

**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**OZON VE 1,25 (OH)<sub>2</sub> VİTAMİN D’NİN**  
**DOKSORUBİSİN İLE OLUŞTURULAN TOKSİK MİYOKARDİT**  
**MODELİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**  
**DR. EFTAL EGEMEN AKBULUT**

**DANIŞMAN**  
**PROF.DR. DOLUNAY GÜRSES**

**DENİZLİ - 2020**

**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**OZON VE 1,25 (OH)<sub>2</sub> VİTAMİN D’NİN**  
**DOKSORUBİSİN İLE OLUŞTURULAN TOKSİK MİYOKARDİT**  
**MODELİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. EFTAL EGEMEN AKBULUT**

**DANIŞMAN**

**PROF.DR. DOLUNAY GÜRSES**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’nin 22.10.2019 tarih ve 2019TIPF021 nolu kararı ile desteklenmiştir.

**DENİZLİ - 2020**

**Prof. Dr. Dolunay Gürses danışmanlığında Dr. EFTAL EGEMEN AKBULUT tarafından yapılan “Ozon ve 1,25 (OH)<sub>2</sub> Vitamin D'nin Doksorubisin ile Oluşturulan Toksik Miyokardit Modeli Üzerine Etkilerinin Araştırılması ” başlıklı tez çalışması 10/08/2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.**

**BAŞKAN: Prof. Dr. Dolunay GÜRSES**

**ÜYE: Prof. Dr. Güleendam KOÇAK**

**ÜYE: Dr. Öğr. Üyesi Münevver YILMAZ**

**Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. 10/08/2020**

**Prof. Dr. ....  
Pamukkale Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Dekanı**

## TEŞEKKÜRLER

Uzmanlık eğitimim boyunca üstün bilgi, beceri ve tecrübelerini aktararak, gelişimimde büyük emeği olan, tez çalışmam sırasında beni yönlendiren, her türlü yardım ve bilimsel desteğini esirgemeyen değerli tez danışmanım Prof. Dr. Dolunay GÜRSES'e,

Asistanlığım süresince üstün bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi hocalarım,

Tez hazırlık aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle büyük desteklerini benden esirgemeyen, saygıdeğer hocalarım; Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE'ye ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Esin AVCI'ya

Uyumlu bir çalışma ve yardımlaşma içerisinde bulunduğum sevgi ve dostluklarıyla asistanlık sürecini mutlulukla tamamlama yardımcı olan tüm asistan doktor arkadaşlarıma ve yandal uzmanı büyüklerime,

Ekibimizde emekleriyle her zaman büyük değeri olan tüm hemşire, personel, laborant ve teknisyen arkadaşlarıma,

Bu günlere gelmemde büyük emeği geçen, hayatımın her döneminde sonsuz güven ve sevgileriyle bana güç ve destek veren, hayatıma anlam katan; sevgili anneme, babama ve ablama,

Bu zorlu süreçte desteğiyle yükümü hafifleten, her zaman yanımda olup bana güç veren, sevgisiyle hayatımı renklendiren sevgili eşime, sonsuz teşekkür ederim.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- ADR** : Adriyamisin  
**ACEİ** : Anjiotensin Konverting Enzim İnhibitörleri  
**DNR** : Daunorubisin  
**DNA** : Deoksiribonükleik Asit  
**DOX** : Doksorubisin  
**EF** : Ejeksiyon Fraksiyonu  
**EKG** : Elektrokardiyografi  
**FS** : Fraksiyonel Kısalma  
**FGF-23** : Fibroblast Büyüme Faktörü 23  
**GSH-Px**: Glutasyon Peroksidaz  
**H&E** : Hematoksilen&Eozin  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Hidrojen Peroksid  
**OH<sup>-</sup>** : Hidroksil Radikali  
**IVIG** : İntravenöz İmmunglobulin  
**IL-10** : İnterlökin 10  
**LOPs** : Lipit Oksidasyon Ürünleri  
**Nf-Kb** : Nükleer Faktörü kB  
**NADP** : Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat  
**PTH** : Parathormon  
**RANKL**: Reseptör Aktivatörü Nükleer Faktör kB Ligandı  
**RNA** : Ribonükleik Asit  
**SOR** : Serbest Oksijen Radikalleri  
**SPSS** : Statistical Package For The Social Sciences  
**SOD** : Süperoksid Dismutaz  
**TAS** : Total Antioksidan Seviye  
**TNF-  $\alpha$**  : Tümör Nekroz Faktör-  $\alpha$   
**TOS** : Total Oksidan Seviye  
**TUNEL** : Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated UTP nick end labeling  
**VDR** : Vitamin D Reseptörü

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
TABLolar DİZİNİ .....	ix
ŞEKİL VE RESİM DİZİNİ .....	x
ÖZET .....	xiii
SUMMARY .....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. MİYOKARDİT .....	3
2.1.1. Epidemiyoloji .....	3
2.1.2. Etiyoloji .....	3
2.1.3. Klinik .....	4
2.1.4. Tanı .....	6
2.1.5. Tedavi .....	6
2.2. DOKSORUBİSİN .....	7
2.2.1. Biyokimyasal Yapısı .....	7
2.2.2. Metabolizması .....	8
2.2.3. Etki Mekanizması .....	9
2.2.4. Yan Etkileri .....	9
2.2.4.a Doksorubisin Kaynaklı Kardiyotoksisite .....	10
2.2.4.b Kardiyotoksisite Patogenezi .....	11
2.2.4.c Kardiyotoksisite Patogenezinde Oksidatif Stres Hipotezi .....	13
2.2.4.d Kardiyotoksisite Klinik Tipleri .....	15
2.2.4.e Kardiyotoksisite Risk Faktörleri .....	16
2.2.4.f Kardiyotoksisite Tanısı .....	16
2.2.5. Doksorubisin İlişkili Kardiyotoksisiteden Korunma ve Tedavide Kullanılabilecek Ajanlar .....	18

2.3. OZON .....	20
2.3.1. Genel Bilgiler .....	20
2.3.2. Medikal Ozonun Elde Edilmesi .....	20
2.3.3. Medikal Ozonun Etki Mekanizması .....	21
2.3.4. Ozon ile İndüklenen Hiperoksinin Terapötik Etkileri .....	23
2.3.5. Medikal Ozon Tedavisi Uygulama Dozları ve Klinik Uygulamaları .....	25
2.3.6. Medikal Ozon Tedavisi Uygulama Yöntemleri .....	26
2.3.7. Medikal Ozon Tedavisinin Yan Etki ve Kontrendikasyonları .....	27
2.4. D VİTAMİNİ .....	28
2.4.1. Genel Bilgiler .....	28
2.4.2. D Vitamini Metabolizması ve 1,25 (OH) <sub>2</sub> Vitamin D Elde Edilişi .....	29
2.4.3. D Vitamini Dengesi Sağlanması .....	30
2.4.4. 1,25 (OH) <sub>2</sub> Vitamin D Etki Mekanizması .....	31
2.4.5. 1,25 (OH) <sub>2</sub> Vitamin D Etkileri .....	31
2.4.6. 1,25 (OH) <sub>2</sub> Vitamin D ve Kardiyovasküler Hastalıklar .....	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	36
3.1. ÇALIŞMA GRUPLARININ OLUŞTURULMASI .....	37
3.2. OZON VERİLMESİ .....	39
3.3. HASTALIK BELİRTİLERİNİN İZLENMESİ VE ANTROPOMETRİK ÖLÇÜMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ .....	40
3.4. EKOKARDİYOĞRAFİ İLE DEĞERLENDİRME .....	41
3.5. RATLARIN SAKRİFİKASYONU .....	43
3.6. BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLERİN ÇALIŞILMASI .....	44
3.7. KALBİN HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ .....	45
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ .....	46
4. BULGULAR .....	47
4.1. ANTROPOMETRİK ÖLÇÜMLER .....	47
4.2. HASTALIK BELİRTİLERİNİN İZLENMESİ .....	49
4.3. BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLER .....	49
4.3.1. Kardiyak Hasar Göstergeleri .....	49
4.3.2. Enflamatuvar ve Antiinflamatuvar Sitokin Seviyeleri .....	51
4.3.3. Oksidan ve Antioksidan Enzim Düzeyleri .....	52
4.4. EKOKARDİYOĞRAFİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI .....	55
4.5. KALBİN HİSTOLOJİK İNCELENMESİ .....	58
5. TARTIŞMA .....	74

6. SONUÇLAR.....	86
KAYNAKLAR.....	89



## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Miyokardit etiyojisinde yer alan etkenler .....	5
<b>Tablo 2.</b> Doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisitenin önlenmesinde araştırılan ajanlar.....	19
<b>Tablo 3.</b> Kalsitriol moleküler ve hücresele etkileri .....	33
<b>Tablo 4.</b> Düşük serum D vitamini düzeyinin kardiyak etkileri .....	34
<b>Tablo 5.</b> Çalışma grupları ve ilaç uygulamaları.....	38
<b>Tablo 6.</b> Billingham histopatolojik dejenerasyon skorlaması.....	45
<b>Tablo 7.</b> Gruplara ait antropometrik ölçümler .....	47
<b>Tablo 8.</b> Grupların kardiyak hasar göstergeleri.....	50
<b>Tablo 9.</b> Grupların enflamatuvar ve antienflamatuvar sitokin seviyeleri.....	51
<b>Tablo 10.</b> Grupların oksidan ve antioksidan enzim düzeyleri .....	53
<b>Tablo 11.</b> Grupların ekokardiyografik ölçümleri .....	56
<b>Tablo 12.</b> H&E boyama ile Billingham dejenerasyon skorlamasına ait veriler.....	58
<b>Tablo 13.</b> TUNEL boyamaya ait apoptozis verileri .....	59
<b>Tablo 14.</b> Grupların Kaspaz 3 ekspresyonunun H skoru sonuçları.....	60

## ŞEKİL VE RESİM DİZİNİ

Şekil 1	Doksorubisin ve Daunorubisin biyokimyasal yapısı.....	8
Şekil 2.	Doksorubisinin Nükleer ve Mitokondrial DNA üzerine etkileri.....	12
Şekil 3.	Doksorubisinin kinon halkasının semikinon radikaline metabolize olması.....	13
Şekil 4.	Fe <sup>+3</sup> – Fe <sup>+2</sup> indirgenmesi.....	14
Şekil 5.	Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları .....	14
Şekil 6.	Medikal ozonun etki mekanizması.....	23
Şekil 7.	Ergokalsiferol ve kolekalsiferol moleküler yapıları.....	28
Şekil 8.	D vitamini metabolizması ve 1,25 (OH) <sub>2</sub> Vitamin D sentezi .....	30
Şekil 9.	1,25 (OH) <sub>2</sub> Vitamin D klasik olmayan etkileri .....	34
Şekil 10.	Çalışmanın zaman çizelgesi .....	37
Şekil 11.	Grupların kilo değişimi (son vücut ağırlığı – ilk vücut ağırlığı).....	48
Şekil 12.	Grupların kalp ağırlıkları.....	48
Şekil 13.	Grupların kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranı .....	48
Şekil 14.	Grupların Troponin T düzeyleri.....	50
Şekil 15.	Grupların NT-pro BNP düzeyleri.....	50
Şekil 16.	Grupların TNF- $\alpha$ düzeyleri .....	52
Şekil 17.	Grupların IL-10 düzeyleri .....	52
Şekil 18.	Grupların MDA düzeyleri.....	54
Şekil 19.	Grupların TOS düzeyleri.....	54
Şekil 20.	Grupların SOD düzeyleri.....	54
Şekil 21.	Grupların GSH-Px düzeyleri.....	54
Şekil 22.	Grupların TAS düzeyleri .....	55
Şekil 23.	Grupların LVes düzeyleri.....	57

Şekil 24. Grupların LVED düzeyleri.....	57
Şekil 25. Grupların EF düzeyleri .....	57
Şekil 26. Grupların FS düzeylerinin karşılaştırılması.....	57
Şekil 27. TUNEL boyamaya ait apopitozis indeksleri .....	59
Şekil 28. Kaspaz-3 ekspresyonunun H-skorları .....	60
Şekil 29. Troponin T düzeyi ile kilo farkı arasındaki ilişki .....	64
Şekil 30. Troponin T düzeyi ile kalp ağırlığı arasındaki ilişki .....	64
Şekil 31. Troponin T düzeyi ile kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranı arasındaki ilişki .....	64
Şekil 32. NT-Pro BNP düzeyi ile son vücut ağırlığı arasındaki ilişki .....	65
Şekil 33. NT-Pro BNP düzeyi ile kilo farkı arasındaki ilişki.....	65
Şekil 34. NT-Pro BNP düzeyi ile kalp ağırlığı arasındaki ilişki.....	65
Şekil 35. NT-Pro BNP düzeyi ile kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranı arasındaki ilişki ..	65
Şekil 36. Troponin T düzeyi ile TNF- $\alpha$ arasındaki ilişki .....	66
Şekil 37. NT-Pro BNP düzeyi ile TNF- $\alpha$ arasındaki ilişki .....	66
Şekil 38. NT-Pro BNP düzeyi ile IL-10 arasındaki ilişki.....	66
Şekil 39. Troponin T düzeyi ile MDA arasındaki ilişki.....	67
Şekil 40. Troponin T düzeyi ile TOS arasındaki ilişki.....	67
Şekil 41. NT-Pro BNP düzeyi ile MDA arasındaki ilişki.....	67
Şekil 42. NT-Pro BNP düzeyi ile TOS arasındaki ilişki .....	67
Şekil 43. Troponin T düzeyi ile SOD arasındaki ilişki .....	68
Şekil 44. Troponin T düzeyi ile GSH-Px arasındaki ilişki .....	68
Şekil 45. Troponin T düzeyi ile TAS arasındaki ilişki.....	68
Şekil 46. NT-Pro BNP düzeyi ile SOD arasındaki ilişki .....	69
Şekil 47. NT-Pro BNP düzeyi ile GSH-Px arasındaki ilişki .....	69
Şekil 48. NT-Pro BNP düzeyi ile TAS arasındaki ilişki.....	69
Şekil 49. Troponin T düzeyi ile LVED arasındaki ilişki .....	70

<b>Şekil 50.</b> Troponin T düzeyi ile LVes arasındaki ilişki .....	70
<b>Şekil 51.</b> Troponin T düzeyi ile EF arasındaki ilişki .....	70
<b>Şekil 52.</b> Troponin T düzeyi ile FS arasındaki ilişki.....	70
<b>Şekil 53.</b> NT-Pro BNP düzeyi ile LVED arasındaki ilişki .....	71
<b>Şekil 54.</b> NT-Pro BNP düzeyi ile LVes arasındaki ilişki.....	71
<b>Şekil 55.</b> NT-Pro BNP düzeyi ile EF arasındaki ilişki.....	71
<b>Şekil 56.</b> NT-Pro BNP düzeyi ile FS arasındaki ilişki .....	71
<b>Şekil 57.</b> Troponin T düzeyi ile Billingham dejenarasyon skorlaması arasındaki ilişki.....	72
<b>Şekil 58.</b> Troponin T düzeyi ile TUNEL boyamaya ait apopitotik indeks arasındaki ilişki ..	72
<b>Şekil 59.</b> Troponin T düzeyi ile kaspaz-3 ekspresyonu H skorları arasındaki ilişki.....	72
<b>Şekil 60.</b> NT-Pro BNP düzeyi ile Billingham dejenarasyon skorlaması arasındaki ilişki .....	73
<b>Şekil 61.</b> NT-Pro BNP düzeyi ile TUNEL boyamaya ait apopitotik indeks ilişkisi .....	73
<b>Şekil 62.</b> NT-Pro BNP düzeyi ile kaspaz-3 ekspresyonu H skorları arasındaki ilişki .....	73

<b>Resim 1.</b> Pamukkale Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı bakım odası ve kafesleri..	36
<b>Resim 2.</b> Ozon jeneratörü ve oksijen tüpü.....	39
<b>Resim 3.</b> İntraperitoneal ozon enjeksiyonu.....	39
<b>Resim 4.</b> Deneklerin vücut ağırlığı ve kalp ağırlığının ölçülmesi.....	40
<b>Resim 5.</b> Deneklerin vücut ağırlığı ve kalp ağırlığının ölçülmesi.....	40
<b>Resim 6.</b> Ratların ekokardiyografi ile değerlendirilmesi .....	41
<b>Resim 7.</b> Ratların ekokardiyografi ile değerlendirilmesi.....	42
<b>Resim 8.</b> Ratların ekokardiyografi ile yapılan hesaplamaları.....	42
<b>Resim 9.</b> Anterior torakotomi işlemi.....	43
<b>Resim 10.</b> İntrakardiyak kan alınması.....	43
<b>Resim 11.</b> Kalbin çıkarılması .....	43
<b>Resim 12.</b> Hematoksin & Eozin ile boyanan kalp dokusu.....	61
<b>Resim 13.</b> Kalp kasında TUNEL yönteminin yapıldığı dokular.....	62
<b>Resim 14.</b> Kalp kasında kaspaz-3 ekspresyonunu ve dağılımı gösteren kesitler .....	64

## ÖZET

### OZON VE 1,25 (OH)<sub>2</sub> VİTAMİN D'NİN DOKSORUBİSİN İLE OLUŞTURULAN TOKSİK MİYOKARDİT MODELİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Eftal Egemen AKBULUT

Dokсорubisin (DOX), özellikle hematolojik maligniteler ve solid tümörler gibi neoplazilerin tedavisinde uzun yıllardır kullanılan antrasiklin türevi kemoterapötik ajanlar olup klinik kullanımı toksik miyokardit gibi ciddi kardiyak yan etkiler nedeniyle kısıtlanmaktadır. Ozon ve D vitamini, deneysel çalışmalarda antioksidan etkileri gösterilmiş medikal ajanlardır. Çalışmamızda, patogenezinde oksidan stresin rol oynadığı dokсорubisin ilişkili toksik miyokardit modeli üzerinde ozon ve D vitamininin etkilerini araştırmayı amaçladık.

Bu amaçla; 285-350 gram ağırlığındaki 40 adet erkek Wistar Albino cinsi rat, her grupta sekiz adet rat olacak şekilde beş gruba ayrıldı. Gruplar; DOX, kontrol, ozon, D vitamini ve ozon+D vitamini şeklindeydi. Kontrol grubu haricindeki tüm gruplara, deneyin 8. gününde, 15 mg/kg tek doz dokсорubisin intraperitoneal (IP) olarak uygulanarak toksik miyokardit modeli oluşturuldu. Deneyin 1-7. ve 9-11. günlerinde; kontrol grubuna 5 ml/kg dozunda serum fizyolojik, ozon grubuna 0,7-1 mg/kg, 60 µg/ml konsantrasyonda ozon, D vitamini grubuna 0.2 µg/kg/gün dozunda 1,25 (OH)<sub>2</sub> D vitamini, Ozon+D vitamini grubuna ise her iki tedavi IP olarak uygulandı. Deneyin 11. günündeki son enjeksiyonlar sonrasında, ratlar anestezi altında ekokardiyografi ile değerlendirildi. Aynı gün intrakardiyak kan örnekleri alınarak sakrifikasyon gerçekleştirildi. Ratların başlangıçtaki ilk vücut ağırlıkları ve sakrifikasyon öncesi son vücut ağırlıkları ölçüldü. Alınan kan örneklerinde; Troponin T, NT-Pro BNP, MDA, TOS, SOD, GSH-Px, TAS, TNF-α ve IL-10 düzeyleri ELİSA yöntemiyle değerlendirildi. Sakrifikasyon sonrası ratların kalbi çıkarıldı, kalp ağırlıkları ölçüldü. Çıkarılan kalp dokuları; Hemotoksilen-Eozin, TUNEL ve kaspaz-3 ile boyanarak histopatolojik olarak değerlendirildi.

İlk ve son vücut ağırlıkları açısından gruplar arasında farklılık saptanmadı (p>0,05). Dokсорubisin uygulanan grupların kilo verdiği, kontrol grubunun kilo aldığı görüldü. DOX grubunda ilk ve son vücut ağırlıkları arasındaki fark en fazla olmakla birlikte; kalp ağırlığı ve kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranı kontrol, ozon ve/veya D

vitamini tedavileri verilen gruplara göre daha azdı ( $p<0,01$ ). Troponin T, NT-Pro BNP, MDA, TOS ve TNF- $\alpha$  düzeyleri DOX grubunda kontrol grubuna göre belirgin yüksekti ( $p<0,05$ ). Ozon, D vitamini ve kombine tedaviler verilen gruplarda ise bu yükselişin gerilediği görüldü. DOX grubunda kontrol grubuna göre düşük saptanan SOD, GSH-Px, TAS ve IL-10 düzeylerinin ( $p<0,01$ ), ozon, D vitamini ve kombine tedaviler verilen gruplarda daha yüksek olduğu izlendi. Ekokardiyografik değerlendirmede; DOX grubunun LVED, LVES çapları artmış, EF ve FS değerleri azalmıştı ( $p<0,05$ ). Ozon ve/veya D vitamini tedavileri uygulanan gruplarda ise bu parametrelerin kontrol grubuna yakın değerlere sahip olduğu gözlemlendi ( $p>0,05$ ). Histopatolojik olarak DOX grubunda; Billingham dejenarasyon skoru, apoptotik indeks ve H-skorunda artış izlendi ( $p=0,000$ ). Ozon, D vitamini ve kombine tedavileri verilen gruplarda bu artışın gerilediği görüldü ( $p>0,05$ ).

Sonuçlarımız, ozon ve D vitamininin doksorubisin ilişkili kardiyotoksisite üzerine kardiyoprotektif etki göstererek faydalı olabileceğini desteklemektedir.

**Anahtar kelimeler:** Doksorubisin, Kardiyotoksisite, Ozon, D vitamini, Rat

## SUMMARY

### RESEARCH OF THE EFFECTS OF OZONE AND 1,25 (OH)<sub>2</sub> VITAMIN D ON DOXORUBISIN-INDUCED TOXIC MYOCARDITIS MODEL

Dr. Eftal Egemen AKBULUT

Doxorubicin (DOX) is an anthracycline-derived chemotherapeutic agent that which has been used especially in the treatment of neoplasms such as hematological malignancies and solid tumors for many years. Its clinical use is limited due to serious cardiac side effects such as toxic myocarditis. Ozone and vitamin D are medical agents with antioxidant effects in experimental studies. In our study, we aimed to investigate the effects of ozone and vitamin D on the DOX-induced toxic myocarditis model, where oxidative stress plays a role in its pathogenesis.

For this purpose, forty male Wistar Albino rats (285-350 g) were divided into five groups (n=8 per group). Groups were in the form of DOX, control, ozone, vitamin D, and ozone + vitamin D. A toxic myocarditis model was created by administering 15 mg/kg single dose of doxorubicin intraperitoneally (IP) to all groups except the control group, on the 8<sup>th</sup> day of the experiment. On the 1-7<sup>th</sup> and 9-11<sup>th</sup> days of the experiment, we apply; 5 ml/kg of saline in the control group, 0.7-1 mg/kg dose at 60 µg/ml concentration of ozone in the ozone group, 0.2 µg/kg dose of 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamin D for the vitamin D group, and both treatments were applied to ozon+vitamin D group. After the last injections on the 11<sup>th</sup> day of the experiment, the rats were evaluated under anesthesia with echocardiography. On the same day, intracardiac blood samples were taken and sacrifice was performed. The initial body weights of rats and their final body weights before sacrifice were measured. Troponin T, NT-Pro BNP, MDA, TOS, SOD, GSH-Px, TAS, TNF-α, and IL-10 levels were performed by the ELISA method in the blood samples taken. After sacrifice, the hearts of the rats were removed and their heart weights were measured. Removed heart tissues

were dyed with Hematoxylin-Eosin, TUNEL and caspase-3 for histopathological evaluation.

There was no difference between the groups in terms of first and last body weights ( $p>0.05$ ). It was observed that, the groups that treated with doxorubicin lost weight and the control group gained weight. Although the difference between the first and last body weights in the DOX group is the greatest; heart weight and heart weight to final body weight ratio were less than the control group, ozone and/or vitamin D treatments group ( $p<0.01$ ). Troponin T, NT-Pro BNP, MDA, TOS, and TNF- $\alpha$  levels were significantly higher in the DOX group compared to the control group ( $p<0.05$ ). This levels were decreased in the groups that were given ozone, vitamin D and combined treatments. SOD, GSH-Px, TAS and IL-10 levels which were determined lower in the DOX group compared to the control group ( $p<0.01$ ), were found higher in the groups given ozone, vitamin D and combined treatments. In echocardiographic evaluation; DOX group's LVED, LVED diameters increased, EF and FS values decreased ( $p<0.05$ ). In the groups where ozone and/or vitamin D treatments were applied, these parameters were observed to have values close to the control group ( $p>0.05$ ). Histopathologically, in the DOX group; Billingham degeneration score, apoptotic index and H-score increased ( $p=0.000$ ). This increase was observed to decrease in the groups given ozone, vitamin D and combined therapies ( $p>0.05$ ).

Our results support that ozone and vitamin D could be beneficial by showing cardioprotective effect on doxorubicin-induced cardiotoxicity.

**Keywords:** Doxorubicin, Cardiotoxicity, Ozone, Vitamin D, Rat



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Miyokardit; çeşitli enfeksiyöz veya nonenfeksiyöz ajanlar aracılığıyla miyozit hücrelerinde meydana gelen, dejenerasyon ve nekroz ile karakterize enflamasyondur. Sağlıklı çocuklarda kalp yetersizliğinin en sık nedeni olup tahmini insidansı 1-2/100.000'dir. Etiyolojisinde: sıklıkla viral etkenler olmak üzere enfeksiyöz ajanlar; daha nadir olarak ise, ilaç toksisitesi veya otoimmün hastalıklar gibi nonenfeksiyöz olaylar yer almaktadır (1). Birçok ilaç kardiyak toksisite yaratarak toksik miyokardite neden olur. Bunlardan en önemlileri antrasiklinlerdir (2).

Antrasiklinler, malignite tedavisinde uzun yıllardan bu yana gerek tek başlarına, gerekse sitotoksik ajanlarla kombinasyon şeklinde kullanılan antineoplastik ilaçlardır. Doksorubisin (DOX), antrasiklin türevi kemoterapötik ilaçlardan en yaygın kullanılanıdır. Özellikle hematolojik maligniteler ve solid tümörler gibi çeşitli neoplazmların tedavisinde kullanılan en etkili kemoterapötik ajanlardandır. Bununla birlikte; klinik faydası, doza bağımlı bir yan etkisi olan kardiyotoksisite insidansı ile belirgin bir şekilde engellenmektedir (3).

Doksorubisine bağlı ortaya çıkan kardiyotoksisitenin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, günümüzde en yaygın kabul edilen görüş; serbest oksijen radikallerinin (SOR) ve oksidatif stresin hücresel hasar gelişimine neden olduğudur. Ayrıca doksorubisin, endojen antioksidan yanıtın da azalmasına yol açmaktadır (4). Doksorubisine bağlı kardiyotoksisite patogenezinde serbest radikallerin ve antioksidan enzimlerin rol oynadığına dair bulguların belirlenmesi, kardiyotoksisitenin önlenmesinde antioksidan tedavilerin araştırılmasını gündeme getirmiş ve bu konuda çok sayıda çalışma yapılmıştır (5-9).

Ozon (O<sub>3</sub>) üç oksijen atomundan oluşan ve atmosferde kararsız halde bulunan, güçlü okside edici özellikte bir gazdır. Medikal ozon, ozonun tıp alanında kullanılan şekli olup immünmodülatör, antienflamatuvar, antimikrobiyal ve antioksidan etkilerinin olduğu bildirilmiştir (10-12). Miyokardiyal

iskemi/reperfüzyon ile ilişkili hasarların akut ozon tedavisi ile azaltılabileceği ve antioksidan enzim üretimini uyararak SOR etkisini nötralize ettiği gösterilmiştir (11).

D vitamini steroid yapılı bir prohormondur. Klasik etki olarak, renal ve intestinal kalsiyum transportunun ve kemik mineralizasyonun düzenlenmesi ile serum kalsiyum ve fosfor seviyelerinin korunmasını sağlar. Klasik olmayan etki olarak ise; ksenobiyotik detoksifikasyon, antioksidan etki, antimikrobiyal etki, immünoregülasyon, antienflamatuvar ve antikanserojen etkiler gibi çeşitli etkileri bulunmaktadır (13,14).

Ozon ve D vitamininin antioksidan etkileri bilinmesine rağmen (10-14); patogenezinde oksidatif stresin rol oynadığı doksorubisin ile ilişkili kardiyotoksisite üzerine etkilerinin araştırıldığı oldukça az sayıda çalışma mevcuttur (15-19). Çalışmamızda; DOX ile oluşturulan toksik miyokardit modeli üzerine ozon ve 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamin D'nin etkilerini araştırmayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. MİYOKARDİT

Miyokardit terimi ilk olarak 1837 yılında Joseph Freidrich Sobernheim tarafından kullanılmış olsa da güncel tanımı; 1995 yılında “*Dünya Sağlık Örgütü/Uluslararası Kardiyoloji Derneği*” ve “*Uluslararası Kardiyoloji Federasyonu*” tarafından, kalp kasının enflamatuvar bir hastalığı olarak kabul edilmiş olup histolojik, immünolojik ve immünohistokimyasal kriterleri bildirilmiştir (1).

#### 2.1.1 Epidemiyoloji

Miyokarditin klinik belirtileri heterojendir ve tanı koyulması oldukça zordur. Miyokardit vakalarının önemli ölçüde atlandığı tahmin edilmektedir. Uluslararası Hastalık Sınıflaması (dokuzuncu revizyon) kodlarını kullanan yakın tarihli bir çalışmada, miyokarditin global prevalansının yılda 100.000 hastada  $\approx 22$  olduğu tahmin edilmiştir (1). İtalya’da yapılan bir otopsi çalışmasında ise miyokardit sıklığı %0,1-5,6 arasında bildirilmiştir (20).

#### 2.1.2 Etiyoloji

Etiyolojide en sık enfeksiyöz nedenler, enfeksiyöz nedenler içerisinde de en sık viral enfeksiyonlar yer almaktadır. Viral etkenlerin sıklığı endomiyokardiyal biyopsi sonuçları ile incelendiğinde, zaman içerisinde etken sıklığında değişiklikler olduğu gözlemlenmiştir. Daha önceki yıllarda; Cocksackievirus, Adenovirus (özellikle serotip 2 ve 5) ve Enterovirus (Koksakivirüs A ve B, Ekovirus ve Poliovirus) miyokardit etiolojisinde en sık viral etkenler olarak bildirilirken, günümüzde en sık karşılaşılan viral etkenin Parvovirus B19 olduğu saptanmıştır. Bu virüsler haricinde; İnfluenza A, İnfluenza H1N1, Sitomegalovirus, Herpes Simplex Virüs, Hepatit C virüsü, Rubella, Rubeola, Respiratuar Sinsityal Virüs, Varicella, Epstein-Barr virüs, HIV, Human Herpes Virüs gibi birçok virüs miyokardit etiolojisinde yer almaktadır. Ayrıca bakteriler, riketsialar, protozoalar, parazitler, mantarlar gibi çeşitli ajanlar da miyokardit etiolojisinde yer alan diğer enfeksiyöz etkenlerdir (21).

Nonenfeksiyöz nedenler arasında; ilaç toksisitesi, ilaç hipersensitivite reaksiyonları, otoimmün veya kollojen doku hastalıkları gibi etkenler yer almaktadır (21). Birçok ilaç kardiyak toksisite yaratarak toksik miyokardite neden olmaktadır. Antrasiklin grubu ilaçlar toksik miyokardite yol açan ilaçlar arasında en sık görülenlerdir (2). Miyokardit etiolojisinde yer alan etkenler Tablo 1'de gösterilmiştir.

### **2.1.3 Klinik**

Miyokardit kliniği, asemptomatik olabileceği gibi kardiyojenik şok, aritmiler ve ani ölüme kadar uzanabilen geniş bir kliniğe de sahip olabilir. Klinik bulgular yaş gruplarına göre oldukça farklılık gösterebilir. Yenidoğan ve süt çocukluğu dönemindeki hastalarda iştahsızlık, ateş, huzursuzluk, çevreye karşı ilgisizlik, solukluk ve terleme gibi spesifik olmayan bulgular izlenmektedir. Fizik muayenede siyanoz, hepatomegali, takipne ve taşikardi gibi konjestif kalp yetersizliği bulgularına sık rastlanılır. Çocukluk dönemi ve adölesan hastalarda genellikle başvurudan 1-2 hafta öncesine ait bir viral hastalık öyküsü vardır. Başlangıç semptomları halsizlik, iştahsızlık, subfebril ateş, solukluk, terleme, çarpıntı, cilt döküntüsü, egzersiz intoleransı ve genel bir yorgunluk hali olabilir. Hastalığın ilerlemesiyle solunumsal problemler belirgin hale gelmeye başlar. Senkop ve kardiyak kollapsa bağlı ani ölümler görülebilir. Konjestif kalp yetersizliğinin bulguları saptanabilir. Yenidoğanların aksine, juguler venöz dolgunluk ve istirahat taşikardisi bu yaş grubunda daha belirgindir. Atriyal fibrilasyon, supraventriküler taşikardi, ventriküler taşikardi ve atriyoventriküler bloklar gibi ritim bozuklukları izlenebilir (21,22).

**Tablo 1.** Miyokardit etiolojisinde yer alan etkenler (21)

<b>Enfeksiyöz Etkenler</b>	<b>Virüsler:</b> Enterovirüsler (Koksaki A-B,Ekovirüs,Poliiovirüs) Adenovirüs Parvovirüs B19 Sitomegalovirüs Herpes virüs İnfluenza A ve H1N1 Human Herpes Virüs 6 Varisella Paramiksovirüs Rubella Mumps Virüs Rabies virüs Hepatit virüs B-C Respiratuvar Sinsitiyal Virüs HIV Epstain-Barr Virüsü	<b>Virüs Dışı Nedenler:</b> <b>A) Bakteriyeel :</b> Meningokok Klebsiella Leptospira Mikoplazma Salmonella Clostridia Mikobakteri Brucella Legionella pneumophila Streptokok Actinomices <b>B) Riketsial:</b> Rickettsia rickettsii Rickettsia tsutsugamushi <b>C) Protozoal:</b> Tripanosoma crusie Toxoplazmozis Amibiazis <b>D) Diğer parazitler:</b> Toxocara canis Şistozomiazis Sistiserkozis Ekinokokkus Visseral larva migrans Trişinozis <b>E) Fungus ve mayalar:</b> Koksidiomikozis Histoplazmozis Kandida	
	<b>İlaçlar:</b> Antrasiklinler Trisiklik antidepresanlar Amfoterisin B Metildopa Fenitoin Penisilin Sülfanamidler Siklofosfamid Asetezolamid İndometazin Tetrasiklin İzoniazid Karbimazol	<b>Otoimmün Hastalıklar:</b> Romatoid Artrit Akut Romatizmal Ateş Kawasaki hastalığı Sarkoidoz Ülseratif Kolit Sistemik Lupus Eritromatozis Skleroderma Bağ dokusu hastalıkları	<b>Toksinler:</b> Akrep toksini Difteri toksini

#### **2.1.4 Tanı**

Çocuklarda miyokardit tanısı klinik bulguların çeşitliliği nedeniyle oldukça zor koyulmaktadır. Bu yüzden tanı koyulabilmesi için klinisyenin şüphesi yaklaşması önem arz eder. Tanı, klinik bulgulara ek olarak yardımcı tetkiklerle desteklenmelidir. Miyokardit şüphesi olan hastalarda ilk olarak kardiyak hasar göstergeleri olan kardiyak biyobelirteçler ve kalp kasının sinirsel ileti sistemini gösteren elektrokardiyografi değerlendirilmelidir. Kardiyak enzimlerde artış ve/veya elektrokardiyografide miyokarditi düşündüren bulguları olan hastalarda, miyokardit tanısını destekleyici olarak; telekardiyografi, ekokardiyografi ve kardiyak manyetik rezonans görüntüleme gibi görüntüleme araçları ve etiyolojiye yönelik olarak viral seroloji belirteçleri kullanılmalıdır. Bununla beraber; invaziv yöntem olan endomiyokardiyal biyopsi, günümüzde miyokardit tanısında altın standarttır. Ancak yöntemin komplikasyona açık olması ve duyarlılığının düşük olması gibi kullanımı sınırlandıran faktörler nedeniyle, tanı için sık başvuru olan bir yöntem olamamıştır (22,23).

#### **2.1.5 Tedavi**

Miyokardiyal hasara bağlı olarak gelişen kardiyak aritmiler ve ani ölümlerin egzersizle tetiklenebilmesi nedeniyle, aktivite kısıtlaması tedavinin önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Hızlı ilerleyen ya da çok ağır vakalarda hastanın hemodinamik stabilizasyonunu sağlamak için bazen mekanik ventilatör ve mekanik dolaşım destekleri gerekebilmektedir. Bu uygulamalar ayrıca kalp nakli için geçiş evresi olarak da kullanılmaktadır. Kompense konjestif kalp yetmezliği olan hastalar taburcu olurken diüretikler, anjiyotensin konverting enzim inhibitörleri (ACEİ), anjiyotensin reseptör blokerleri (ARB) verilebilir fakat kardiyovasküler kollaps ve fulminan kalp yetmezliği ile gelen hastalarda bu ajanlar kontrendikedir. Belirgin atriyal veya ventriküler aritmilerle gelen hastalarda amiodaron gibi spesifik antiaritmikler kullanılmalı ve implante kardioverter defibrilatör yerleştirilmesi planlanmalıdır. Akut veya fulminan miyokardit tedavisinde intravenöz immunglobulin (IVIG) kullanılabilir (24). IVIG etkinliğine dair değişken sonuçlar bildirilmiş olsa da, yakın zamanda yayınlanan bir Cochrane meta-analizinde; çocuk

hastaların IVIG tedavisine yetişkin hastalara kıyasla daha olumlu yanıt verdiği bildirilmiştir (25). Kortikosteroidlerin kardiyak fonksiyonu artırdığı rapor edilmekle birlikte çocuk hastalardaki veriler ikna edici değildir. İmmüsupresan tedavi alan hastalarda relaps olduğu dikkati çekmiştir. Skleroderma, lupus, polimiyozit, sarkoidoz gibi otoimmün hastalıkların yol açtığı miyokardit olgularında immüsupresif tedavi ile olumlu sonuçlar alınmaktadır. İmmüsupresif tedaviden yararlanan bir grup da giant cell miyokardittir. Miyokardit tedavisinde spesifik antiviral tedavinin yeri yoktur (24).

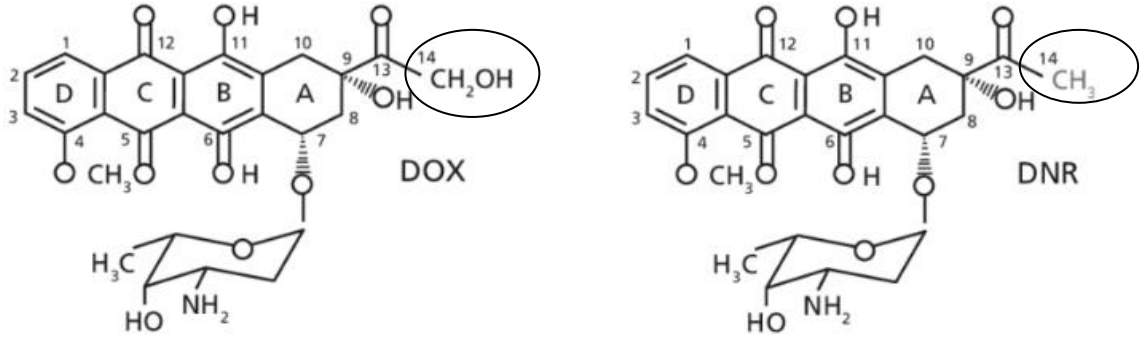
Tedavide henüz kesinleşmiş spesifik ya da standart bir tedavi protokolü bulunmamakla birlikte kabul gören en önemli tedavi, destek tedavisidir. Tedavi arayışları halen devam etmektedir (24).

## **2.2. DOKSORUBİSİN**

Doksorubisin (ticari adıyla Adriamisin, Doxorubisin), 1960'lı yıllarda Streptomyces Peuceitius isimli bakteriden izole edilmiş, antrasiklin türevi bir kemoterapötik ilaçtır. Geniş spektrumlu bir kemoterapötik ajan olması nedeniyle çeşitli malignitelerde uzun yıllardır kullanılmaktadır (3).

### **2.2.1. Biyokimyasal Yapısı**

Antrasiklin molekülleri, tetrasiklik çekirdek ve ona bağlı amino şekerden (daunosamin) oluşurlar. İlacın kırmızı renkte oluşu içeriğindeki tetrasiklik çekirdek nedeniyledir. Gruptaki tüm üyelerin tetrasiklik halkaya komşu kinon ve hidrokinon grupları bulunmakla birlikte kimyasal yapıdaki küçük farklılıklar, bu ilaçların farklı aktivite spektrumlarından sorumludur (3). Bulunan ilk antrasiklin bileşeni olan Daunorubisin (DNR) molekülündeki 14. karbonun hidroksil grubu alması ile DOX meydana gelir (Şekil 1). Antrasiklinler planar yapıları ve fizyolojik pH'da pozitif yüklü olmaları sayesinde DNA çift sarmalı arasına girerek yapısal değişikliklere neden olabilmektedir (3,4).



**Şekil 1.** Dokсорubisin (DOX) ve Daunorubisin (DNR) biyokimyasal yapısı: Daunorubisin molekülündeki 14. karbonun hidroksil grubu alması ile DOX meydana gelir (4).

### 2.2.2. Metabolizması

DOX, diğer tip uygulamalarla doku nekrozuna yol açması ve absorpsiyonunun kısıtlı olması nedeniyle sadece intravenöz yolla uygulanmaktadır. Uygulandıktan sonra karaciğer, dalak ve miyokard gibi dokularda plazmadan 5–10 kat yüksek konsantrasyona ulaşsa da; en yüksek konsantrasyonuna tümör dokusunda ulaşır. Kan beyin bariyerini ise geçmez (26).

Damar içi uygulamadan hemen sonra karaciğerde, indirgenme tepkimeleri gerçekleşir: karbonil kökü ana yapıdan ayrılarak, dokсорubisinol ve daunorubisinol'e parçalanır. Bu bileşikler ana bileşikten daha az aktiftir. DOX ve ana metaboliti olan dokсорubisinol, yaklaşık %75 oranında plazma proteinlerine bağlanır (27).

En önemli eliminasyonu karaciğerden safra yoluyla, metabolitlerinin bir kısmı böbreklerden (%3-10) ve geri kalanı da dışkıyla (%40-50) atılır. Bu nedenle karaciğer ve böbrek fonksiyon bozukluğu olan hastalarda doz ayarlaması yapılması gerekir (27).



### 2.2.3. Etki Mekanizması

Doksorubisin, DNA ile ilişkili enzimlere bağlanarak etki gösterir. DNA zincirinin transkripsiyon sırasında açılmasını sağlayan topoizomerez II enzimini inhibe eder. DNA interkalasyonu ile guanin ve sitozin baz çiftleri arasına girerek DNA replikasyonunu durdurur, böylelikle transkripsiyon ve translasyon engellenmiş olur. Doksorubisin hem nükleer DNA, hem de mitokondriyal DNA üzerine olan interkalasyon yeteneği ile bu etkiyi gösterir (3).

Topoizomerez II'nin inhibisyonu sonucunda DNA'da meydana gelen hasar apoptotik yolları indükler ve hücre ölümü gerçekleşir. Doksorubisin ayrıca, hücre bölünme siklusundaki S ve G2 fazlarına etki ederek hızla çoğalan tümör hücrelerinin replikasyonunu engeller ve antitümör etki oluşturur (3).

Doksorubisinin yapısındaki kinon, NADPH oksidoredüktaz ile tepkimeye girerek semikinon radikaline dönüşür. Semikinon radikalleri kararsız bileşiklerdir ve oksijenle reaksiyona girmeleri sonucunda DNA hasarına neden olan süperoksit ve hidrojen peroksit oluştururlar (3).

Doksorubisinin diğer bir etkisi demir metabolizması üzerinedir. DOX; demir şelatörüdür ve demiri bağlar. Oluşan DOX-demir kompleksi, hidrojen peroksitin reaktif hidroksil radikallerine dönüşümünü katalize eder. Böylece, doksorubisin aracılı serbest radikallerin salınımı, DNA hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanan oksidatif strese neden olabilir (3). Bu mekanizmalar, doksorubisini güçlü bir antikanser ilacı haline getirirken, beraberinde birçok yan etkiye de neden olmasını sağlamaktadır (3,28).

### 2.2.4. Yan Etkileri

DOX tedavisine bağlı olarak akut veya kronik dönemde birçok yan etki ortaya çıkar. Kullanımı ile ilişkili en yaygın yan etkiler akut bulantı ve kusma, alopesi, nörolojik rahatsızlıklar (halüsinasyonlar, vertigo, baş dönmesi), kümülatif kardiyotoksisite ve kemik iliği aplazisidir. DOX'un kemik iliği üzerine baskılayıcı

etkileri, lökopeni (esas olarak granülositopeni), nötropeni, trombositopeni ve anemi şeklindedir. Ancak bu etkilerin şiddeti ve ortaya çıkışı DOX dozuna ve hastanın kemik iliğinin rejenerasyon kapasitesine bağlıdır. Aşırı duyarlılık (ateş, titreme, ürtiker), tırnaklarda hiperpigmentasyon, lakrimasyon ve konjonktivit de görülebilir (28,29).

Doksorubisinin sürekli olarak küçük bir damara uygulanması fleboskleroz gibi problemler ortaya çıkabilir. Yerel dokularda veya organlarda ekstrevasyonlar meydana gelirse, nekroz ortaya çıkabilir. Ekstrevasyonun diğer yan etkileri arasında selülit, tromboflebit ve ağrı nedeniyle gelişen eklem hareket kısıtlılığı yer almaktadır (29).

Doksorubisin tedavisinde ilacın kullanım süresi ve dozuna bağımlı olarak gelişebilen ve tedaviyi sınırlandıran en önemli yan etki, kardiyotoksisitedir (29).

#### **2.2.4.a- Doksorubisin Kaynaklı Kardiyotoksisite**

Kullanıma girdiği günden bu yana DOX kaynaklı kardiyotoksisite kemoterapinin önemli bir komplikasyonu olmuştur (28,29). Yapılan bir çalışmada antrasiklin tedavisi sonrası genel kardiyotoksisite insidansı %9 olarak bildirilmiştir (30). Pediatrik yaş grubunun incelendiği başka bir çalışmada ise, tedaviye bağlı kardiyovasküler komplikasyon oranı %4,5-7 arasında bildirilmiştir (31).

DOX kaynaklı kardiyak toksisite, doza bağımlı gelişir ve kardiyak etkilenmeler bireysel farklılıklar gösterir. Kardiyak hasarın ağırlığı; ilacı kan kalp bariyerindeki endotelial hücrelerden dışarı pompalayan P-glikoprotein ve diğer ATP-bağlayıcı kaskat proteinlerinin seviyesi ile ters orantılıdır (32,33). Yapılan çalışmada kardiyotoksisite insidansı; 400 mg/m<sup>2</sup> kümülatif dozda %5, 500 mg/m<sup>2</sup>lik dozda %16, 550 mg/m<sup>2</sup>lik dozda %26 ve 700 mg/m<sup>2</sup>lik dozda ise %48 olarak bildirilmiştir (34). Kardiyotoksisite riskini en aza indirmek için maksimum kümülatif dozun; 18 yaş ve üzeri hastalarda 550 mg/m<sup>2</sup>, 18 yaşından küçük çocuklarda ise 300 mg/m<sup>2</sup> ile sınırlandırılması önerilmiş olsa da, 210 mg/m<sup>2</sup> kadar düşük dozlarda dahi kardiyotoksisite gelişebildiği gösterilmiştir (35,36).

DOX kaynaklı kardiyotoksisite klinikte non-spesifik elektrokardiyografik değişikliklerinden, aritmiler, miyokard infarktüsü, miyokardit, perikardit, kardiyomiyopati ve konjestif kalp yetmezliğine kadar geniş çeşitlilik gösterebilir. Semptomlar akut olarak tedavi sırasında veya tedaviden sonraki birkaç gün ile hafta içerisinde ortaya çıkabileceği gibi, tedavi sonrası aylar hatta yıllar sonrasında da izlenebilir (37).

#### **2.2.4.b - Kardiyotoksisite Patogenezi**

Kardiyotoksisiteyle ilgili birçok çalışma yapılmış olsa da, patogeneziyle ilgili mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır. DOX kaynaklı kardiyotoksisite, farklı potansiyel yolları olan çok aşamalı bir süreç olarak değerlendirilmektedir (3,30-33).

Antrasiklinlerin neden olduğu kardiyak hasar mekanizması antitümöral etkilerinden farklıdır. Antitümöral etkide hedef yapı DNA olarak karşımıza çıkarken; kardiyotoksisite patogenezinde sitoplazmik ve nükleer membranlar, mitokondri, sarkoplazmik retikulum ve mitokondriyal/nükleer DNA gibi birden fazla hedef karşımıza çıkmaktadır (Şekil 2) (38).

Kardiyotoksisite gelişiminde ana mekanizma tam olarak anlaşılamamış olup bu konuda birden çok mekanizma bildirilmiştir (3,38-42). Öne çıkan mekanizmalar, doksorubisinin:

1. Mitokondriyal DNA'da delesyon ve mutasyonlara neden olarak enerji üretim defekti geliştirmesi (39),

2. Sirtüin proteinin inhibisyonu aracılığıyla mitokondriyal lipit oksidasyonunu bozması, ATP ve fosfokreatinin üretimini engelleyerek miyokard kontraktilitesinde azalmaya neden olması (39,40),

3. Yapısındaki kinon halkasının semikinon radikaline metabolize olarak hücre içi demir ile şelasyon yapması sonucunda oluşan SOR ve hidroksil radikallerinin,

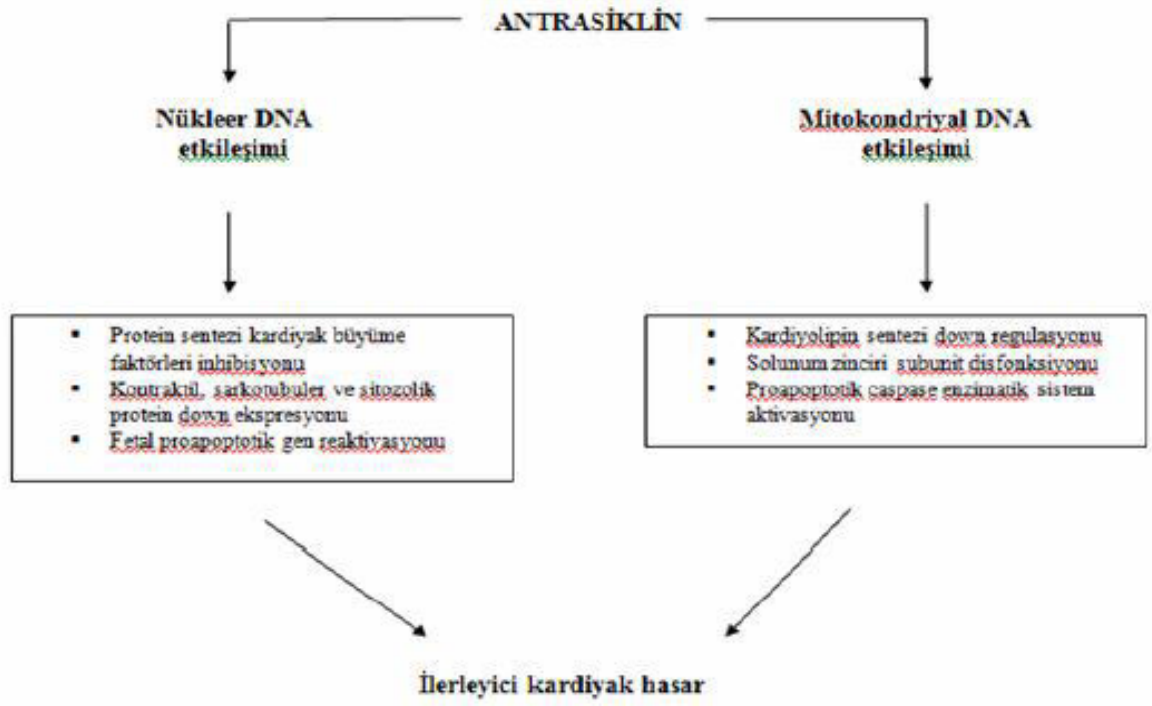
mitokondriyal membran hasarına yol açması, enzimatik yolağın bozulması, lipid peroksidasyonunun artması (Şekil 3) (41),

4. Miyozit hücrelerini SOR hasarından koruyan glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) enzimlerinin bu hücrelerde az olması veya bulunmaması (40),

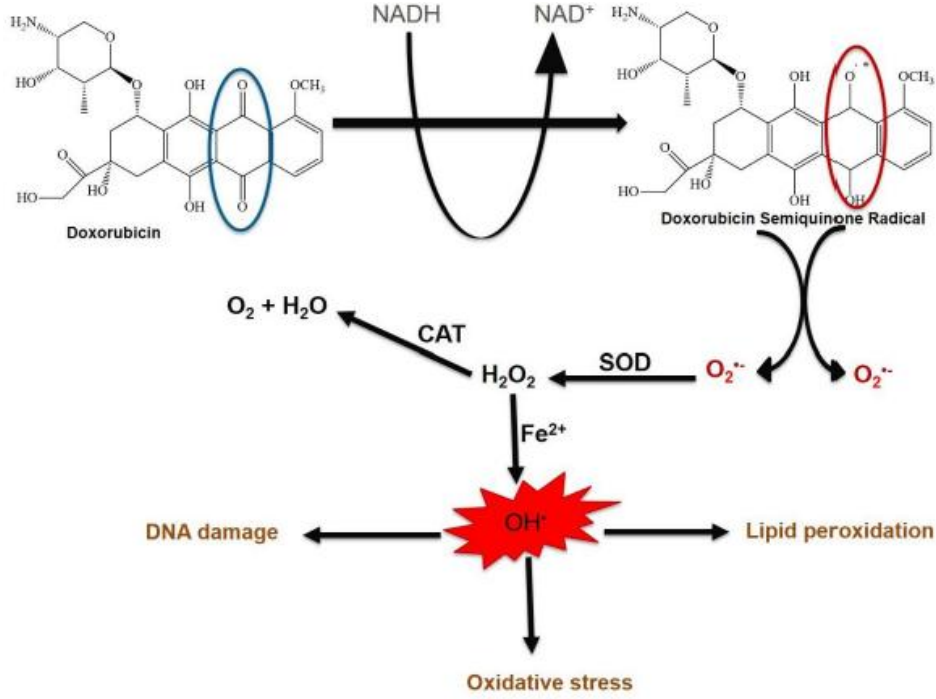
5. Metaboliti olan doksorubisinolün, sarkoplazmik retikulumda kalsiyum kanallarının sayısını azaltması ve fonksiyonunu engellemesi, miyokardın kontraksiyon ve relaksasyon fazlarını değiştirmesi (40),

6. Kardiyomiyositlerde alfa aktin, miyozin hafif ve ağır zincirleri, troponin I ve desmin proteinlerinin azalması sonucu miyofibriler kayıp gelişmesi ve miyofibriler kasılma yeteneğinin azalması (42),

7. Kardiyomiyositlerde hidrojen peroksit ve superoksit dismutaz artışına neden olarak, proapoptotik p53 gen aktivasyonu ve apoptozu indüklemesi (3,40).



Şekil 2. Doksorubisinin Nükleer ve Mitokondriyal DNA üzerine etkileri (38).



**Şekil 3.** Doksorubisinin kinon halkasının semikinon radikaline metabolize olması ve Haber-Weiss reaksiyonu ile hidroksil radikali (OH<sup>•</sup>) açığa çıkması (41).

#### 2.2.4.c - Kardiyotoksisite Patogenezinde Oksidatif Stres Hipotezi

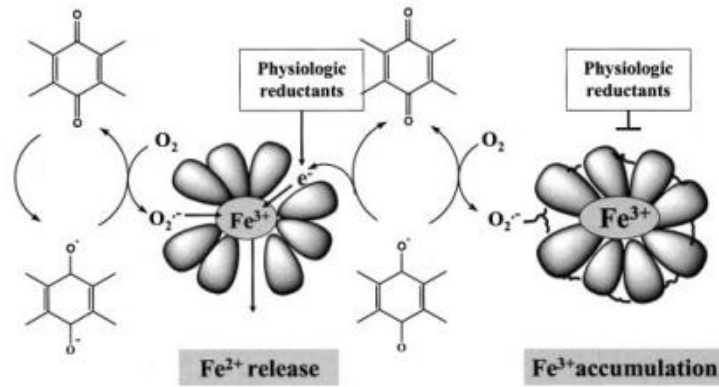
Kardiyotoksisite patogenezinde şu an için en fazla kabul gören görüş oksidatif stres hipotezidir. Bunun başlıca nedeni: kardiyomiyositlerin diğer hücrelerle kıyaslandığında daha fazla mitokondri içeriğine ve oksijen tüketimine sahip hücreler olmasına karşın; SOR eliminasyon kabiliyetlerinin göreceli olarak daha zayıf olması ve bu nedenle SOR'a daha fazla maruz kalmalarıdır (43,44).

Antrasiklin kaynaklı oksidatif stres iki farklı yol ile meydana gelebilir.

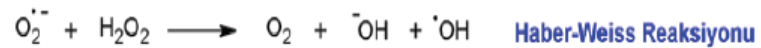
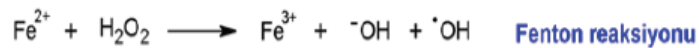
1- DOX'un ferritinden aldığı ferrik demir (Fe<sup>3+</sup>) ile bağlanmasıyla DOX-Fe<sup>3+</sup> kompleksi oluşur. Bu kompleks, glutatyon, indirgenmiş NADP (Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat), sitokrom p450 redüktaz gibi indirgeyici ajanlar varlığında bir elektron alarak indirgenir ve DOX-Fe<sup>2+</sup> kompleksi oluşur. İndirgenmiş DOX-Fe<sup>2+</sup> kompleksi almış olduğu elektronu oksijene aktararak eski haline dönerken oksijen ise elektron alarak O<sub>2</sub><sup>-</sup> molekülüne indirgenir. O<sub>2</sub><sup>-</sup> kararsızdır ve kendiliğinden veya süperoksit dismutaz (SOD) enziminin aktivitesi (dismutasyon) ile hidrojen peroksid

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve oksijen açığa çıkartır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub><sup>-</sup>, Haber-Weiss reaksiyonuna girer ve hidroksil radikali (OH<sup>-</sup>) açığa çıkar. DOX-Fe<sup>3+</sup> ile DOX-Fe<sup>2+</sup> arasındaki bu redoks döngüsü sürekli devam ederek aşırı miktarda serbest radikal oluşur ve bu durum kardiyotoksisite ile sonuçlanır (Şekil 4) (45).

2- DOX'un yapısındaki kinonun mitokondriyal redüktazlardan elektron alarak indirgenmesiyle kararsız bir bileşik olan semikinon serbest radikali oluşur. Semikinon, yapısındaki eşlenmemiş elektronu oksijene aktararak kinon yapısına geri dönerken; oksijen ise elektron alarak süperoksit radikaline (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) indirgenir. Kararsız O<sub>2</sub><sup>-</sup> dismutasyona uğrayarak hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve oksijen açığa çıkartır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub><sup>-</sup>, Haber-Weiss reaksiyonuna girer ve hidroksil radikali (OH<sup>-</sup>) açığa çıkar (Şekil 5). Artan oksidanlar kardiyomiyositlerde lipit peroksidasyonuna neden olur. Bu durum hücre içerisinde: mitokondrial disfonksiyon, kalsiyum regülasyonunda bozulma, sarkomerlerde parçalanma, DNA hasarı, nekrotik ya da apoptotik hücre ölümü ile sonuçlanır (46).



Şekil 4. Fe<sup>+3</sup> – Fe<sup>+2</sup> indirgenmesi (45).



Şekil 5. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları (46).

#### 2.2.4.d - Kardiyotoksisite Klinik Tipleri

Doksorubisin kardiyotoksisitesi, tedavinin herhangi bir evresinde ortaya çıkabilir. Akut, subakut, kronik ve geç kardiyotoksisite olarak dört şekilde sınıflandırılabilir (47).

**1. Akut Kardiyotoksisite:** İlacın uygulanması esnasında veya ilaç uygulandıktan sonraki 24 saat içerisinde ortaya çıkar. Görülme sıklığı %0,4-41 arasındadır. Genellikle semptom yoktur. Nadiren aritmiler (sıklıkla sinüs taşikardisi), miyokardit, perikardit veya akut myokard enfarktüsü nedeni ani ölüm gelişebilir. Elektrokardiyografide (EKG) nonspesifik değişiklikler (QT aralığında uzama, ST-T dalga değişiklikleri, voltaj düşüklüğü) görülebilir. Bu dönemdeki komplikasyonlar dozdan bağımsız olup genellikle geri dönüşümlüdür (47,48).

**2. Subakut Kardiyotoksisite:** Doksorubisin son dozundan sonraki günler veya haftalar içerisinde gelişir ve daha nadir olarak görülür. Bu dönemde perikardit ve miyokardit izlenebilir (47).

**3. Kronik Kardiyotoksisite:** Kümülatif doza bağlı olarak ortaya çıkar, geri dönüşsüz toksisite şeklidir. Görülme sıklığı %0,4-23 arasında bildirilmiştir. Kemoterapiden birkaç hafta veya birkaç ay sonra, progresif kalp yetersizliği veya kardiyak şok kliniği ile ortaya çıkmaktadır. Kronik kardiyotoksisitenin, 550 mg/m<sup>2</sup> üzerindeki dozlarda artış gösterdiği bildirilmiştir (47).

**4. Geç Kardiyotoksisite:** Doksorubisin tedavisinden en az bir yıl sonra ortaya çıkmaktadır. Literatürde 20 yıl sonra ortaya çıkmış vakalar bildirilmiştir. Geri dönüşümsüz miyosit hasarı, miyokard kitlesinde azalma ve ilerleyici fibrozis, kardiyak fonksiyon bozukluğunun nedenlerini oluşturmaktadır. Çocukluk çağında onkolojik tedavi alan hastalarda daha sık görülür (46,47).

#### **2.2.4.e - Kardiyotoksisite Risk faktörleri**

Kardiyotoksisite gelişiminde potansiyel risk faktörleri şunlardır (49-52):

- 1- Kümülatif doz (özellikle 550 mg/m<sup>2</sup> üzerindeki dozlarda)
- 2- Mediastinal radyasyon öyküsü (eş zamanlı veya öncesinde, özellikle > 2000 cgray dozunda)
- 3- Siklofosamid, metotreksat ve etoposid gibi diğer kardiyotoksik ajanlarla birlikte kullanım
- 4- Eşlik eden kalp hastalığı öyküsü
- 5- Yaş ( özellikle <4 , >65 yaş hastalar )
- 6- Kadın cinsiyet
- 7- İlacın bolus uygulanması

#### **2.2.4.f - Kardiyotoksisite Tanısı**

Tanı için risk değerlendirmesi yapılmalı ve tedavi alan hastalar uzun süreli izlenmelidir. Klinik hikaye, ayrıntılı fizik muayene, natriüretik peptitler veya troponin gibi kardiyak biyobelirteçler ve görüntüleme yöntemleriyle kardiyak fonksiyonlar değerlendirilmelidir.

Hikayede risk faktörleri varlığı, alınan ilacın kümülatif doz miktarı ve tedavi protokolü, ilaç kullanım süresi sorgulanmalıdır. Fizik muayenede spesifik bir bulgu olmamakla birlikte; dispne, takipne, ortopne, akciğer oskultasyonunda ral duyulması, kardiyak oskultasyonda gallop ritmi duyulması, boyunda venöz dolgunluk, periferik ödem ve hepatomegali dikkat edilmesi gereken bulgulardır (49,51).

Antrasiklin tedavilerine bağlı olarak EKG'de, ST-T değişikliklikleri, QT aralığında uzama, QRS dalgası voltaj düşüklüğü, ileti kusurları ve aritmiler gibi EKG değişiklikleri ortaya çıkabilir. Bu değişiklikler non spesifik olup geçici olabilir ve kronik kardiyomiyopati gelişimi ile ilişkili değildir (48).



Antrasiklin tedavisi alan hastalarda potansiyel kardiyotoksite tanısı ve takibi için tedavi başlangıcında ve takiplerde yineleyen ekokardiyografik inceleme önerilmektedir. Ekokardiyografi ile kardiyak işlev bozuklukları, kapak hastalıkları, perikardiyal hastalıklar ve pulmoner hipertansiyon gibi komplikasyonlar saptanabilir. Antrasiklinlerin neden olduğu kardiyak işlev bozukluğu, ejeksiyon fraksiyonu (EF) için normalin alt sınırın olan %50'nin altına düşmesi ya da tedavi öncesi bazal değere göre %10'luk bir azalma olarak tanımlanır. Bu azalma sol ventrikul işlevlerindeki ilk bozulmanın gösterilmesinden sonraki 2-3. haftalarda tekrarlayan kardiyak görüntüleme yapılarak doğrulanmalıdır (53,54).

Son dönemlerde "*Miyokardiyal Global Longitudinal Strain*" (GLS) sol ventrikul işlev bozukluğunun erken saptanmasında önemli bir parametre olarak gösterilmiştir. Başlangıç GLS'den %15'lik bir rölatif düşüşün sol ventrikül subklinik işlev bozukluğunun erken göstergesi olduğu bildirilmiştir (55).

Sol ventrikul işlevlerini değerlendirmede kullanılacak bir diğer yöntem, multigated radyonuklid anjiografidir. Kemoterapi nedenli kardiyotoksisitenin tanısında yüksek hassasiyet ve az teknik kısıtlılık özelliklileri ile yıllardır kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemin kullanımı radyasyon maruziyeti dolayısıyla kısıtlıdır. Kardiyak yapı ve hemodinami hakkında sınırlı ek bilgi sağlar (53,54).

Kardiyotoksisite değerlendirilmesinde kardiyak manyetik rezonans görüntüleme (KMRG) de kullanılabilir. KMRG özellikle göğüs bölgesine ışın alan hastalarda perikardı değerlendirmede oldukça faydalıdır. Geç gadolinum görüntüleme, skar veya fibrozisi saptamada yararlı olabilir ve bu durum etkilenmiş sol ventrikül işlevleri açısından prognostik belirteç olabilir (56).

Kardiyak hasarın erken dönemde saptanmasında kardiyak biyobelirteçler kullanılmaktadır. Bu biyobelirteçlerden biri olan serum Troponin I düzeylerinin antrasiklin tedavisi alan hastalardaki yüksekliği, ileride ortaya çıkabilecek sol ventrikul işlev bozukluğu açısından önemlidir. Yüksek duyarlılıklı Troponin I ile GLS kombinasyonunun, gelişebilecek kardiyotoksisiteyi öngörmede yüksek hassasiyet (%93) ve negatif prediktif değeri (%91) ile faydalı olabileceği bildirilmiştir (57). Bir diğer önemli biyobelirteç olan natriüretik peptitler, özellikle kalp yetmezliğinin

saptanmasında yaygın olarak kabul görmüştür. Çok düşük seviyelerdeki artışlarında dâhi yüksek riskli hastaları belirleyerek, tedaviyi yönlendirebilecekleri bildirilmiştir (58).

Antrasiklin kardiyotoksitesitesi için en spesifik ve en sensitif değerlendirme tekniği, sağ ventrikülden yapılan endomiyokardiyal biyopsidir. Alınan biyopsi materyalinin Billingham semikantitatif skorlaması ile kardiyotoksisite histopatolojik olarak derecelendirilir. Ancak invaziv olması, uygulama ve değerlendirmedeki zorluklar, özellikle çocuk hastalarda riskli olması ve sol ventrikülün sıklıkla etkilendiği görüşü nedeniyle günümüzde tercih edilmemektedir (59).

DOX kardiyotoksitesitesinde tipik olarak; miyofibrillerin parsiyel veya total kaybı, miyosit vakuolizasyonu, nükleus-kromatin disorganizasyonu ve kromatinin yerini soluk filamanlara bırakması gibi değişiklikler izlenir (59). Kümülatif doz miktarıyla, histolojik değişikliklerin şiddeti korelasyon göstermektedir (60).

### **2.2.5. Doksorubisin İlişkili Kardiyotoksisiteden Korunma ve Tedavide Kullanılabilecek Ajanlar**

Doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisitenin önlenmesinde birçok ajan denenmiştir (Tablo 2) (61-64). Bazı hayvan çalışmalarında da kısmi olumlu sonuçlar izlenmiştir. Berthiaume ve arkadaşları, sıçanlarda diyetle verilen E vitaminin kardiyak mitokondiriyal membranı güçlendirdiğini fakat bu etkisinin DOX toksisitesinden korunmak için yeterli olmadığını belirtmişlerdir (61). El-Missiry ve arkadaşları, sıçanlarda merkaptopropionil glisin (MPG) ön tedavisinin adriyamisininden neden olduğu akut oksidatif toksisiteye karşı kalbi ve karaciğeri koruyabilen antioksidatif potansiyeli olduğunu bildirmişlerdir (62). Yamanaka ve arkadaşları, amlodipinin yenidoğan sıçan kardiyak miyositlerinde doksorubisine bağlı apoptozu önlediğini bildirmişlerdir (63). Singal ve arkadaşları ise, probukolün oksidatif stresi ve apoptozu azalttığını, ayrıca yüksek lipit konsantrasyonlarının modülasyonu ile kalp yetmezliğini önlediğini; bu nedenle, DOX ve probukol ile kombine tedavinin yüksek bir kardiyoprotektif potansiyele sahip olduğunu belirtmişlerdir (64).

**Tablo 2.** Dokсорubisin kaynaklı kardiyotoksisite önlenmesinde araştırılan ajanlar (61-64)

<b>İLAÇ GRUBU</b>	<b>ETKEN MADDE ADI</b>
Anti Hiperlipidemik ilaçlar	Probukol, Lovastatin
Kalsiyum Kanal Blokerleri	Amlodipin
Demir Şelatörleri	Deksrazoksan
Endotelin Reseptör Antagonistleri	Bosentan
Beta-Blokerler	Karvedilol, Nebivolol
Fosfodiesteraz Tip 5 inhibitörleri	Sildenafil
Kalsiyum Sensitizörleri	Levosimendan
Periferik Vazodilatörler	Pentoksifilin
Antioksidanlar	NO, Selenyum, E vitamini, Merkaptopropionil glisin

Günümüzde DOX'un kardiyotoksik etkilerinin azaltılmasında kullanılan klinik olarak onaylanmış tek ilaç deksrazoksan'dır. Bu preparat hücre içindeki demir iyonlarını bağlayarak dokсорubisinin demir iyonlarına bağlanmasını önler. DOX-Fe<sup>3+</sup> ile DOX-Fe<sup>2+</sup> arasındaki redoks döngüsü engellenir (45). Yapılan çalışmalarda deksrazoksan tedavisinin kalp yetmezliği insidansını önemli ölçüde azalttığı ve kronik DOX (10 doz, 30 mg/m<sup>2</sup>/doz) alan yüksek riskli akut lenfoblastik lösemili çocuklarda kardiyoprotektif etkilerinin olduğu gösterilmiştir (65,66). Bununla birlikte başka bir çalışmada ise deksrazoksan'nın, ikincil malignitelere yol açtığı ve DOX etkinliğini azalttığı bildirilmiştir (67).

Klinik olarak onaylanmamış olmakla birlikte olumlu etkileri izlenen diğer bir yöntem, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin (ACEİ) kullanılmasıdır. ACEİ'ler, kalp yetmezliği olan hastalarda ön ve ard yükü azaltan antihipertansif ajanlar olarak kullanılmaktadır. Etkili bir ACEİ antihipertansif özelliklerine ek olarak, antioksidan özellik de gösterir. Bu özelliğiyle kardiyotoksisitenin önlenmesine katkıda bulunabilir (68). ACE inhibitörü preparatı olan enalapril uygulamasının, mitokondriyal solunum etkinliğini koruduğu ve DOX ile ilişkili serbest radikal oluşumunu önleyerek kardiyak disfonksiyonu azalttığı gösterilmiştir (69). Bu çalışmaların yanı sıra, çocukluk döneminde DOX ile tedavi edilen ve uzun süreli izlenen hastalarda, sol ventrikül yapı ve fonksiyonundaki enalapril kaynaklı iyileşmenin 6-10 yıl içerisinde kaybedildiği bildirilmektedir. Ayrıca ACE inhibitörlerinin olumsuz yan etkilere sahip olduğu ve bu ilacın kanser tedavisi sırasında bir kardiyoprotektif ajan olarak seçilmesinin dikkatle değerlendirilmesi gerektiği belirtilmektedir (70).

## 2.3 OZON

### 2.3.1 Genel bilgiler

On dokuzuncu yüzyılın ortalarında keşfedilen bir gaz olan ozon ( $O_3$ ), mezomerik durumların varlığı nedeniyle dinamik olarak kararsız yapıda üç adet oksijen atomundan oluşan bir moleküldür. Oda ısısında, renksiz ve kendine has kokusu olan gaz formunda bulunur. Yarılanma ömrü: 20 °C'de 40 dakika ve 0 °C'de yaklaşık 140 dakikadır. Oksijenden 1,6 kat daha yoğundur ve suda 10 kat daha fazla çözünebilir. Ozon, dünyanın 25-30 km üzerindeki stratosfer katmanında yer alır ve temel işlevi yeryüzünü ultraviyole (UV) radyasyonunun zararlı etkilerinden korumaktır (10,71). Kimyasal yapısı itibariyle radikal özelliği taşımamakla birlikte, florin ve persülfattan sonra bilinen üçüncü en güçlü oksidan maddedir. Bu özelliği nedeniyle keşfedildiği ilk yıllarda dezenfeksiyon amacıyla kullanılırken, özellikle ozon jeneratörlerinin keşfiyle birlikte medikal kullanımı artarak günümüze gelmiştir (72).

Ozon ilk olarak 1840 yılında Alman kimyager CF Schönbein tarafından, yıldırım sonrası oluşan kokuya dayanılarak tanımlanmıştır. Ozonun tıbbi amaçla ilk defa kullanımının 1880 yılında Dr. John Harvey Kellogg (Battle Creek/Michigan/ABD) tarafından gerçekleştirildiğini yazan kaynaklar bulunmakla birlikte; daha yaygın görüşe göre kabul edilen ilk tıbbi kullanımı Birinci Dünya Savaşı sırasında Alman askerlerinin gangren ve benzeri ciddi yaralanmalarını tedavi eden Dr. Albert Wolff'a dayanır (73).

### 2.3.2 Medikal Ozonun Elde Edilmesi

Medikal ozon en sık Corona Discharge Ozon Jeneratörleri aracılığıyla elde edilir. Bu yöntemde oksijen molekülünün ( $O_2$ ) çift bağı yüksek voltajlı (4000-14000 V) elektrik akımı verilerek bozular. Serbest kalan oksijen atomunun var olan bir  $O_2$  molekülüyle birleşmesiyle ozon gazı ( $O_3$ ) oluşur. Ozon oluşumu;  $3O_2 + 68,4 \text{ Kcal} \rightarrow 2O_3$  tepkimesi ile gerçekleşir. Medikal ozonun diğer elde edilme yöntemleri, ultraviyole ozon jeneratörleri ve soğuk plazma sistemidir (74).

Medikal ozon kullanımında dikkat edilmesi gereken bazı noktalar vardır. Ozon hiçbir zaman saf olarak verilmemelidir. Ozon-oksijen karışımı belli oranlarda karıştırılarak uygulanmalıdır. Bu karışımda oksijen en az %95, ozon en fazla %5 olmalıdır. Normal atmosfer havasının bu karışıma girmesi engellenmelidir. Ozonun reaktif özelliği nedeniyle, hava ile teması sonucu toksik bir gaz olan nitrojen dioksit oluşabilmektedir. Ayrıca hava embolisi riski sebebiyle, ozon gaz olarak direkt damar içerisine verilmemelidir. Tüm işlemler sırasında ozona dayanaklı malzemenin (paslanmaz çelik, nötral cam ve teflon) kullanılması gerekmektedir (75).

### 2.3.3 Medikal Ozonun Etki Mekanizması

Her gaz gibi ozon da “*Henry kanunu*”na göre; sıcaklık, basınç ve konsantrasyon parametrelerine bağlı olarak saf suda fiziksel olarak çözünür. Diğer gazlardan farklı olarak ozon, biyolojik sıvılarda (serum fizyolojik, plazma, lenf, idrar gibi) oksijene göre çok daha hızlı olarak çözünür ve reaksiyona girer. Bu özelliğiyle majör otohemoterapi esnasında uygulanan ozon/oksijen karışımındaki ozon; çoklu doymamış yağ asitleri, askorbik ve ürik asitler gibi antioksidanlar, sistein gibi sülfhidril gruplarına sahip tiyol bileşikler, glutatyon ve albümin ile reaksiyona girer. Ozon dozuna bağlı olarak karbonhidratlar, enzimler, DNA ve RNA da bu reaksiyonlardan etkilenebilir. Bu bileşiklerin tümü ozon karşısında elektron verici olarak işlev görür ve oksidasyona uğrar. Bunun sonucunda  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  gibi SOR ve lipit oksidasyon ürünleri (LOPs) oluşur. Sıklıkla doymamış yağ asitlerinde bulunan çift bağlarla (-C=C-) gerçekleşen bu ana reaksiyon, “ $R-CH=CH-R'+O_3+H_2O \rightarrow R-CH=O+R'-CH=+H_2O_2$ ” şeklindedir. Oluşan  $H_2O_2$ ,  $Fe^{+2}$  ile Fenton reaksiyonuna girer ve  $OH^-$  radikali oluşur (Şekil 5) (75,76).

Sistemik ozon uygulamalarında, ozonun plazmada reaksiyona girmesiyle oluşan SOR ve LOPs'lar birçok hücrede farklı mekanizmaları tetikler (Şekil 6) (12). Örneğin oluşan LOPs'lar; SOD, GSH-Px ve CAT gibi antioksidan enzimlerin ve hemoksijenaz gibi stres proteinlerinin üretimini uyarır. LOPs'ların kemik iliğinde metalloproteinaz salınımını aktive edebildikleri de öne sürülmüştür. Bu enzimlerden özellikle matriks metalloproteinaz-9 kök hücreleri kan dolaşımına salınır ve hasarlı

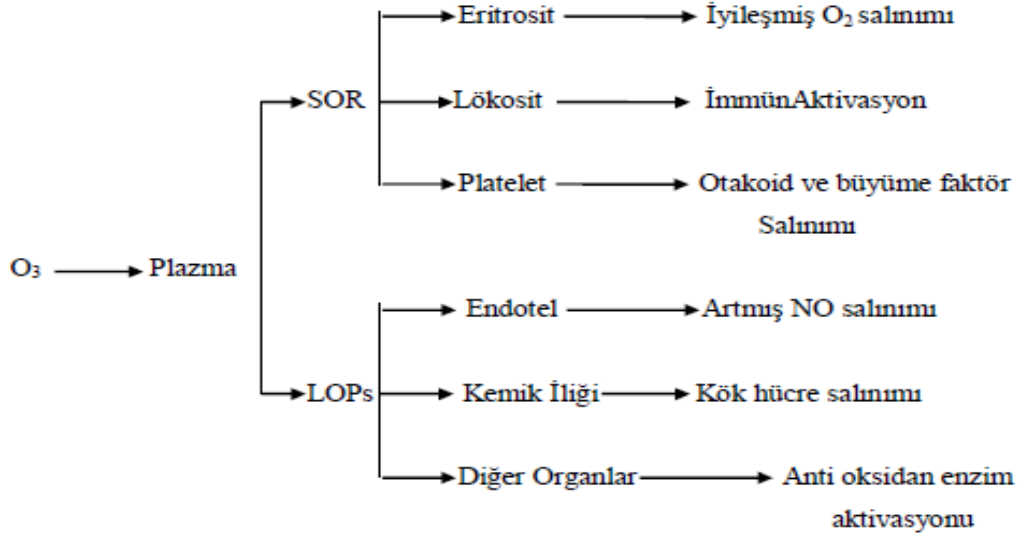
bölgelerde, iskemik ve enfarktöslü dokularda lokalize olabilir. Bu da hasar sınırlaması ve daha iyi iyileşme ile sonuçlanır (76,77).

Oluşan SOR'lar (özellikle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ise; eritrositlerde pentoz fosfat yolunun aktivasyonu ve glikolizin hızlanmasına neden olur. 2,3-difosfogliserat artışıyla birlikte oksihemoglobin eğrisi sağa kayar. Böylece oksijen dokulara daha kolay salınabilir. Hidrojen peroksit lenfosit ve monositlerde ise; sitoplazmaya nüfuz ederek, sisteini oksitler ve diğer biyokimyasal olaylardan sorumlu transkripsiyon nükleer faktörü kB'yi (Nf-kB) aktive eder. Nf-kB tirozin kinazı aktive eder. Bu olaylar dizisi, Nf-kB faktörü vasıtasıyla, reseptörlerin ve sitokinlerin sentezinden sorumlu çeşitli genlerin aktivasyonu ile sona erer. Bu durum IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 ve IL-6'nın üretilmesine yol açar. Ozonun önemli immünomodülatör etkisi bu şekilde açıklanabilir (10,12).

Ozonlanmış plazma, trombositlere de etki eder. Aktive olmuş trombositler, çeşitli büyüme faktörleri salgılayarak doku iyileşmesine yardımcı olur. Trombosit fonksiyonlarını arttırıcı özelliği nedeniyle, ozon ile otohemoterapi uygulaması yapılmadan önce kullanılacak materyalin (örneğin serum şişesi) antikoagülan ile hazırlanması gerekmektedir (78).

Ozonlanmış plazmaya endotelial dokunun yanıtı, vazodilatasyon ile NO salımı ve damarların neoformasyonu ile artan vasküler endotelial büyüme faktörü salgılanması (neo-anjiyogenez) şeklinde olur.

Ozon, topikal olarak kullanıldığında ise etkisini; interstisyel matriksin (fibrin, fibronektin, hiyaluronik asit) endotelial hücre proliferasyonunu belirleyen endotelial büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörü üretimini arttırarak yara iyileşmesi üzerine gösterir (10,12).



Şekil 6. Medikal ozonun etki mekanizması (12).

### 2.3.4 Ozon ile İndüklenen Hiperoksinin Terapötik Etkileri

1. Trofik etki: En önemli etkilerinden biri trofik eylemdir. Bu eylem; dezenfeksiyon (sterilizasyon değil), granülasyon dokusunun uyarılması, neo-anjiyogenez yoluyla onarım işlemleri, lokal kan mikrosirkülasyonunda belirgin iyileşme, daha fazla oksijen katkısı ve toksik atık ürünlerin daha hızlı ortadan kaldırılması (detoksifikasyon) ile gerçekleşir. Ozon, SOR üretimi yoluyla, fagositoz sırasında aktif lökositlerde meydana gelene benzer bir şekilde antimikrobiyal bir oksidan görevi görür. Bu etkisini özellikle anaerobik bakterilere karşı gösterir. Ayrıca peroksitleri ve serbest radikalleri bloke eden enzimlerin aktivasyonunu tetikleyerek, GSH, SOD ve CAT gibi detoksifiye edici ajanları artırır (76-78).

2. Analjezik etki: Beyindeki spesifik proenflamatuvar veya pro-apoptotik kaspazların modülasyonu yoluyla nöropatik ağrının gelişmesini önler (79). Periferik oklüzif arter hastalığı olan hastalarda O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> karışımının kullanılmasının ağrıyı azalttığı gösterilmiştir (80).

3. İmmünomodülatör etki: Metabolik özellik olarak ozon sitrik asit döngüsünü hızlandırır ve mitokondriyal aktiviteyi uyarır (81). IFN, IL-2 ve TNF- $\alpha$  üretimini

arttırma kapasitesi, immünomodülatör aktivitesini gösterir. Bocci, ozonun, büyük bir bağışıklık reaksiyonu başlatan makrofajları aktive edecek çeşitli güçlü proenflamatuvar sitokinlerin sentezini indükleyebileceğini belirtmektedir (12).

4. Antioksidan etki: Ozon; iyi oksijenlenme, iyi perfüzyon, periferde iyi oksijen tüketimi sağlar, trombosit deforme edilebilirliğini arttırır, kan viskozitesini azaltır, protrombin azaltıcı fibrinojeni uzatır, indüklenmiş iskemiden sonra laminer akış sağlar. Ozon, antioksidan enzim üretimini (GSH, SOD, CAT) uyararak endojen SOR'un etkisini nötralize eder. Sıçanlarda deneysel veriler, miyokardiyal iskemi/reperfüzyon ile ilişkili hasarların akut O<sub>3</sub> ön tedavisi ile azaltılabileceğini göstermiştir. Tüm bu olaylar hipoksiyi yener ve olası bir enfeksiyon veya tümörün hipoksik bölgesine antibiyotik ve kemoterapötiklerin gelişini teşvik eder (10-12).

5. Antienflamatuvar etki: Doku hasarına ilk yanıt her zaman enflamasyondur. Bu nedenle, koruyucu ozon uygulaması bu patolojik durumun başlangıcını ve/veya seyrini etkileyebilir. Sepsis, ciddi enfeksiyonlar ve/veya kritik hastalıkları olan ve ozon ile erken dönemde tedavi edilen hastalarda, organ hasarında bir azalma elde etmek mümkündür. O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> karışımı, güçlü bir in vitro antibakteriyel aktiviteye sahiptir, enflamatuvar süreçleri in vivo kontrol eder ve bakteri ve toksinlere karşı ilk savunma hattı olan fagositik aktiviteyi modüle eder. Böylece, O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> karışımı, farklı karın organlarındaki proenflamatuvar sitokinlerin üretimini/salımını arttırır ve ciddi enfeksiyon oluşumunu sınırlandırabilir (10,12).

6. Antitümöral Etki: Birçok çalışmada ozonun farklı antitümör mekanizmaları olduğu gösterilmiştir (81-83). Bu çalışmalardan birinde, ozon aracılı hiperoksinin tümörün invazivlik ve metastatik derecesi ile ilişkili olarak, hipoksiye neden olan faktör 1-A'yı (HIF1A) inhibe ettiği bildirilmiştir. HIF1A'ya karşı koyan ozon kaynaklı hiperoksi, kanser hücresi direncini azaltarak kemoterapi etkisini arttırmaktadır. Bu eylem, kemoterapötik ilaçların daha düşük dozda etkin kemoterapi sağlamasına ve bunun sonucunda da toksisitesinin ve yan etkilerinin azalmasına yol açacaktır. Böylelikle ozon, kemoterapinin olumsuz birçok etkisine karşı koruyucudur (83). Ozonun, onkolojik hastalarda mevcut immünosupresyonun neden olduğu bazı enfeksiyonları (vajinit, prostatit, vb.) azaltılabileceği bildirilmiştir (84).



### 2.3.5 Medikal Ozon Tedavisi Uygulama Dozları ve Klinik Uygulamaları

Medikal ozon; antioksidan, anti-enflamatuvar, immunmodülatör ve anti-mikrobiyal özelliklerinden ötürü birçok hastalığın tedavisinde ya asıl ya da destek tedavi olarak kullanılmaktadır. Medikal ozon kullanım ilkeleri; “*Uluslararası Ozon Tedavisi Okulları*”nın 2010 yılında yayınladığı “Madrid Ozon Deklorasyonu”nda belirlenmiştir. Bu deklarasyonda; terapötik ozon konsantrasyonunun 5-60 µg/ml arasında olduğu kabul edilmiş ve konsantrasyonlar düşük, orta ve yüksek konsantrasyon olarak üçe ayrılmıştır (85).

1.Düşük düzey konsantrasyonlar (10-20 µg/ml): İmmünomodülatör etkiye sahiptir. Bağışıklık sisteminin etkilendiği hastalıklarda kullanılmaktadır.

2.Orta düzey konsantrasyonlar (20-30 µg/ml): İmmünomodülatuvar ve antioksidandır. Nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer, Parkinson, demans), akciğer hastalıkları (amfizem, kronik obstruktif akciğer hastalığı, akut respiratuvar stres sendromu), oftalmolojik hastalıklar (retinitis pigmentosa, katarakt, glokom, yaşa bağlı maküler dejenerasyon), hematolojik hastalıklar (talasemiler, orak hücreli anemi) ve vasküler hastalıklarda (hipertansiyon, venöz yetmezlik, periferel arteriyel hastalık, kardiyak iskemi, venöz staz) kullanılmaktadır.

3.Yüksek düzey konsantrasyonlar (30-60 µg/ml): Anti-enflamatuvar etkiye sahiptir. Enfeksiyöz hastalıkların (*HIV, Herpes Simplex Virüs, Human Papilloma Virüs, Hepatit A, B, C, zona, giardiazis, candidiazis*), dermatolojik hastalıkların, eklem hastalıklarının (osteoartrit, gonartroz), alerjik hastalıkların ve sistemik enflamatuvar hastalıkların (SLE, romatoid artrit, Crohn hastalığı) tedavisinde kullanılmaktadır.

### 2.3.6 Medikal Ozon Tedavisi Uygulama Yöntemleri

#### 1.Sistemik Uygulamalar:

Major Otohemoterapi: Son dönemdeki en yaygın kullanılan uygulama yöntemidir. Yaklaşık 50-100 ml hasta kanı, basıncı alınmış kapalı devre serum seti sistemi ile alınır ve vücut dışında uygun dozlarda ozon ile reaksiyona sokulur. Ozonla zenginleştirilmiş olan hastanın kanı hastaya belirli bir hızda retransfüze edilir. Bu tedavide steril tek kullanımlık malzeme kullanılmalıdır. Bu yöntem; arteriyel dolaşım bozuklukları, enfeksiyonlar, bağışıklık yetersizliğinden kaynaklanan hastalıklar, kanser hastalarının ek tedavisi, romatizmal eklem hastalıkları gibi durumlarda sıklıkla tercih edilmektedir (86,87).

Minör Otohemoterapi: Hastadan alınan 3-5 ml kana 20 µg/ml dozda ozon eklenir ve kısa bir süre beklenir. Bu bekleme süresinde ozon kanda çözünür, biyolojik moleküller ile reaksiyona girer. Bu zenginleştirme işlemi sonrasında intramusküler olarak hastaya geri enjekte edilir. Bu yöntem; alerjik vakalar, akne ve fronkülozis gibi durumlarda sıklıkla tercih edilir (10).

Rektal insüflasyon: En eski uygulama yöntemlerinden biridir. Ozon bir katater ve buna bağlı silikon torba ya da enjektör aracılığı ile rektal yoldan uygulanır. Genel kural olarak 150-300 ml ozon/oksijen karışımı tatbik edilir. Sistemik etkileri açısından majör otohemoterapi alternatifidir. Yaklaşık 10-12 insüflasyonluk bir uygulama programı sonrasında majör otohemoterapinin sonuçlarına benzer bir metabolik değişim (ATP artışı ve 2,3-DPG) izlenebilir. Bu yöntem: sistemik olarak majör otohemoterapinin uygulanmadığı, özellikle intravenöz reinfüzyonun damarların uygun olmaması nedeniyle uygulanmadığı yaşlı hastalar gibi; topikal olarak bağırsaklarda proktit ve kolit gibi patolojik durumlarda ve bağışıklık sisteminin yetersiz kaldığı sistemik enfeksiyonlarda sıklıkla tercih edilir (10,87,88).

Periton İçi Uygulama: Deneysel hayvan çalışmalarında en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Periton boşluğuna sabitlenen bir silikon kateterle 10-20 µg/ml arasındaki bir konsantrasyon ve 200-300 ml arasındaki bir hacimde ozonlanmış suyla periton yıkanır. Bu yöntem insanlarda peritonitin tedavisinde kullanılmaktadır (88).

## **2. Topikal Uygulamalar:**

Düşük Basıncılı Ozon Uygulaması: Bu yöntem özellikle; dekübit ülserleri, radyasyon yaraları ve fistül tedavilerinde tercih edilmektedir (86,89).

Transkutanöz Ozon İmersiyonu: Bu yöntem; varis ülserlerinin ve geniş alana yayılan enfekte olmuş yaraların tedavisinde tercih edilmektedir (86,89).

İntraartiküler Ozon Enjeksiyonu: Bu uygulama; romatoid artrit, osteoartrit ve gonartroz durumlarında sıklıkla tercih edilmektedir (75,86,88).

Ozonlanmış Ürünlerin Uygulanması: Ozonize su, ozonize zeytinyağı, ozonize kremler vb şekilde yapılan uygulamalardır. Bu yöntem; diş ve diş eti yaraları, enfekte cilt yaraları, mantar enfeksiyonları, zona ve otitis eksterna gibi durumlarda kullanılabilir (75,86,88).

### **2.3.7 Medikal Ozon Tedavisinin Yan Etki ve Kontrendikasyonları**

Ozon tedavisi terapötik doz aralığında kullanıldığında yan etkileri oldukça azdır. Gözlenen yan etkiler genellikle iyatrojenik hatalar sonucunda gelişen lokal komplikasyonlardan veya ozonun yüksek konsantrasyonlarda inhale edilmesinden kaynaklanmaktadır. En sık görülen yan etkiler; dudaklarda ve dilde karıncalanma hissi, mide bulantısı, ağızda metalik tat, yorgunluk, kaşıntı, eritematöz deri döküntüleri ve hafif hipotansiyondur (90).

Ozon tedavisinin kesin kontrendike olduğu durum; glukoz 6 fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği ile giden Favizm hastalığıdır. Kesin kontrendike olmamakla birlikte tedavinin seyrini etkilemesi nedeniyle, C vitamini ve E vitamini içeren tüm antioksidan takviyelerin bırakılması önerilmektedir. Ayrıca; nonkompanse diyabetes mellitus, toksik hipertiroidizm, hamilelik (özellikle ilk 3 ayda) göreceli kontrendike durumlar olarak gösterilmektedir (91,92).

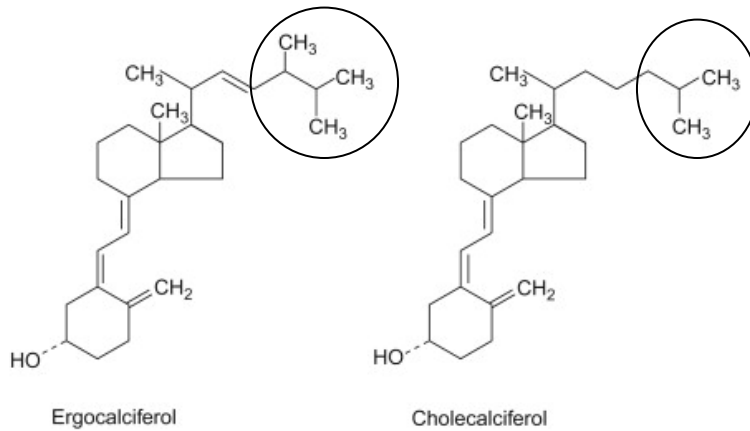
## 2.4 D VİTAMİNİ

### 2.4.1 Genel Bilgiler

D vitamini, keşfedildiği ilk yıllarda bir vitamin olarak karakterize edilmiş olsa da günümüzde steroid yapılı bir prohormon olarak kabul edilmektedir. Esas olarak D<sub>2</sub> vitamini (Ergokalsiferol) ve D<sub>3</sub> vitamin (Kolekalsiferol) şeklinde iki ana formu vardır. D<sub>2</sub> vitamini bitki kaynaklarından elde edilir ve insanda sentezlenemez, diyetle dışardan alınır. D<sub>3</sub> vitamini ise özellikle balık yağları, yumurta ve süt ürünleri gibi hayvansal gıdaların tüketilmesi yoluyla besinlerle alınır ve büyük çoğunluğu deride 7-dehidrokolesterolden 280-320 nm dalga boyunda ultraviyole B (UVB) ışınlarının etkisiyle sentezlenir. Çeşitli enzimatik aktiviteler ile aktif formu olan 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D'ye dönüşür. D<sub>2</sub> ve D<sub>3</sub> vitaminleri sadece yan zincir yapılarında farklılık gösterir (Şekil 7) (93).

D vitamininin klasik etkisi, renal ve intestinal kalsiyum transportunun ve kemik mineralizasyonun düzenlenmesi ile serum kalsiyum ve fosfor seviyelerinin korunmasını sağlamaktır. Klasik etkisi haricinde, birçok etkiye daha sahip olduğu bilinmektedir (13,14).

D vitamini; ksenobiyotik detoksifikasyon, immünoregülasyon, antiinflamatuvar, antioksidan, antimikrobiyal, antikanserojen, antihipertrofik ve antifibrotik etki gibi birçok önemli etkiye sahiptir (13,14).



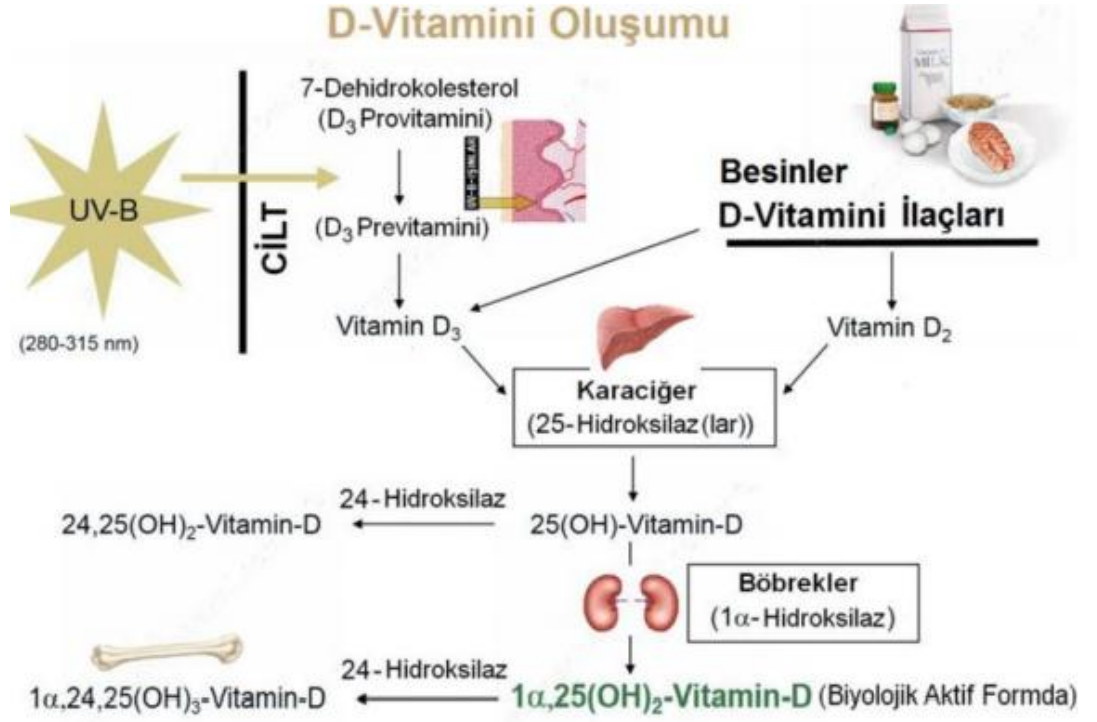
Şekil 7. Ergokalsiferol ve kolekalsiferol moleküler yapıları (93).

## 2.4.2 D Vitamini Metabolizması ve 1,25 (OH)<sub>2</sub> Vitamin D Elde Edilişi

Deride sentezlenen (D<sub>3</sub>-Kolekalsiferol) veya diyetle alınan D vitamini (D<sub>2</sub>-Ergokalsiferol) biyolojik olarak aktif değildir. Bu bileşikler D vitamini bağlayıcı proteine bağlanarak karaciğere taşınır, burada 25 hidroksilaz enzimi ile 25 hidroksi vitamin D'ye [25(OH) Vitamin D] dönüşür. 25(OH) Vitamin D, böbreklerde 1 $\alpha$ -Hidroksilaz enzimi ile biyolojik olarak aktif form olan ve kalsitriol olarak da bilinen 1,25 dihidroksi Vitamin D'ye [1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D] dönüşür (Şekil 8). 1 $\alpha$ -Hidroksilaz enzimi aktif D vitamini sentezinde anahtar rol oynar. Enzim aktivitesi, kalsiyum (Ca), fosfor, parathormon (PTH) ve fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF-23) ile düzenlenir (94,95). 1 $\alpha$ -Hidroksilaz enzimi böbrek dışında birçok dokuda (örneğin bağırsak, epidermis, makrofajlar, prostat, meme, pankreas ve paratiroid bezi gibi) bulunmaktadır. Bu nedenle böbrek dışı dokularda da 25(OH) Vitamin D düzeylerinin yeterli düzeylerde olması aktif D vitamini üretimi için gereklidir (95).

Vücüttaki D vitamini düzeyi tespitinde, her ne kadar biyolojik olarak aktif form olsa da, 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D ideal ölçüm için kullanılamaz. Çünkü yarı ömrü 4-6 saat kadar kısa ve dolaşımdaki düzeyleri 25(OH) Vitamin D'den 1000 kat daha düşüktür. 25(OH) Vitamin D'nin ise ortalama plazma ömrü yaklaşık 3 haftadır ve plazmada daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Bu nedenle serum seviyelerini vücut D vitamini depolamasını ve durumunu gösterir (96).

D vitamini ve metabolitleri birçok dokuda bulunan 24 hidroksilaz enzim tarafından yıkılır. Suda çözünür inaktif kalsitriolik aside katabolize edilerek, safra yoluyla atılırlar (Şekil 8) (13,96).



**Şekil 8.** D vitamini metabolizması ve 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D sentezi (95).

### 2.4.3 D Vitamini Dengesi Sağlanması

D vitamini ve metabolitlerinin düzenlenmesi, 1α-Hidroksilaz ve 24-Hidroksilaz aktiviteleri arasındaki dengeye bağlıdır. Her iki enzim de serum kalsiyum, kalsitriol ve fosfat seviyeleri ile titizlikle düzenlenir. Düşük serum kalsiyum koşulları veya düşük D vitamini seviyeleri altında, paratiroid bezleri tarafından salgılanan PTH, 1α-hidroksilazın sentezini uyarır ve 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D aktivasyonunda artışa neden olur. PTH ayrıca 24-hidroksilazı inhibe eder ve renal sodyum fosfat taşıyıcılarının ekspresyonunu azaltarak etki gösteren FGF-23'ün osteoklast ve osteosit sentezini indükleyebilir (97). FGF-23 ayrıca 1α-Hidroksilazın renal ekspresyonunu baskılayarak ve 24-Hidroksilazı indükleyerek D vitamini homeostazisini ayarlayabilir. Böylece hiper fosfatemi koşulları altında serum kalsitriol seviyelerini ve ardından serum kalsiyumunu azaltabilir (98).

#### **2.4.4 1,25 (OH)<sub>2</sub> Vitamin D Etki Mekanizması**

1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D'nin moleküler düzeydeki etki mekanizması genomik ve non-genomik etkiler olarak ikiye ayrılır.

D vitamininin genomik etkisi, aktif D vitamini formu olan 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D'nin vitamin D reseptörüne (VDR) bağlanması ile olur. Bu bağlanma sonrası oluşan kompleks, önce nükleustaki retinoik asit X reseptörü (RXR)'ne ve ondan sonra da DNA üzerinde bulunan vitamin D cevap elemanı (VDRE) olarak bilinen bölgeye bağlanır. Sonuç olarak 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D-VDR-RXR-VDRE etkileşimi sonucu hedef gende DNA transkripsiyonunu regüle eder (99).

1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D non-genomik etkisini ise; hücre membranında membran ilişkili hızlı yanıt steroid bağlayan proteine (1,25 D<sub>3</sub>-MARRS) veya membran ile ilişkili VDR'ye (mVDR) bağlanarak hücre içi sinyal yollarını (cAMP, PKA, PLC, PI-3 kinaz, MAP kinaz) aktive etmesi ve membran üzerindeki iyonların Ca, klor (Cl) trans membran geçişini değiştirmesi ile gerçekleştirmektedir (99,100). VDR'ler birçok farklı dokuda (endotel, miyokard, deri, düz kas, akciğer, beyin, prostat, kolon, meme, monosit ve makrofajlar vb.) gösterilmiştir. Bu nedenle metabolizma için büyük öneme sahiptir (99).

#### **2.4.5 1,25 (OH)<sub>2</sub> Vitamin D Etkileri**

##### **1- Klasik etkileri:**

1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D klasik etkisi, renal ve intestinal kalsiyum transportunu ve kemik mineralizasyonunu düzenleyerek serum kalsiyum ve fosfor seviyelerinin korunmasıdır. Bu amaçla 3 hedef dokuya etki eder. İlk hedefi bağırsaktır. Diyetle alınan kalsiyumunun bağırsakta aktif emiliminde yer alan proteinleri indükler ve fosfatın enterositlerden aktif emilimini uyarır. İkinci olarak kemik dokuya etki eder

(14). Vücuttaki kalsiyum yetersizliğinde, reseptör aktivatörü nükleer faktör  $\kappa$ B ligandı (RANKL) üretmek için osteoblastları uyarır. RANKL daha sonra osteoklastogenezi uyarır ve kemik rezorpsiyonu için istirahat osteoklastlarını aktive eder. Aynı zamanda, pirofosfat seviyelerinin ve osteopontin artışıyla kemik mineralizasyonunu engeller (101). Kalsitriol ise, kondrosit farklılaşmasını aktive ederek ve serum kalsiyum ve fosfat seviyelerini artırarak kemik oluşumunu ve büyümesini destekler. Bu nedenle, D vitamini eksikliği iskeletin yetersiz mineralleşmesine neden olur ve düşük D vitamini düzeyleri korunduğunda, kalsiyum ve fosfat tükenmesi nedeniyle kemik büyüme plakaları mineralize edilemez (102). Üçüncü ve son olarak, distal renal tübüle etki eder. Glomerullerde filtrelenmiş kalsiyumun büyük bir kısmı proksimal tübülde pasif olarak geri emilse de geri emilemeyen kısım kalsitriol ve PTH etkisiyle distal renal tübüllerde aktif olarak geri emilir (14).

## **2- Klasik Olmayan Etkileri:**

Yakın zaman içerisinde VDR'lerin; monositler, lenfositler, keratinositler, beyin, plasenta, yumurtalık hücreleri, pankreasın adacık hücreleri, miyozitler gibi böbrek dışı diğer birçok dokuda mevcut olduğunu kanıtlamıştır. Birçok dokuda var olduğu anlaşılan VDR'ler ile kalsitriolün; antiinflamatuvar, antioksidatif, antihipertrofik ve antifibrotik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Tablo 3) (103). Ayrıca yapılan çalışmalarda D vitamininin bilinen klasik rolü haricinde, hücre büyümesi ve farklılaşması, otoimmünite, insülin sekresyonu, kan basıncı düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik süreçte önemli rolü olduğunu gösterilmiştir (Şekil 9) (104,105).

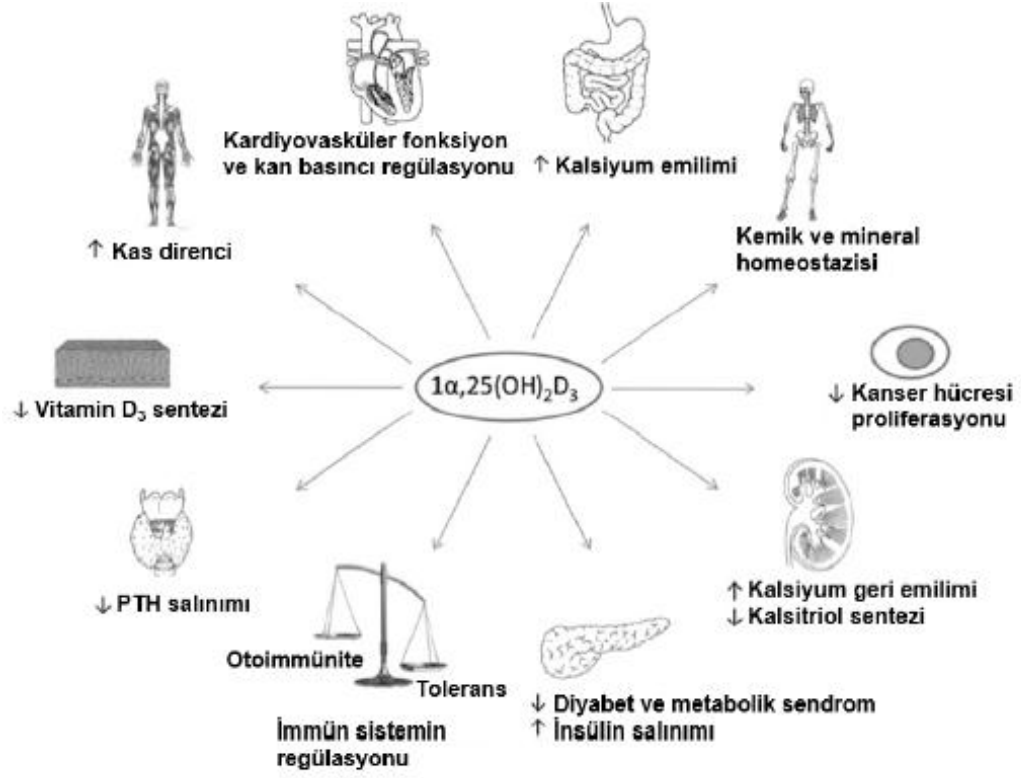


**Tablo 3.** Kalsitriol moleküler ve hücresel etkileri (103)

<b>ETKİ</b>	<b>MEKANİZMA</b>
Diabetes Mellitus'taki kardiyak metabolizmada iyileşme	-İnsülin sekresyonunu artırır -İnsülin reseptörünün ekspresyonunu uyarır ve glikoz taşınması için insülin duyarlılığını artırır -PPAR izoform aktivitesini modüle eder -GLUT4 translokasyonunu düzenler ve glikozun hücre içerisine alımını kolaylaştırır
Renin-anjiyotensin sistem inhibisyonu	-Renin biyosentezini baskılar -Tip 1 anjiyotensin II reseptörünü aşağı regüle eder
Antienflamatuvar özellik	-TNF- $\alpha$ gibi proenflamatuvar sitokinleri azaltır -IL-10 gibi anti-enflamatuvar sitokinleri artırır -NF-kB aktivitesini baskılar
Antioksidatif etki	-NADPH oksidaz aktivitesini inhibe ederek ROS oluşumunu azaltır -Süperoksit dismutazı yukarı regüle ederek hücreSEL SOR süpürücü enzim aktivitesini artırır
Antihipertrofik ve antifibrotik aktiviteler	-Hipertrofi gen ekspresyonunu baskılar -Kardiyak hücre dışı matriks metabolizmasını düzenler
Antiaterosklerotik etki	-Damarsal düz kas hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü engeller -Antikoagülasyon: doku faktörünü baskılar, trombomodulini artırır -Fibrinolizi artırır, plazminojen aktivatör inhibitörü-1 aktivitesini baskılar -Köpük hücre oluşumunu engeller

#### **2.4.6 1,25 (OH)<sub>2</sub> Vitamin D ve Kardiyovasküler Hastalıklar**

VDR'ler hemen hemen her dokuda bulunmakla birlikte kardiyovasküler sistemde de yaygın olarak bulunur ve geniş bir etki yelpazesine sahiptir. Bu etkiler arasında miyokardiyal aktivite düzenlenmesi, kardiyak remodeling, renin anjiyotensin aldosteron sisteminin baskılanması, endotel disfonksiyonunun önlenmesi, enflamasyonun azaltılması, ateroskleroz ve trombüs gelişimini önleme sayılabilir. Yapılan çalışmalarla düşük D vitamini düzeylerinin kardiyovasküler hastalıklar ve mortalite riskini arttırdığı saptanmıştır (106). Tablo 4'de düşük D vitamin düzeyleri sonucunda izlenen kardiyovasküler etkiler gösterilmiştir.



**Şekil 9.** 1,25 (OH)<sub>2</sub> Vitamin D klasik olmayan etkileri (104,105).

**Tablo 4.** Düşük serum D vitamini düzeyinin kardiyak etkileri (106)

Kardiyomiyositler üzerine	Hipertrofi
	Renin-Anjiotensin-Aldosteron sistemi aktivasyonu
Ekstrasellüler matriks üzerine	Metalloproteinaz aktivasyonu
	Kollajen depozisyonu
İmmün/ enflamatuvar sistem üzerine	T Hücre aktivasyonu
	Sitokin salınımı
	Tromboza yatkınlık
Damar yapısı üzerine	Düz kas proliferasyonu
	Endotel disfonksiyonu
	Aterosklerotik plak oluşumu

Ventriküler kardiyomiyositler VDR'yi ve ayrıca aktif D vitamini oluşturmak için gerekli hidroksilazları eksprese etmektedir (107). Deneysel kanıtlar, D vitamininin kardiyomiyosit hipertrofini inhibe edebileceğini göstermektedir. 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D'nin, yenidoğan ratların kardiyomiyositlerinde endotelin kaynaklı hipertrofiyi ortadan kaldırdığı, natriüretik peptid salınımını azalttığı ve proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (108,109). Bunun yanında, D vitamininin kardiyak remodelingi de etkileyebildiği, D vitamini eksikliği olan ratlarda kalsiyum düzeylerinden bağımsız olarak kollajen artışı ile kardiyomegali geliştiği bildirilmiştir (110). VDR seçici olarak yok edilen farelerde artmış matriks metaloproteinaz düzeyleri, metaloproteinazların doku inhibitörlerinde azalma ve fibrozda artış saptanmıştır (101).

D vitamini kardiyak kontraktileti de etkileyebilir. VDR, sarkoplazmik retikulum kalsiyum ATPaz ile etkileşime girebileceği T-tübüllere yerleşir. 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D ile tedavi; kalsiyum alımını uyarır, kontraktileti artırır ve gevşemeyi kolaylaştırır (112,113).

D vitamini transkripsiyonel düzeyde renin gen ekspresyonunu inhibe eder. Kalp yetmezliği tedavisindeki birçok ilacın merkezi hedefi, renin anjiyotensin aldenosteron sistemidir (RAAS). Deneysel iki farklı çalışmada; VDR veya 1 $\alpha$ -Hidroksilaz reseptörü seçici olarak yok edilen farelerin, kontrol gruplarına kıyasla yüksek renin, anjiyotensin II ve aldosteron seviyelerine sahip oldukları saptanmış, 1,25(OH)<sub>2</sub> D vitamini takviyesi ile RAAS düzeylerinin baskılandığı bildirilmiştir (113,114).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Kardiyoloji Bilim Dalı tarafından doksorubisin ile oluşturulan toksik miyokardit modeli üzerine ozon ve 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamin D'nin etkilerini araştırmak üzere planlandı. Çalışma öncesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan 30.05.2019 tarih ve 60758568-020/39438 sayılı onay alındı. Çalışma, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 22.10.2019 tarih ve 2019TIPF021 nolu kararı ile desteklendi.

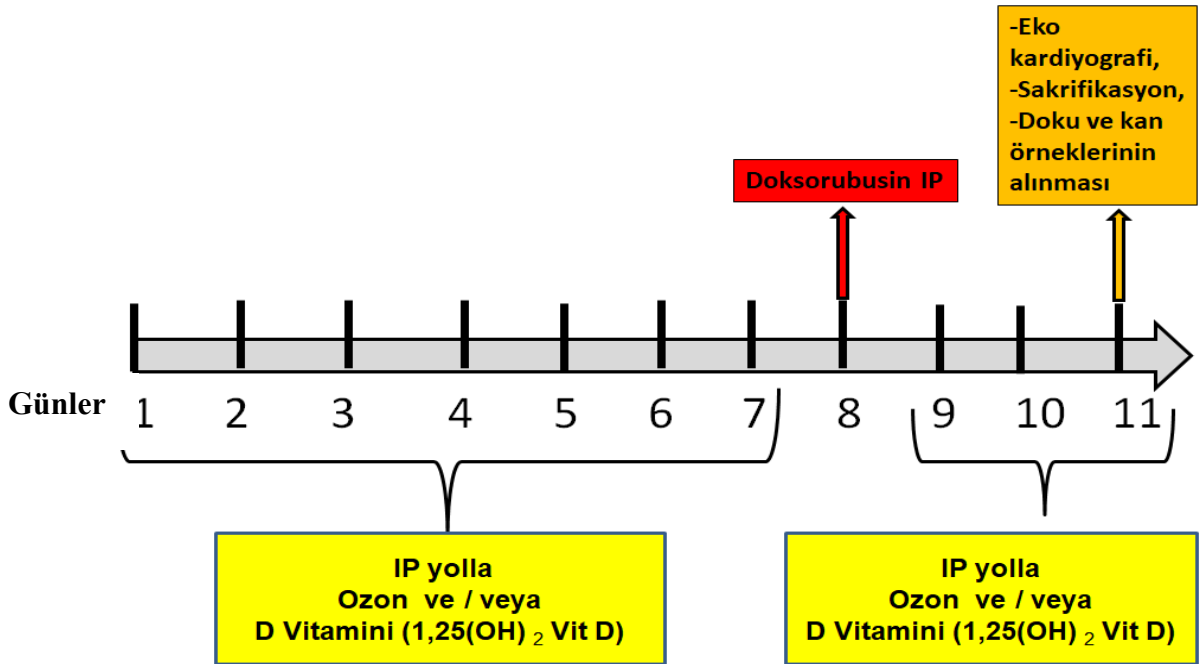
Çalışma, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yürütüldü ve ağırlıkları 285 ile 350 gram arasında değişen 13-15 haftalık erkek Wistar Albino cinsi toplam 40 adet rat ile yapıldı. Ratlar Kobay Deney Hayvanları A.Ş. laboratuvarından temin edildi ve deneye alınmadan önce ortama adaptasyonlarının sağlanması amacıyla bir hafta süreyle bekletildiler. Çalışma süresince tüm ratlara standart diyet ve su verildi. Tüm ratlar, deney sonuçlanana kadar 11 gün boyunca 12 saat ışıklı, 12 saat ışiksiz ortamda ve 20-25°C arasındaki oda sıcaklığında izlendi (Resim 1).



**Resim 1.** Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı bakım odası ve kafesleri

### 3.1. ÇALIŞMA GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Çalışmanın başlangıcında, tüm ratların vücut ağırlıkları ölçülerek kaydedildi. Çalışmaya alınan toplam 40 rat her grupta sekizer rat olacak şekilde rastgele beş gruba ayrıldı. Deneyin 8. günü; DOX ile kardiyotoksisite oluşturulacak gruplara 15 mg/kg doksorubisin, kontrol grubuna ise 5 ml/kg serum fizyolojik (SF) intraperitoneal (IP) yoldan tek doz uygulandı. Deneyin 1-7. ve 9-11. günlerinde ise; her gruba, önceden belirlenmiş olan tedaviler: SF, ozon, D vitamini ve ozon+D vitamini IP yoldan her gün uygulandı. Tedavi gruplarından biri olan ozon+D vitamini grubunda tedaviler, her gün 2 farklı yerden olacak şekilde IP yoldan verildi. Sıçanların eşit strese maruz bırakılması amacıyla diğer tüm gruplara da, belirlenen tedavilerine ek olarak, her gün farklı yerlerden olacak şekilde 5 ml/kg SF IP yoldan verildi. Çalışmanın zaman çizelgesi Şekil 10'de gösterilmiştir. Çalışma grupları ve gruplara yapılan işlemler Tablo 5'da verilmiştir.



Şekil 10. Çalışmanın zaman çizelgesi.

**Tablo 5.** Çalışma grupları ve ilaç uygulamaları

Gruplar	Dokсорubisin 8.gün IP tek	Ozon	1,25(OH) <sub>2</sub> Vit D
Grup 1= Kontrol (n=8)	-	-	-
Grup 2=DOX (n=8)	+	-	-
Grup 3= Ozon (n=8)	+	+	-
Grup 4= D vit (n=8)	+	-	+
Grup 5= Ozon+D vit (n=8)	+	+	+

Grup 1 (Kontrol grubu, n=8): Bu gruptaki ratlara, çalışmanın 8. gününde tek doz, çalışmanın diğer günlerinde ise günde 2 doz olacak şekilde 5 ml/kg dozunda SF farklı yerlerden IP olarak uygulandı.

Grup 2 (DOX grubu, n=8): Bu gruptaki ratlara; çalışmanın 8. gününde 15 mg/kg dozunda tek doz dokсорubisin, çalışmanın diğer günlerinde ise (1-7. ve 9-11. günlerinde) 5 ml/kg dozunda SF farklı yerlerden günde 2 doz olacak şekilde IP olarak uygulandı.

Grup 3 (Ozon grubu, n=8): Bu gruptaki ratlara, çalışmanın 8. gününde 15 mg/kg dozunda tek doz dokсорubisin, çalışmanın diğer günlerinde ise (1-7. ve 9-11. günlerinde) 0,7-1 mg/kg dozda, 60 µg/ml konsantrasyonda ozon ve 5 ml/kg dozunda SF, farklı yerlerden IP olarak uygulandı.

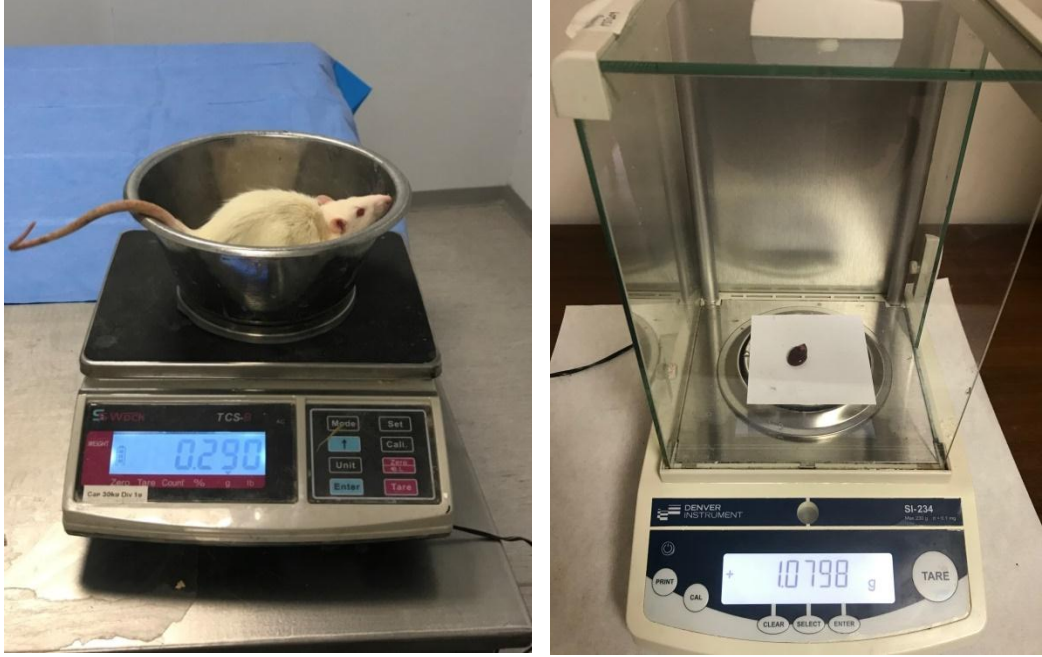
Grup 4 (D vit grubu, n=8): Bu gruptaki ratlara, çalışmanın 8. gününde 15 mg/kg dozunda tek doz dokсорubisin, çalışmanın diğer günlerinde ise (1-7. ve 9-11. günlerinde) 0.2 µg/kg/gün dozunda 1,25-(OH)<sub>2</sub> Vitamin D ve 5 ml/kg dozunda SF, farklı yerlerden IP olarak uygulandı.

Grup 5 (Ozon + D vit grubu, n=8): Bu gruptaki ratlara, çalışmanın 8. gününde 15 mg/kg dozunda tek doz dokсорubisin, çalışmanın diğer günlerinde ise (1-7. ve 9-11. günlerinde) 0,7-1 mg/kg dozda, 60 µg/ml konsantrasyonda ozon ve 0.2 µg/kg/gün dozunda 1,25-(OH)<sub>2</sub> Vitamin D, farklı yerlerden IP olarak uygulandı.



### 3.3. HASTALIK BELİRTİLERİNİN İZLENMESİ VE ANTROPOMETRİK ÖLÇÜMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ratlar çalışmanın başladığı günden itibaren izlendi ve aktiviteleri, klinik olarak hastalık geliştirip geliştirmedikleri kaydedildi. Ratların başlangıç vücut ağırlıkları, sakrifiye edilmeden önceki vücut ağırlıkları ve sakrifiye edildikten sonra ise kalp ağırlıkları ölçüldü (Resim 4 ve 5). Başlangıç ve son vücut ağırlıkları arasındaki fark kaydedildi.



**Resim 4-5.** Deneklerin vücut ağırlığı ve kalp ağırlıklarının ölçülmesi



### 3.4. EKOKARDİYOGRAFI İLE DEĞERLENDİRME

Çalışmanın son günü son enjeksiyonlar yapıldıktan sonra, sakrifikasyon öncesi, tüm ratlara 10 mg/kg ksilazin hidroklorid + 80 mg/kg ketamin hidroklorid anestezisi uygulandı. Ratlar anestezisi etkisindeyken ekokardiyografik değerlendirme uygulandı (Resim 6 ve 7). Ekokardiyografi, GE Vivid S5 ekokardiyografi cihazı ve 10 MHz'lik sektör problar kullanılarak yapıldı. Parasternal eksenlerden 2D ve M-mode görüntüler elde edildi. M-mode görüntülerden; sol ventrikül arka duvar diyastolik çapı (LVPWTed), sol ventrikül arka duvar sistolik çapı (LVPWTes), sol ventrikül end-diyastolik çapı (LVed) ve sol ventrikül end-sistolik çapı (LVes), interventriküler septum diyastolik çapı (IVSed), interventriküler septum sistolik çapı (IVSes) ölçüldü (Resim 8). Elde edilen ölçümlerden ejeksiyon fraksiyonu (EF) ve fraksiyonel kısalma (FS) değerleri aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı (116).

$$EF (\%): (LVDd)^3 - (LVDs)^3 / (LVDd)^3 \times 100$$

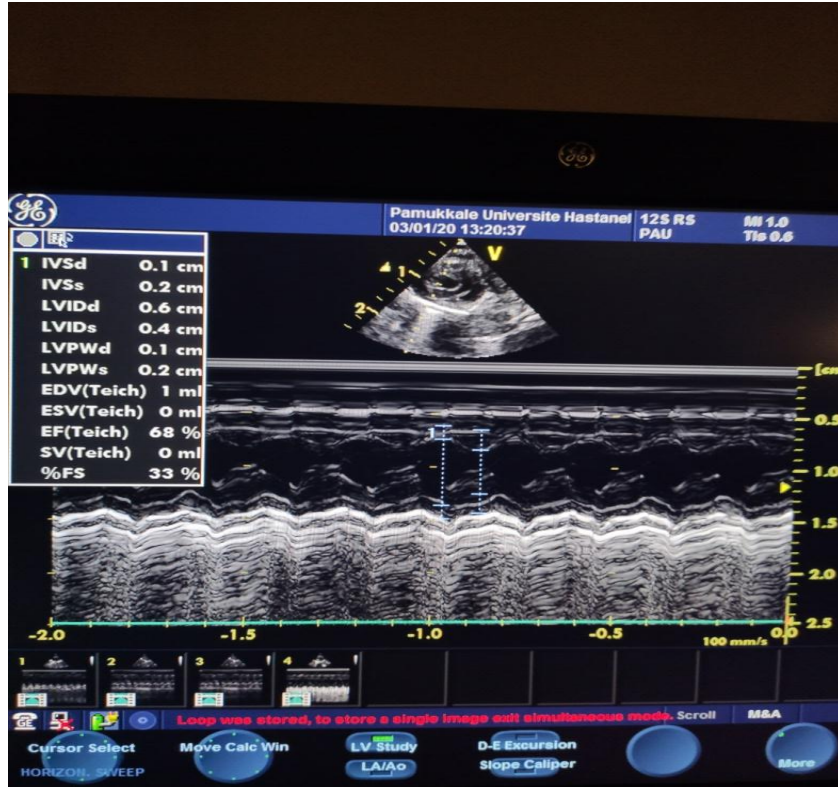
$$FS (\%): (LVDd) - (LVDs) / (LVDd) \times 100$$



**Resim 6.** Ratların ekokardiyografi ile değerlendirilmesi



**Resim 7.** Ratların ekokardiyografi ile değerlendirilmesi



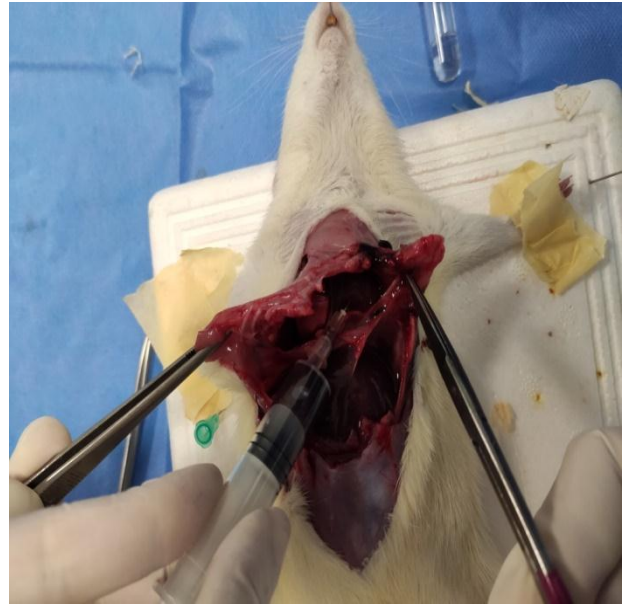
**Resim 8.** Ratların ekokardiyografi ile yapılan hesaplamaları

### 3.5. RATLARIN SAKRİFİKASYONU

Her bir rata prosedürün 11. gününde (ozon, D vitamini veya serum fizyolojik son IP enjeksiyonuyla aynı gün içerisinde), ketamin (%10 Ketazol®) 90 mg/kg ve xylazine (%2 Xylazinbio®) 15 mg/kg karşımı ile intraperitoneal anestezi verildi. Ekokardiyografik değerlendirmenin ardından anterior torakotomi uygulandı (Resim 9). Biyokimyasal analizler için tüm ratlardan intrakardiyak kan örnekleri alındı (Resim 10). Sakrifiye edilen ratların sakrifikasyon sonrası kalpleri çıkarıldı (Resim 11) ve kalp ağırlıkları tartılarak kaydedildi (Resim 5).



**Resim 9.** Anterior torakotomi işlemi



**Resim 10.** İntrakardiyak kan alınması



**Resim 11.** Kalbin çıkarılması

### 3.6. BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLERİN ÇALIŞILMASI

Çalışmanın 11. gününde anestezi altında yapılan sakrifikasyonun ardından, tüm ratlardan yaklaşık 5-7 ml kan intrakardiyak yoldan alındı. Alınan kan örnekleri serum ayırıcı jelli tüpe (BD Vacutainer® SST™ Tubes, USA) aktarıldıktan sonra, yaklaşık 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında 10 dakika boyunca 3500 devirde santrifüj edildi. Elde edilen serum örnekleri ependorf tüplerine ayrılarak çalışma gününe dek -20 °C altında saklandı.

Çalışma günü oda sıcaklığına getirilen serum örneklerinden Troponin T, MDA, SOD, GPX, TNF- $\alpha$ , IL-10, TAS ve TOS düzeyleri Sunred (Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd, China) ile NT-Pro BNP düzeyi ise Fine Test (Wuhan Fine Biotech Co., Ltd, China) ticari kitleri kullanılarak, sandviç prensibine bağlı immün ölçüm yöntemi (ELISA) ile analiz edildi.

Çalışmada kullanılan kitlerin standart ve kimyasalları hazırlandıktan sonra mikrolakada bulunan kuyucuklara standartlar ve örnekler pipetlenmiştir. Ardından prospektüste anlatılan adımlar izlenerek örneklerin testlerin konsantrasyonlarına göre renklendirilmesi sağlanmıştır. Renk oluşumu gözlemlendikten sonra 450 nanometrede (nm) Biotek Elx800 Mikrolaka okuyucu (BioTek Instruments Inc., USA) kullanılarak kuyucukların absorbans değerleri okunmuştur. Gen5 data analiz programı ile serum absorbans değerleri kullanılarak konsantrasyonlar hesaplanmıştır.

Bulunan değerler Troponin T ve TNF- $\alpha$  analizleri ng/L, MDA analizi nmol/ml, SOD analizi ng/ml, TOS analizi U/ml, NT-Pro BNP, TAS, IL-10 ve GPX analizleri ise pg/ml birimi şeklindedir. Yöntemlerin çalışma içi CV değeri <%7 ve çalışmalar arası CV değeri <%10 idi.

### 3.7. KALBİN HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ

Çıkarılan kalpler morfolojik incelemeleri yapıldıktan sonra %10 formalin solüsyonu içerisine alındı. Örnekler daha sonra parafin bloklar içerisine gömüldü. Her bloktan dört mikrometre kalınlığında seri kesitler alındı. Preparatlar uygun boyamalar ile boyandıktan sonra Olympus BX51 mikroskop ile ışık mikroskopunda incelendi ve resimlendi. Histopatolojik değerlendirme, aynı histolog tarafından çalışma gruplarına kör olarak yapıldı.

Hematoksilen&Eozin (H&E) ile boyanan kesitlerde kalp dokusu; histopatolojik değişiklikler, bu değişikliklerin şiddeti ve yaygınlığı açısından incelendi. Elde edilen bulgular Billingham dejenerasyon skoru kullanılarak değerlendirildi (59). Tablo 6'da Billingham dejenerasyon skoru gösterilmiştir.

**Tablo 6.** Billingham histopatolojik dejenerasyon skorlaması (59)

<b>Grade 0</b>	Normal miyokardiyal ultrastrüktürel morfoloji
<b>Grade 0,5</b>	Tamamen normal olmayan ancak antrasikline özgü hasar kanıtı bulunmayan inceleme
<b>Grade 1</b>	Hücrelerin <%5'inde izlenen izole miyositer hasarlanma ve/veya erken miyofibriler kayıp
<b>Grade 1,5</b>	Tüm hücrelerin %6-15'i arasında izlenen miyositer hasarlanma ve/veya miyofibriler kayıp
<b>Grade 2</b>	Tüm hücrelerin %16-25'ine izlenen, miyofibriler kayıp ve/veya vakuolizasyondan etkilenen hasarlanmış miyosit kümeleri
<b>Grade 2,5</b>	Tüm hücrelerin %26-35'inde izlenen miyofibriler kayıp ve/veya vakuolizasyondan etkilenen hasarlanmış miyosit kümeleri
<b>Grade 3</b>	Tüm hücrelerin >%35'inde izlenen şiddetli, yaygın miyosit hasarı, hücrel kayıplar ve hücreler arası boşluklar

Miyokard dokusunda apoptoz oranını belirlemek için kesitler, TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling) tekniği ile TUNEL Chromogenic Apoptosis Detection Kit (ABP Biosciences) kullanılarak boyandı. Boyanma sonrası, her kesit için 10 alanda hücreler 40X objektif ile sayılarak TUNEL-pozitif hücre sayıları belirlendi. Apoptotik hücre oranı (Apoptotik indeks) yüzde cinsinden hesaplandı (117).

Miyositlerdeki apoptozis şiddeti immünohistokimyasal aktif kaspaz-3 boyaması ile araştırıldı. Kaspaz-3 immünoaktivitesinin gösterilmesi amacıyla, rat spesifik anti-kaspaz-3 (1:100; Neomarkers, Fremont, CA) antikoru kullanıldı. Hücrelerin aktif kaspaz-3 immünoaktivitesi, boyanma şiddeti ile değerlendirildi. Boyanma şiddeti, pozitif alanların yüzdesi ile çarpılarak semikantitatif H-Skoru ile hesaplandı (118). Boyanma şiddeti ve H-skor hesaplama formülü aşağıda gösterilmiştir.

Boyanma şiddeti:

- 0 = Boyanma yok,
- +1 = Zayıf düzeyde boyanma,
- +2 = Orta düzeyde boyanma,
- +3 = Güçlü düzeyde boyanma olarak değerlendirildi.

H-Skor:  $[1 \times (\% \text{ cells } 1+) + 2 \times (\% \text{ cells } 2+) + 3 \times (\% \text{ cells } 3+)]$  (118).

### 3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde "*Statistical Package for Social Sciences*" (SPSS 25.0, Inc, Chicago, IL, USA) paket programı kullanıldı. Sürekli değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma, medyan (en küçük – en büyük değerler) ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğunun incelenmesinde Shapiro Wilk testi kullanıldı. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi (post hoc olarak Tukey testi); parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise, bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Kruskal Wallis Varyans Analizi (post hoc olarak Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi) kullanıldı. Değişkenlerin aralarındaki ilişkilerin değerlendirilmesi Spearman korelasyon analizi ile yapıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. ANTROPOMETRİK ÖLÇÜMLER

Tüm gruplardaki ratların deney başlangıcındaki ilk vücut ağırlıkları ve deney sonlandırılmadan önceki son vücut ağırlıkları (ratlar sakrifiye edilmeden önceki) değerlendirildi. İlk ve son vücut ağırlıkları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık saptanmadı ( $p>0,05$ ). Kontrol grubundaki tüm ratların deney süresindeki 11 günlük izlemi boyunca kilo almış olduğu izlenirken, DOX grubunda daha belirgin olmak üzere diğer grupların hepsinde kilo kaybı olduğu görüldü. Kontrol grubunun ortalama  $14,13\pm 4,64$  gram kilo aldığı görülürken, DOX grubu ortalama  $10,38\pm 4,07$ , ozon grubu  $3,63\pm 6,76$ , D vit grubu  $4,63\pm 5,1$ , ozon+D vit grubu ise  $4,25\pm 6,52$  gram kilo kaybetmişti. Son ve ilk vücut ağırlıklarına göre ratların kilo değişim miktarı değerlendirildiğinde; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ( $p=0,000$ ). Farklılık, kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasında anlamlıydı ( $p<0,05$ ), (Şekil 11).

Gruplara ait veriler Tablo 7’de verilmiştir.

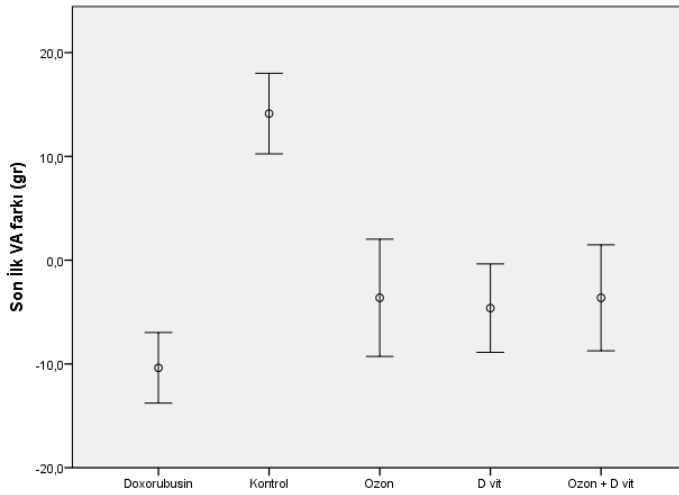
**Tablo 7.** Gruplara ait antropometrik ölçümler

GRUP	İlk VA(gr)	Son VA(gr)	Son-İlk VA (gr)	Kalp Ağırlığı(gr)	Kalp Ağırlığı/Son VA
	Ort $\pm$ SS (Min-Maks)	Ort $\pm$ SS (Min-Maks)	Ort $\pm$ SS Ortan(Min-Maks)	Ort $\pm$ SS (Min-Maks)	Ort $\pm$ SS (Min-Maks)
Doxorubusin(1) (n=8)	$311,38 \pm 14,78$ (285 – 330)	$301 \pm 15,65$ (270 – 318)	$-10,38 \pm 4,07$ $-9,5 (-17 - -5)$	$1,03 \pm 0,06$ (0,92 - 1,11)	$0,0034 \pm 0,0001$ (0,0033 - 0,0035)
Kontrol(2) (n=8)	$311 \pm 22,09$ (285 – 350)	$325,13 \pm 20,81$ (305 – 360)	$14,13 \pm 4,64$ 13 (10 - 22)	$1,19 \pm 0,07$ (1,11 - 1,29)	$0,0037 \pm 0,00004$ (0,0036 - 0,0037)
Ozon(3) (n=8)	$312,25 \pm 12,44$ (290 – 328)	$308,63 \pm 13,1$ (284 – 331)	$-3,63 \pm 6,76$ $-6,5 (-10 - 5)$	$1,1 \pm 0,07$ (1 - 1,21)	$0,0036 \pm 0,0001$ (0,0033 - 0,0038)
D vit(4) (n=8)	$314 \pm 16,11$ (290 – 335)	$309,38 \pm 15,18$ (286 – 330)	$-4,63 \pm 5,1$ $-5 (-10 - 7)$	$1,09 \pm 0,05$ (1,02 - 1,16)	$0,0035 \pm 0,0001$ (0,0034 - 0,0037)
Ozon + D vit(5) (n=8)	$313,75 \pm 17,18$ (285 – 340)	$310,13 \pm 14,81$ (292 – 340)	$-3,63 \pm 6,12$ $-5 (-10 - 7)$	$1,11 \pm 0,07$ (1 - 1,25)	$0,0036 \pm 0,0001$ (0,0033 - 0,0037)
Gruplar Arası p	>0,05	>0,05	<b>0,000*</b>	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>
İkili Farklılıklar			<b>2-1, 2-3, 2-4, 2-5</b>	<b>2-1, 2-4</b>	<b>1-2, 1-3, 1-5, 2-4</b>

VA: Vücut ağırlığı, D vit: D vitamini, Ort: Aritmetik ortalama, Ortan: Ortanca, SS: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum

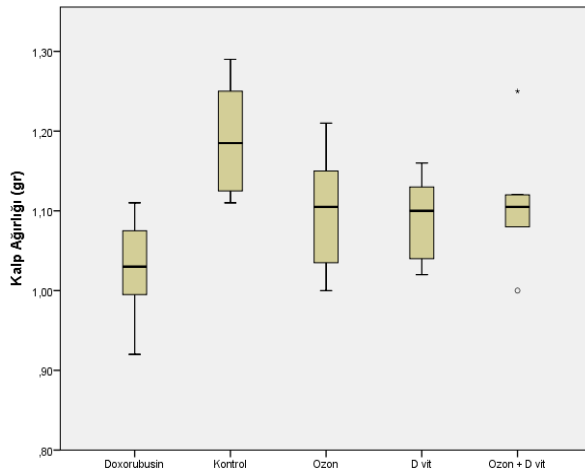
\*Son-İlk VA için Kruskal-Wallis, diğer parametreler için Oneway Anova istatistiksel analiz yöntemi kullanılmıştır



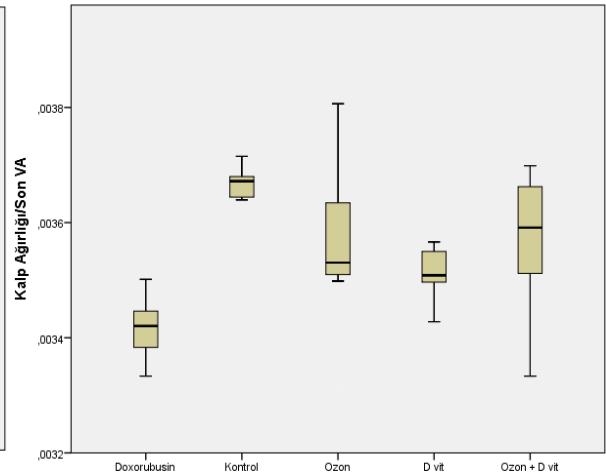


**Şekil 11.** Grupların kilo değişimi (son vücut ağırlığı – ilk vücut ağırlığı).

Ratlar sakrifiye edildikten sonra kalp ağırlıkları değerlendirildi. Kalp ağırlıkları açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı ( $p=0,001$ ). Farklılığın kontrol grubu ile DOX ve kontrol grubu ile D vit grupları arasından kaynaklandığı görüldü ( $p<0,05$ ), (Tablo 7, Şekil 12). Kalp ağırlığının son vücut ağırlığına oranına bakıldığında; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ( $p=0,000$ ). Farklılıklar; DOX grubu ile kontrol grubu, DOX grubu ile Ozon, DOX grubu ile Ozon+D vit grubu ve kontrol grubu ile D vit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,05$ ), (Tablo 7, Şekil 13).



**Şekil 12.** Grupların kalp ağırlıkları.



**Şekil 13.** Grupların kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranı



## 4.2. HASTALIK BELİRTİLERİNİN İZLENMESİ

Ratlar çalışmanın başladığı günden itibaren izlendi. Özellikle 8. gündeki doksorubisin IP enjeksiyonu sonrası; kardiyotoksisite oluşturulan gruplardaki ratlarda, tüy yapısında belirgin bozulma, iştahta azalma, hareket yeteneğinde kısıtlanma gibi kalp hastalığını düşündüren bulgular gözlemlendi.

## 4.3. BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLER

### 4.3.1 Kardiyak Hasar Göstergeleri

Çalışmamızda kardiyak hasar göstergelerinden Troponin T ve NT-pro BNP düzeyleri değerlendirildi. Troponin T düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ( $p=0,001$ ). Troponin T; DOX grubunda ortalama  $26,99 \pm 3,59$ , kontrol grubunda  $16,06 \pm 3,42$ , Ozon grubunda  $20,14 \pm 6,16$ , D vit grubunda  $20,35 \pm 2,8$ , Ozon+D vit grubunda  $18,83 \pm 3,97$  ng/L olarak bulundu. Troponin T düzeyi, DOX grubunda diğer tüm gruplara göre belirgin artmış olmakla birlikte; farklılığın DOX grubu ile kontrol grubu, DOX grubu ile Ozon+D vit grupları arasından kaynaklandığı görüldü ( $p<0,05$ ), (Tablo 8, Şekil 14).

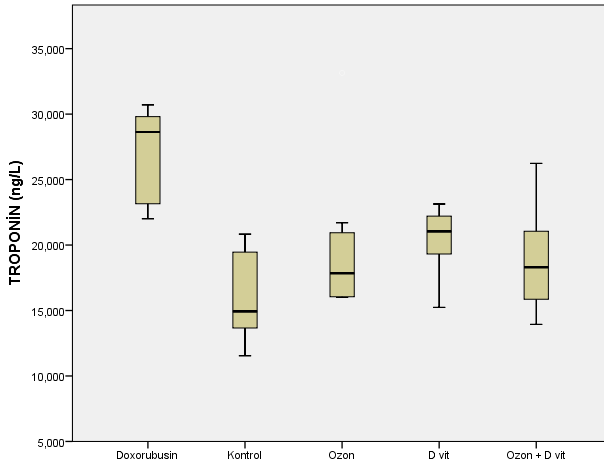
NT-pro BNP düzeyleri açısından da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ( $p=0,000$ ). NT-pro BNP; DOX grubunda ortalama  $336,32 \pm 161,6$ , kontrol grubunda  $159,91 \pm 7,8$ , ozon grubunda  $185,04 \pm 9,17$ , D vit grubunda  $199,06 \pm 6,16$ , Ozon+D vit grubunda  $173,11 \pm 3,74$  pg/ml olarak bulundu. NT-pro BNP düzeyi DOX grubunda, tüm gruplara göre belirgin artmış olmakla birlikte; farklılık; kontrol grubu ile D vit grubu, DOX grubu ile kontrol grubu, DOX grubu ile Ozon+D vit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,05$ ), (Tablo 8, Şekil 15).

**Tablo 8.** Grupların kardiyak hasar göstergeleri

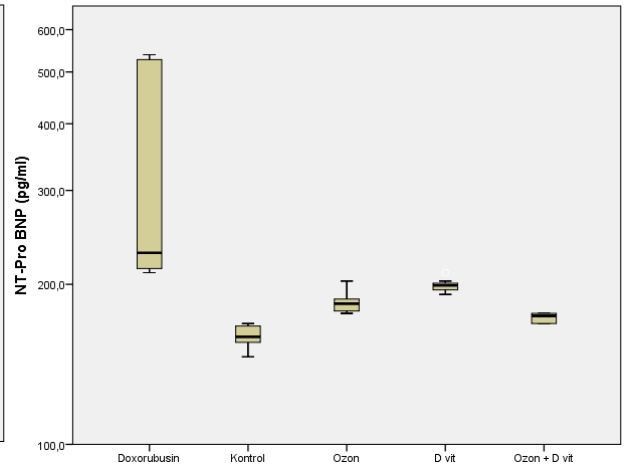
GRUP	Troponin T (ng/L)	NT-Pro BNP (pg/ml)
	Ort± SS	Ort± SS
	Ortan (Min-Maks)	Ortan (Min-Maks)
Doxorubusin(1) (n=8)	26,99 ± 3,59 28,63 (22,01 - 30,71)	336,32 ± 161,6 229,25 (210,38 - 538,68)
Kontrol(2) (n=8)	16,06 ± 3,42 14,93 (11,54 - 20,83)	159,91 ± 7,8 159,43 (146,23 - 168,87)
Ozon(3) (n=7)	20,14 ± 6,16 17,84 (15,99 - 33,14)	185,04 ± 9,17 183,96 (176,42 - 202,83)
D vit(4) (n=7)	20,35 ± 2,8 21,05 (15,24 - 23,14)	199,06 ± 6,16 199,06 (191,51 - 210,38)
Ozon + D vit(5) (n=8)	18,83 ± 3,97 18,3 (13,94 - 26,24)	173,11 ± 3,74 174,53 (168,87 - 176,42)
Gruplar arası p	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>
İkili farklılıklar	<b>1-2, 1-5</b>	<b>2-1, 2-4, 1-5</b>

*D vit: D vitamini, Ort: Aritmetik ortalama, Ortan: Ortanca SS: Standart sapma, Min:Minimum, Maks:Maksimum*

Verilerin analizinde Kruskal-Wallis istatistiksel analiz yöntemi kullanılmıştır



**Şekil 14.** Grupların Troponin T düzeyleri.



**Şekil 15.** Grupların NT-pro BNP düzeyleri.

### 4.3.2 Enflamatuvar ve Antienflamatuvar Sitokin Seviyeleri

Çalışmamızda enflamatuvar sitokin olarak, TNF- $\alpha$  düzeyi değerlendirildi. Gruplar arasında TNF- $\alpha$  düzeyleri açısından istatistiksel olarak farklılık saptandı (p=0,012). TNF- $\alpha$ , DOX grubunda ortalama 246,87 $\pm$ 58,11, kontrol grubunda 122,43 $\pm$ 58,36, ozon grubunda 140,7 $\pm$ 65,95, D vit grubunda 161,7 $\pm$ 83,11, Ozon+D vit grubunda 130,16 $\pm$ 46,36 ng/L olarak bulundu. TNF- $\alpha$  düzeyi, DOX grubunda tüm gruplara göre belirgin artmış olmakla birlikte; farklılığın DOX grubu ile kontrol grubu, DOX grubu ile Ozon+D vit grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p<0,05), (Tablo 9, Şekil 16).

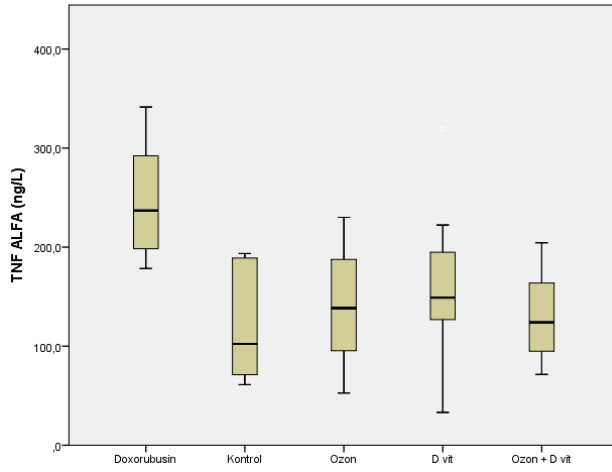
Çalışmamızda antienflamatuvar sitokin olarak, IL-10 düzeyi değerlendirildi. IL-10 düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık olduğu görüldü (p=0,008). IL-10, DOX grubunda 118,71 $\pm$ 36,38, kontrol grubunda 173,99 $\pm$ 21,56, Ozon grubunda 127,39 $\pm$ 30,97, D vit grubunda 130,48 $\pm$ 47,66, Ozon+D vit grubunda 113,51  $\pm$  24,76 pg/ml olarak bulundu. IL-10 düzeyi kontrol grubunda, tüm gruplara göre en yüksek seviyede olmakla birlikte; farklılık; kontrol grubu ile DOX grubu ve kontrol grubu ile Ozon+D vit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0,05), (Tablo 9, Şekil 17).

**Tablo 9.** Grupların enflamatuvar ve antienflamatuvar sitokin seviyeleri

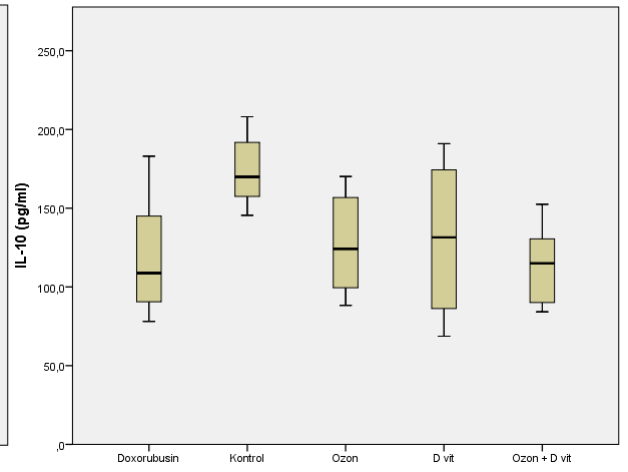
GRUP	TNF- $\alpha$ (ng/L)	IL-10 (pg/ml)
	Ort $\pm$ SS Ortan(Min-Maks)	Ort $\pm$ SS (Min-Maks)
Doxorubusin(1) (n=8)	246,87 $\pm$ 58,11 236,93 (178,4 - 341,47)	118,71 $\pm$ 36,38 (78,05 - 183,02)
Kontrol(2) (n=8)	122,43 $\pm$ 58,36 102,22(61,22 - 193,5)	173,99 $\pm$ 21,56 (145,45 - 208,06)
Ozon(3) (n=8)	140,7 $\pm$ 65,95 138,44 (52,64 - 230,07)	127,39 $\pm$ 30,97 (88,26 - 170,11)
D vit(4) (n=8)	161,7 $\pm$ 83,11 148,99 (33,15 - 319,19)	130,48 $\pm$ 47,66 (68,71 - 190,99)
Ozon + D vit(5) (n=8)	130,16 $\pm$ 46,36 124 (71,52 - 204,39)	113,51 $\pm$ 24,76 (84,2 - 152,51)
Gruplar arası p	<b>0,012*</b>	<b>0,008</b>
İkili farklılıklar	<b>1-2, 1-5</b>	<b>2-1, 2-5</b>

D vit: D vitamini, Ort: Aritmetik ortalama, Ortan: Ortanca, SS: Standart sapma, Min:Minimum, Maks: Maksimum

\* TNF- $\alpha$  için Kruskal Wallis, IL-10 için Oneway Anova istatistiksel analiz yöntemi kullanılmıştır



Şekil 16. Grupların TNF- $\alpha$  düzeyleri.



Şekil 17. Grupların IL-10 düzeyleri.

### 4.3.3 Oksidan ve Antioksidan Enzim Düzeyleri

Çalışmamızda oksidan parametrelerden MDA ve TOS düzeyleri değerlendirildi. Gruplar arasında MDA düzeyleri açısından istatistiksel olarak farklılık saptandı ( $p=0,007$ ). MDA; DOX grubunda ortalama  $16,78 \pm 2,11$ , kontrol grubunda  $12,03 \pm 2,49$ , ozon grubunda  $12,73 \pm 3,48$ , D vit grubunda  $13,92 \pm 2,67$ , Ozon+D vit grubunda  $12,61 \pm 2,05$  nmol/ml olarak bulundu. MDA düzeyi DOX grubunda, diğer tüm gruplara göre belirgin artmış olmakla birlikte; farklılık DOX grubu ile kontrol grubu, DOX grubu ile ozon, DOX grubu ile Ozon+D vit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p<0,05$ ), (Tablo 10, Şekil 18).

TOS düzeyleri açısından da gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık olduğu görüldü ( $p=0,038$ ). TOS; DOX grubunda ortalama  $38,24 \pm 3,67$ , kontrol grubunda  $31,66 \pm 3,37$ , ozon grubunda  $34,49 \pm 5,94$ , D vit grubunda  $35,54 \pm 5,21$ , Ozon+D vit grubunda  $33,9 \pm 4,26$  U/ml olarak bulundu. TOS düzeyi DOX grubunda, tüm gruplara göre belirgin artmış olmakla birlikte; farklılığın DOX grubu ile kontrol grubu arasından kaynaklandığı görüldü ( $p<0,05$ ), (Tablo 10, Şekil 19).

Çalışmamızda antioksidan parametrelerden SOD, GSH-Px ve TAS düzeyleri değerlendirildi. Gruplar arasında SOD düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ( $p=0,004$ ). SOD; DOX grubunda  $12,97 \pm 2,37$ , kontrol grubunda  $19,46 \pm 4,57$ , ozon grubunda  $18,35 \pm 3,09$ , D vit grubunda  $17,51 \pm 2,38$ , Ozon+D vit grubunda  $17,36 \pm 3,11$  ng/ml olarak bulundu. Farklılık; DOX grubu ile kontrol grubu ve

DOX grubu ile ozon grubu arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,05$ ), (Tablo 10, Şekil 20).

GSH-Px düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü ( $p=0,004$ ). GSH-Px; DOX grubunda ortalama  $27,05\pm 5,53$ , kontrol grubunda  $38,8\pm 8,31$ , Ozon grubunda  $35,37\pm 4,54$ , D vit grubunda  $36,31\pm 4,88$ , Ozon+D vit grubunda  $34,24\pm 4,39$  pg/ml olarak bulundu. GSH-Px düzeyi DOX grubunda, tüm gruplara göre belirgin azalmış olmakla birlikte farklılık; DOX grubu ile kontrol grubu, DOX grubu ile ozon grubu ve DOX grubu ile D vit grupları arasında anlamlıydı ( $p<0,05$ ), (Tablo 10, Şekil 21).

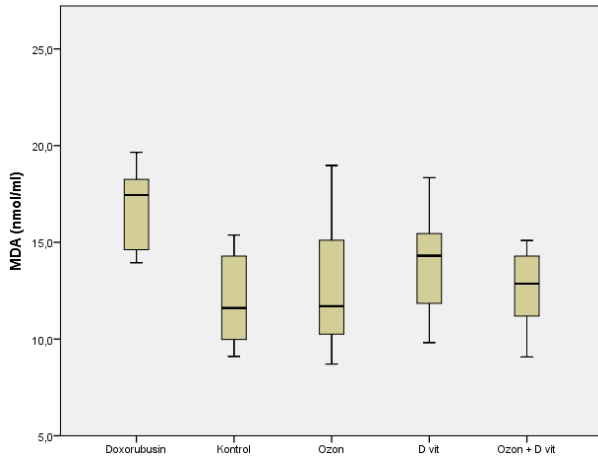
TAS düzeyleri açısından da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü ( $p=0,01$ ). TAS; DOX grubunda ortalama  $1,51\pm 0,12$ , kontrol grubunda  $1,82\pm 0,24$ , Ozon grubunda  $1,67\pm 0,18$ , D vit grubunda  $1,63\pm 0,13$ , Ozon+D vit grubunda  $1,72\pm 0,1$  pg/ml olarak bulundu. Farklılık; DOX grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,01$ ), (Tablo 10 , Şekil 22).

**Tablo 10.** Grupların oksidan ve antioksidan enzim düzeyleri

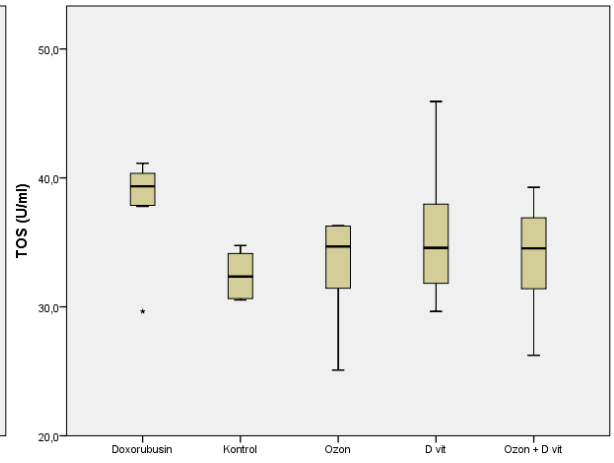
GRUP	MDA (nmol/ml)	TOS (U/ml)	SOD (ng/ml)	GSH-Px (pg/ml)	TAS (pg/ml)
	Ort $\pm$ SS (Min-Maks)	Ort $\pm$ SS Ortan (Min-Maks)	Ort $\pm$ SS (Min-Maks)	Ort $\pm$ SS (Min-Maks)	Ort $\pm$ SS (Min-Maks)
Doxorubusin(1) (n=8)	$16,78 \pm 2,11$ (13,94 - 19,65)	$38,24 \pm 3,67$ 39,35 (29,65 - 41,13)	$12,97 \pm 2,37$ (9,91 - 16,24)	$27,05 \pm 5,53$ (18,52 - 35,5)	$1,51 \pm 0,12$ (1,31 - 1,64)
Kontrol(2) (n=8)	$12,03 \pm 2,49$ (9,1 - 15,38)	$31,66 \pm 3,37$ 32,35 (24,31 - 34,75)	$19,46 \pm 4,57$ (13,49 - 25,16)	$38,8 \pm 8,31$ (27,66 - 49,54)	$1,82 \pm 0,24$ (1,45 - 2,21)
Ozon(3) (n=8)	$12,73 \pm 3,48$ (8,71 - 18,98)	$34,49 \pm 5,94$ 34,68 (25,1 - 46,07)	$18,35 \pm 3,09$ (13,63 - 23,4)	$35,37 \pm 4,54$ (27,66 - 40,46)	$1,67 \pm 0,18$ (1,47 - 1,95)
D vit(4) (n=8)	$13,92 \pm 2,67$ (9,82 - 18,34)	$35,54 \pm 5,21$ 34,58 (29,65 - 45,92)	$17,51 \pm 2,38$ (14,39 - 22,02)	$36,31 \pm 4,88$ (30,71 - 45,67)	$1,63 \pm 0,13$ (1,43 - 1,82)
Ozon+D vit(5) (n=8)	$12,61 \pm 2,05$ (9,08 - 15,1)	$33,9 \pm 4,26$ 34,53 (26,24 - 39,27)	$17,36 \pm 3,11$ (13,68 - 21,27)	$34,24 \pm 4,39$ (28,48 - 40,94)	$1,72 \pm 0,1$ (1,58 - 1,91)
Gruplar arası p	<b>0,007</b>	<b>0,038*</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,01</b>
İkili farklılıklar	<b>1-2, 1-3, 1-5</b>	<b>1-2</b>	<b>1-2, 1-3</b>	<b>1-2, 1-3, 1-4</b>	<b>1-2</b>

D vit: D vitamini, Ort: Aritmetik ortalama, Ortan: Ortanca, SS: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum

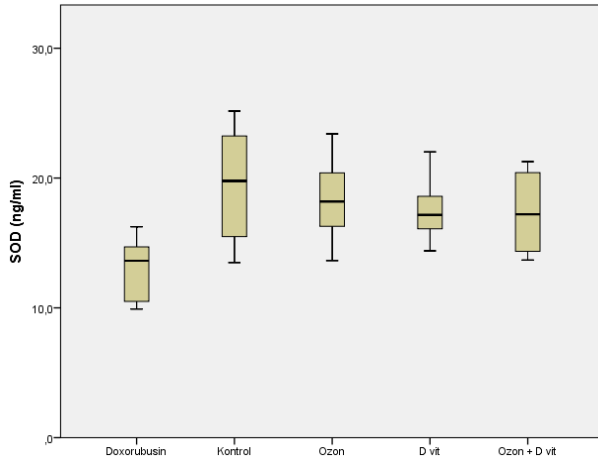
\* TOS için Kruskal-Wallis, diğer parametreler için Oneway Anova istatistiksel analiz yöntemi kullanılmıştır



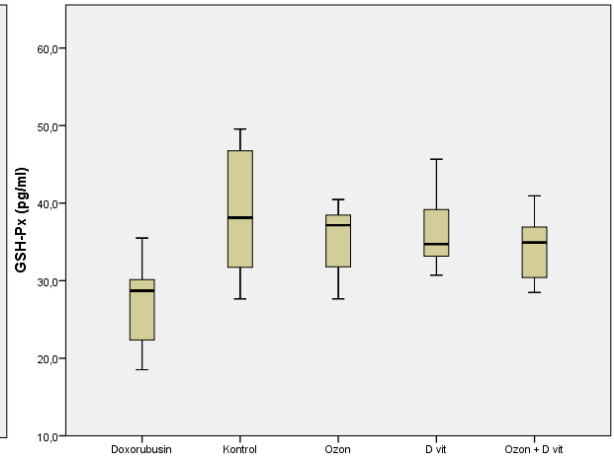
Şekil 18. Grupların MDA düzeyleri.



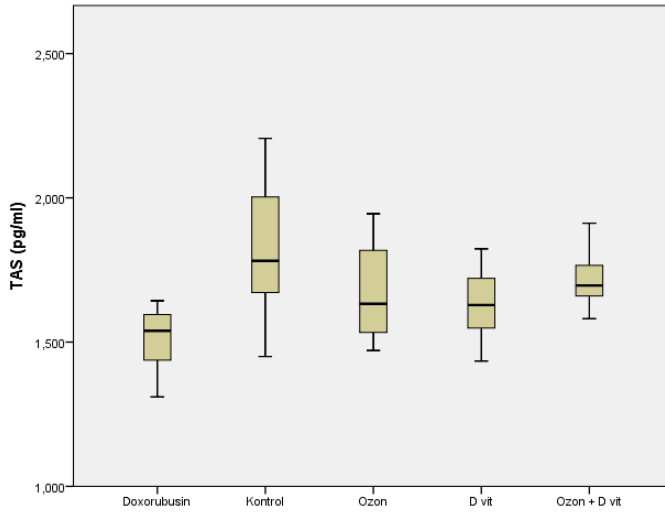
Şekil 19. Grupların TOS düzeyleri.



Şekil 20. Grupların SOD düzeyleri.



Şekil 21. Grupların GSH-Px düzeyleri.



Şekil 22. Grupların TAS düzeyleri.

#### 4.4. EKOKARDİYOĞRAFİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI

Gruplar arasında, ekokardiyografide ölçülen; LVPWTe, LVPWTes, LVED, LVes, IVSed, IVSes, EF ve FS değerleri değerlendirildi. LVPWTes, LVPWTe, IVSed ve IVSes açısından gruplar arasında farklılık saptanmadı ( $p>0,05$ ) (Tablo 11).

LVED açısından gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık saptandı ( $p=0,028$ ). LVED; DOX grubunda ortalama  $7,24\pm 0,37$ , kontrol grubunda  $6,65\pm 0,37$ , ozon grubunda  $6,58\pm 0,35$ , D vit grubunda  $6,56\pm 0,55$ , ozon+D vit grubunda  $6,63\pm 0,27$  mm olarak bulundu. LVED, DOX grubunda tüm gruplara göre belirgin artmıştı. Farklılık, DOX grubu ile diğer tüm gruplar arasında anlamlıydı ( $p<0,01$ ), (Tablo 11, Şekil 23).

LVes açısından gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık saptandı ( $p=0,000$ ). LVes ölçümleri, DOX grubunda ortalama  $5,4\pm 0,42$ , kontrol grubunda  $4,36\pm 0,24$ , ozon grubunda  $4,33\pm 0,2$ , D vit grubunda  $4,46\pm 0,43$ , ozon+D vit grubunda  $4,53\pm 0,19$  mm olarak bulundu. LVes, DOX grubunda tüm gruplara göre belirgin artmıştı. Farklılığın DOX grubu ile diğer tüm gruplar arasında anlamlı olduğu görüldü ( $p<0,01$ ), (Tablo 11, Şekil 24).

Ejeksiyon fraksiyonu açısından gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık saptandı (p=0,000). EF, DOX grubunda ortalama %58,4±4,84, kontrol grubunda % 71,64±2,82, ozon grubunda % 71,1±5,17, D vit grubunda %68,3±4,82, ozon+D vit grubunda %68±2,9 olarak bulundu. EF, DOX grubunda diğer tüm gruplara göre belirgin düşük idi. Farklılık DOX grubu ile tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0,01), (Tablo 11, Şekil 25).

Fraksiyonel kısalma açısından da gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık bulundu (p=0,000). FS, DOX grubunda ortalama % 25,45±2,94, kontrol grubunda % 34,36±2,22, ozon grubunda %34,09±4, D vit grubunda %31,98±3,53, ozon+D vit grubunda %31,67±2,13 olarak bulundu. FS, DOX grubunda tüm gruplara göre belirgin düşük idi. Farklılığın DOX grubu ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p<0,01), (Tablo 11, Şekil 26).

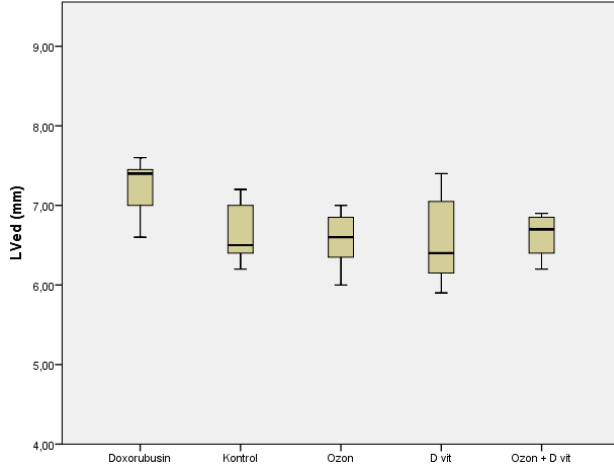
**Tablo 11.** Grupların ekokardiyografik ölçümleri

	LVPWTed (mm)	LVPWTes (mm)	IVSed (mm)	IVSes (mm)	LVed (mm)	LVes (mm)	EF (%)	FS (%)
GRUP	Ort± SS Ortan (Min-Maks)		Ort ± SS (Min-Maks)	Ort± SS Ortan (Min-Maks)		Ort ± SS (Min-Maks)		
Doxorubisin (1) (n=8)	1,58 ± 0,19 1,5 (1,3 - 1,9)	2,49 ± 0,23 2,5 (2,2 - 2,8)	1,55 ± 0,12 (1,4 - 1,8)	2,54 ± 0,29 2,5 (2 - 3)	7,24 ± 0,37 7,4 (6,6 - 7,6)	5,4 ± 0,42 (4,6 - 6)	58,4 ± 4,84 (50,8 - 66,1)	25,45 ± 2,94 (21,05 - 30,3)
Kontrol (2) (n=8)	1,4 ± 0,2 1,4 (1,1 - 1,8)	2,43 ± 0,22 2,5 (2 - 2,7)	1,43 ± 0,18 (1,2 - 1,8)	2,4 ± 0,33 2,5 (2 - 3)	6,65 ± 0,37 6,5 (6,2 - 7,2)	4,36 ± 0,24 (4 - 4,7)	71,64 ± 2,82 (67,5 - 76)	34,36 ± 2,22 (31,25 - 37,88)
Ozon (3) (n=7)	1,46 ± 0,15 1,45 (1,2 - 1,7)	2,31 ± 0,22 2,4 (2 - 2,5)	1,51 ± 0,16 (1,3 - 1,8)	2,55 ± 0,16 2,5(2,4-2,8)	6,58 ± 0,35 6,6 (6 - 7)	4,33 ± 0,2 (4,1 - 4,6)	71,1 ± 5,17 (64,3 - 79)	34,09 ± 4 (29,03 - 40,58)
D vit (4) (n=7)	1,45 ± 0,21 1,5 (1,2 - 1,8)	2,36 ± 0,23 2,5 (2 - 2,5)	1,56 ± 0,27 (1,2 - 2)	2,43 ± 0,21 2,5 (2 - 2,7)	6,56 ± 0,55 6,4 (5,9 - 7,4)	4,46 ± 0,43 (4 - 5,2)	68,3 ± 4,82 (61,8 - 75,2)	31,98 ± 3,53 (27,42 - 37,14)
Ozon+D vit (5) (n=8)	1,39 ± 0,24 1,35 (1,2 - 1,9)	2,23 ± 0,32 2 (2 - 2,8)	1,58 ± 0,39 (1 - 2)	2,61 ± 0,33 2,45 (2,2-3)	6,63 ± 0,27 6,63 (6,2 - 6,9)	4,53 ± 0,19 (4,2 - 4,8)	68 ± 2,9 (64,8 - 74,1)	31,67 ± 2,13 (29,41 - 36,23)
Gruplar arası p İkili Farklılıklar	>0,05*	>0,05*	>0,05	>0,05*	0,028 *	0,000	0,000	0,000
					1-2, 1-3, 1-4, 1-5	1-2, 1-3, 1-4, 1-5	1-2, 1-3, 1-4, 1-5	1-2, 1-3, 1-4, 1-5

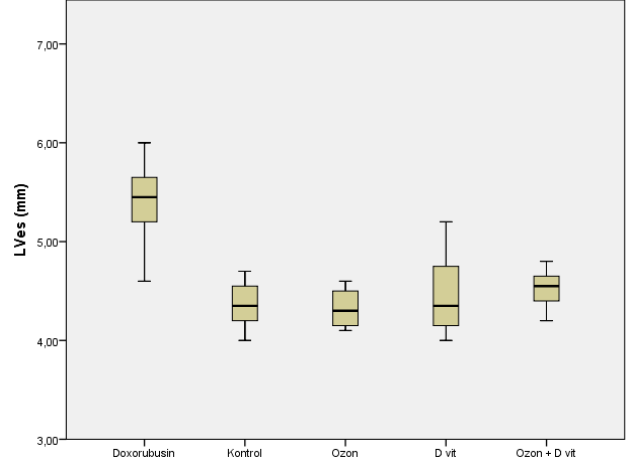
D vit: D vitamini, Ort: Aritmetik ortalama, Ortan: Ortanca, SS: Standart sapma, Min:Minimum, Maks: Maksimum, EF: Ejeksiyon fraksiyonu, FS: Fraksiyonel kısalma

\* LVPWTed, LVPWTes, IVSes ve LVed parametreleri için Kruskal-Wallis, diğer parametreler için Oneway Anova analiz yöntemi kullanılmıştır

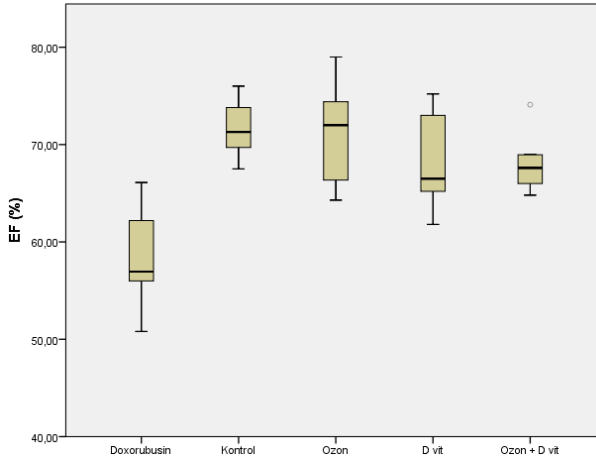




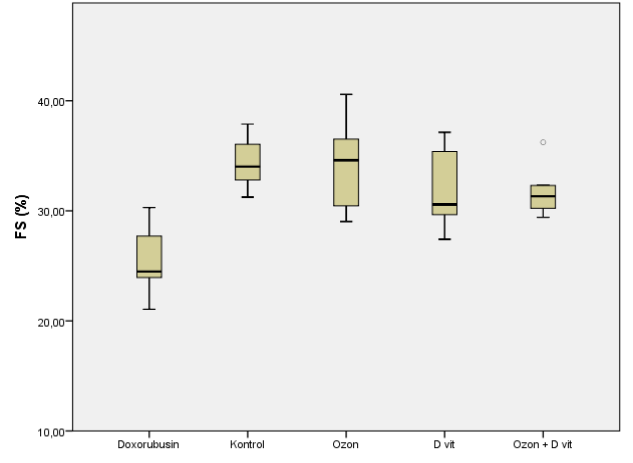
**Şekil 23.** Grupların LVed düzeyleri .



**Şekil 24.** Grupların LVes düzeyleri.



**Şekil 25.** Grupların EF düzeyleri.



**Şekil 26.** Grupların FS düzeyleri.

#### 4.5. KALBİN HİSTOLOJİK İNCELENMESİ

Kalbin histolojik incelemesinde 3 farklı boyama yöntemi kullanıldı.

##### 1- Hematoksilen&Eozin (H&E) Boyama:

Kesitler H&E ile boyandıktan sonra Billingham dejenerasyon skoru kullanılarak değerlendirildi (Tablo 7) (74). Billingham skorlaması ile, DOX grubunda %87,5 oranında grade 3 dejenerasyon, %12,5 oranında grade 2 dejenerasyon saptanırken; kontrol grubunda hiçbir ratta grade 1 ve üzerinde dejenerasyon yoktu. Kontrol grubundaki ratların %62,5'inde Billingham skoru grade 0 iken, %37,5'inde grade 0,5 idi. Ozon, D vitamini ve ozon + D vitamini verilen gruplarda ise grade 3 dejenerasyon olmadığı görüldü (Tablo 12). Gruplar arasında Billingham skorlaması açısından istatistiksel olarak farklılık saptandı ( $p=0,000$ , Tablo 12). Farklılığın DOX grubu ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p<0,05$ ).

**Tablo 12.** H&E boyama ile Billingham dejenerasyon skorlamasına ait veriler

GRUP	Grade 0	Grade 0,5	Grade 1	Grade 1,5	Grade 2	Grade 2,5	Grade 3
Doxorubusin(1) (n=8)	-	-	-	-	n=1 %12,5	-	n=7 %87,5
Kontrol(2) (n=8)	n=5 %62,5	n=3 %37,5	-	-	-	-	-
Ozon(3) (n=8)	-	-	n=3 %37,5	n=1 %12,5	n=2 %25	n=2 %25	-
D vit(4) (n=8)	-	-	n=1 %12,5	n=3 %37,5	n=3 %37,5	n=1 %12,5	-
Ozon+D vit(5) (n=8)	-	-	-	n=3 %37,5	n=4 %50	n=1 %12,5	-

\*Verilerin analizinde Kruskal-Wallis istatistiksel analiz yöntemi kullanılmıştır,  $p=0,000$

##### 2- TUNEL Boyama:

Kesitlerde TUNEL-pozitif hücreler sayıldı ve apoptotik indeks yüzde (%) cinsinden hesaplandı. Apoptotik indeks, DOX grubunda ortalama  $30\pm 3,7$ , kontrol grubunda  $1,25\pm 0,46$ , ozon grubunda  $7,38\pm 0,74$ , D vit grubunda  $7,13\pm 1,13$ , ozon+D vit grubunda  $7,13\pm 1,36$  olarak bulundu. DOX grubundaki apoptotik hücre oranının belirgin artmış olduğu görüldü ( $p=0,000$ ). Farklılığın DOX grubu ile kontrol grubu, DOX grubu ile D vit grubu, DOX grubu ile ozon+D vit grubu ve kontrol grubu ile

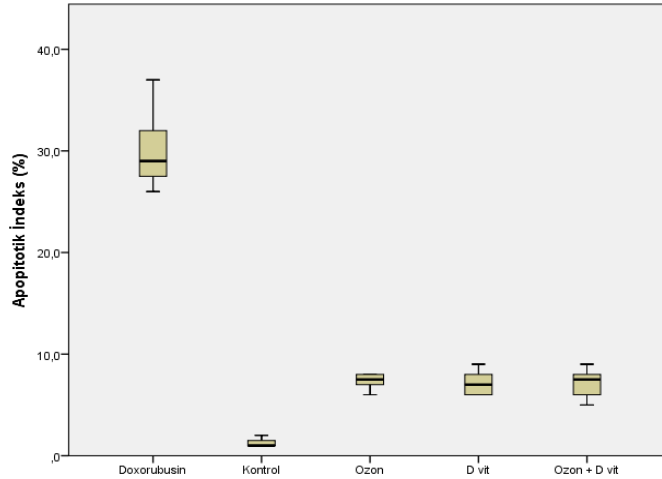
ozon grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p<0,05$ ), (Tablo 13, Şekil 27).

**Tablo 13.** TUNEL boyamaya ait apoptotik indeks

GRUP	Apoptotik İndeks (%)
	Ort $\pm$ SS Ortan(Min-Maks)
Doxorubusin(1) (n=8)	30 $\pm$ 3,7
	29 (26 - 37)
Kontrol(2) (n=8)	1,25 $\pm$ 0,46
	1(1 - 2)
Ozon(3) (n=8)	7,38 $\pm$ 0,74
	7,5 (6 - 8)
D vit(4) (n=8)	7,13 $\pm$ 1,13
	7 (6 - 9)
Ozon+D vit(5) (n=8)	7,13 $\pm$ 1,36
	7,5 (5 - 9)
Gruplar arası p	<b>0,000</b>
İkili farklılıklar	<b>1-2, 1-4, 1-5, 2-3</b>

*D vit: D vitamini, Ort: Aritmetik ortalama, Ortan: Ortanca, SS: Standart sapma, Min:Minumum, Maks:Maksimum,*

Verilerin analizinde Kruskal-Wallis istatistiksel analiz yöntemi kullanılmıştır



**Şekil 27.** TUNEL boyamaya ait apoptotik indeksleri.

### 3- Kaspaz-3 İmmünohistokimyasal Boyama:

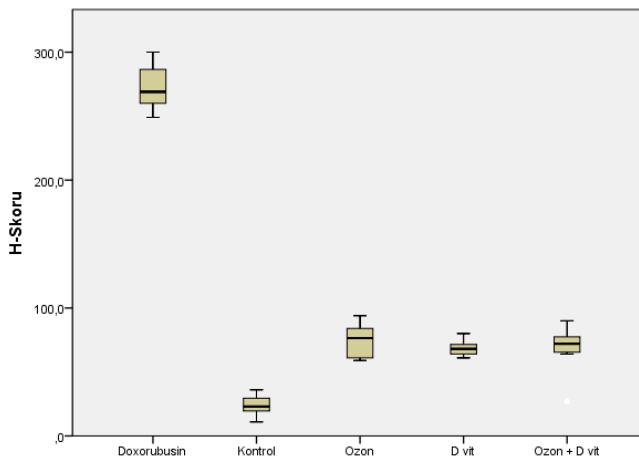
Her kesit için kaspaz-3 immünohistokimyasal boyanma skorlaması olan H-skoru hesaplandı. H-skoru değeri, DOX grubunda ortalama 272,5 $\pm$ 17,96, kontrol grubunda 23,88 $\pm$ 7,86, ozon grubunda 74,5 $\pm$ 13,24, D vit grubunda 68,5 $\pm$ 6,19, ozon+D vit grubunda 68,38 $\pm$ 18,68 olarak bulundu. DOX grubunun kontrol grubuna göre ortalama

11,4 kat yüksek H-skoruna sahip olduğu izlendi. Tedavi uygulanan gruplarda ise bu oranın ortalama 3,6-4 kat yüksek H-skorlarına gerilediği saptandı. DOX grubundaki kaspaz-3 immunoreaktivite skorlamasının diğer gruplara göre belirgin yüksek olduğu izlendi (p=0,000). Farklılığın DOX grubu ile tüm gruplar arasında ve kontrol grubu ile tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p<0,05), (Tablo 14, Şekil 28).

**Tablo 14.** Grupların Kaspaz 3 ekspresyonun H-skoru sonuçları

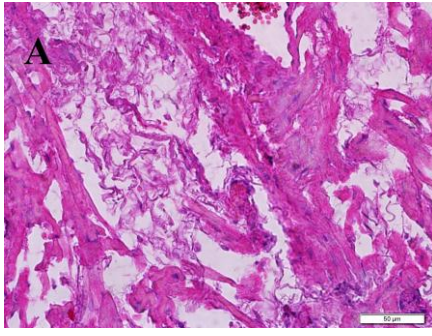
GRUP	H-Skoru
	Ort ± SS (Min-Maks)
Doxorubisin(1) (n=8)	272,5 ± 17,96 (249 - 300)
Kontrol(2) (n=8)	23,88 ± 7,86 (11 - 36)
Ozon(3) (n=8)	74,5 ± 13,24 (59 - 94)
D vit(4) (n=8)	68,5 ± 6,19 (61 - 80)
Ozon + D vit(5) (n=8)	68,38 ± 18,68 (27 - 90)
Gruplar arası p	<b>0,000</b>
İkili farklılıklar	<b>1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 2-3, 2-4, 2-5</b>

*D vit: D vitamini, Ort: Aritmetik ortalama, SS: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum*  
Verilerin analizinde Oneway Anova istatistiksel analiz yöntemi kullanılmıştır

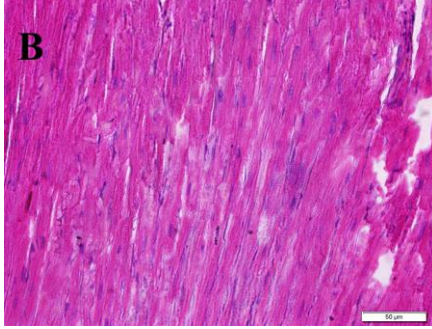


**Şekil 28.** Kaspaz-3 ekspresyonun H-skorları.

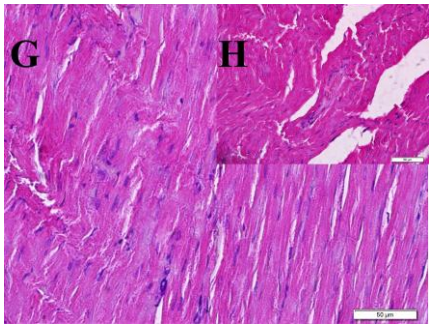
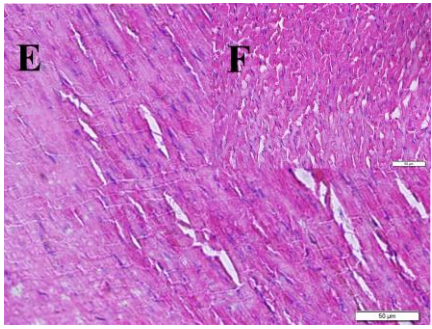
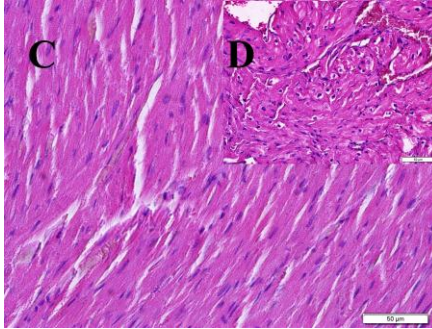
Miyokardın histolojik preparatlarının Hematoksilen&Eozin, TUNEL ve kaspaz-3 boyanma görünümleri sırasıyla Resim 12,13 ve 14'te verilmiştir.



Resimde normal yapısı tamamen kaybolmuş kalp kası dokusu görülmektedir. Dokunun tamamına yakın bölümünde; kas liflerinin bütünlüğünün bozulduğu, liflerin birbirinden ayrıldığı, koptuğu ve geniş boşlukların olduğu izlenmektedir. Pek çok lifte çekirdek görülmemekle birlikte nadir olarak görülen bazı kas liflerinin çekirdeklerinin küçüldüğü ve nekrotik görünüm aldığı izlenmiştir. Kapillerlerdeki genişleme ve yaygınlaşma dikkat çeken bir diğer histolojik bulgudur.



Normal kalp kası dokusuna ait histolojik görünüm.

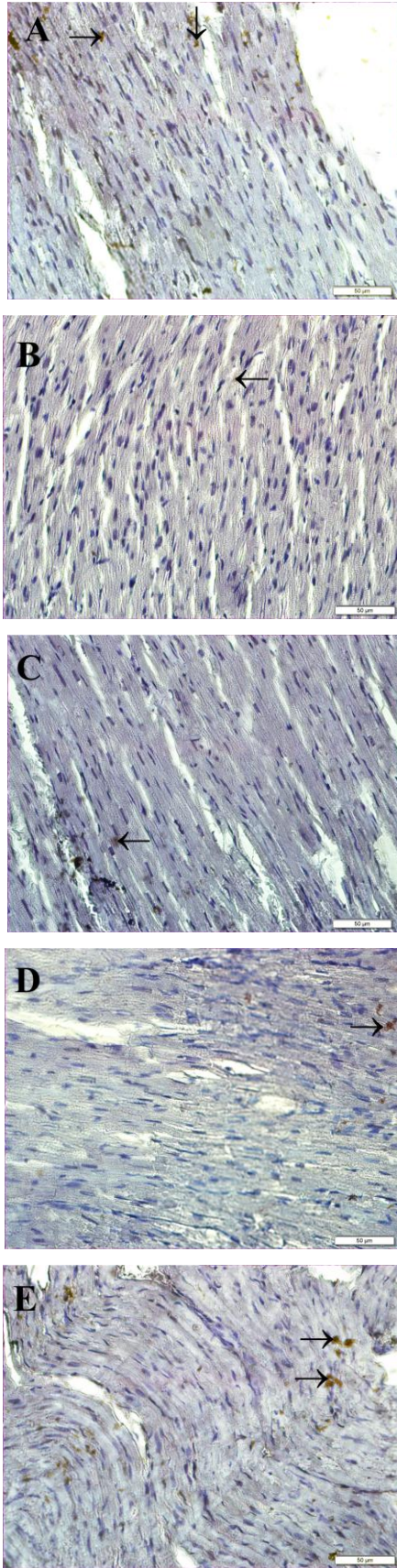


Ozon, D vitamini ve Ozon+D vitamini uygulanan gruplarda bazı alanlarda kas dokusunun normale yakın görünüm sergilediği, bazı alanlarda ise toksik dejenerasyonun devam ettiği görülmektedir (Resim 38- C, E, G). Toksik dejenerasyonun devam ettiği alanlarda; kas liflerinde bütünlüğün kaybolduğu, sitoplazmik içeriğin azaldığı, hücreler arası alanda ve hücrelerde vakuollerin olduğu, hücrelerin ödemlendiği ve şiştiği izlenmektedir. Ayrıca bazı alanlarda nekrotik görümlü çekirdeklerin varlığının devam ettiği görülmektedir (Resim 38- D, F, H).

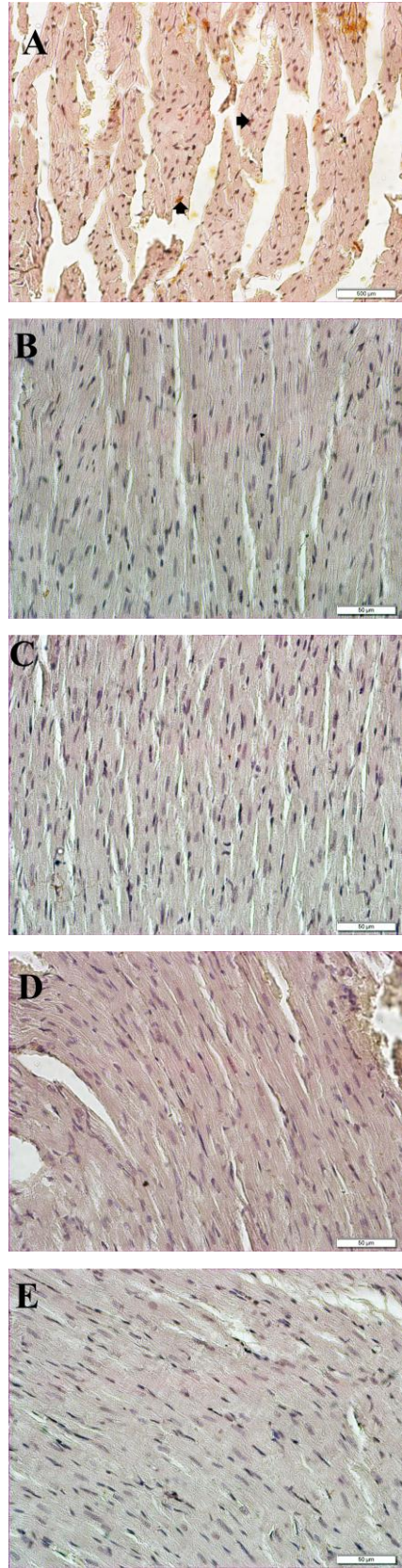
**Resim 12.** Hematoksilen & Eozin ile boyanan kalp dokusu (A-H).

Doksorubisin verilen grup; (A), Kontrol; (B), Doksorubisin + Ozon uygulanan grup; (C,D), Doksorubisin + D vitamini uygulanan grup; (E,F), Doksorubisin + Ozon ve D vitamininin birlikte uygulandığı grup; (G, H) (Hematoksilen & Eozin Bar 50  $\mu$ m X400).



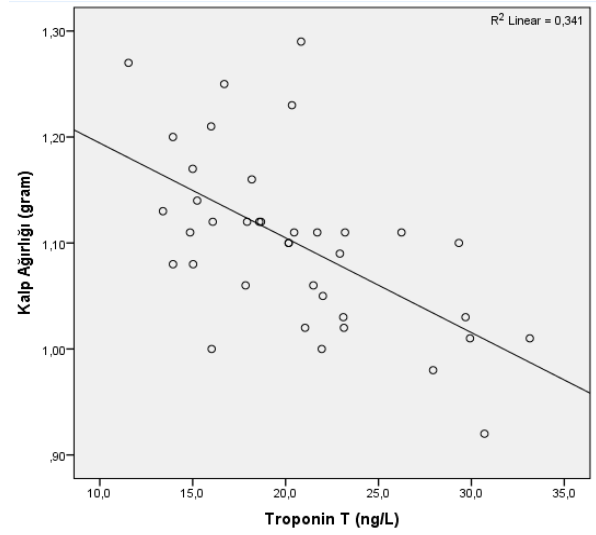
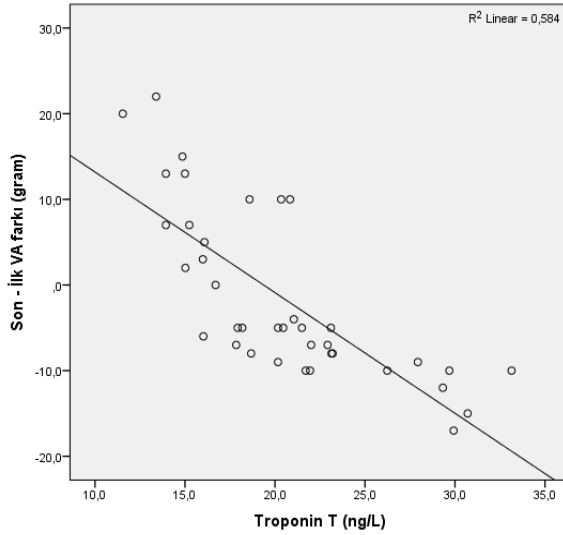


**Resim 13.**Kalp kasında apoptozisin varlığını gösteren TUNEL yönteminin yapıldığı dokular; (A-E). Doksorubisin verilen grup; (A), Kontrol; (B), Doksorubisin + Ozon uygulanan grup; (C), Doksorubisin + D vitamini uygulanan grup; (D), Doksorubisin + Ozon ve D vitamininin birlikte uygulandığı grup; (E). TUNEL pozitif hücreler ince ok ile gösterilmiştir. (TUNEL, Bar 50 µm X400).



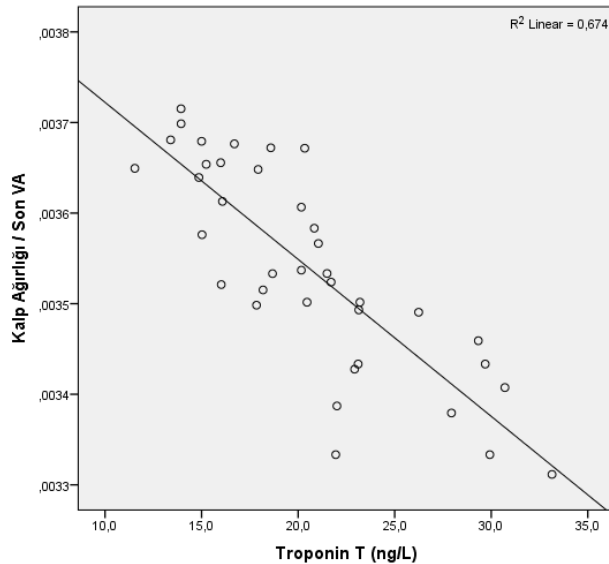
**Resim 14.** Kalp kasında kaspaz-3 ekspresyonunu ve dağılımı gösteren kesitler; (A-E) .  
Dokсорubisin verilen grup; (A), Kontrol; (B), Dokсорubisin + Ozon uygulanan grup; (C), Dokсорubisin + D vitamini uygulanan grup; (D), Dokсорubisin + Ozon ve D vitamininin birlikte uygulandığı grup; (E). Kaspaz-3 pozitif hücreler kalın ok ile gösterilmiştir. *İmmunoperoksidaz&hematoksilen Bar 50 µm X400.*

Kardiyak hasarlanma göstergelerinden biri olan Troponin T düzeyleri ile kilo farkı (son vücut ağırlığı ile ilk vücut ağırlığı arasındaki fark), kalp ağırlığı ve kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif ilişki saptandı ( $p=0,000$ ;  $r$  değerleri sırasıyla  $-0,834$ ,  $-0,604$  ve  $-0,845$ ), (Şekil 29-31). Troponin T düzeylerindeki artışla birlikte; kilo farkı, kalp ağırlığı ve kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranlarının azaldığı görüldü.



**Şekil 29.** Troponin T düzeyi ile kilo farkı (son vücut ağırlığı ile ilk vücut ağırlığı arasındaki fark) arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r= -0,834$ ).

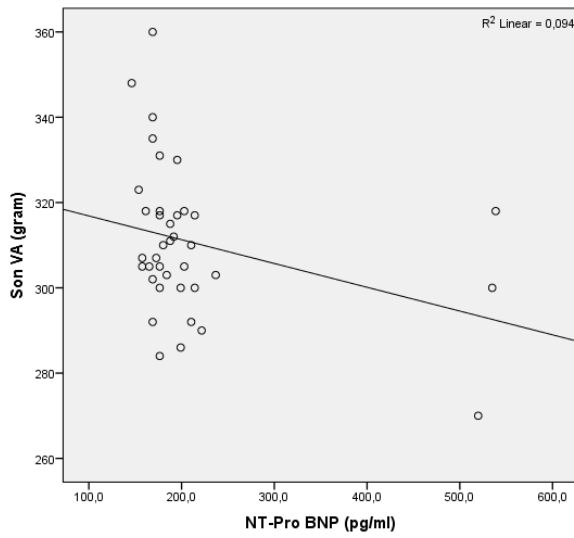
**Şekil 30.** Troponin T düzeyi ile kalp ağırlığı arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r= -0,604$ ).



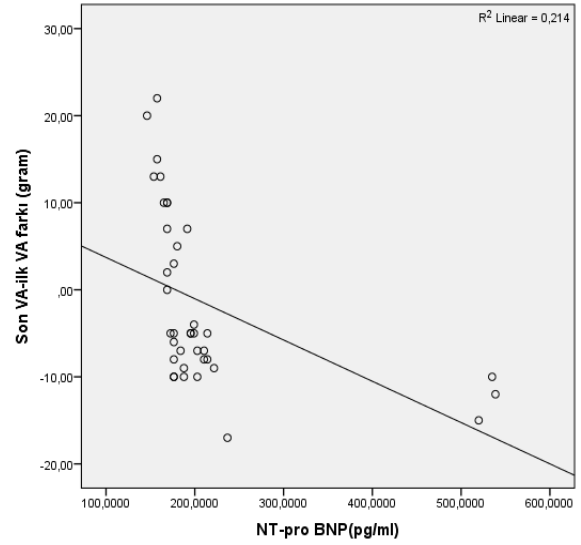
**Şekil 31.** Troponin T düzeyi ile kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranı arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r= -0,845$ ).



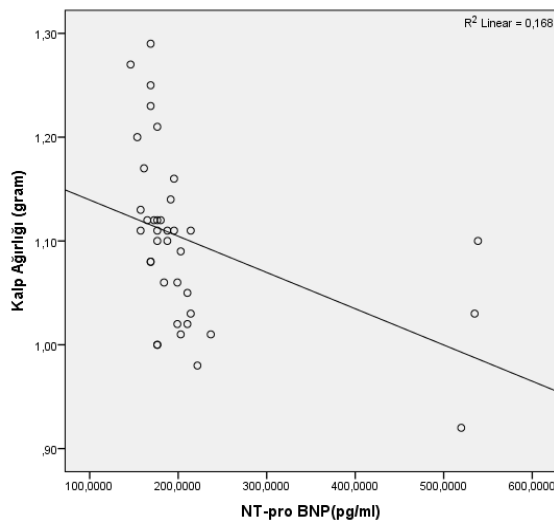
Kardiyak hasarlanma göstergelerinden NT-pro BNP düzeyleri ile; son vücut ağırlığı, kilo farkı, kalp ağırlığı ve kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif ilişki saptandı (son vücut ağırlığı için  $p=0,021$ ,  $r= -0,374$ , kilo farkı için  $p=0,000$ ,  $r= -0,778$ , kalp ağırlığı için  $p=0,000$ ,  $r= -0,651$  ve kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranı için  $p=0,000$ ,  $r= -0,804$ ) (Şekil 32-35). NT-pro BNP düzeylerindeki artışla birlikte; son vücut ağırlığı, kilo farkı, kalp ağırlığı ve kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranının azaldığı görüldü.



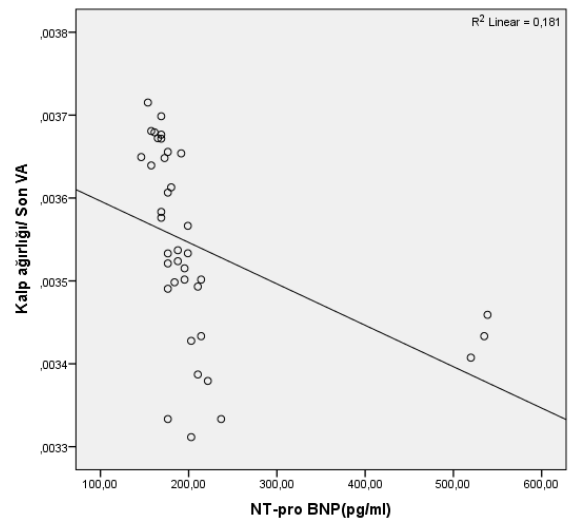
**Şekil 32.** NT-Pro BNP düzeyi ile son vücut ağırlığı arasındaki ilişki ( $p=0,021$ ,  $r= -0,374$ ).



**Şekil 33.** NT-Pro BNP düzeyi ile kilo farkı (son vücut ağırlığı ile ilk vücut ağırlığı arasındaki fark) arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r= -0,778$ ).

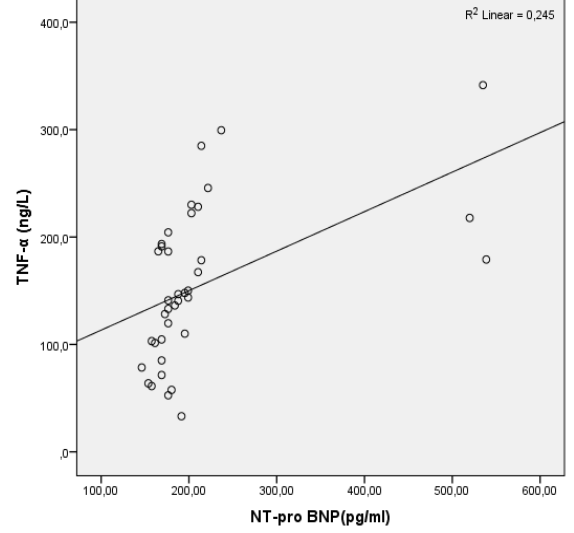
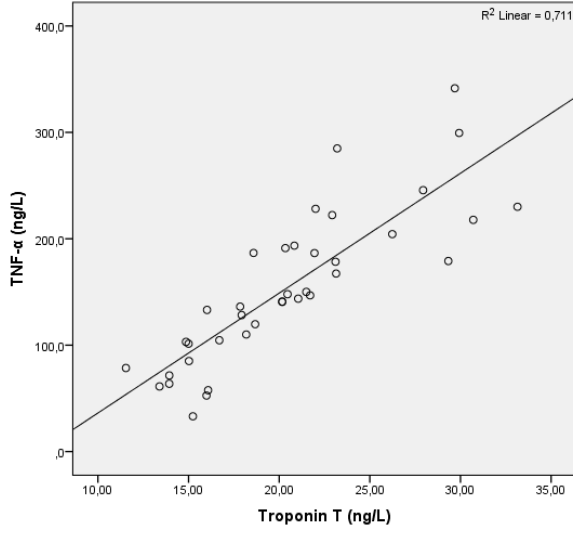


**Şekil 34.** NT-Pro BNP düzeyi ile kalp ağırlığı arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r= -0,651$ ).



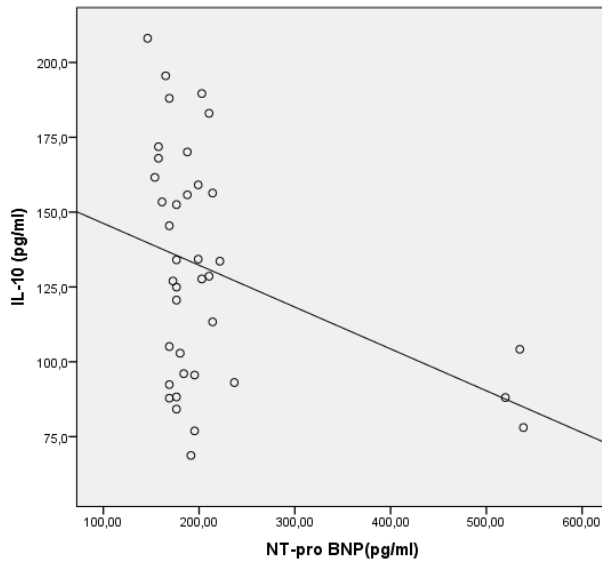
**Şekil 35.** NT-Pro BNP düzeyi ile kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranı arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r=-0,804$ ).

Enflamatuvar sitokin olan TNF- $\alpha$  ile kardiyak hasarlanma göstergeleri olan Troponin T ve NT-pro BNP arasında anlamlı pozitif ilişki saptandı ( $p=0,000$ ; Troponin T için  $r=0,903$ , NT-pro BNP için  $r=0,643$ ), (Şekil 36,37). Troponin ve NT-pro BP düzeyleri arttıkça, TNF- $\alpha$  düzeyi de artmaktaydı. Anti-enflamatuvar sitokin olan IL-10 ile NT-pro BNP ile anlamlı negatif ilişki saptandı ( $p=0,042$ ,  $r= -0,332$ ), (Şekil 38).



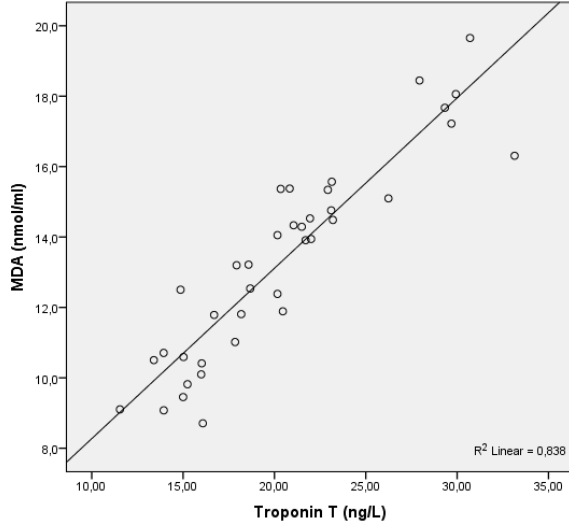
**Şekil 36.** Troponin T düzeyi ile TNF- $\alpha$  arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r= 0,903$ ).

**Şekil 37.** NT-Pro BNP düzeyi ile TNF- $\alpha$  arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r= 0,643$ ).

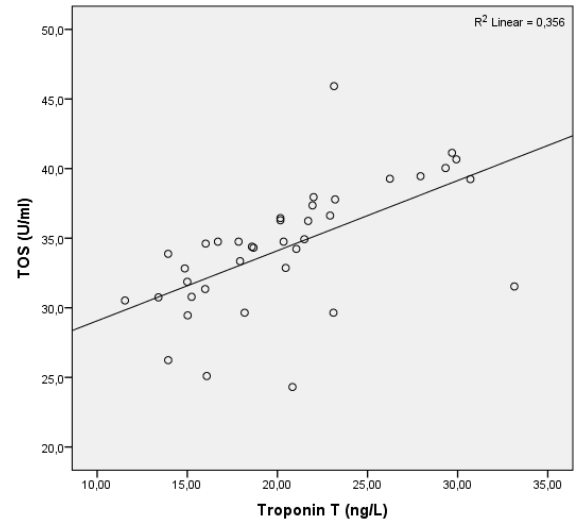


**Şekil 38.** NT-Pro BNP düzeyi ile IL-10 arasındaki ilişki ( $p=0,042$ ,  $r= -0,332$ ).

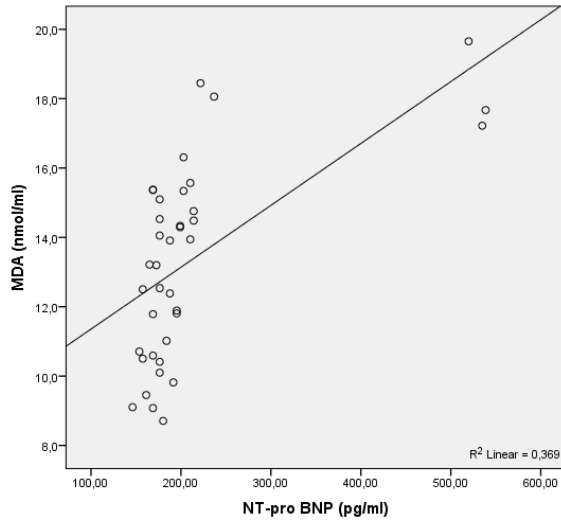
Oksidan belirteçler olan MDA ve TOS ile kardiyak hasarlanma göstergeleri olan Troponin T ve NT-pro BNP düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildi. Troponin T ile MDA ve TOS arasında anlamlı pozitif ilişki saptandı ( $p=0,000$ ;  $r=0,952$  ve  $r=0,685$ ), (Şekil 39,40). NT-pro BNP ile MDA ve TOS arasında da anlamlı pozitif ilişki olduğu görüldü ( $p=0,000$ ;  $r=0,652$  ve  $r=0,569$ ), (Şekil 41,42). Oksidan parametrelerdeki artışla paralel olarak kardiyak hasar belirteçlerinde artış olduğu görüldü.



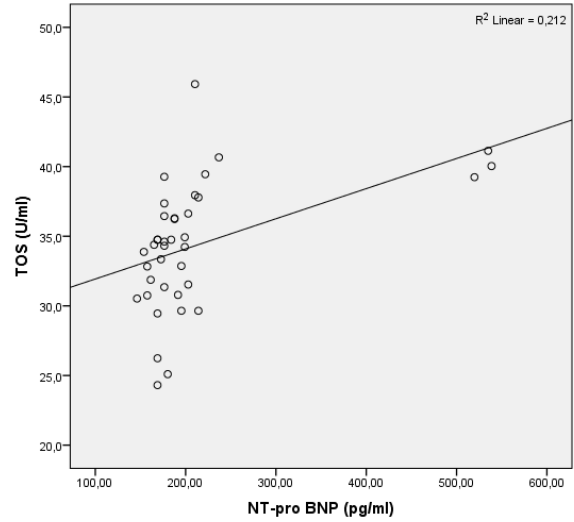
Şekil 39. Troponin T düzeyi ile MDA arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r=0,952$ ).



Şekil 40. Troponin T düzeyi ile TOS arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r=0,685$ ).

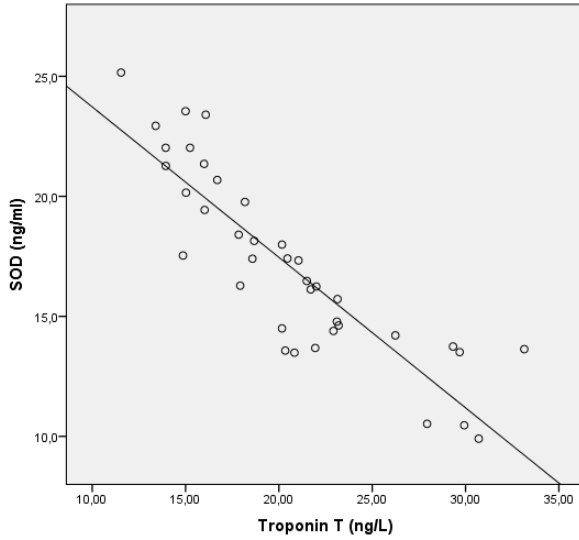


Şekil 41. NT-Pro BNP düzeyi ile MDA arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r=0,652$ ).

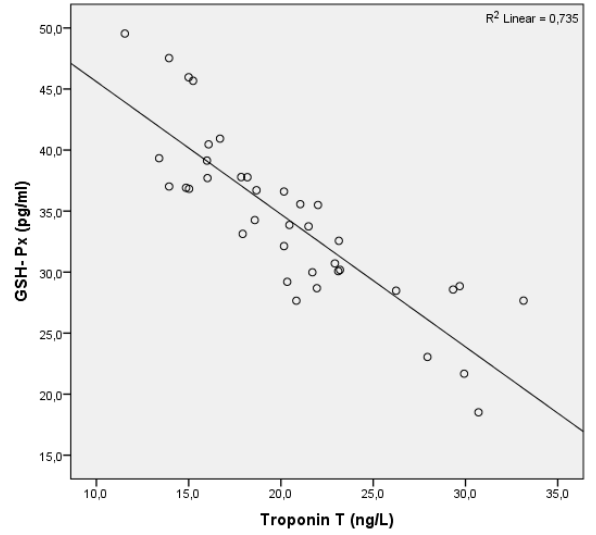


Şekil 42. NT-Pro BNP düzeyi ile TOS arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r=0,569$ ).

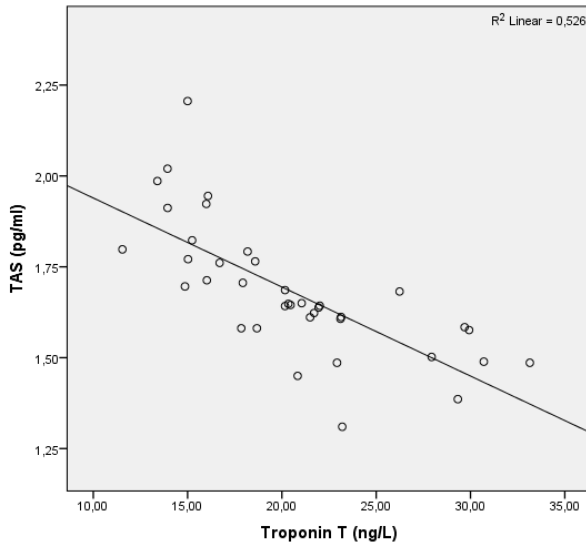
Antioksidan belirteçler olan SOD, GSH-Px ve TAS ile kardiyak hasarlanma göstergeleri olan Troponin T ve NT-Pro BNP düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildi. Troponin T ile SOD, GSH-Px ve TAS arasında anlamlı negatif ilişki saptandı ( $p=0,000$ ;  $r$  değerleri sırasıyla SOD için  $r= -0,889$ ; GSH-Px için  $r= -0,889$  ve TAS için  $r= -0,569$ ), (Şekil 43-45).



Şekil 43. Troponin T düzeyi ile SOD arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r= -0,889$ ).

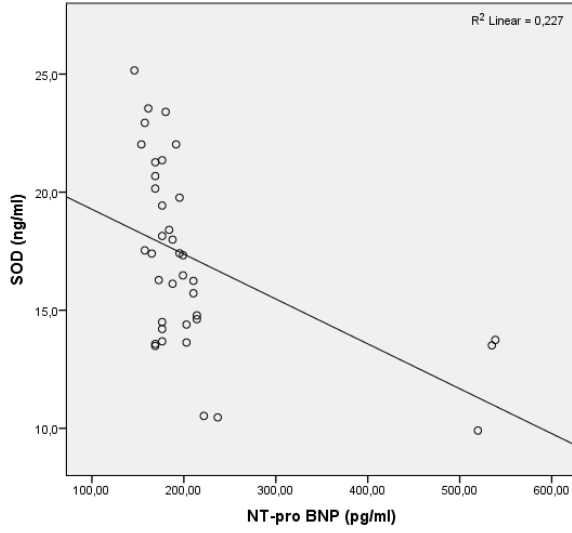


Şekil 44. Troponin T düzeyi ile GSH-Px arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r= -0,889$ ).

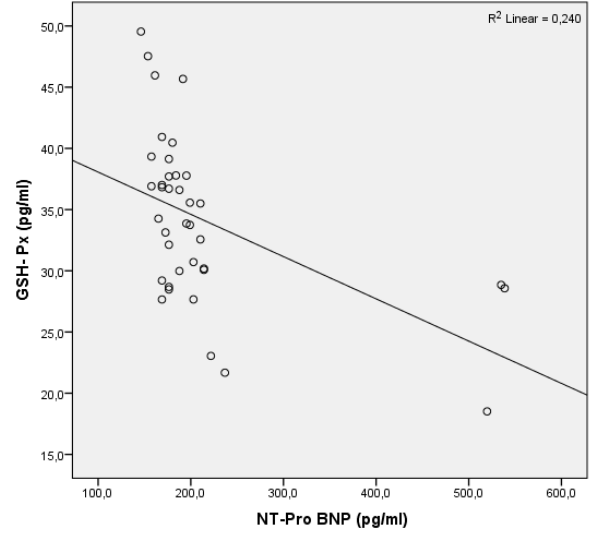


Şekil 45. Troponin T düzeyi ile TAS arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r= -0,569$ ).

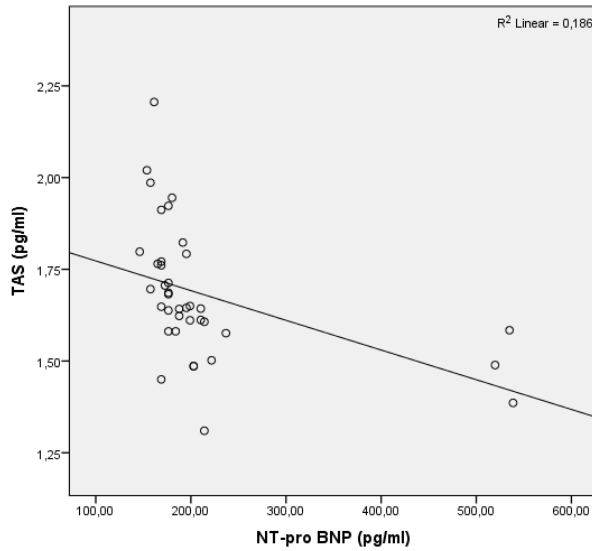
NT-Pro BNP ile SOD, GSH-Px ve TAS arasında da anlamlı negatif ilişki bulundu ( $p=0,000$ ;  $r$  değerleri sırasıyla SOD için  $r= -0,605$ , GSH-Px için  $r= -0,594$  ve TAS için  $r= -0,701$ ), (Şekil 46-48). Antioksidan parametrelerdeki artışla kardiyak hasar belirteçlerinde azalma görüldü.



Şekil 46. NT-Pro BNP düzeyi ile SOD arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r= -0,605$ ).

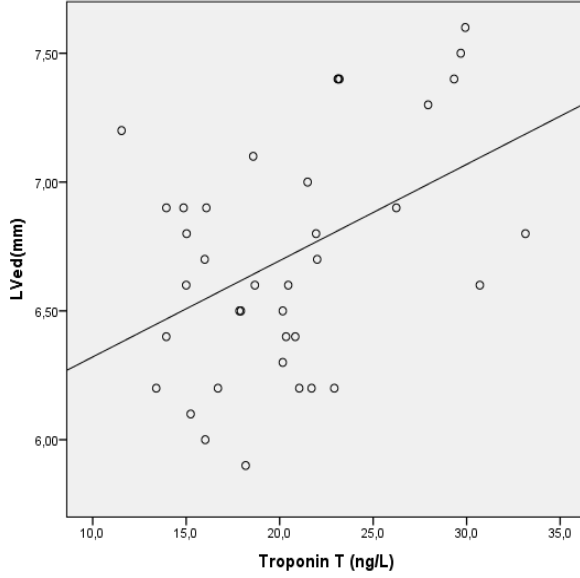


Şekil 47. NT-Pro BNP düzeyi ile GSH-Px arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r= -0,605$ ).

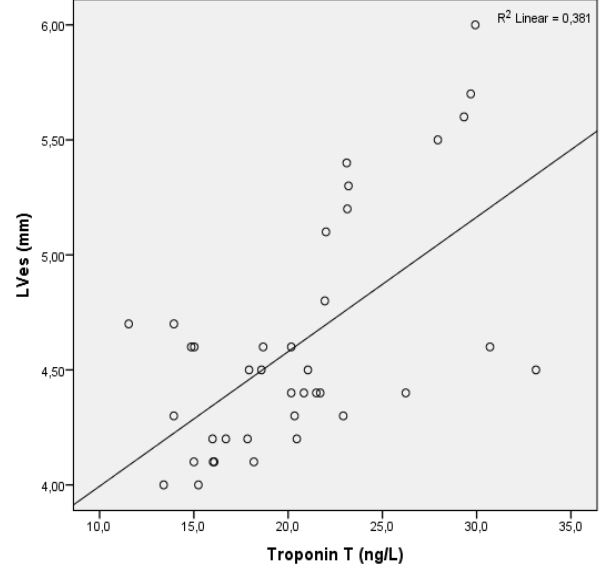


Şekil 48. NT-Pro BNP düzeyi ile TAS arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r= -0,701$ ).

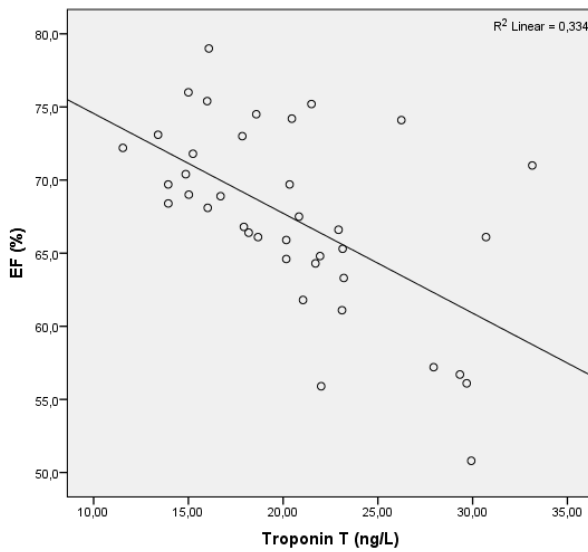
Ekokardiyografi verileri ile kardiyak hasarlanma göstergeleri olan Troponin T ve NT-Pro BNP düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde; Troponin T ile LVPW Ted, LVed, LVes, IVSed ve IVSes arasında anlamlı pozitif ilişki saptandı (LVPW Ted için  $p=0,002$ ,  $r=0,486$ ; LVed için  $p=0,013$ ,  $r=0,399$ ; LVes için  $p=0,000$ ,  $r=0,555$ ; IVSed için  $p=0,002$ ,  $r=0,374$ ; IVSes için  $p=0,021$ ,  $r=0,374$ ), (Şekil 49,50). Troponin T ile EF ve FS değerleri arasında ise anlamlı negatif ilişki saptandı ( $p=0,000$ ,  $r$  değerleri sırasıyla EF için  $r= -0,592$ ; FS için  $r= -0,616$ ), (Şekil 51,52).



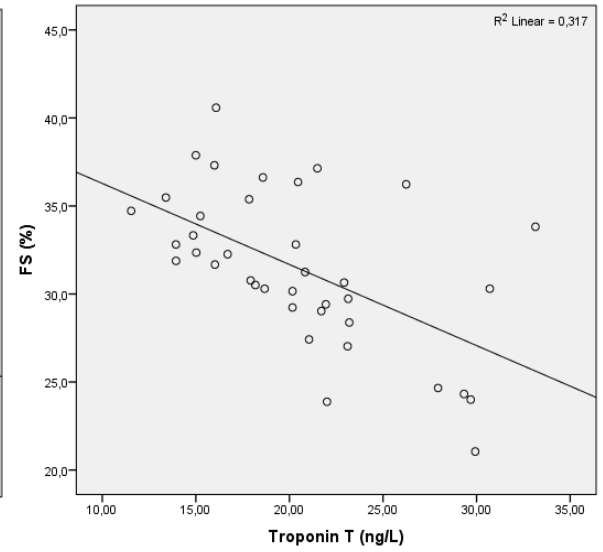
Şekil 49. Troponin T düzeyi ile LVed arasındaki ilişki ( $p=0,013$ ,  $r= 0,399$ ).



Şekil 50. Troponin T düzeyi ile LVes arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r= 0,555$ ).

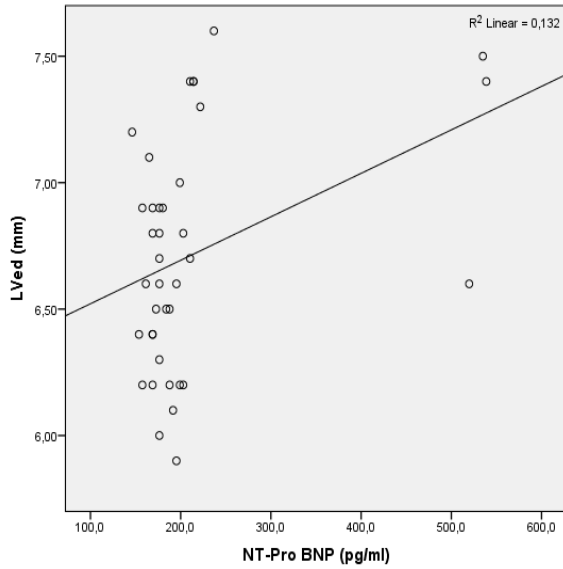


Şekil 51. Troponin T düzeyi ile EF arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r= -0,592$ ).

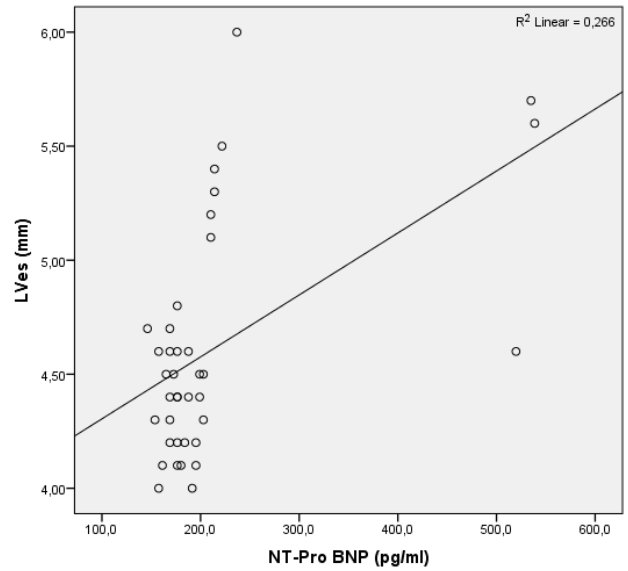


Şekil 52. Troponin T düzeyi ile FS arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r= -0,616$ ).

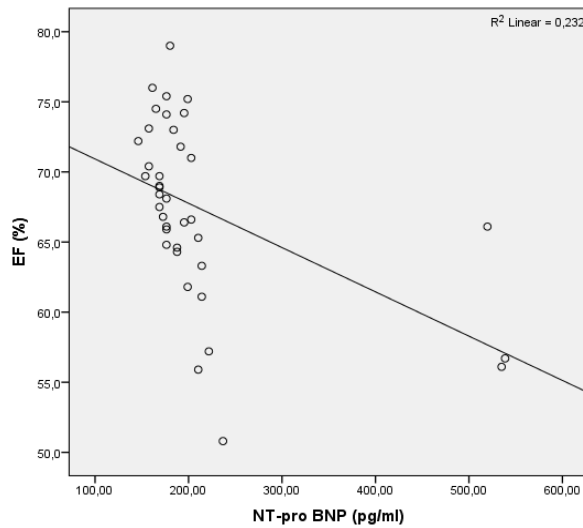
NT-pro BNP ile LVPW Ted, LVED, Lves ve IVSed arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki saptandı (LVPW Ted için  $p=0,007$ ,  $r=0,430$ , LVED için  $p=0,041$ ,  $r=0,334$ , Lves için  $p=0,004$ ,  $r=0,460$ , IVSed için  $p=0,021$ ,  $r=0,374$ ), (Şekil 53,54). NT-Pro BNP ile EF ve FS arasında ise istatistiksel olarak anlamlı negatif ilişki bulundu ( $p=0,000$ ,  $r= -0,616$ ), (Şekil 55,56).



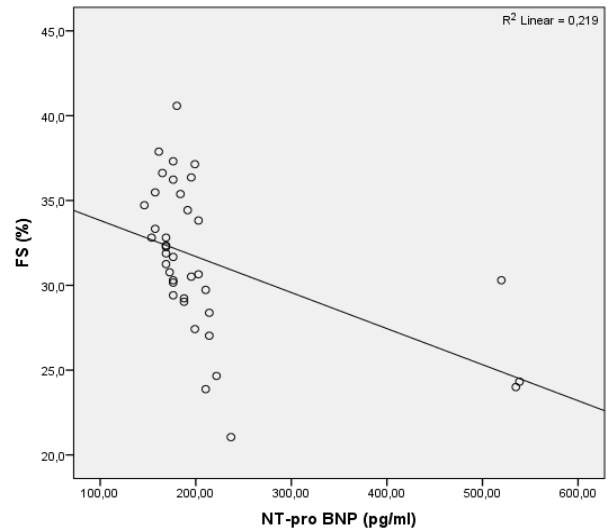
Şekil 53. NT-Pro BNP düzeyi ile LVED arasındaki ilişki ( $p=0,041$ ,  $r=0,334$ ).



Şekil 54. NT-Pro BNP düzeyi ile Lves arasındaki ilişki ( $p=0,004$ ,  $r= 0,460$ ).

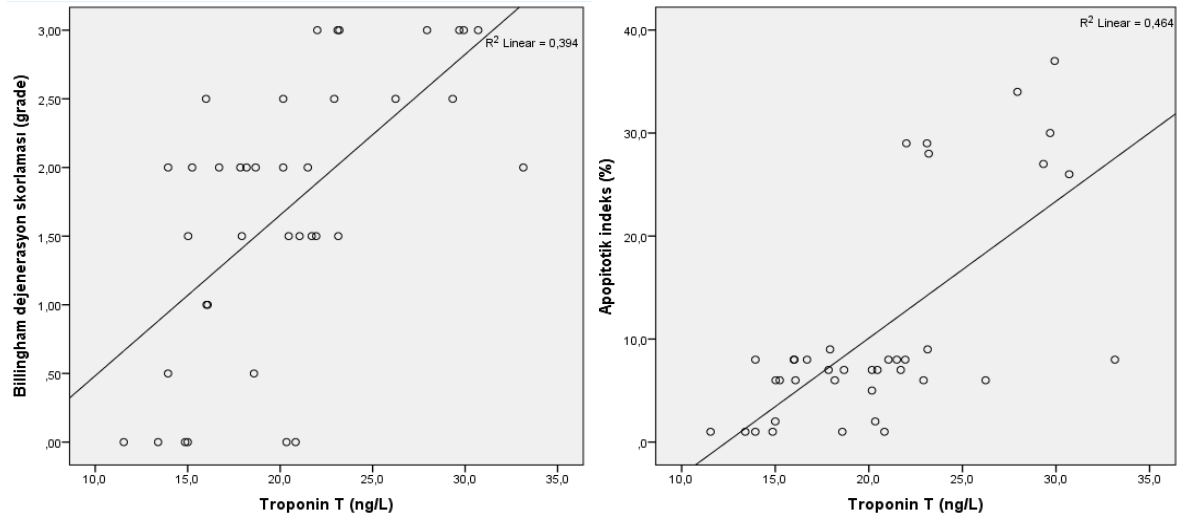


Şekil 55. NT-Pro BNP düzeyi ile EF arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r= -0,616$ ).



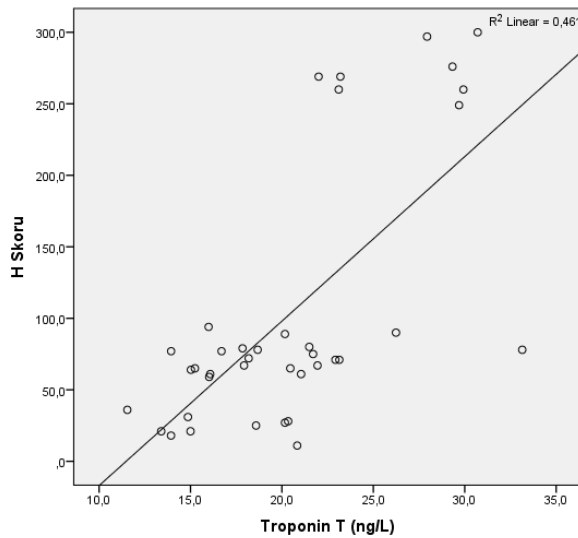
Şekil 56. NT-Pro BNP düzeyi ile FS arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r= -0,616$ ).

Histolojik bulgular ile kardiyak hasarlanmanın şiddeti arasındaki ilişki incelendiğinde; Troponin T ile Billingham dejenerasyon skoru, TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücre oranı ve Kaspaz-3 immunreaktivitesi H-skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki saptandı ( $p=0,000$ ;  $r$  değerleri sırasıyla Billingham skoru için  $r=0,654$ ; apoptotik indeks için  $r=0,651$  ve kaspaz-3 H-skoru için  $r=0,658$ ), (Şekil 57-59).



**Şekil 57.** Troponin T düzeyi ile Billingham dejenerasyon skorlaması arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r=0,654$ ).

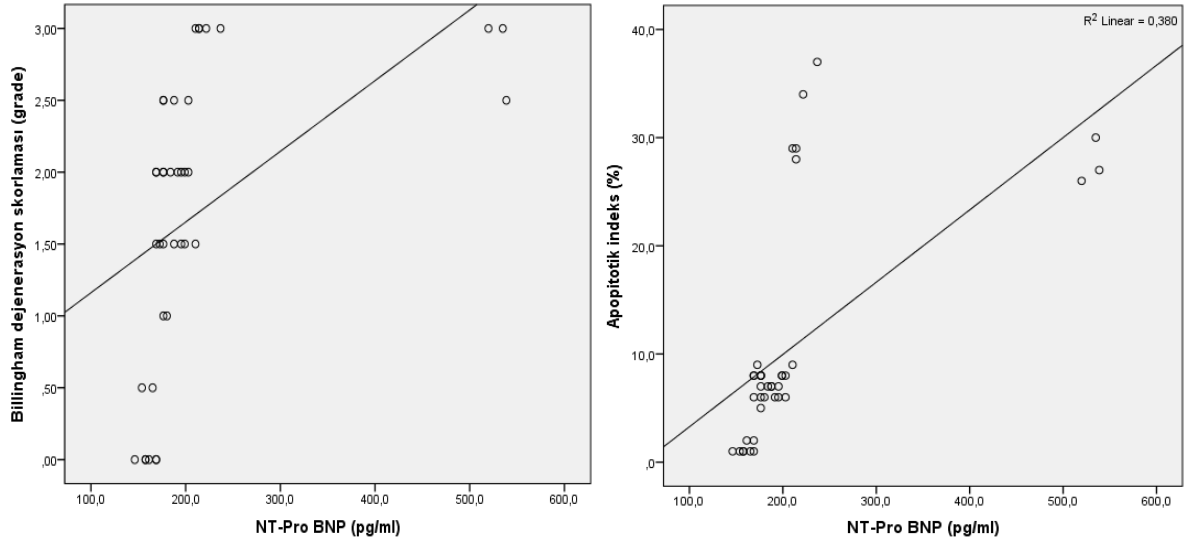
**Şekil 58.** Troponin T düzeyi ile TUNEL boyamaya ait apoptotik indeks arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r=0,651$ ).



**Şekil 59.** Troponin T düzeyi ile kaspaz-3 ekspresyonu H skorları arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r=0,658$ ).

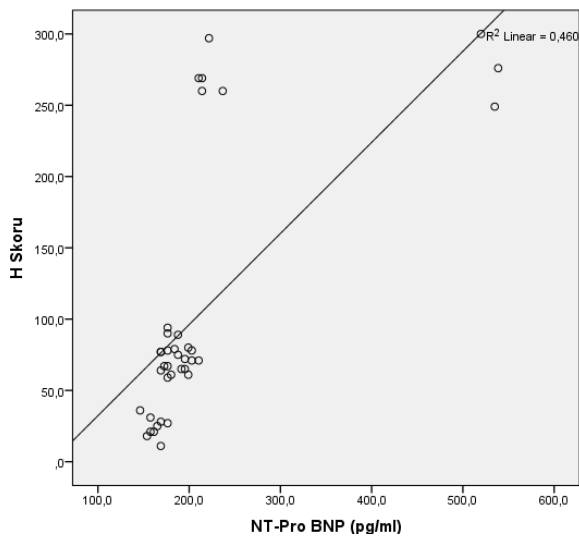


Nt-pro BNP ile Billingham dejenerasyon skoru, TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücre oranı ve Kaspaz-3 immunreaktivitesi H-skorları arasında da istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki saptandı ( $p=0,000$ ;  $r$  değerleri sırasıyla Billingham skoru için  $r=0,789$ , apoptotik indeks için  $r=0,789$  ve kaspaz-3 H-skoru için  $r=0,776$ ), (Şekil 60-62).



**Şekil 60.** NT-Pro BNP düzeyi ile Billingham dejenerasyon skorlaması arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r= 0,789$ ).

**Şekil 61.** NT-Pro BNP düzeyi ile TUNEL boyamaya ait apoptotik indeks arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r= 0,789$ ).



**Şekil 62.** NT-Pro BNP düzeyi ile kaspaz-3 ekspresyonu H skorları arasındaki ilişki ( $p=0,000$ ,  $r= 0,776$ ).

## TARTIŞMA

Miyokardit; miyozit hücrelerindeki dejenerasyon ve nekroz ile karakterize enflamasyondur. Bulguları asemptomatik veya subklinik seyirden, fulminan seyire kadar değişiklik gösterebilir. Bu nedenle tanı koyması zordur ve çoğu vakanın atlandığı düşünölmektedir. Etiyolojisi, enfeksiyöz ve nonenfeksiyöz ajanlar olarak iki gruba ayrılır. Enfeksiyöz ajanlar içerisinde en sık viral etkenler izlenirken, nonenfeksiyöz ajanlar içerisinde otoimmün hastalıklar ve ilaç toksisiteleri öne çıkan etkenlerdir (1). Etiyolojide birçok ilaç toksik miyokardit geliştirebilmekle birlikte; antrasiklin grubu ilaçlar toksik miyokardit etiyolojisinde sıklıkla karşımıza çıkan ilaçlardır (2). Günümüzde miyokardit tedavisinde spesifik bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Tedavi seçenekleri etiyolojiye göre değişiklik gösterir. Şu an için kabul gören en önemli tedavi, destek tedavisidir (1,24). Tanı koymadaki zorluklar ve spesifik tedavisinin henüz bulunamamış olması nedeniyle deneysel birçok çalışmada tedavi seçenekleri araştırılmaya devam etmektedir (119-122).

Doksorubisin, antrasiklin türevi nonspesifik kemoterapötik ilaç olup çeşitli neoplazmların tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Birçok mekanizma ile antitümöral etki gösterebilir. Öne çıkan mekanizmalar, direkt ya da dolaylı yoldan nükleer-mitokondriyal DNA hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanan oksidatif stres geliştirmesidir (3,28). Miyokardın oksidatif strese yüksek duyarlılığı ve DOX'un nonspesifik anti tümöral etkisi sonucunda, tedaviyi sınırlandıran en önemli yan etkisi olan kardiyotoksisite ve toksik miyokardit gelişmektedir (28,29). DOX ilişkili kardiyotoksisite-toksik miyokardit; genel insidansı %4,5-9 aralığında olup akut ya da kronik dönemde, doz bağımlı olarak gelişmektedir (30,31). Klinik olarak; nonspesifik semptomlardan, kardiyomiyopati ve konjestif kalp yetmezliğine kadar değişebilen geniş klinikle karşımıza çıkabilmektedir (37). Bu nedenle tanı koymak zor olup kesin tanısı endomiyokardiyal biyopsidir. Fakat çocuk hastalarda riskli olması ve sol ventrikölün sıklıkla etkilendiği görüşü nedeniyle günümüzde tercih edilmemektedir (59). Çeşitli çalışmalarda kardiyak biyobelirteçler ve ekokardiyografik incelemenin tanı koymadaki etkinliği gösterilmiş olup tanı için sıklıkla bu yöntemler kullanılmaktadır (53,54,58). DOX ilişkili kardiyotoksisiteden sorumlu patojenik mekanizmalar henüz tam olarak açıklanamamış olsa da, en fazla kabul edilen görüş: serbest oksijen radikallerinin açığa çıkması ve antioksidan enzim aktivitelerinde izlenen değişiklikler sonucu miyozit hasarı gelişmesidir (3,43). Bu durum

kardiyotoksisitenin önlenmesinde antioksidan tedavileri gündeme getirmiş olup literatürde antioksidan tedavilerin etkinliğini inceleyen çok sayıda deneysel hayvan çalışması olduğu görülmüştür (5-9,61).

Ozon, dinamik olarak kararsız yapıda üç adet oksijen atomundan oluşan; renksiz, kendine has kokusu olup oda ısısında gaz formunda bulunan, bilinen en güçlü oksidan maddelerden biridir. Stratosfer katmanında yer alır ve temel işlevi yeryüzünü ultraviyole radyasyonunun zararlı etkilerinden korumaktır (10,71). Medikal ozon; ozonun tıpta kullanılan formu olup uzun yıllardır birçok hastalığın tedavisinde güvenle kullanılmaktadır. Medikal ozon; doğrudan vücuda uygulanamaz, belirli oranlarda (oksijen en az %95, ozon en fazla %5 olacak şekilde) oksijen ile karıştırılarak sistemik ya da lokal olarak çeşitli yollardan (iv,ip,rektal, intraartiküler, transkütanöz vb.) vücuda verilebilir. Günümüzde en yaygın verilmiş şekli, sistemik uygulama yolu olan major otohematerapidir. Sistemik ozon uygulamalarında, plazmada SOR ve LOPs'lar oluşur ve birçok hücrede çeşitli mekanizmalar tetiklenir. Tetiklenen mekanizmalar aracılığıyla ozon, farklı konsantrasyonlarda: anti-oksidan, anti-enflamatuvar, anti-mikrobiyal, anti-tümoral, immunmodülatör ve trofik etkiler göstermektedir (10-12,81-84). Literatürde ozonun anti-oksidan etkilerini inceleyen çok sayıda klinik ve deneysel çalışma mevcuttur (11,80,81,123).

D vitamini, steroid yapılı bir prohormon olup vücuda alınması sonrası çeşitli enzimatik aktiviteler ile aktif formu olan 1,25(OH)<sub>2</sub> D vitaminine dönüşür. 1,25(OH)<sub>2</sub> vit D etkisini D vitamini reseptörüne bağlanarak gerçekleştirir. Vitamin D reseptörlerinin; deri, düz kas, kalp kası, akciğer, beyin, prostat, kolon, meme ve kan hücreleri gibi birçok farklı dokuda varlığının gösterilmesi ile D vitamininin çeşitli etkileri olduğu klinik ve deneysel çalışmalar ile gösterilmiştir (99). D vitamininin başlıca etkisi; renal ve intestinal kalsiyum transportunu ve kemik mineralizasyonunu düzenleyerek serum kalsiyum ve fosfor seviyelerinin korunmasıdır (14). Klinik ve deneysel çalışmalarda D vitamininin; anti-enflamatuvar, anti-oksidatif, anti-hipertrofik, anti-fibrotik, anti-aterosklerotik, anti-kanserojenik ve immünregülatuvar etkiler gibi çeşitli etkileri olduğu bildirilmiştir (13,14,103). Günümüzde global bir sorun olan D vitamini eksikliğinin oksidatif strese neden olduğu ve D vitamini takviyesi ile oksidatif stresin azaldığı yönündeki bilgiler literatürdeki birçok çalışma ile gösterilmiştir (124-127).

Antrasiklinler yaklaşık 40 yıldır yaygın kullanılan kemoterapötik ilaçlar olmasına rağmen, tedavi kısıtlayıcı yan etkisi olan kardiyak toksisite günümüzde hala önemini korumaktadır. Antrasiklinlerin kemoterapideki klinik önemi; kardiyotoksisite yapıcı yan etkisi, bu yan etkinin önlenmesi ve tedavi alternatiflerinin arayışı deneysel modellerin geliştirilmesini teşvik etmektedir. Literatürde ozon ve D vitamini kardiyak etkileri üzerine yapılmış birçok çalışma bulunmakla birlikte (11,103,107-111,128-130), antrasiklin kardiyotoksitesini üzerine olan etkileriyle ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır (15-19).

Literatürde antrasiklin kardiyotoksitesinde ozonun etkisini araştıran sadece iki çalışma mevcuttur. Delgado ve arkadaşları, erkek Sprague Dawley ratlarda kronik kardiyotoksisite geliştirerek ozonun etkisini incelemişlerdir (15). Doksorubisini haftada iki kez, toplamda 50 gün süreyle intraperitoneal yoldan uygulayarak kronik kardiyotoksisite modeli oluşturmuşlar ve ozonu 50 µg/ml konsantrasyon ve 6 ml dozunda toplamda yirmi seans rektal yoldan vermişlerdir. Kontrol grubuna ise ozon tedavisi yerine oksijen rektal yoldan verilmiştir. Doksorubisin verilerek toksisite oluşturulan ancak ozon verilmeyen gruba ise rektal yoldan hiçbir uygulama yapılmamıştır. Biyokimyasal parametrelerden Pro-BNP, malondialdehit, katalaz ve süperoksid dismutaz düzeyleriyle birlikte histopatolojik inceleme yapılmış ve ozonun; antioksidan enzimlerde artma, oksitlenmiş makromoleküllerde azalma sağlayarak doksorubisine bağlı dilate kardiyomiyopatiyi önlediği bildirilmiştir. Çalışmadaki ratların eşit strese maruz bırakılmaması, rektal yoldan verilen oksijen tedavisinin kontrol grubu biyokimyasal ve histolojik parametrelerinde değişikliğe neden olabilmesi ve farklı ağırlıktaki ratlara verilen sabit miktarda ozon tedavisinin çalışma sonuçlarını etkileyebilmesi bu çalışmanın önemli kısıtlılıklarıdır. Ozon ile ilgili yapılan yakın tarihli diğer çalışmada ise Simonetti ve arkadaşları, insan derisi fibroblast hücreleri ve fetal kardiyomiyositleri subklinik konsantrasyonlarda doksorubisine maruz bırakarak farklı konsantrasyonlarda ozon vermişler ve etkilerini incelemişlerdir (16). Çalışmada fetal atriyal kardiyomiyositlere doksorubisin uygulanmış ve 10-20-30-40-50 µg/ml konsantrasyonlarda ozon verilmiştir. Ozonun 30 µg/ml konsantrasyonda plato oluşturarak sitoprotektif ve antiinflamatuvar etkinliğinin olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma hücresel düzeyde yapılmış olup DOX etkisi atriyal miyositlerde incelenmiştir. Ancak ventriküler etkilenme değerlendirilmemiştir.

Literatürde D vitamini ve metabolitlerinin antrasiklin ile ilişkili kardiyotoksisite üzerine etkilerini araştıran ise sadece üç çalışma bulunmaktadır. Tsai ve arkadaşlarının C57BL/6 tip farelerde DOX ilişkili kardiyak disfonksiyon üzerine kalsitriol tedavisinin etkisini araştırdıkları çalışmada (17), doksorubisin dört hafta boyunca haftada iki kez toplam kümülatif doz 32 mg/kg olacak şekilde uygulanmış ve kalsitriol 150 ng/kg/gün toplamda on iki hafta süreyle verilmiştir. Çalışmada; ekokardiyografi ile kardiyak fonksiyonlar değerlendirilmiş, PCR yöntemiyle mRNA'daki atriyal natriüretik peptid ve brain natriüretik peptid düzeyleri incelenmiş, histopatolojik olarak hematoksilen eozin ve immünflorosan boyamalar yapılarak kardiyak hasar gösterilmiştir. Kalsitriolün endotelial mezenkimal geçisi engelleyerek kardiyak fibrozisi ve disfonksiyonu iyileştirdiği bildirilmiştir (17). Gül ve arkadaşları, doksorubisin ile kardiyotoksisite oluşturdukları Wistar Albino cinsi ratlarda melatonin ve D vitamini etkisini araştırmışlardır (18). Çalışmanın ilk günü 60.000 IU/kg dozunda tek doz intraperitoneal D vitaminini, çalışmanın 15-16-17. günlerinde ise toplam 18 mg/kg kümülatif dozda doksorubisini intraperitoneal yoldan uygulamışlardır. Çalışmada kullanılan D vitamini preparatı belirtilmemiş olup kardiyak etkilenme; kreatin kinaz düzeyleri, troponin düzeyleri, elektrokardiyografi ve sintigrafi ile değerlendirilmiş, histopatolojik değerlendirme ise yapılmamıştır. D vitamini tedavisinin doksorubisin ilişkili kardiyotoksisitedeki tüm parametreleri koruduğu bildirilmiştir. Son olarak çalışmamıza devam ettiğimiz süreç içerisinde özeti yayınlanan literatürdeki son çalışmada ise Diab ve arkadaşları, doksorubisin ilişkili kronik kardiyotoksisite oluşturulan dişi Wistar Albino ratlarda oral D vitamini etkisini araştırmışlardır (19). Çalışmada, doksorubisin 15 mg/kg kümülatif dozda haftada iki gün, toplam üç hafta intraperitoneal yoldan uygulanmış; D vitamini ise 500 IU/kg günde tek doz, haftada beş gün, toplamda üç hafta süreyle oral gavajla verilmiştir. D vitamini, kalsiyum, BNP, Troponin I, malondialdehit, total antioksidan kapasite düzeyleri incelenmiş ve elektrokardiyografik değerlendirme yapılmıştır. D vitamininin kronik süreçteki kardiyak disfonksiyonu önlemede kısmi yarar sağladığı bildirilmiştir. Literatürdeki çalışmaların çoğu kronik doksorubisin kardiyotoksisitesindeki etkileri araştırmaya yönelik olarak yapılmış, metodolojik çeşitliliklere sahip çalışmalardır. Ozon ve D vitamininin kombine etkilerini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda akut doksorubisin kardiyotoksisitesi oluşturduğumuz ratlarda, antioksidan etkileri daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan ozon ve D vitamini ile ikisinin kombine kullanımındaki etkilerini araştırmayı planladık. Bu amaçla; hem

linik, hem biyokimyasal, hem de histopatolojik parametreleri birlikte değerlendirdik. Ayrıca literatürden farklı olarak; kardiyak hasarlanmanın biyokimyasal göstergelerinden olan Troponin T ve Nt-Pro BNP düzeylerini birlikte inceledik. Oksidan parametrelerden MDA ve TOS düzeylerini; antioksidan parametrelerden SOD, GSH-Px ve TAS düzeylerini değerlendirdik. Histolojik olarak ise, hematoksilen&eoziin boyamanın yanında TUNEL ve kaspaz-3 immünohistokimyasal boyamalarını da kullanarak üç farklı yöntemle histolojik değerlendirme gerçekleştirdik. Böylece literatürde yapılan çalışmalardan farklı olarak sadece apoptozis varlığını değil, apoptozisin şiddetini de araştırdık. Çalışmamızda, doksorubisin kardiyotoksisitesine yönelik çok çeşitli parametrelerle değerlendirme yapılması, çalışmamızın hassasiyetini ve özgünlüğünü arttırmaktadır.

DOX kullanımı kardiyomiyositlerde; miyofibril kaybına, sitoplazmik vakuolizasyona, apoptoza ve nekroz gelişimine neden olarak kalp ağırlığında azalmaya neden olmaktadır (131). Ayrıca iştahta azalma, kusma gibi gastrointestinal yan etkileri nedeniyle vücut ağırlığında kayıplar da izlenmektedir. Akut dönemdeki kilo kaybının intravasküler alandaki sıvı kaybına bağlı olabileceği bildirilmiştir (132). Deneysel çalışmalarda doksorubisin kardiyotoksisitesi oluşturulan ratlarda kalp ağırlığı ve kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranının azaldığı gösterilmiştir (131-133). Çalışmamızda doksorubisin verilerek toksik miyokardit oluşturulan ratların kalp ağırlıklarında ve kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranında, literatürle benzer şekilde azalma tespit ettik. Ratların kalp ağırlıklarındaki azalma; ozon ve ozon+D vitamini tedavileri verilen gruplarda DOX grubunun ağırlık kaybına kıyasla belirgin azdı. Kalp ağırlığının son vücut ağırlığına oranı ise; doksorubisin grubunda diğer tüm gruplardan daha düşük idi. Tedavi verilen tüm gruplarda bu oranın arttığı görüldü. Bu sonuçlar; çalışmamızda doksorubisin kaynaklı toksik miyokardit modelinin oluştuğunu ve uygulanan tedavilerin kardiyak hasarı ve buna bağlı kilo kaybını önleyerek doksorubisin ilişkili kardiyotoksisite üzerine kardiyoprotektif etkisine işaret edebilir.

Doksorubisinin kardiyomiyositlerde dejenerasyon, apoptoz ve nekroz gelişimine neden olduğu bilinmektedir (60). Miyozitlerdeki bu hasarlar sonucunda, kardiyak hasar göstergesi olan troponin düzeylerinde artış izlenir. Literatürdeki çalışmalarda; doksorubisin ilişkili kardiyotoksisitede troponin düzeylerinin minimal miyozit hasarında dahi erken dönemde arttığı ve bu özelliğiyle kardiyotoksisitenin belirlenmesinde belirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (133-135). Deneysel

çalışmalarda doksorubisin ilişkili kardiyotoksisite-toksik miyokardit modelinde troponin düzeyleri yüksek bulunmuş, tedavi etkinliğini değerlendirmede troponin düzeyindeki azalmanın önemli olduğu gösterilmiştir (135,136). Ozonun doksorubisin kardiyotoksisitesi üzerine etkilerini inceleyen çalışmalarda troponin düzeyleri değerlendirilmemiş olup D vitamininin doksorubisin kardiyotoksisitesi üzerine etkilerini inceleyen ise iki çalışmada troponin düzeylerinin değerlendirildiği görülmüştür. Bu çalışmalardan Gül ve arkadaşlarının çalışmasında (18), doksorubisin uygulanan ratlarda Troponin T düzeylerinin arttığı, D vitamini tedavisi verilen grupta ise bu artışın izlenmediği bildirilmiştir. Diğer bir çalışma olan Diab ve arkadaşlarının çalışmasında da (19), doksorubisin uygulanması sonrası Troponin I düzeyleri yüksek bulunmuş, D vitamini tedavisi ile Troponin I düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir. Biz de çalışmamızda, literatürdeki çalışmalarla uyumlu olarak; DOX grubunda Troponin T düzeylerinin kontrol grubu ile kıyaslandığında belirgin artmış olduğunu tespit ettik. Ayrıca ozon ve D vitamini tedavileri verilen tüm gruplarda Troponin T düzeylerinde gerileme olduğunu, ozon+D vitamini kombine tedavisi verilen grupta ise bu gerilemenin daha belirgin olduğunu saptadık.

Kardiyak hasarlanmanın bir diğer belirteci olan NT-Pro BNP düzeylerinin doksorubisin ilişkili kardiyak hasarda arttığı bilinmektedir. Doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisitede intravasküler hacim azalmasının bir sonucu olarak, ratlarda doku hipoperfüzyonu gelişebileceği bildirilmiştir. Organ perfüzyonunu korumak için, ratlar periferik vazokonstriksiyon yapar ve dolaşan hacmi arttırmak için kardiyak önyükte artış izlenir. Akut kardiyotoksisitesi olan rat kalbinde artmış kardiyak hasar ve azalan kasılma fonksiyonları sonucunda kalp yetmezliği benzeri tablo izlenebilmektedir (137). Sol ventrikülün artan basıncı, serum NT-Pro BNP seviyelerinde artışa neden olmaktadır. Literatürdeki birçok deneysel çalışmada doksorubisin ilişkili kardiyotoksisitede NT-Pro BNP seviyelerinde artış olduğu bildirilmiş ve uygulanan tedavilerle NT-Pro BNP düzeylerinde azalma olması, kardiyotoksisite-toksik miyokardit tedavi etkinliğini değerlendirmede anlamlı kabul edilmiştir (137-139). Delgado ve arkadaşlarının çalışmasında (15), doksorubisin uygulanan ratlarda pro-BNP düzeylerinin arttığı, ozon tedavisi verilen grupta bu artışın izlenmediği bildirilmiştir. Diab ve arkadaşlarının çalışmasında da (19), benzer şekilde doksorubisin uygulanması sonrası BNP düzeyleri yüksek bulunmuş, D vitamini tedavisi ile BNP düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir. Çalışmamızda önceki çalışmalarla paralel olarak; NT-Pro BNP düzeyleri, DOX ile toksik miyokardit oluşturulan grupta anlamlı yüksek

bulundu. Bu yüksekliğin, ozon ve/veya D vitamini tedavileri verilen tüm gruplarda gerilediğini, ozon+D vitamini kombine tedavisi verilen grupta ise daha belirgin olduğunu saptadık. Bu sonuçlar; çalışmamızda doksorubisin kaynaklı toksik miyokardit modelinin oluştuğunu ve uygulanan tedavilerin kardiyak hasar ve buna bağlı kardiyak hasar belirteçleri olan Troponin T ile NT-Pro BNP artışını önleyerek doksorubisin ilişkili kardiyotoksisite üzerine kardiyoprotektif etkisini desteklemektedir.

Doksorubisin tedavisi sonrası kardiyomiyositlerde izlenen bir diğer değişiklik, artan serbest oksijen radikal düzeyleri ve buna bağlı NFκB aktivasyonudur. NFκB aktivasyonu; TNF-α, siklooksijenaz-2 ve nitrik oksit gibi enflamatuvar sitokinlerin üretimini arttırmaktadır (140,141). Deneysel çalışmalarla doksorubisin ilişkili kardiyotoksisite modellerinde TNF-α düzeylerinin arttığı ve verilecek antienflamatuvar tedaviler ile TNF-α düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (132,136,140-142). Ancak, ozon ve D vitamininin doksorubisin kardiyotoksisitesi üzerine etkilerini inceleyen çalışmalarda TNF-α düzeyleri değerlendirilmemiştir. Literatürden farklı olarak alışmamızda TNF-α düzeylerini değerlendirdik. Doksorubisin ile toksik miyokardit oluşturulan grupta TNF-α düzeyinin anlamlı yüksek olduğunu ve başlıca ozon+D vitamini kombine tedavisi verilen grupta olmak üzere tedavi verilen tüm gruplarda TNF-α düzeylerinin azaldığını saptadık. Bu sonuçlar, ozon+D vitamini tedavisinin yüksek antienflamatuvar etki sağlayarak miyokardiyal enflamasyonu azalttığına işaret edebilir.

Toksik miyokardit patogenezinde arttığı bilinen enflamatuvar mekanizmalara sekonder olarak, antienflamatuvar sitokinlerde düşüklük izlenebilir (143,144). Bununla birlikte bazı deneysel çalışmalarda, miyozitlerin antienflamatuvar sitokin üretimini arttırarak devam eden enflamatuvar duruma karşı kendilerini korumayı amaçladığı ve bu amaçla serum IL-10 seviyelerinde artış izlendiği gösterilmiştir (145,146). Ozon ve D vitamininin doksorubisin kardiyotoksisitesi üzerine etkilerini inceleyen çalışmalarda ise IL-10 düzeylerinin değerlendirilmediği grlmektedir. Çalışmamızda IL-10 düzeylerini değerlendirdik ve doksorubisin verilen grupta IL-10 düzeyinin azaldığını tespit ettik.

Doksorubisinin indüklediği oksidatif stres; serbest radikallerin artmasına, antioksidan enzimlerde azalmaya ve lipit peroksidasyonuna yol açar. Bunun



sonucunda, membran hasarı göstergesi olarak kabul edilen malondialdehit düzeylerinde artış izlenir (140,147). Doksorubisin ilişkili kardiyotoksistelerde oksidatif stres hipotezinin araştıran çalışmalarda MDA düzeyi yüksek bulunmuş ve tedavi ile MDA düzeylerinde azalma izlenmiştir (131,140,147). Zare ve arkadaşlarının çalışmasında (131); DOX verilerek kardiyotoksiste oluşturulan ratlarda gelişen oksidatif hasara bağlı olarak MDA düzeylerinin yükseldiği ve Apigenin tedavisi ile MDA düzeylerinin gerilediği bildirilmiştir. Arozal ve arkadaşlarının, Daunorubisin tetkiklediği kardiyotoksistenin önlenmesinde karvedilol ile yaptıkları çalışmada (148), hem kalp, hem de böbrek dokusunda MDA düzeylerinin arttığı ve karvedilol tedavisinin bu artışı azalttığı bildirilmiştir. El-Agamy ve arkadaşları, ratlarda DOX uygulanmasıyla artan MDA düzeylerinin, sitagliptin tedavisi ile artışının önlendiği ve sitagliptinin antioksidan özelliği aracılığıyla kardiyoprotektif etki gösterdiğini bildirilmişlerdir (149). Ozonun doksorubisin kardiyotoksistesi üzerine etkilerini inceleyen Delgado ve arkadaşlarının çalışmasında (15), doksorubisin uygulanan ratlarda MDA düzeyleri yüksek saptanmış, ozon tedavisi verilen grupta ise MDA düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir. D vitamininin doksorubisin kardiyotoksistesi üzerine etkilerini inceleyen Diab ve arkadaşlarının çalışmasında da (19), benzer şekilde doksorubisin uygulanması sonrası MDA düzeyleri yüksek bulunmuş, D vitamini tedavisi ile MDA düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir. Doksorubisin ilişkili kardiyotoksiste modelinde bir diğer oksidan parametre olan total oksidan seviye düzeylerinin de artmış olduğu ve antioksidan tedaviler ile bu artışın önlenebildiği deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (150,151). Ozon ve D vitamininin doksorubisin kardiyotoksistesi üzerine etkilerini inceleyen çalışmalarda ise total oksidan seviyenin değerlendirilmediği görölmektedir. Çalışmamızda oksidan parametrelerden hem MDA hem de TOS düzeylerini inceledik. Doksorubisin verilen grupta hem MDA hem de TOS düzeylerinin arttığını, özellikle ozon olmak üzere tedavi verilen gruplarda ise azaldığını saptadık. Bu sonuçlar; doksorubisinin oksidatif stresi tetiklediğini, ozonun lipid peroksidasyonunu önleyerek DOX ilişkili toksik miyokardite karşı koruyucu etki sağladığını, D vitamininin ise antioksidan etkisinin ozona göre kısıtlı düzeyde olduğunu göstermektedir.

Doksorubisin ilişkili kardiyotoksiste modelinde hücre içi antioksidan enzim özelliği gösteren süperoksit dismutaz ve serbest radikallerin temizlenmesinde önemli bir görevi olan glutatyon peroksidaz düzeyleri azalmaktadır (140,147). Çok sayıda çalışmada SOD ve GSH-Px gibi antioksidan parametrelerin azaldığı bildirilmiş,

uygulanan antioksidan tedavilerle SOD ve GSH-Px değerlerinde artış izlenmiştir (147,152,153). Yu ve arkadaşları, DOX ilişkili kardiyotoksisite oluşturmuş ratlarda antioksidan parametrelerden SOD ve GSH-Px enzim düzeylerinin azaldığını,  $\alpha$ -Linolenic asit tedavisi ile bu azalmanın önüne geçildiğini göstermişlerdir (147). Doksorubisin kardiyotoksisitesinde ozonun ve D vitamininin etkisini değerlendiren çalışmaların hiçbirinde GSH-Px düzeyleri bakılmamış, sadece birinde ise SOD düzeyleri değerlendirilmiştir. Delgado ve arkadaşları, doksorubisin uygulanan ratlarda SOD düzeylerinin azaldığını, ozon tedavisi verildiğinde bu azalmanın olmadığını bildirilmişlerdir (15).

Antioksidan parametlerden bir diğeri, genel bir antioksidan gösterge olan total antioksidan seviyesidir. Doksorubisin ilişkili kardiyotoksisitede total antioksidan seviyesinin azaldığı gösterilmiştir (154,155). Al-Harhi ve arkadaşları, ratlarda doksorubisin ilişkili kardiyotoksisite üzerine resvatrol etkisini inceledikleri çalışmalarında (154), doksorubisin verilen ratlarda total antioksidan seviyesinin azaldığını bildirmişlerdir. Dai ve arkadaşları, doksorubisin ile kardiyotoksisite oluşturulan ratlarda oktreotid etkisini araştırmış, doksorubisin verilen grupta total antioksidan seviyesinin düşük olduğu saptamışlardır (155). Bu çalışmalarda, tedaviler ile TAS düzeylerinde artış olduğu gösterilmiştir (154,155). Ozonun doksorubisin kardiyotoksisitesi üzerine etkilerini inceleyen çalışmaların hiçbirinde TAS düzeyi değerlendirilmemiş olup D vitamininin doksorubisin kardiyotoksisitesi üzerine etkilerini inceleyen sadece bir çalışmada TAS düzeyi değerlendirilmiş ve doksorubisin kardiyotoksisitesinde TAS düzeylerinin azaldığı, D vitamini tedavisi ile ise arttığı bildirilmiştir (19).

Çalışmamızda antioksidan parametrelerden hem SOD, hem GSH-Px hem de TAS düzeylerini inceledik. Doksorubisin verilen grupta SOD, GSH-Px ve TAS düzeylerinin azaldığını, özellikle ozon olmak üzere tedavi verilen gruplarda ise tüm antioksidan parametrelerin arttığını saptadık. SOD ve GSH-Px düzeylerinin ozon verilen grupta belirgin artması ve kontrol grubu ile benzer değerlere gelmesi; ozonun hem hücre içi antioksidan mekanizmaların indüklenmesinde, hem de serbest radikallerin nötralizasyonunda etkili olduğunu göstermektedir. D vitamini verilen grupta ise GSH-Px düzeylerinde belirgin artış saptanması, D vitamininin daha çok serbest oksijen radikallerinin nötralizasyonunda etkili olduğunu gösterebilir.

Doksozubisin ilişkili toksik miyokarditte gelişen miyokardiyal hasar ve apopitoz nedeniyle, sol ventrikül fonksiyonları bozulur ve kalbin kasılma yeteneğinde kayıplar izlenir. Klinikte bu kayıpların erken saptanması, kardiyak hasar ilerlemeden önlem alınması ve olası tedavi alternatiflerinin değerlendirilmesi açısından önemlidir. Ekokardiyografik inceleme; girişimsel olmayan, miyokard yapı ve performansını etkili şekilde değerlendirebilen güvenilir bir yöntem olup doksozubisin kardiyotoksitesinin saptanması ve takip edilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (53). Ekokardiyografi ile ejeksiyon fraksiyonu ve fraksiyonel kısalma ölçümleri yapılması, doksozubisin tedavisi alan hastalarda sol ventrikül sistolik fonksiyonlarının değerlendirilmesinde önemlidir (156). Doksozubisin ilişkili kardiyotoksitede; sol ventrikül sistol ve diyastol sonu çapının arttığı, ejeksiyon fraksiyonu ve fraksiyonel kısalma değerlerinin azaldığı bilinmektedir (53). Klinik ve deneysel çalışmalarda; ejeksiyon fraksiyonu ve fraksiyonel kısalma değerlerindeki artışın tedavi etkinliğini değerlendirmede önemli olduğu gösterilmiştir (157-159). Paiva ve arkadaşları, osteosarkomlu hastalarda yaptıkları klinik çalışmada (157); doksozubisin tedavisi verilen hasta grubunda ejeksiyon fraksiyonu ve fraksiyonel kısalma değerlerinin önemli ölçüde azaldığını, doksozubisin ile birlikte deksrazoksan tedavisi verilen grupta ise bu azalmanın olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmada sol ventrikül sistol ve diyastol sonu ölçümlerinin DOX grubunda arttığı, deksrazoksan tedavisi ile birlikte verilen grupta ise bu artışın gerilediği bulunmuştur. Kontrol grubuna benzer değerlerde ölçülen ejeksiyon fraksiyonu ve fraksiyonel kısalma değerleri ile deksrazoksanın kardiyoprotektif etkili olduğunu bildirmişlerdir. Barış ve arkadaşlarının, doksozubisin ilişkili kardiyotoksitesite oluşturulan Sprague-Dawley cinsi ratlarda Taurin etkisini araştırdıkları çalışmada (158), doksozubisin uygulaması sol ventrikül sistol ve diyastol sonu çaplarını arttırmış, ejeksiyon fraksiyonu ve fraksiyonel kısalma değerlerini azaltmıştır. Taurin tedavisi sonrasında ise, değişen parametrelerin normale döndüğü gösterilmiş ve Taurinin doksozubisinin kardiyotoksik etkilerine karşı koruyucu etkili olduğu bildirilmiştir. Chen ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada (159); Wistar Albino cinsi ratlarda doksozubisin ilişkili kardiyotoksitesite oluşturulması sonrasında sol ventrikül sistol ve diyastol sonu çaplarının arttığı, ejeksiyon fraksiyonu ve fraksiyonel kısalmanın azaldığı bildirilmiştir. Eritropoetin tedavisi sonrasında ise ejeksiyon fraksiyonunun arttığı ve sol ventrikül sistol sonu çapının azaldığı gösterilmiştir. Literatürde ozonun doksozubisin kardiyotoksitesisi üzerine etkilerini inceleyen çalışmaların hiçbirinde ekokardiyografik değerlendirme yapılmamış olmakla birlikte, D vitamininin doksozubisin kardiyotoksitesisi üzerine etkilerini inceleyen sadece bir

çalışmada ekokardiyografik değerlendirme yapılmıştır. Tsai ve arkadaşları, doksorubisin uygulamasının ejeksiyon fraksiyonu ve fraksiyonel kısalmayı azalttığını, D vitamini tedavisi ile bu değerlerde farklılık oluşturmadığını bildirmişlerdir (17). Çalışmamızda; doksorubisin verilen grupta sol ventrikül sistol ve diyastol sonu çaplarını artmış, ejeksiyon fraksiyonu ve fraksiyonel kısalmayı ise azalmış olarak saptadık. Ozon, D vitamini ve kombine tedavi verilen gruplarda, ejeksiyon fraksiyonu ve fraksiyonel kısalmanın arttığını ve kontrol grubuna benzer değerlere sahip olduklarını gözledik. Sonuçlarımız, çalışmamızda doksorubisin kaynaklı toksik miyokardit modelinin ekokardiyografik olarak da oluştuğunu, ozon ve D vitamininin miyokardın kasılma fonksiyonunu koruyarak doksorubisin ilişkili toksik miyokardite karşı koruyucu etki gösterdiklerini destekler niteliktedir.

Antrasiklin kardiyotoksitesi için en spesifik ve en sensitif değerlendirme tekniği, sağ ventrikülden yapılan endomiyokardiyal biyopsidir (59). Doksorubisin ilişkili kardiyotoksistide miyozitler histolojik olarak incelendiğinde; miyofibrillerin parsiyel veya total kaybı, vakuolizasyon, nukleus-kromatin disorganizasyonu ve kromatinin yerini soluk filamanlara bırakması gibi tipik değişiklikler izlenmektedir (59,133). Bu değişiklikler Billingham dejenerasyon skorlaması kullanılarak sınıflandırılır. Literatürdeki çalışmalarda doksorubisin uygulaması sonrası H&E ile boyanan preparatlarda miyofibrillerde tipik hasarlanmaların olduğu ve Billingham skorlamasında artış izlendiği bildirilmiştir (155,160). Doksorubisine bağlı gelişen kardiyotoksistide izlenen bir diğer önemli histolojik bulgu, apoptozis gelişimidir. Çeşitli çalışmalarda doksorubisinin anlamlı apoptozise yol açtığı ve apoptotik indeksi arttırdığı gösterilmiştir (161,162).

Ozon ve D vitamininin doksorubisin ilişkili kardiyotoksiste üzerine etkilerini inceleyen çalışmaların hiçbirinde Billingham dejenerasyon skorlaması kullanılmamış ve apoptozis değerlendirilmemiştir. Çalışmamızda H&E boyamaya ek olarak, Billingham dejenerasyon skorlamasını değerlendirdik. Ayrıca apoptozis varlığı ve şiddetinin değerlendirilmesi amacıyla da TUNEL ve kaspaz-3 boyama tekniklerini kullandık. Doksorubisin verilen grupta; kas dokusunun normal yapısının kaybolduğunu, kas liflerinde bütünlüğün bozulduğunu, liflerin birbirinden ayrılıp koparak geniş boşluklar oluşturduğunu saptadık. Pek çok lifte çekirdek izlenmemekle birlikte; kas liflerinde nadiren izlenen çekirdeklerin küçüldüğü veya nekrotik görünüm aldığını gözledik. Billingham dejenerasyon skorlamasının doksorubisin verilen grupta

belirgin yüksek olduğunu belirledik. Tedavi uygulanan gruplarda ise, çoğu alanlarda kas dokusunun normale yakın görünüm sergilediğini ve Billingham dejenerasyon skorunun gerilediğini saptadık. TUNEL ile apoptotik indeksi, kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama ile H-skor değerlerini hesapladık. Doksorubisin verilen grupta hem apoptotik hücre oranının hem de H-skorunun diğer gruplara göre anlamlı yüksek olduğunu, ozon ve D vitamini tedavileri ile bu değerlerin anlamlı ölçüde azaldığını saptadık. DOX grubunun H-skoru, kontrol grubuna göre ortalama 11,4 kat yüksek bulunurken, tedavi uygulamaları ile H-skorunun anlamlı ölçüde gerilemişti. Sonuçlarımız; doksorubisin kaynaklı toksik miyokardit modelinin hücresel düzeyde anlamlı hasara ve apoptozise yol açarak kardiyotoksisitenin oluştuğuna, ozon ve D vitamini tedavilerinin miyokard hücresindeki dejenerasyon ile apoptotik yolları baskılayarak kardiyoprotektif etkilerine işaret etmektedir.

Literatürdeki diğer çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda kardiyak hasarlanma belirteçleri ile oksidan-antioksidan kapasite, enflamatuvar-antiinflamatuvar sitokin düzeyleri, ekokardiyografi parametreleri ve histolojik veriler arasındaki ilişkileri de inceledik. Troponin T ve NT-Pro BNP düzeylerinin, oksidan enzimler ve enflamatuvar sitokinler ile pozitif ilişkili; antioksidan parametrelerle ise negatif ilişki olduğunu saptadık. Bu durum, oksidatif stresin ve enflamasyonun ağırlığının kardiyak hasarlanmanın ciddiyeti ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Troponin T ve NT-Pro BNP düzeyleri ile ekokardiyografi verileri arasında saptanan pozitif ilişki ise, kardiyak hasarlanmanın ciddiyetiyle klinik etkilenmenin şiddeti arasında paralellik olduğuna işaret etmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda; doksorubisin kardiyotoksisitesi oluşturduğumuz ratlarda ozon, D vitamini ve ozon ile D vitamininin kombine uygulamaları ile toksik miyokardit tablosunun hem biyokimyasal, hem ekokardiyografik, hem de histopatolojik olarak gerilediğini ve düzeldiğini gözledik. Kardiyak hasar belirteçlerindeki azalma, ekokardiyografik olarak miyokardiyal fonksiyonlardaki düzelme ve histopatolojik olarak normale yakın izlenen kalp dokusuna ait verilerimiz ozon ve D vitamininin kardiyoprotektif etkili olduğunu göstermektedir. Sonuçlarımız, uzun yıllar boyunca tedavi alternatifleri araştırılan doksorubisin kardiyotoksisitesinde oldukça ucuz ve kolay ulaşılabilen ozon ve D vitamininin kullanılabilmesine işaret etmektedir. Ancak bu konuda yapılacak geniş çaplı, prospektif, klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

## SONUÇLAR

Bu çalışma; doksorubisin ilişkili akut kardiyotoksisite oluşturulan ratlarda, ozon ve D vitamini ile ikisinin kombine kullanımındaki etkilerinin araştırılması amacıyla yapıldı.

1- Ratların ilk ve son vücut ağırlıkları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık saptanmadı ( $p>0,05$ ).

2- Kontrol grubundaki tüm ratların deney süresindeki 11 günlük izlemi boyunca kilo almış olduğu izlenirken, DOX grubunda daha belirgin olmak üzere diğer grupların hepsinde kilo kaybı olduğu görüldü. Kilo değişimindeki farklılık, kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasında anlamlıydı ( $p=0,000$ ).

3- Kalp ağırlıkları açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı ( $p=0,001$ ). Farklılığın kontrol grubu ile DOX ve kontrol grubu ile D vit grupları arasından kaynaklandığı görüldü ( $p<0,05$ ).

4- Kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranına bakıldığında; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ( $p=0,000$ ). Farklılık; DOX grubu ile kontrol grubu, DOX grubu ile Ozon, DOX grubu ile Ozon+D vit grubu ve kontrol grubu ile D vit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,05$ ).

5- Kardiyak hasar göstergelerinden Troponin T düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık saptandı ( $p=0,001$ ). Farklılığın DOX grubu ile kontrol grubu, DOX grubu ile Ozon+D vit grupları arasından kaynaklandığı görüldü ( $p<0,05$ ).

6- NT-Pro BNP düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ( $p=0,000$ ). Farklılık; kontrol grubu ile D vit grubu, DOX grubu ile kontrol grubu, DOX grubu ile Ozon+D vit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,05$ ).

7- TNF- $\alpha$  düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık saptandı ( $p=0,012$ ). Farklılığın DOX grubu ile kontrol grubu, DOX grubu ile Ozon+D vit grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p<0,05$ ).

8- IL-10 düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ( $p=0,008$ ). Farklılık; kontrol grubu ile DOX grubu ve kontrol grubu ile Ozon+D vit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,05$ ).

9- MDA düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık saptandı ( $p=0,007$ ). Farklılık; DOX grubu ile kontrol grubu, DOX grubu ile ozon, DOX grubu ile Ozon+D vit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,05$ ).

10- TOS düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık olduğu bulundu ( $p=0,038$ ). Farklılığın DOX grubu ile kontrol grubu arasından kaynaklandığı görüldü ( $p<0,05$ ).

11- Gruplar arasında SOD düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ( $p=0,004$ ). Farklılık; DOX grubu ile kontrol grubu ve DOX grubu ile ozon grubu arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,05$ ).

12- GSH-Px düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü ( $p=0,004$ ). Farklılık; DOX grubu ile kontrol grubu, DOX grubu ile ozon grubu ve DOX grubu ile D vit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,05$ ).

13- TAS düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü ( $p=0,01$ ). Farklılığın DOX grubu ile kontrol grubu arasından kaynaklandığı görüldü ( $p<0,01$ ).

14- Ekokardiyografide ölçülen; LVED, LVES, EF ve FS açısından gruplar arasında farklılık saptandı ( $p$  değerleri sırasıyla LVED için  $p=0,028$ ; LVES, EF ve FS için  $p=0,000$ ). Farklılık DOX grubu ile tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,01$ ).

15- Billingham skorlaması açısından gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık saptandı ( $p=0,000$ ). Farklılığın DOX grubu ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p<0,01$ ).

16- Apoptotik hücre oranı açısından gruplar arasında farklılık saptandı ( $p=0,000$ ). Farklılık; DOX grubu ile kontrol grubu, DOX grubu ile D vit grubu, DOX grubu ile ozon+D vit grubu ve kontrol grubu ile ozon grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı saptandı ( $p<0,01$ ).

17- Kaspaz-3 immunoreaktivite skorlaması açısından gruplar arasında farklılık saptandı ( $p=0,000$ ). Farklılığın DOX grubu ile tüm gruplar arasında ve kontrol grubu ile tüm gruplar arasında anlamlı olduğu görüldü ( $p<0,001$ ).

18- Troponin T düzeyleri ile;

- Kilo farkı (son vücut ağırlığı ile ilk vücut ağırlığı arasındaki fark), kalp ağırlığı ve kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranı arasında anlamlı negatif ilişki saptandı ( $p=0,000$ ;  $r$  değerleri sırasıyla  $-0,834$ ,  $-0,604$  ve  $-0,845$ ).
- TNF- $\alpha$  arasında anlamlı pozitif ilişki saptandı ( $p=0,000$ ,  $r=0,903$ ).
- MDA ve TOS arasında anlamlı pozitif ilişki saptandı ( $p=0,000$ ;  $r=0,952$  ve  $r=0,685$ ).

- SOD, GSH-Px ve TAS arasında anlamlı negatif ilişki saptandı ( $p=0,000$ ;  $r$  değerleri sırasıyla SOD için  $r= -0,889$ ; GSH-Px için  $r= -0,889$  ve TAS için  $r= -0,569$ ).
- LVPWTed, LVed, LVes, IVSed ve IVSes arasında anlamlı pozitif ilişki saptandı (LVPWTed için  $p=0,002$ ,  $r=0,486$ ; LVed için  $p=0,013$ ,  $r=0,399$ ; LVes için  $p=0,000$ ,  $r=0,555$ ; IVSed için  $p=0,002$ ,  $r=0,374$ ; IVSes için  $p=0,021$ ,  $r=0,374$ ).
- EF ve FS arasında anlamlı negatif ilişki saptandı ( $p=0,000$ ,  $r$  değerleri sırasıyla EF için  $r= -0,592$ ; FS için  $r= -0,616$ ).
- Billingham dejenarasyon skoru, TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücre oranı ve kaspaz-3 immunreaktivitesi H-skorları arasında anlamlı pozitif ilişki saptandı ( $p=0,000$ ;  $r$  değerleri sırasıyla Billingham skoru için  $r= 0,654$ ; apoptotik indeks için  $r= 0,651$  ve kaspaz-3 H-skoru için  $r= 0,658$ ).

#### 19- NT-Pro BNP düzeyleri ile;

- Son vücut ağırlığı, kilo farkı, kalp ağırlığı ve kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranı arasında anlamlı negatif ilişki saptandı (son vücut ağırlığı için  $p=0,021$ ,  $r= -0,374$ , kilo farkı için  $p=0,000$ ,  $r= -0,778$ , kalp ağırlığı için  $p=0,000$ ,  $r= -0,651$  ve kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranı için  $p=0,000$ ,  $r=-0,804$ ).
- TNF- $\alpha$  arasında anlamlı pozitif ilişki saptandı ( $p=0,000$ ,  $r=0,643$ ).
- IL-10 arasında anlamlı negatif ilişki saptandı ( $p=0,042$ ,  $r= -0,332$ ).
- MDA ve TOS arasında anlamlı pozitif ilişki saptandı ( $p=0,000$ ;  $r=0,652$  ve  $r=0,569$ ).
- SOD, GSH-Px ve TAS arasında anlamlı negatif ilişki bulundu ( $p=0,000$ ;  $r$  değerleri sırasıyla SOD için  $r= -0,605$ , GSH-Px için  $r= -0,594$  ve TAS için  $r= -0,701$ ).
- LVPWTed, LVed, LVes ve IVSed arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki saptandı (LVPWTed için  $p=0,007$ ,  $r=0,430$ , LVed için  $p=0,041$ ,  $r=0,334$ , LVes için  $p=0,004$ ,  $r=0,460$ , IVSed için  $p=0,021$ ,  $r=0,374$ ).
- EF ve FS arasında anlamlı negatif ilişki bulundu ( $p=0,000$ ,  $r= -0,616$ ).
- Billingham dejenarasyon skoru, TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücre oranı ve kaspaz-3 immunreaktivitesi H-skorları arasında anlamlı pozitif ilişki saptandı ( $p=0,000$ ;  $r$  değerleri sırasıyla Billingham skoru için  $r=0,789$ , apoptotik indeks için  $r=0,789$  ve kaspaz-3 H-skoru için  $r=0,776$ ).



## KAYNAKLAR

1. Fung G, Luo H, Qiu Y, Yang D, McManus B. Myocarditis. *Circ Res* 2016;118(3):496-514.
2. Simmons A, Vacek JL, Meyers D. Anthracycline-induced cardiomyopathy. *Postgrad Med* 2008;120(4):67-72.
3. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004; 56(2):185-229.
4. Wenningmann N, Knapp M, Ande A, Vaidya TR, Ait-Oudhia S. Insights into doxorubicin induced cardiotoxicity: molecular mechanisms, preventive strategies, and early monitoring. *Mol Pharmacol* 2019;96(2):219-32.
5. Spallarossa P, Garibaldi S, Altieri P, Fabbi P, Manca V, Nasti S, et al. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:837-46.
6. Zhang YY, Yi M, Huang YP. Oxymatrine ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Cell Physiol Biochem* 2017;43(2):626- 35.
7. Abushouk AI, Ismail A, Salem AMA, Afifi AM, Abdel-Daim MM. Cardioprotective mechanisms of phytochemicals against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biomed Pharmacother* 2017;90:935- 46.
8. Yu J, Wang C, Kong Q, Wu X, Lu JJ, Chen X. Recent progress in doxorubicin-induced cardiotoxicity and protective potential of natural products. *Phytomedicine* 2018;40:125-39.
9. Abdel-Daim MM, Kilany OE, Khalifa HA, Ahmed AAM. Allicin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Cancer Chem Pharmacol* 2017;80(4):745-53.
10. Di Paolo N, Bocci V, Gaggioti E. Ozone therapy editorial review. *Int J Artificial Organs* 2004;27:168-75.
11. Di Filippo C, Marfella R, Capodanno P, Ferraraccio F, Coppola L, Luongo M, et al. Acute oxygen-ozone administration to rats protects the heart from ischemia reperfusion infarct. *Inflamm Res* 2008;57(10):445-9.
12. Bocci V. *Oxygen-ozone therapy: a critical evaluation*. Dordrecht Ed: Springer Science Business Med 2002:31-7.
13. Valero-Zanuya M, Hawkins-Carranza F. Metabolism, endogenous and exogenous sources of vitamin D. *Rev Esp Enferm Metab Oseas* 2007;16:63-70.

14. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G: Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiol Rev* 2016;96:365-408.
15. Delgado-Roche L, Hernández-Matos Y, Medina EA, Morejón DÁ, González MR, Martínez-Sánchez G. Ozone-oxidative preconditioning prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in sprague-dawley rats. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2014;14(3):e342- 8.
16. Simonetti V, Quagliariello V, Franzini M, Iaffaioli RV, Maurea N, Valdenassi L. Ozone exerts cytoprotective and anti-inflammatory effects in cardiomyocytes and skin fibroblasts after incubation with doxorubicin. *Evid Based Complement Alternat Med* 2019;2019:2169103.
17. Tsai TH, Lin CJ, Hang CL, Chen WY. Calcitriol attenuates doxorubicin-induced cardiac dysfunction and inhibits endothelial-to-mesenchymal transition in mice. *Cells* 2019;8(8):865.
18. Gul SS, Aygün H. Cardioprotective effect of vitamin D and melatonin on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rat model: an electrocardiographic, scintigraphic and biochemical study. *Eur Res J* 2019;5(4):649-57.
19. Diab FMA, Nassef NA, Abdelhamid NS, Amin YMK. Effect of vitamin D supplementation on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *QJM: An International Journal of Medicine*, Volume 113, Issue Supplement\_1, March 2020, hcaa065.004.
20. Carniel E, Sinagra G, Bussani R, Di Lenarda A, Pinamonti B, Lardieri G, et al. Fatal myocarditis: morphologic and clinical features. *Italian heart journal:official Journal of the Italian Federation of Cardiology* 2004;5(9):702-6.
21. Towbin JA. Myocarditis. In: Hugh D. Allen M, editor. *Moss and Adams' Heart Disease in Infants, Children, and Adolescents 7th ed* Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins 2008:1207-24.
22. Park MK. Cardiovascular Infections, Myocarditis. In: Park MK, eds. *Pediatric cardiology for Practitioners*. 6 th ed. St. Louis: Mosby 2014;19:342-66.
23. Dominguez F, Kuhl U, Pieske B, Garcia-Pavia P, Tschope C. Update on myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: reemergence of endomyocardial biopsy. *Revista Espanola de Cardiologia (English ed)* 2016;69(2):178-87.
24. Spicer RL, Ware SM. Disease of the Myocardium. In: Kliegman RM, Geme JW, Schor NF editors. *Nelson Textbook of Paediatrics* 20th, Elsevier 2015, p:2271-81.
25. Robinson J, Hartling L, Vandermeer B, Klassen TP. Intravenous immunoglobulin for presumed viral myocarditis in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2015;(5):CD004370.

26. Anton W, Giuseppe G, Michael BA, Edward AS. Pharmacotherapy of Neoplastic Diseases. In: Laurence LB, Randa HD, Björn CK, eds. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 13th ed McGraw-Hill: 2018:1426-28.
27. Speth PA, van Hoesel QG, Haanen C. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. Clin Pharmacokinet 1988;15(1):15-31.
28. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects, Pharm Genomics 2011;21:440-6.
29. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. Curr Med Chem 2009;16:3267-85.
30. Cardinale D, Colombo A, Bacchiani G, Tedeschi I, Meroni CA, Veglia F, et al. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. Circulation 2015;131:1981-8.
31. Larussi D, Indolfi P, Galderisi M, Bosonne E. Cardiac toxicity after anthracycline chemotherapy in childhood. Hertz 2000;25:676-88.
32. Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. N Engl J Med 1998;339: 900-5.
33. Deng S, Wojnowski L. Genotyping the risk of anthracycline-induced cardiotoxicity. Cardiovasc Toxicol 2007;7:129-33.
34. Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. Cancer 2003;97(11):2869-79.
35. Sepe DM, Ginsberg JP, Balis FM. Dexrazoxane as a cardioprotectant in children receiving anthracyclines. Oncologist 2010;15:1220-6.
36. Luo X, Reichetzer B, Trines J, Benson LN, Lehotay D. L-Carnitine attenuates Doksorubisin-induced lipid peroxidation in rats. Free Radic Biol Med 1999;26:1158-65.
37. Gudmundsdottir T, Winther JF, de Fine Licht S, Bonnesen TG, Asdahl PH, Trygvadottir L, et al. Cardiovascular disease in adult life after childhood cancer in Scandinavia: a population-based cohort study of 32,308 one-year survivors. Int J Cancer 2015;137:1176-86.
38. Hale JP, Lewis IJ. Anthracyclines: cardiotoxicity and its prevention. Arch Dis Child 1994;71:457-62.

39. Dolinsky VW. The role of sirtuins in mitochondrial function and doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Biol Chem* 2017;398(9):955-74.
40. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol* 2013;65(2):157-70.
41. Shabalala S, Muller CJF, Louw J, Johnson R. Polyphenols, autophagy and doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Life Sci* 2017;180:160-70.
42. Aries P, Paradis P, Lefevre C, Schwartz RJ, Nemer M. Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:6975-80.
43. Menna P, Salvatorelli E, Minotti G. Cardiotoxicity of antitumor drugs. *Chem Res Toxicol* 2008;21:978-89.
44. Ascensão A, Magalhães J, Soares J, Ferreira R, Neuparth M, Marques F, et al. Endurance training attenuates doxorubicin induced cardiac oxidative damage in mice. *Int J Cardiol* 2005;100:451-60.
45. Simunek T, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R, Gersl V. Anthracycline induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Reports* 2009;61:154-71.
46. Vejpongsa P, Yeh ET. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. *J Am Coll Cardiol* 2014;64(9):938-45.
47. Outomuro D, Grana DR, Azzato F, Milei J. Adriamycin-induced myocardial toxicity: new solutions for an old problem? *Int J Cardiol* 2007;117:6-15.
48. Larsen RL, Jakacki RI, Vetter VL, Meadows AT, Silber JH, Barber G. Electrocardiographic changes and arrhythmias after cancer therapy in children and young adults. *Am J Cardiol* 1992;70:73-4.
49. Herrmann J, Lerman A, Sandhu NP, Villarraga HR, Mulvagh SL, Kohli M. Evaluation and management of patients with heart disease and cancer: cardio-oncology. *Mayo Clin Proc* 2014;89:1287-306.
50. Bolis FM, Holcenberg JS, Poplack DG. General Principles of Chemotherapy. In: Pizzo PA, Poplack DG (eds) *Principle and Practice Pediatric Oncology*. J.B. Lippincott Company, USA, 2001:186-9.
51. Kremer LC, van Dalen EC, Offringa M, Voûte PA. Frequency and risk factors of anthracycline-induced clinical heart failure in children: a systematic review. *Ann Oncol* 2002;13(4):503-12.
52. Casper ES, Gaynor JJ, Hajdu SI, Magill GB, Tan C, Friedrich C, et al. A prospective randomized trial of adjuvant chemotherapy with bolus versus continuous infusion of doxorubicin in patients with high-grade extremity soft tissue sarcoma and an analysis of prognostic factors. *Cancer* 1991;68(6):1221-9.

53. Thavendiranathan P, Grant AD, Negishi T, Plana JC, Popovic ZB, Marwick TH. Reproducibility of echocardiographic techniques for sequential assessment of left ventricular ejection fraction and volumes: application to patients undergoing cancer chemotherapy. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:77-84.
54. Plana JC, Galderisi M, Barac A, Ewer MS, Ky B, Scherrer-Crosbie M, et al. Expert consensus for multimodality imaging evaluation of adult patients during and after cancer therapy: a report from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 2014;27(9):911-39.
55. Armenian SH, Hudson MM, Mulder RL, Chen MH, Constine LS, Dwyer M, et al. Recommendations for cardiomyopathy surveillance for survivors of childhood cancer: a report from the International Late Effects of Childhood Cancer Guideline Harmonization Group. *Lancet Oncol* 2015;16(3):e123-36.
56. Gulati A, Jabbour A, Ismail TF, Guha K, Khwaja J, Raza S, et al. Association of fibrosis with mortality and sudden cardiac death in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *JAMA* 2013;309:896-908.
57. Sawaya H, Sebag IA, Plana JC, Januzzi JL, Ky B, Tan TC, et al. Assessment of echocardiography and biomarkers for the extended prediction of cardiotoxicity in patients treated with anthracyclines, taxanes, and trastuzumab. *Circ Cardiovasc Imaging* 2012;5:596-603.
58. Ledwidge M, Gallagher J, Conlon C, Tallon E, O'Connell E, Dawkins I, et al. Natriuretic peptidebased screening and collaborative care for heart failure: the STOP-HF randomized trial. *JAMA* 2013;310:66-74.
59. Billingham ME, Mason JW, Bristow MR, Daniels JR. Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep* 1978;62:865-72.
60. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis* 2007;49:330-52.
61. Berthiaume JM, Oliveira PJ, Fariss MW, Wallace KB. Dietary vitamin E decreases doxorubicin-induced oxidative stress without preventing mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc Toxicol* 2005;5:257-67.
62. El-Missiry MA, Othman AI, Amer MA, Abd el-Aziz MA. Attenuation of the acute adriamycin-induced cardiac and hepatic oxidative toxicity by N-(2- mercaptopropionyl) glycine in rats. *Free radical research* 2001;35:575-81.
63. Yamanaka S, Tatsumi T, Shiraishi J, Mano A, Keira N, Matoba S, et al. Amlodipine inhibits doxorubicin-induced apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:870-8.
64. Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N. Adriamycin-induced hearth failure:mechanism and modulation. *Moll. Cell. Biochem* 2000; 207:77-85.

65. Van Dalen EC, Caron HN, Dickinson HO, Kremer LCM. Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011;15(6):CD003917.
66. Lipshultz SE, Scully RE, Lipsitz SR, Sallan SE, Silverman LB, Miller TL, et al. Assessment of dexrazoxane as a cardioprotectant in doxorubicin-treated children with high-risk acute lymphoblastic leukaemia: Long-term follow-up of a prospective, randomised, multicentre trial. *The Lancet Oncol* 2010;11(10):950-61.
67. Tebbi CK, London WB, Friedman D, Villaluna D, De Alarcon PA, Constine LS, et al. Dexrazoxane-associated risk for acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome and other secondary malignancies in pediatric Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 2007;25(5):493-500.
68. Borghi C, Bacchelli S, Degli Esposti D, Ambrosioni E. A review of the angiotensin-converting enzyme inhibitor, zofenopril, in the treatment of cardiovascular diseases. *Exp Opin Pharmacother* 2004;5(9):1965-77.
69. Hiona A, Lee AS, Nagendran J, Xie X, Connolly AJ, Robbins RC, et al. Pretreatment with angiotensin-converting enzyme inhibitor improves doxorubicin-induced cardiomyopathy via preservation of mitochondrial function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011;142(2):396-403.
70. Silber JH, Cnaan A, Clark BJ, Paridon SM, Chin AJ, Rychik J, et al. Enalapril to prevent cardiac function decline in long-term survivors of pediatric cancer exposed to anthracyclines. *J Clin Oncol* 2004;22(5):820- 8.
71. Bocci V. Biological and clinical effects of ozone: Has ozone therapy a future in medicine, *Br J Biomed Sci* 1999;56:270-9.
72. Bocci V. Ozone as janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators Inflamm* 2004;13(1):3-11.
73. Rubin MB. The history of ozone. *Bull Hist Chem* 2001;26(1):40-56.
74. Chen, J, Davidson JH. Ozone production in the positive dc corona discharge: model and comparison to experiments. *Plas Chem and Plas Proc* 2002;22;495-522.
75. Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy state of the art. *Arch Med Res* 2006;37:425-35.
76. Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Radic Biol Med* 1995;19:935-41.
77. Wang G, Guo Q, Hossain M, Fazio V, ZeynalovE, Janigro D, et al. Bone marrow-derived cells are the major source of MMP-9 contributing to blood-brain barrier dysfunction and infarct formation after ischemic stroke in mice. *Brain Res* 2009;1294:183-92.

78. Di Paolo N, Gaggiotti E, Galli F. Extracorporeal blood oxygenation and ozonation: clinical and biological implications of ozone therapy. *Redox Rep* 2005;10(3):121-30.
79. Fuccio C, Luongo C, Capodanno P, Giordano C, Scafuro MA, Siniscalco D, et al. A single subcutaneous injection of ozone prevents allodynia and decreases the over-expression of pro-inflammatory caspases in the orbito-frontal cortex of neuropathic mice. *Eur J Pharmacol* 2009;603(1-3):42-9.
80. Giunta R, Coppola A, Luongo C, Sammartino A, Guastafierro S, Grassia A, et al. Ozonized autohemotransfusion improves hemorheological parameters and oxygen delivery to tissues in patients with peripheral occlusive arterial disease. *Ann Hematol* 2001;80(12):745-8.
81. Zanardi I, Borrelli E, Valacchi G, Travagli V, Bocci V. Ozone: a multifaceted molecule with unexpected therapeutic activity. *Curr Med Chem* 2016;23(4):304-14.
82. Hatfield SM, Kjaergaard J, Lukashev D, Schreiber TH, Belikoff B, Abbott R, et al. Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation. *Sci Transl Med* 2015;7(277):277ra30.
83. Ai Z, Lu Y, Qiu S, Fan Z. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeting HIF-1-regulated cancer metabolism. *Cancer Lett* 2016;373(1):36-44.
84. Wu HM, Jiang ZF, Ding PS, Shao LJ, Liu RY. Hypoxia-induced autophagy mediates cisplatin resistance in lung cancer cells. *Sci Rep* 2015;5:12291.
85. Spain ozone therapy society of medical professionals a. Madrid declaration on ozone therapy 2010 Available from: <https://aepromo.org/en/madrid-declaration-on-ozone-therapy/>. 20 Ocak 2020 tarihinde erişilmiştir.
86. Elvis AM, Ekta JS. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med* 2011;2(1):66-70.
87. Bocci V, Di Paolo N. Oxygen-ozone therapy in medicine: an update. *Blood Purif* 2009;28(4):373-6.
88. Viebahn-Hänsler R, León Fernández OS, Fahmy Z. Ozone in medicine: the low-dose ozone concept-guidelines and treatment strategies, ozone: science & engineering. *J Int Ozone Ass* 2012;34(6):408-24.
89. Fitzpatrick E, Holland OJ, Vanderlelie JJ. Ozone therapy for the treatment of chronic wounds: A systematic review. *Int Wound Journal* 2018;15(4):633-44.
90. Sagai M, Bocci V. Mechanisms of action involved in ozone therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Med Gas Research* 2011;1:29.

91. International Scientific Committee of Ozone Therapy - ISCO3/MET/00/01 Major Autohemotherapy. Available from: <https://isco3.org/wp-content/uploads/2017/03/ISCO3-MET-00-01-MAHT-V1-03102016.pdf> 10 Şubat 2020 tarihinde erişilmiştir.
92. Fedorova T, Dubrovina N, Sokur T, Burlev A, Bakuridze E. Ozone therapy and the indices of lipid peroxidation in a complex treatment of the pregnant with iron-deficient anemia. *Meditinskii almanakh* 2013;3:159-60.
93. Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* 1998;78(4):1193-231.
94. Wacker M, Holick MF. Vitamin D-effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. *Nutrients* 2013;5:111-48.
95. Öngen B, Kabaroğlu C, Parıldar Z. D Vitamini'nin biyokimyasal ve laboratuvar değerlendirmesi. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2008;6:23-31.
96. Gil Á, Plaza-Diaz J, Mesa MD. Vitamin D: classic and novel actions. *Ann Nutr Metab* 2018;72(2):87-95.
97. Christakos S. In search of regulatory circuits that control the biological activity of vitamin D. *J Biol Chem* 2017;292:17559-60.
98. Perwad F, Portale AA. Vitamin D metabolism in the kidney: regulation by phosphorus and fibroblast growth factor 23. *Mol Cell Endocrinol* 2011;347:17-24.
99. Hossein-nezhad A, Holick MF. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin Proc* 2013;88:720-55.
100. Özkan B, Döneray H. D vitamininin iskelet sistemi dışı etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Derg* 2011;54:99-119.
101. Harada S, Mizoguchi T, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Takeda S, Sakai S, et al. Daily administration of eldcalcitol (ED-71), an active vitamin D analog, increases bone mineral density by suppressing RANKL expression in mouse trabecular bone. *J Bone Miner Res* 2012;27(2):461-73.
102. Nakamichi Y, Udagawa N, Suda T, Takahashi N. Mechanisms involved in bone resorption regulated by vitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2018;177:70-6.
103. Lee TW, Lee TI, Chang CJ, Lien GS, Kao YH, Chao TF, et al. Potential of vitamin D in treating diabetic cardiomyopathy. *Nutr Res* 2015;35(4):269-79.
104. Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr* 2008;88(2):491S-9S.
105. Wolden-Kirk H, Gysemans C, Verstuyf A, Mathieu C. Extraskeletal effects of vitamin D. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2012;41:571-94.



106. Brinkley DM, Ali OM, Zalawadiya SK, Wang TJ. Vitamin D and heart failure [published correction appears in *Curr Heart Fail Rep*. 2018 Apr 30] *Curr Heart Fail Rep* 2017;14(5):410-20.
107. Chen S, Glenn DJ, Ni W, Grigsby CL, Olsen K, Nishimoto M, et al. Expression of the vitamin D receptor is increased in the hypertrophic heart. *Hypertension* 2008;52(6):1106–12.
108. O’Connell TD, Berry JE, Jarvis AK, Somerman MJ, Simpson RU. 1,25-Dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> regulation of cardiac myocyte proliferation and hypertrophy. *Am J Phys* 1997;272(4 Pt 2):H1751–8.
109. Wu J, Garami M, Cheng T, Gardner DG. 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D, and retinoic acid antagonize endothelin-stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 1996;97(7):1577-88.
110. Chen S, Law CS, Grigsby CL, Olsen K, Hong TT, Zhang Y, et al. Cardiomyocyte-specific deletion of the vitamin D receptor gene results in cardiac hypertrophy. *Circulation* 2011;124(17):1838-47.
111. Rahman A, Hershey S, Ahmed S, Nibbelink K, Simpson RU. Heart extracellular matrix gene expression profile in the vitamin D receptor knockout mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103(3-5):416–9.
112. Tishkoff DX, Nibbelink KA, Holmberg KH, Dandu L, Simpson RU. Functional vitamin D receptor (VDR) in the T-tubules of cardiac myocytes: VDR knockout cardiomyocyte contractility. *Endocrinology* 2008;149(2):558-64.
113. Green JJ, Robinson DA, Wilson GE, Simpson RU, Westfall MV. Calcitriol modulation of cardiac contractile performance via protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41(2):350-9.
114. Zhang W, Chen L, Zhang L, Xiao M, Ding J, Goltzman D, et al. Administration of exogenous 1,25(OH)<sub>2</sub>D normalizes overactivation of the central renin-angiotensin system in 1 $\alpha$ (OH)ase knockout mice. *Neurosci Lett* 2015;588:184-9.
115. Xiang W, Kong J, Chen S, Cao LP, Qiao G, Zheng W, et al. Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288(1):E125–32.
116. Folland ED, Parisi AF, Moynihan PF, Jones DR, Feldman CL, Tow DE. Assessment of left ventricular ejection fraction and volumes by real-time, two-dimensional echocardiography. A comparison of cineangiographic and radionuclide techniques. *Circulation* 1979;60(4):760-6.
117. Wu X, Cheng B, Cai ZD, Lou LM. Determination of the apoptotic index in osteosarcoma tissue and its relationship with patients prognosis. *Cancer Cell Int* 2013;13(1):56.

118. Pu X, Storr SJ, Zhang Y, Rakha EA, Green AR, Ellis IO, et al. Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival. *Apoptosis* 2017;22(3):357-68.
119. Daliento L, Calabrese F, Tona F, Caforio AL, Tarsia G, Angelini A, et al. Successful treatment of enterovirus-induced myocarditis with interferon-alpha. *J Heart Lung Transplant* 2003;22:214-7.
120. Di Filippo S. Improving outcomes of acute myocarditis in children. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2016;14(1):117-25.
121. Chen HS, Wang W, Wu SN, Liu JP. Corticosteroids for viral myocarditis. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;(10):CD00447.
122. Rajagopal SK, Almond CS, Laussen PC, Rycus PT, Wypij D, Thiagarajan RR. Extracorporeal membrane oxygenation for the support of infants, children, and young adults with acute myocarditis: a review of the extracorporeal life support organization registry. *Crit Care Med* 2010;38:382-7.
123. Samet JM, Hatch GE, Horstman D, Steck-Scott S, Arab L, Bromberg PA, et al. Effect of antioxidant supplementation on ozone-induced lung injury in human subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(5):819-25.
124. Teixeira TM, da Costa DC, Resende AC, Soulage CO, Bezerra FF, et al. Activation of Nrf2-Antioxidant signaling by 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents Leptin-Induced oxidative stress and inflammation in human endothelial cells. *J Nutr* 2017;147:506-13.
125. Hamden K, Carreau S, Jamoussi K, Miladi S, Lajmi S, Aloulou D, et al. 1-alpha,25 dihydroxyvitamin D3: therapeutic and preventive effects against oxidative stress, hepatic, pancreatic and renal injury in alloxan-induced diabetes in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 2009;55:215-22.
126. Bao B-Y, Ting H-J, Hsu J-W, Lee Y-F. Protective role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. *Int J Cancer* 2008;122:2699-706.
127. Dong J, Wong SL, Lau CW, Lee HK, Ng CF, Zhang L, et al. Calcitriol protects renovascular function in hypertension by down-regulating angiotensin II type 1 receptors and reducing oxidative stress. *Eur Heart J* 2012;33:2980-90.
128. Srebot V, Gianicolo EA, Rainaldi G, Trivella MG, Sicari R. Ozone and cardiovascular injury. *Cardiovasc Ultrasound* 2009;7:30.
129. Buyuklu M, Kandemir FM, Set T, Bakırcı EM, Degirmenci H, Hamur H, et al. Beneficial effects of ozone therapy on oxidative stress, cardiac functions and clinical findings in patients with heart failure reduced ejection fraction. *Cardiovasc Toxicol* 2017;17(4):426-33.

130. Ahmed LA, Salem HA, Mawsouf MN, Attia AS, Agha AM. Cardioprotective effects of ozone oxidative preconditioning in an in vivo model of ischemia/reperfusion injury in rats. *Scand J Clin Lab Invest* 2012;72(5):345-54.
131. Zare MFR, Rakhshan K, Aboutaleb N, Nikbakht F, Naderi N, Bakhshesh M, et al. Apigenin attenuates doxorubicin induced cardiotoxicity via reducing oxidative stress and apoptosis in male rats. *Life Sci* 2019;232:116623.
132. Shaker RA, Abboud SH, Assad HC, Hadi N. Enoxaparin attenuates doxorubicin induced cardiotoxicity in rats via interfering with oxidative stress, inflammation and apoptosis. *BMC Pharmacol Toxicol* 2018;19(1):3.
133. Bertinchant JP, Polge A, Juan JM, Oliva-Lauraire MC, Giuliani I, Marty-Double C, et al. Evaluation of cardiac troponin I and T levels as markers of myocardial damage in doxorubicin-induced cardiomyopathy rats, and their relationship with echocardiographic and histological findings. *Clin Chim Acta* 2003;329(1-2):39-51.
134. Simůnek T, Klimtová I, Adamcová M, Gersl V, Hrdina R, Sterba M, et al. Cardiac troponin T as an indicator of reduced left ventricular contractility in experimental anthracycline-induced cardiomyopathy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003;52(5):431-4.
135. Zilinyi R, Czompa A, Czegledi A, Gajtko A, Pituk D, Lekli I, et al. The cardioprotective effect of metformin in doxorubicin-induced cardiotoxicity: the role of autophagy. *Molecules* 2018;23(5):1184.
136. Abu Gazia M, El-Magd MA. Ameliorative effect of cardamom aqueous extract on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Cells Tissues Organs* 2018;206(1-2):62-72.
137. Kittiwarawut A, Vorasettakarnkij Y, Tanasanvimon S, Manasnayakorn S, Sriuranpong V. Serum NT-proBNP in the early detection of doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Asia Pac J Clin Oncol* 2013;9(2):155-61.
138. Daugaard G, Lassen U, Bie P, Pedersen EB, Jensen KT, Abildgaard U, et al. Natriuretic peptides in the monitoring of anthracycline induced reduction in left ventricular ejection fraction. *Eur J Heart Fail* 2005;7:87-93.
139. Nakamae H, Tsumura K, Terada Y, Nakane T, Nakamae M, Ohta K, et al. Notable effects of angiotensin II receptor blocker, valsartan, on acute cardiotoxic changes after standard chemotherapy with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisolone. *Cancer* 2005;104(11):2492-8.
140. Abd El-Aziz TA, Mohamed RH, Pasha HF, Abdel-Aziz HR. Catechin protects against oxidative stress and inflammatory-mediated cardiotoxicity in Adriamycin treated rats. *Clin Exp Med.* 2012;12:233-40.
141. Sari FR, Arozal W, Watanabe K, Harima M, Veeravedu PT, Thandavarayan RA, et al. Carvedilol attenuates inflammatory-mediated cardiotoxicity in daunorubicin-induced rats. *Pharmaceuticals* 2011;4(3):551-66.

142. Bien S, Riad A, Ritter CA, Gratz M, Olshausen F, Westermann D, et al. The endothelin receptor blocker bosentan inhibits doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cancer Research* 2007;67(21):10428-35.
143. Kobayashi M, Usui F, Karasawa T, Kawashima A, Kimura H, Mizushina Y, et al. NLRP3 deficiency reduces macrophage interleukin-10 production and enhances the susceptibility to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Sci Rep* 2016;6:26489.
144. Dhingra R, Margulets V, Kirshenbaum LA. Molecular mechanisms underlying anthracycline cardiotoxicity: challenges in cardio-oncology. *Cardio-Oncology* 2017:25-32.
145. Teng LL, Shao L, Zhao YT, Yu X, Zhang DF, Zhang H: The beneficial effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on doxorubicin-induced chronic heart failure in rats. *J Int Med Res* 2010;38:940-8.
146. Lin MC, Yin MC. Preventive effects of ellagic acid against doxorubicin-induced cardio-toxicity in mice. *Cardiovasc Toxicol* 2013;13:185-93.
147. Yu X, Cui L, Zhang Z, Zhao Q, Li S.  $\alpha$ -Linolenic acid attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats through suppression of oxidative stress and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* 2013;45(10):817-26.
148. Arozal W, Watanabe K, Veeraveedu PT, Ma M, Thandavarayan RA, Sukumaran V, et al. Protective effect of carvedilol on daunorubicin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Toxicology* 2010;274(1-3):18-26.
149. El-Agamy DS., Abo-Haded HM., Elkablawy MA. Cardioprotective effects of sitagliptin against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Exp Biol Med* 2016;241(14):1577–87.
150. Yıldız Pehlivan D, Durdağı G. Effects of thymoquinone on blood parameters in doxorubicin cardiotoxicity. *Exp App Med Science* 2020;16-7.
151. Hamza AA, Ahmed MM, Elwey HM, Amin A. Melissa officinalis protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats and potentiates its anticancer activity on MCF-7 cells. *PLoS One* 2016;11(11):e0167049.
152. Disli OM, Sarihan E, Colak MC, Vardi N, Polat A, Yagmur J, et al. Effects of Molsidomine against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Eur Surg Res* 2013;51:79-90.
153. Zhao L, Tao X, Qi Y, Xu L, Yin L, Peng J. Protective effect of dioscin against doxorubicin-induced cardiotoxicity via adjusting microRNA-140-5p-mediated myocardial oxidative stress. *Redox Biol* 2018;16:189-98.

154. Al-Harhi SE, Alarabi OM, Ramadan WS, Alaama MN, Al-Kreathy HM, Damanhourî ZA, et al. Amelioration of doxorubicin-induced cardiotoxicity by resveratrol. *Mol Med Rep* 2014;10(3):1455-60.
155. Dai GF, Wang Z, Zhang JY. Octreotide protects doxorubicin-induced cardiac toxicity via regulating oxidative stress. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22(18):6139-48.
156. Santin JC, Deheinzelin D, Junior SP, Lopes LF, de Camargo B. Late echocardiography assessment of systolic and diastolic function of the left ventricle in pediatric cancer survivors after anthracycline therapy. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007;29(11):761-5.
157. Paiva MG, Petrilli AS, Moisés VA, Macedo CR, Tanaka C, Campos O. Cardioprotective effect of dexrazoxane during treatment with doxorubicin: a study using low-dose dobutamine stress echocardiography. *Pediatr Blood Cancer* 2005;45(7):902-8.
158. Barış VÖ, Gedikli E, Yersal N, Müftüoğlu S, Erdem A. Protective effect of taurine against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: echocardiographical and histological findings. *Amino Acids* 2019;51(10-12):1649-55.
159. Chen X, Chen Y, Bi Y, Fu N, Shan C, Wang S, et al. Preventive cardioprotection of erythropoietin against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Drugs Ther* 2007;21(5):367-74.
160. Bjelogrić SK, Radic J, Radulovic S, Jokanovic M, Jovic V. Effects of dexrazoxane and amifostine on evolution of doxorubicin cardiomyopathy in vivo. *Exp Biol Med* 2007;232(11):141.
161. Argun M, Üzüm K, Sönmez MF, Özyurt A, Derya K, Çilenk KT, et al. Cardioprotective effect of metformin against doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Anatol J Cardiol* 2016;16(4):234-41.
162. Elsurer C, Onal M, Selimoğlu N, Erdur O, Yılmaz M, Erdogan E, et al. Postconditioning ozone alleviates ischemia-reperfusion injury and enhances flap endurance in rats. *J Invest Surg* 2020;33(1):15-24.