AST'nin koruyucu etkileri incelenmiş ve CP grubu ile kıyaslandığında malondialdehit (MDA)

seviyesinde azalma, GSH seviyesinde artış, DNA fragmentasyonunda, TUNEL (+) hücrelerde ve p53 gen ekspresyonunda azalma olduğu tespit edilerek AST'nin antioksidan ve antiapoptik etkileri gösterilmiştir (170). Alam ve ark. (2017) çalışmasında ise isopreteranol ile indüklenen sıçan kalp hasarında 25 mg/kg AST kullanılmış ve isopreteranol ile oksidatif yönde bozulan NO, APOP, SOD, CAT, GSH seviyeleri AST ile normal düzeylerine dönmüştür (136). Sıçanlarla yapılan bir başka çalışmada yine 25 mg/kg AST uygulamasının doksorubisin ile oluşturulan hipokampal kognitif bozulma üzerine etkileri incelenmiş ve hipokampüsteki antioksidan ve antiapoptotik etkileri MDA, GSH, CAT, kaspaz 3 ve sitokrom c seviyelerinde düzelme ile gösterilmiştir (171). Sıçan kardiyomiyositleri ile in vitro, fareler ile in vivo yapılan deneysel bir çalışmada homosistein ile oluşturulan kardiyak hasar üzerine AST etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın in vitro kısmında AST etkisi ile sıçan hücrelerinde hipodiploid DNA sayısı, TUNEL (+) hücre sayısı, kaspaz 3-7-9 aktivasyonunda ve Bcl 2 ekspresyonunda azalma ile mitokontri bağlantılı apoptozun; ROS ve O₂⁻ seviyelerinde azalma ile oksidatif hasarın homosistein grubuna kıyasla azaldığı gösterilmiştir. İn vivo kısmında ise AST'nin GSH'yı arttırıp, MDA ve kaspaz 3 (+) hücre sayısını azalttığı gösterilerek antioksidan ve antiapoptotik etkileri teyit edilmiştir (172).

Çalışmamız ile elde ettiğimiz veriler ışığında CP, kalp histolojisinde bozulmalara yol açabilir ve doku oksidatif hasar ve apoptoz süreçlerini olumsuz yönde etkileyebilir. Astaksantin ise bu dokularda CP ile indüklenen histolojik bozulmaları, oksidatif hasarı ve apoptozu azaltabilir. Bu koruyucu etkinin daha iyi değerlendirilebilmesi için farklı doz ve uygulama süreleri ile daha ileri analiz yöntemleri kullanılarak yeni çalışmalar gerçekleştirilmesinin uygun olacağı düşüncesindeyiz.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Siklofosfamidin kalp dokusundaki toksik etkilerine karşı AST'nin koruyucu etkilerinin araştırıldığı deneysel çalışmamızın sonucunda,

Siklofosfamid sıçan kalplerinde:

- ✓ Kardiyomiyositlerde dejenerasyon, hipereozinofili, piknotik çekirdekler, dalgalı lifler, perinükleer ödem, vakuolizasyon, kontraksiyon bantları, kas liflerinde ayrılma, vasküler konjesyon
- ✓ PAS (+) boyanmada artış
- ✓ Apoptotik indeks'de artış
- ✓ Anti-NOX2/gp91phox (+) hücre düzeyinde artış izlendi.

Astaksantin uygulanan sıçan kalplerinde:

- ✓ Histolojik bulgulara gerileme
- ✓ PAS (+) boyanmada azalma
- ✓ Apoptotik indeks'de azalma
- ✓ Anti-NOX2/gp91phox (+) hücre düzeyinde azalma izlendi.

Çalışma bulgularından yola çıkılarak yapılacak sonraki çalışmalarda;

1. Bulguların daha da zenginleştirilmesi için elektron mikroskobu, moleküler biyoloji gibi ileri teknoloji ve teknikler kullanılabilir.
2. Astaksantin'in etkisinin daha iyi değerlendirilebilmesi için daha yüksek doz ve uzun süre uygulamaları yapılabilir.
3. Tek başına AST'nin doku üzerine etkisini görebilmek için AST grubu oluşturulabilir.
4. Oksidan ve antioksidan parametrelerin genişletilebilmesi için ek biyokimyasal analizler gerçekleştirilebilir.
5. Apoptozu farklı yollar üzerinden değerlendirebilmek için farklı apoptoz belirleme yöntemleri ilave edilebilir.
6. Siklofosfamid kullanımı ile CP endikasyonlarından biri modellenerek AST'nin hem hastalık üzerine hem CP toksisitesi üzerine etkileri değerlendirilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Gershwin ME, Goetzl EJ, Steinberg, AD. "Cyclophosphamide: use in practice." *Annals of internal medicine*. 1974; 80(4): 531-540.
2. Goldberg, MA, Antin JH, Guinan E, Rapoport JM. "Cyclophosphamide cardiotoxicity: an analysis of dosing as a risk factor." *Blood*. 1986; 68(5): 1114-1118.
3. Chrystal K, Cheong K, Harper P. "Chemotherapy of small cell lung cancer: state of the art." *Current opinion in oncology*. 2004; 16(2): 136-140.
4. Cartei G, Cartei F, Cantone A, Causarano D, Genco G, Tobaldin A, Interlandi G, Giraldi T. "Cisplatin-cyclophosphamide-mitomycin combination chemotherapy with supportive care versus supportive care alone for treatment of metastatic non-small-cell lung cancer." *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1993; 85(10): 794-800.
5. Makhani N, Gorman MP, Branson HM, Stazzone L, Banwell BL, Chitnis T. Cyclophosphamide therapy in pediatric multiple sclerosis. *Neurology*. 2009; 72(24): 2076-2082.
6. Hogan SL, Nachman PH, Wilkman AS, Jennette JC, Falk RJ. Prognostic markers in patients with antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated microscopic polyangiitis and glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1996; 7(1): 23-32.
7. Richmond R, McMillan TW, Luqmani RA. Optimisation of cyclophosphamide therapy in systemic vasculitis. *Clinical pharmacokinetics*. 1998; 34(1): 79-90.
8. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 12. baskı. Ankara: Pelikan Yayıncılık; 2009. 315-343.
9. Fraiser LH, Kanekal S, Kehrer JP. Cyclophosphamide toxicity. *Drugs*. 1991; 42(5): 781-795.
10. Conklin DJ, Haberzettl P, Jagatheesan G, Baba S, Merchant ML, Prough RA, Williams JD, Prabhu SD, Bhatnagar A. Glutathione S-transferase P protects against cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in mice. *Toxicology and applied pharmacology*. 2015; 285(2): 136-148.
11. Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *TRENDS in Biotechnology*. 2003; 21(5): 210-216.

12. Fassett RG, Coombes JS. Astaxanthin in cardiovascular health and disease. *Molecules*. 2012; 17(2): 2030-2048.
13. Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*. 1991; 63(1): 141-146.
14. Spence AP. *Basic Human Anatomy*. Benjamin-Cummings Publishing Company, 1986. 276-335
15. Arıncı K, Alaittin E. *Anatomi*. 3. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2001. 1-15.
16. Sancak B, Cumhuriyet M. *Fonksiyonel Anatomi Baş-Boyun ve İç Organlar*. 3. baskı. Ankara: ODTÜ Yayıncılık; 2002. 141-154.
17. Rizzo DC. *Fundamentals of Anatomy and Physiology*. 4th ed. Boston: Cengage Learning; 2015. 322-347.
18. Drake RL, Vogl AW, Mitchell AWM. *Gray's Anatomy for Students*. 3rd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, Elsevier; 2015. 184-209.
19. Gosling JA, Harris PF, Humpherson JR, Whitmore I, Willan PL. *Human Anatomy, Color Atlas and Textbook*. 6th ed. Elsevier; 2017. 25-70.
20. Standring S. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 41st ed. Elsevier; 2016. 994-1023.
21. Sinnatamby CS. *Last's Anatomy: Regional and Applied*. 12th ed. Elsevier; 2011. 1-35.
22. Hansen JT. *Netter's Clinical Anatomy*. 3rd. ed. Philadelphia: Elsevier; 2014. 87-143.
23. Regan J, Russo A, Putte CV. *Seeley's Essentials of Anatomy & Physiology*. 9th. ed. New York: McGraw-Hill Education; 2016. 318-349.
24. Eşrefoğlu M. *Embriyoloji* 1. baskı. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevleri; 2017. 141-150.
25. Sadler TW. *Langman's Medical Embriyology*. 2010; *Langman Medikal Embriyoloji*. 11. baskı, Çeviren: Başaklar AC, Ankara: Palme Yayıncılık, 2011. 165-200.
26. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West, PH. *Larsen's Human Embryology*. Philadelphia: Elsevier. 2015. 267-303.
27. Cochard LR. *Netter's Atlas of Human Embryology*. Philadelphia: Elsevier; 2012. 83-111.

28. Moore KL, Persaud TVN. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. 2008; Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. 2. baskı, Çeviren: Dalçık H, Yıldırım M. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2009. 285-337.
29. Husain AY. High-Yield Thoracic Pathology. Philadelphia: Saunders-Elsevier; 2012. 486-488.
30. Krishnamurthy R. Embryologic Basis and Segmental Approach to Imaging of Congenital Heart Disease. In: Ho VB, Reddy GP, editors. Cardiovascular İmaging. 1st. ed. Missouri: Saunders-Elsevier; 2011. 3-29.
31. England MA. Life Before Birth. 2nd. ed. London: Mosby -Wolfe; 1996. 104-109.
32. Juraszek AL. Cardiac Embriyology and Genetics. In: Sellke F, Pedro J, Swanson SJ, editors. Sabiston and Spencer Surgery of the Chest. 9th. ed. Philadelphia: Elsevier; 2016. 1861-1873.
33. Conti CR. Netter Collection of Medical Illustrations Cardiovascular System. 2nd. ed. Philadelphia: Elsevier; 2014. 71-90.
34. Lowe JS, Anderson PG. Stevens & Lowe's Human Histology. 4th. ed. Philadelphia: Elsevier; 2015. 143-165.
35. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. 2. baskı. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi; 2016. 1-30.
36. Ovalle WK, Nahirney PC. Netter's Essential Histology. 2008; Netter Temel Histoloji. 1st. ed. Çeviren: Müftüoğlu S, Kaymaz S, Atilla P. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi; 2009.
37. Mescher, A. L. Junqueira's basic histology: text and atlas. 14th. ed. United States of America: Mcgraw-Hill; 2016. 193-214.
38. Eşrefoğlu M. Genel Histoloji. 2. baskı. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi; 2016. 275-304.
39. Kühnel W. Color Atlas of Cytology, Histology and Microscopic Anatomy. 4th. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2003. 158-179.
40. Gartner LP, Hiatt JL. Cell Biology and Histology: Board Review Series. 7th. ed. Baltimore: Wolters Kluwer Health; 2015. 124-142
41. Ross MH, Pawlina W. Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology. Wolters Kluwer Health; 2015. 404-441.

42. Ash JF, Morton DA, Scott SA. Histology: The Big Picture. McGraw Hill Companies; 2013. 89-102.
43. Eroschenko VP, Di Fiore MS. DiFiore's atlas of histology with functional correlations. 2003; diFiore'nin Histoloji Atlası, Fonksiyonel İlişkileriyle. 12. baskı. Çeviren: Demir R. Ankara: Palme Yayıncılık; 2013. 216-238.
44. Berridge BR, Vleet JFV, Herman E. Cardiac, Vascular, and Skeletal Muscle Systems. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, Bolon B, Ochoa R, Mahler BW, editors. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. 3rd. ed. Elsevier; 2013. 1567-1665.
45. Young B, O'Dowd G, Woodford P. Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas. 6.th. ed. Philadelphia: Elsevier; 2014. 144-158.
46. Sabita M, Neelam V. Inderbir Singh's Textbook of Human Histology: With Colour Atlas and Practical Guide. 7th. ed. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2014. 210-223.
47. Peckham M. Histology at a Glance. 1st. ed. West Sussex; John Wiley & Sons; 2011. 42-43.
48. Gartner LP, Hiatt JL. Concise Histology. Philadelphia: Saunders, Elsevier; 2011. 152-167.
49. Gerson SL, Caimi PF, William BM, Creger RJ. Pharmacology and Molecular Mechanisms of Antineoplastic Agents for Hematologic Malignancies. In: Hoffman R, Benz EJ, Silberstein LE, Heslop HE, Weitz JI, Anastasi J, Salama M, editors. Hematology: Basic Principles and Practice. 7th. ed. Philadelphia: Elsevier; 2018. 849-912.
50. Colombo JL, Stolz SM. Treatment of life-threatening primary pulmonary hemosiderosis with cyclophosphamide. Chest. 1992; 102(3), 959-960.
51. Ahmed LA, El-Maraghy SA, Rizk SM. Role of the KATP channel in the protective effect of nicorandil on cyclophosphamide-induced lung and testicular toxicity in rats. Scientific reports. 2015; 5, 14043.
52. Stankiewicz A, Skrzydlewska E, Makiela M. Effects of amifostine on liver oxidative stress caused by cyclophosphamide administration to rats. Drug Metabol Drug Interact. 2002; 19(2), 67-82.
53. Suarez-Almazor ME, Belseck E, Shea B, Tugwell P, Wells GA. Cyclophosphamide for treating rheumatoid arthritis. The Cochrane Database of Systematic Reviews. 2000; (4), CD001157.

54. McCune J, Clowse M. General principles of the use of cyclophosphamide in rheumatic disease. UpToDate, Waltham. 2016; Topic 7963.
55. Smith DR. Cyclophosphamide therapy for multiple sclerosis. Multiple Sclerosis. Humana Press. 2005; 171-191
56. Langford CA. Cyclophosphamide as induction therapy for Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. Clinical & Experimental Immunology. 2011; 164(1): 31-34.
57. Cummins, DL, Mimouni D, Anhalt GJ, Nousari CH. Oral cyclophosphamide for treatment of pemphigus vulgaris and foliaceus. Journal of the American Academy of Dermatology. 2003; 49(2): 276-280.
58. Greenhall GH, Salama AD. What is new in the management of rapidly progressive glomerulonephritis? Clinical kidney journal. 2015; 8(2), 143-150.
59. Anwer F, Yun S, Nair A, Ahmad Y, Krishnadashan R, Deeg HJ. Severe refractory immune thrombocytopenia successfully treated with high-dose pulse cyclophosphamide and eltrombopag. Case reports in hematology. 2015; 2015, 3 pages.
60. Brodsky RA, Chen AR, Dorr D, Fuchs EJ, Huff CA, Luznik L, Smith BD, Matsui WH, Goodman SN, Ambinder RF, Jones RJ. High-dose cyclophosphamide for severe aplastic anemia: long-term follow-up. Blood. 2010; 115(11): 2136-2141.
61. Starzl TE, Putnam CW, Halgrimson CG, Schroter GT, Martineau G, Launois BJ, Corman L, Penn I, Booth AS, Groth CG, Porter KA. Cyclophosphamide and whole organ transplantation in human beings. Surgery, gynecology & obstetrics. 1971; 133(6); 981-991.
62. Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th. ed. The McGraw-Hill Companies; 2011. 1665-1769.
63. Chu E, Sartorelli AC. Cancer Chemotherapy. In: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, editors. Basic & clinical pharmacology. 12th. ed. McGraw-Hill; 2012. 949-975.
64. Barbie DA, Frank DA. Pharmacology of Cancer: Genome Synthesis, Stability, and Maintenance. In: Golan DE, Armstrong EJ, Armstrong AW, editors. Principles of pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy. 4th. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2017. 723-749.
65. Korkmaz A, Topal T, Oter S. Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and

nitrogen species as well as PARP activation. *Cell Biology and Toxicology*. 2007; 23(5): 303-312.

66. Merwid-Ląd A, Książczyńska D, Halon A, Chlebda-Sieragowska E, Trocha M, Szandruk M, Sozański T, Magdalan J, Kopacz M, Kuzniar A, Nowak D, Piesiewicz M, Szeląg A. Impact of morin-5'-sulfonic acid sodium salt on cyclophosphamide-induced gastrointestinal toxicity in rats. *Pharmacological Reports*. 2015; 67(6): 1259-1263.
67. El-Sheikh AA, Morsy MA, Okasha AM. Inhibition of NF- κ B/TNF- α pathway may be involved in the protective effect of resveratrol against cyclophosphamide-induced multi-organ toxicity. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2017; 39(4): 180-187.
68. Specks U, Flaherty KR, Jett JR, Hollingsworth H, Savarese DM. Cyclophosphamide pulmonary toxicity. *UpToDate*. 2017; Topic 4349.
69. Haubitz M. Acute and long-term toxicity of cyclophosphamide. *Transplantationsmedizin*. 2007; 19(2): 26-31.
70. Conklin, DJ, Haberzettl P, Lesgards JF, Prough RA, Srivastava S, Bhatnagar A. Increased sensitivity of glutathione S-transferase P-null mice to cyclophosphamide-induced urinary bladder toxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2009; 331(2): 456-469.
71. Jou YC, Lien FC, Cheng MC, Shen CH, Lin CT, Chen PC. Hyperbaric oxygen therapy for cyclophosphamide-induced intractable refractory hemorrhagic cystitis in a systemic lupus erythematosus patient. *Journal of the Chinese Medical Association*. 2008; 71(4): 218-220.
72. Chakkor A, Salihoune M, Znati K, Mahassini N, Kabbaj N. Low-dose Cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in a multiple sclerosis patient: A case report and literature review. *Int J Gastroenterol Hepatol Transpl Nutr* 2017; 2(iii):14-16.
73. Martinez-Gabarron M, Enriquez R, Sirvent AE, García-Sepulcre M, Millán I, Amorós F. Hepatotoxicity following cyclophosphamide treatment in a patient with MPO-ANCA vasculitis. *Nefrologia*. 2011; 31(4): 496-498.
74. Aubrey DA. Massive hepatic necrosis after cyclophosphamide. *British Medical Journal*. 1970; 3(5722): 588.
75. Malik SW, Myers JL, DeRemee RA, Specks U. Lung toxicity associated with cyclophosphamide use. Two distinct patterns. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996; 154(6): 1851-1856.

76. Matsuyama JR, Kwok KK. A variant of the chemotherapy-associated erythrodysesthesia syndrome related to high-dose cyclophosphamide. 1989; 23(10): 776-779.
77. Hoorweg-Nijman JJ, Delemarre-van de Waal HA, de Waal FC, Behrendt H. Cyclophosphamide-induced disturbance of gonadotropin secretion manifesting testicular damage. *Acta endocrinologica*. 1992; 126(2); 143-148.
78. Tripathi DN, Jena GB. Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells. *Toxicology*. 2008; 248(2-3): 96-103.
79. Wang CL, Wang F, Bosco JJ. Ovarian failure in oral cyclophosphamide treatment for systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 1995; 4(1); 11-14.
80. Rehman MU, Tahir M, Ali F, Qamar W, Lateef A, Khan R, Quaiyoom A, Hamiza OO, Sultana, S. Cyclophosphamide-induced nephrotoxicity, genotoxicity, and damage in kidney genomic DNA of Swiss albino mice: the protective effect of Ellagic acid. *Molecular and cellular biochemistry*. 2012; 365(1-2): 119-127.
81. Shanholtz C. Acute life-threatening toxicity of cancer treatment. *Critical care clinics*. 2001; 17(3): 483-502.
82. Gottdiener JS, Appelbaum FR, Ferrans VJ, Deisseroth A, Ziegler J. Cardiotoxicity associated with high-dose cyclophosphamide therapy. *Archives of internal medicine*. 1981; 141(6): 758-763.
83. Agarwal N, Burkart TA. Transient, high-grade atrioventricular block from high-dose cyclophosphamide. *Texas Heart Institute Journal*. 2013; 40(5): 626.
84. Aronson JK. *Meyler's side effects of analgesics and anti-inflammatory drugs*. Elsevier. 2010
85. Buja LM, Ferrans VJ, Graw RG. Cardiac pathologic findings in patients treated with bone marrow transplantation. *Human pathology*. 1976; 7(1): 17-45.
86. Dhesi S, Chu MP, Blevins G, Paterson I, Larratt L, Oudit GY, Kim DH. Cyclophosphamide-induced cardiomyopathy: a case report, review, and recommendations for management. *Journal of investigative medicine high impact case reports*. 2013; 1(1); 2324709613480346.
87. Kurauchi K, Nishikawa T, Miyahara E, Okamoto Y, Kawano Y. Role of metabolites of cyclophosphamide in cardiotoxicity. *BMC research notes*. 2017; 10(1): 406.

88. Kumar V, Abbas A K, Fausto N, Aster J C. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Eighth ed. Philadelphia : Elsevier Health Sciences ; 2010. 3-42.
89. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Basic Pathology. 2013; Robbins Temel Patoloji. 9. baskı, Çeviren: Tuzlalı S, Güllüoğlu M, Çevikbaş U, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2014. 1-28.
90. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The international journal of biochemistry & cell biology. 2007; 39(1): 44-84.
91. Puigserver P. Signaling Transduction and Metabolomics. In: Hoffman R, Benz EJ, Silberstein LE, Heslop HE, Weitz JI, Anastasi J, Salama M, editors. Hematology: Basic Principles and Practice. 7th. ed. Philadelphia: Elsevier; 2018. 68-78.
92. Baynes JW, Dominiczak MH. Oxygen and Life. In: Baynes JW, Dominiczak MH, editors. Medical Biochemistry. 4th. ed. Philadelphia: Elsevier; 2014. 486-495.
93. Mitchell RN, Cotran RS. Hücre Zedelenmesi, Adaptasyonu ve Ölümü. İçinde: Aker H, çev. Robbins Temel Patoloji. 7. Baskı. Çeviri Editörü: Çevikbaş U. İstanbul: Nobel Kitabevi; 2003. 3-32.
94. Goljan EF. Rapid Review Pathology: with student consult. 4th. ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier; 2014. 8-35.
95. Sanchez H, Barone J. USMLE Step 1 Pathology Lecture Notes. Kaplan Medical; 2013. 5-14.
96. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS - generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiological Reviews. 2007; 87(1): 245 - 313.
97. Champion Y, Paclet MH, Jesaitis AJ, Marques B, Grichine A, Berthier S, Lenormand JL, Lardy B, Stasia MJ, Morel F. New insights into the membrane topology of the phagocyte NADPH oxidase: characterization of an anti-gp91-phox conformational monoclonal antibody. Biochimie. 2007; 89(9): 1145-1158.
98. Buja LM, Krueger GR. Netter's Illustrated Human Pathology with student consult. Updated 2nd. ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2013. 1-14.
99. Xiu P. Crash Course Pathology. 4th. ed. Elsevier- Mosby; 2012. 3-14.

100. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease with student consult. 9th. ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2015. 31-68.
101. Lieberman M, Ricer R. Biochemistry, Molecular Biology, and Genetics: Board Review Series. 6th. ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams&Wilkins; 2014; 109-144.
102. Schneider AS, Szanto PA. Board Review Series: Pathology. 4.th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2014. 1-16.
103. Sattar HA. Fundamentals of Pathology: Medical Course and Step 1 Review. 1st. ed. Chicago: Pathoma.com; 2011. 1-10.
104. Mohan H. Textbook of Pathology. 6th. ed. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2010. 21-60.
105. Bury JP. Disorders Of Growth, Differentiation And Morphogenesis. In: Cross SS, editor. Underwood's Pathology: A Clinical Approach with student consult. 6th. ed. Elsevier Health Sciences; 2013. 57-78.
106. Gong JP, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. Analytical Biochemistry. 1994; 218(2): 314-319.
107. Segawa K, Nagata S. An apoptotic 'eat me'signal: phosphatidylserine exposure. Trends in Cell Biology. 2015; 25(11): 639-650.
108. Kidd P. Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential. Alternative Medicine Review. 2011; 16(4): 355-364.
109. Hussein G, Sankawa U, Goto H, Matsumoto K, Watanabe H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. Journal of Natural Products. 2006; 69(3): 443-449.
110. Ambati RR, Phang SM, Ravi S, Aswathanarayana RG. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—a review. Marine Drugs. 2014; 12(1): 128-152.
111. Dose J, Matsugo S, Yokokawa H, Koshida Y, Okazaki S, Seidel U, Eggersdorfer M, Rimbach G, Esatbeyoglu T. Free radical scavenging and cellular antioxidant properties of astaxanthin. International Journal of Molecular Sciences. 2016; 17(1): 103.

112. Naguib YM. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48(4): 1150-1154.
113. McNulty HP, Byun J, Lockwood SF, Jacob RF, Mason RP. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2007; 1768(1): 167-174.
114. Lyons NM, O'Brien NM. Modulatory effects of an algal extract containing astaxanthin on UVA-irradiated cells in culture. *Journal of Dermatological Science*. 2002; 30(1): 73-84.
115. Zhang L, Wang H. Multiple mechanisms of anti-cancer effects exerted by astaxanthin. *Marine Drugs*. 2015; 13(7): 4310-4330.
116. Lee SJ, Bai SK, Lee KS, Namkoong S, Na HJ, Ha KS, Han JA, Yim SV, Chang K, Kwon YG, Lee SK, Kim YM. Astaxanthin Inhibits Nitric Oxide Production and Inflammatory Gene Expression by Suppressing I κ B Kinase-dependent NF- κ B Activation. *Molecules and Cells*. 2003; 16(1): 97-105.
117. Ohgami K, Shiratori K, Kotake S, Nishida T, Mizuki N, Yazawa K, Ohno S. Effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2003; 44(6): 2694-2701.
118. Wang X, Willén R, Wadström T. Astaxanthin-rich algal meal and vitamin C inhibit *Helicobacter pylori* infection in BALB/cA mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000; 44(9): 2452-2457.
119. Uchiyama K, Naito Y, Hasegawa G, Nakamura N, Takahashi J, Yoshikawa T. Astaxanthin protects β -cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. *Redox Report*. 2002; 7(5): 290-293.
120. Park JS, Mathison BD, Hayek MG, Massimino S, Reinhart GA, Chew BP. Astaxanthin stimulates cell-mediated and humoral immune responses in cats. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2011; 144(3-4): 455-461.
121. Huang LJ, Chen WP. Astaxanthin ameliorates cartilage damage in experimental osteoarthritis. *Modern Rheumatology*. 2015; 25(5): 768-771.
122. Wu H, Niu H, Shao A, Wu C, Dixon BJ, Zhang J, Yang S, Wang Y. Astaxanthin as a potential neuroprotective agent for neurological diseases. *Marine Drugs*. 2015; 13(9): 5750-5766.
123. Kishimoto Y, Yoshida H, Kondo K. Potential anti-atherosclerotic properties of astaxanthin. *Marine drugs*. 2016; 14(2): 35.

124. Chalyk NE, Klochkov VA, Bandaletova TY, Kyle NH, Petyaev IM. Continuous astaxanthin intake reduces oxidative stress and reverses age-related morphological changes of residual skin surface components in middle-aged volunteers. *Nutrition Research*. 2017; 48: 40-48.
125. Islam MA, Al Mamun MA, Faruk M, Islam MTU, Rahman MM, Alam MN, Rahman AFMT, Reza HM, Alam MA. Astaxanthin ameliorates hepatic damage and oxidative stress in carbon tetrachloride-administered rats. *Pharmacognosy Research*. 2017; 9(1): 84-91.
126. Ishikawa S, Hashizume K, Nishigori H, Tezuka Y, Sanbe A, Kurosaka D. Effect of astaxanthin on cataract formation induced by glucocorticoids in the chick embryo. *Current Eye Research*. 2015; 40(5): 535-540.
127. Anderson ML. A preliminary investigation of the enzymatic inhibition of 5 α -reductase and growth of prostatic carcinoma cell line LNCap-FGC by natural astaxanthin and saw palmetto lipid extract in vitro. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*. 2005; 5(1): 17-26.
128. Otani H. Site-specific antioxidative therapy for prevention of atherosclerosis and cardiovascular disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013; 2013-796891.
129. Gross GJ, Lockwood SF. Cardioprotection and myocardial salvage by a disodium disuccinate astaxanthin derivative (Cardax™). *Life Sciences*. 2004; 75(2): 215-224.
130. Preuss HG, Echard B, Yamashita E, Perricone NV. High dose astaxanthin lowers blood pressure and increases insulin sensitivity in rats: are these effects interdependent? *International Journal of Medical Sciences*. 2011; 8(2): 126.
131. Li W, Hellsten A, Jacobsson LS, Blomqvist HM, Olsson AG, Yuan XM. Alpha-tocopherol and astaxanthin decrease macrophage infiltration, apoptosis and vulnerability in atheroma of hyperlipidaemic rabbits. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2004; 37(5): 969-978.
132. Yoshida H, Yanai H, Ito K, Tomono Y, Koikeda T, Tsukahara H, Tada N. Administration of natural astaxanthin increases serum HDL-cholesterol and adiponectin in subjects with mild hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 2010; 209(2): 520-523.
133. Choi HD, Youn YK, Shin WG. Positive effects of astaxanthin on lipid profiles and oxidative stress in overweight subjects. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2011; 66(4): 363-369.

134. Choi HD, Kim JH, Chang MJ, Kyu-Youn Y, Shin WG. Effects of astaxanthin on oxidative stress in overweight and obese adults. *Phytotherapy Research*. 2011; 25(12): 1813-1818.
135. Bhatt L, Sebastian B, Joshi V. Mangiferin protects rat myocardial tissue against cyclophosphamide induced cardiotoxicity. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*. 2017; 8(2): 62-67.
136. Alam MN, Hossain MM, Rahman MM, Subhan N, Mamun MA, Ulla A, Reza HM, Alam MA. Astaxanthin prevented oxidative stress in heart and kidneys of isoproterenol-administered aged rats. *Journal of dietary supplements*. 2018 Jan 2;15(1):42-54.
137. Sila A, Ghilissi Z, Kamoun Z, Makni M, Nasri M, Bougatef A, Sahnoun Z. Astaxanthin from shrimp by-products ameliorates nephropathy in diabetic rats. *European journal of nutrition*. 2015 Mar 1;54(2):301-7.
138. Bancroft JD, Cook HC, Turner DR. *Manual of Histological Techniques and Their Diagnostic Application*. 2nd. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994. 425-427.
139. Demir R, Yilmazer S, Öztürk M, Üstünel İ, Demir N, Korgun ET, Akkoyunlu G. *Histolojik Boyama Teknikleri -Başvuru Kitabı-*. 4th. ed. Ankara: Palme Yayıncılık; 2001. 1-50.
140. Bancroft JD, Layton C. The hematoxyline and eosin. In: Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD, editors. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 7th. ed. Churchill Livingstone Elsevier; 2011. 173-186.
141. Tokatli F, Uzal C, Doganay L, Kocak Z, Kaya M, Ture M, Kurum T, Alkaya F, Karadağ H, Kutlu K. The potential cardioprotective effects of amifostine in irradiated rats. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 2004; 58(4): 1228-1234.
142. Rauscher R, Edenharder R, Platt KL. In vitro antimutagenic and in vivo anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 1998 Mar 16;413(2):129-42.
143. Cazin B, Gorin NC, Laporte J, Gallet B, Douay L, Lopez M, Najman A, Duhamel G. Cardiac complications after bone marrow transplantation. A report on a series of 63 consecutive transplantations. *Cancer*. 1986 May 15;57(10):2061-9.
144. Federman DG, Henry G. Chemotherapy-induced myocardial necrosis in a patient with chronic lymphocytic leukemia. *Respiratory medicine*. 1997 Oct 1;91(9):565-7.

145. Todorova V, Vanderpool D, Blossom S, Nwokedi E, Hennings L, Mrak R, Klimberg VS. Oral glutamine protects against cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in experimental rats through increase of cardiac glutathione. *Nutrition*. 2009 Jul 1;25(7-8):812-7.
146. Çetik Yıldız S, Keskin C, Şahintürk V, Ayhanci A. Cardioprotective effects of *Hypericum triquetrifolium* Turra. against cyclophosphamide related cardiotoxicity in rats. *Marmara Pharmaceutical Journal*. 2018 Sep 1;22(3).
147. Gunes S, Sahinturk V, Karasati P, Sahin IK, Ayhanci A. Cardioprotective effect of selenium against cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rats. *Biological trace element research*. 2017 May 1;177(1):107-14.
148. Buja LM, Ferrans VJ, Graw Jr RG. Cardiac pathologic findings in patients treated with bone marrow transplantation. *Human pathology*. 1976 Jan 1;7(1):17-45.
149. Gado AM, Adam AN, Aldahmash BA. Cardiotoxicity induced by cyclophosphamide in rats: protective effect of curcumin. *Journal of Research in Environmental Science and Toxicology*. 2013;2(4):87-95.
150. Bouchardy B, Majno G. Histopathology of early myocardial infarcts: a new approach. *The American journal of pathology*. 1974 Feb;74(2):301.
151. Eichbaum FW. 'Wavy' myocardial fibers in spontaneous and experimental adrenergic cardiopathies. *Cardiology*. 1975;60(6):358-65.
152. Miller LM, Gal A. Cardiovascular system and lymphatic vessels. *Pathologic basis of veterinary disease*. 2017:561.
153. Omole JG, Ayoka OA, Alabi QK, Adefisayo MA, Asafa MA, Olubunmi BO, Fadeyi BA. Protective effect of kolaviron on cyclophosphamide-induced cardiac toxicity in rats. *Journal of evidence-based integrative medicine*. 2018 Feb 19;23:2156587218757649.
154. El-Agamy DS, Elkablawy MA, Abo-Haded HM. Modulation of cyclophosphamide-induced cardiotoxicity by methyl palmitate. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2017 Feb 1;79(2):399-409.
155. Moirangthem Rs, Gunindro N, Takhellambam Ds. Cardioprotective Effect Of *Phyllanthus Fraternus* Leaves Extract Against Cyclophosphamide-Induced Myocardial Injury In Rats. *Asian J Pharm Clin Res*. 2017;10(12):280-5.
156. Bashandy MA, Zedan OI. Role of Alpha Lipoic Acid on Cyclophosphamide Induced Cardiotoxicity in Adult Male Albino Rat: Histological Study. *Egyptian Journal of Histology*. 2020 Dec 1;42(4):888-99.

157. El-Sheikh AA, Abdelzaher WY, Gad AA, Abdel-Gaber SA. Purine versus non-purine xanthine oxidase inhibitors against cyclophosphamide-induced cardiac and bone marrow toxicity in rats. *Human & Experimental Toxicology*. 2020 Mar;39(3):249-61.
158. Schaefer S, Ramasamy R. Glycogen utilization and ischemic injury in the isolated rat heart. *Cardiovascular research*. 1997 Jul 1;35(1):90-8.
159. Iqbal A, Iqbal MK, Sharma S, Ansari MA, Najmi AK, Ali SM, Ali J, Haque SE. Molecular mechanism involved in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity: Old drug with a new vision. *Life sciences*. 2019 Feb 1;218:112-31.
160. Embi N, Rylatt DB, Cohen P. Glycogen Synthase Kinase-3 from Rabbit Skeletal Muscle: Separation from Cyclic-AMP-Dependent Protein Kinase and Phosphorylase Kinase. *European Journal of biochemistry*. 1980 Jun;107(2):519-27.
161. Nojiri H, Shimizu T, Funakoshi M, Yamaguchi O, Zhou H, Kawakami S, Ohta Y, Sami M, Tachibana T, Ishikawa H, Kurosawa H. Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Nov 3;281(44):33789-801.
162. Upaganlawar A, Balaraman R. Effects of Lagenaria siccassaria fruit juice on lipid profile and glycoprotein contents in cardiotoxicity induced by isoproterenol in rats. *Toxicology international*. 2012 Jan;19(1):15.
163. Sakr SA, Mahran HA, Abo-El-Yazid SM. Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) ameliorates cyclophosphamide-induced histopathological, histochemical and biochemical changes in the liver of albino mice. *Egyptian Journal of Experimental Biology (Zoology)*. 2009;5:331-9.
164. Asiri YA. Probucol attenuates cyclophosphamide-induced oxidative apoptosis, p53 and Bax signal expression in rat cardiac tissues. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2010;3(5):308-16.
165. Iqbal A, Sharma S, Ansari MA, Najmi AK, Syed MA, Ali J, Alam MM, Ahmad S, Haque SE. Nerolidol attenuates cyclophosphamide-induced cardiac inflammation, apoptosis and fibrosis in Swiss Albino mice. *European journal of pharmacology*. 2019 Nov 15;863:172666.
166. Avci H, Epikmen ET, İpek E, Tunca R, Birincioglu SS, Akşit H, Sekkin S, Akkoç AN, Boyacioglu M. Protective effects of silymarin and curcumin on cyclophosphamide-induced cardiotoxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2017 Jun 14;69(5):317-27.
167. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutellingsperger C. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on

- early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *Journal of immunological methods*. 1995 Jul 17;184(1):39-51.
168. Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel JL, Hasenfuss G, Shah AM. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003 Jun 18;41(12):2164-71.
 169. Vázquez-Medina JP, Popovich I, Thorwald MA, Viscarra JA, Rodriguez R, Sonanez-Organis JG, Lam L, Peti-Peterdi J, Nakano D, Nishiyama A, Ortiz RM. Angiotensin receptor-mediated oxidative stress is associated with impaired cardiac redox signaling and mitochondrial function in insulin-resistant rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2013 Aug 15;305(4):H599-607.
 170. Tripathi DN, Jena GB. Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2010 Feb 1;696(1):69-80.
 171. El-Agamy SE, Abdel-Aziz AK, Wahdan S, Esmat A, Azab SS. Astaxanthin ameliorates doxorubicin-induced cognitive impairment (chemobrain) in experimental rat model: impact on oxidative, inflammatory, and apoptotic machineries. *Molecular neurobiology*. 2018 Jul 1;55(7):5727-40.
 172. Fan CD, Sun JY, Fu XT, Hou YJ, Li Y, Yang MF, Fu XY, Sun BL. Astaxanthin attenuates homocysteine-induced cardiotoxicity in vitro and in vivo by inhibiting mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Frontiers in physiology*. 2017 Dec 12;8:1041.