



Sercan KAYA ^{1, a}

¹ Batman Üniversitesi,
Sağlık Hizmetleri Meslek
Yüksekokulu,
Tıbbi Hizmetler ve Teknikler
Bölümü,
Batman, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0001-9014-2448

ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp.Derg.
2023; 37 (2): 105 - 112
http://www.fusabil.org

Alüminyum Klorür Kaynaklı Kardiyotoksik Sıçan Modelinde N-Asetilsistein Uygulamasının TRPM2 İyon Kanallarına Etkisi

Amaç: Kalp, biyotoksik ajan olan Alüminyum (AL) birikimi için önemli bir hedef organdır. Bu çalışma, AL kaynaklı kardiyotoksisiteye karşı glutasyon öncüsü N-asetilsistein'in (NAC), kardioprotektif etkisi olup olmadığını ve transient reseptör potansiyel melastatin 2 (TRPM2) kanalları ekspresyonu üzerine etkinliğini sıçan modelinde göstermeyi amaçlamaktadır.

Gereç ve Yöntem: Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlar rastgele 4 eşit gruba ayrıldı (n=7). Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmadı. AL grubuna 14 gün boyunca 30 mg/kg/gün dozunda alüminyum klorür, intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı. AL+NAC grubuna 14 gün boyunca 30 mg/kg/gün dozunda alüminyum klorür i.p. uygulandıktan 1 saat sonra 150 mg/kg/gün N-asetilsistein 14 gün boyunca i.p. olarak uygulandı. NAC grubuna ise 150 mg/kg/gün N-asetilsistein, 14 gün boyunca i.p. uygulandı. 14. günün sonunda sıçanlar dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından kalp dokuları çıkarılarak biyokimyasal ve histolojik analizler yapıldı.

Bulgular: AL grubunda histopatolojik değişiklikler ve miyokardiyal enzim seviyelerinde artış olduğu gözlemlendi. NAC uygulamasının AL kaynaklı histopatolojik değişiklikleri azalttığı gözlemlendi. Ayrıca AL grubunda Kontrol ve NAC gruplarına kıyasla TRPM2 ve Kaspaz 3 immünreaktivitesinde anlamlı bir artış olduğu belirlendi. AL+NAC grubunda ise AL grubuna göre TRPM2 ve Kaspaz 3 immünreaktivitesinde azalma olduğu belirlendi.

Sonuç: AL kaynaklı kardiyotoksiste üzerine NAC uygulaması, biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikleri azaltarak/hafifleterek ve TRPM2 kanalı ekspresyonunu düzenleyerek kardioprotektif etki gösterebilir.

Anahtar Kelimeler: Alüminyum, kardiyotoksiste, N-asetilsistein, TRPM2

The Effect of N-Acetylcysteine Administration on TRPM2 İon Channels in Aluminum Chloride-Induced Cardiotoxic Rat Model

Objective: The heart is an important target organ for the accumulation of the biotoxic agent Aluminum (AL). This study aims to show whether the glutathione precursor N-acetylcysteine (NAC) has a cardioprotective effect against AL-induced cardiotoxicity and its effectiveness on the expression of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) channels in a rat model.

Materials and Methods: Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 equal groups (n=7). No application was made to the control group. In the AL group, 30 mg/kg/day aluminum chloride was administered intraperitoneally (i.p.) for 14 days. The AL+NAC group was administered 150 mg/kg/day N-acetylcysteine i.p. for 14 days, 1 hour after aluminum chloride was administered i.p. at a dose of 30 mg/kg/day for 14 days. In the NAC group, 150 mg/kg/day N-acetylcysteine was administered, i.p. for 14 days. At the end of the 14th day, the rats were decapitated. After decapitation, heart tissues were removed and biochemical and histological analyzes were performed.

Results: Histopathological changes and increase in myocardial enzyme levels were observed in the AL group. It was observed that NAC application reduced AL-induced histopathological changes. In addition, it was determined that there was a significant increase in TRPM2 and Caspase 3 immunoreactivity in the AL group compared to the Control and NAC groups. In the AL+NAC group, there was a decrease in TRPM2 and Caspase 3 immunoreactivity compared to the AL group.

Conclusion: On AL-induced cardiotoxicity, NAC administration may exert a cardioprotective effect by reducing/attenuating biochemical and histopathological changes and regulating TRPM2 channel expression.

Key Words: Aluminum, cardiotoxicity, N-acetylcysteine, TRPM2

Giriş

Alüminyum (AL) çevrede en yaygın bulunan metallere biridir (1). Ayrıca AL bileşiklerinin yaygın kullanımı maruz kalma insidansını arttırmaktadır (2). Günümüzde vücut dokularında AL birikiminin organ hasarı ile ilişkili olduğuna dair önemli kanıtlar bulunmaktadır (3). AL'nin özellikle karaciğer, kalp, kemik ve beyin başta olmak üzere tüm dokularda birikebileceği bildirilmiştir (4). Birkaç araştırmacı AL kaynaklı kalp hasarına (5) ve kardiyak komplikasyonlara (6) odaklanmıştır. AL'nin kardiyotoksik etki mekanizması oksidatif stres ve hücre içi redoks sisteminin bozulmasına bağlanabilir (7).

Yazışma Adresi Correspondence

Sercan KAYA

Batman Üniversitesi,
Sağlık Hizmetleri Meslek
Yüksekokulu,
Tıbbi Hizmetler ve
Teknikler Bölümü,
Batman - TÜRKİYE

sercan.kaya@batman.edu.tr

Ayrıca AL'nin membran hasarı, oksidatif stres ve moleküler düzeyde gen ekspresyonuna müdahale gibi etkilerinin olduğu bilinmektedir (8).

N-asetilsistein (NAC) in vivo ve in vitro olarak glutatyon biyosentezini artırabilen L-Sistein için bir öncü olan güçlü antioksidan özelliğe sahip bir besin takviyesi olarak tanımlanmıştır (9). NAC, hücre içi glutatyon seviyelerini artırıp mitokondriyal membran depolarizasyonunu azaltarak hücrelerde apoptozu önleyebilir (10). Oksidatif stresin, metal toksitesinin ana yolu olduğu bilinmektedir (11). Mitokondriyal hasarın neden olduğu apoptoz, kardiyomiyositlerde oksidatif stres hasarının temel mekanizmalarından biridir (12). Bcl-2 ailesi, apoptozun mitokondriyal yolunda yer alır ve bir dizi süreç sonucunda Kaspaz 3'ün aktivasyonu yoluyla apoptozu indükler (13).

Transient reseptör potansiyel melastatin 2 (TRPM2), seçici olmayan Ca^{2+} geçirgen bir katyon kanalıdır (14). Oksidatif stres hasarı için yaygın olarak kabul edilen mekanizmalardan biride, hücre ölümünü indüklemek için hücre içi iyon homeostazının bozulmasıdır. TRPM2, vücutta geniş bir dağılıma sahiptir ve oksidatif stres ile aktivasyona karşı oldukça hassastır. Reaktif oksijen türleri (ROS) poli(ADPR)-polimeraz (PARP) ve TRPM2 kanallarının aktivasyonu, TRPM2 aracılı hücre dışı Ca^{2+} ve Na^+ akışı, mitokondriyal Ca^{2+} uniporter (MCU) aracılı Ca^{2+} ve Na^+ mitokondriyal birikiminden mitokondriyal disfonksiyona, sitokrom c salınımına ve Kaspaz 3 aktivasyonundan oluşan moleküler bir mekanizmanın aracılık ettiği kardiyomiyosit apoptozunu indükler (15).

AL, kardiyovasküler sistem üzerinde toksik etkiler gösterir ancak ilgili mekanizmaları hakkında çok az çalışma vardır (16). Bu çalışma, glutatyon öncüsü NAC'ın, AL'nin indüklediği kardiyotoksitesiteye karşı in vivo kardiyoprotektif etkisini; histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak değerlendiren, bu etkiyi sıçan modelinde göstermek için tasarlanmıştır. Ayrıca bu sürecin TRPM2 iyon kanalları ekspresyonunu nasıl etkilediği belirlenecektir.

Gereç ve Yöntem

Araştırma ve Yayın Etiği: Çalışma, Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (09.09.2021-2021/26-E-35582840-604.01.01-169995) tarafından onaylanmıştır.

Deney Dizaynı: Deney hayvanlarının bakımı ile ilgili optimal koşullar (12 saat aydınlık/karanlık, 22- 25 °C sıcaklık, %50±10 nem oranı, add-libitum su ve yem) sağlandı. Deney prosedürü, Helsinki Deklarasyonuna uygun olarak gerçekleştirildi. Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 28 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan (8-10 haftalık, 200-250 g ağırlık) rastgele eşit sayıda dört gruba ayrıldı.

Grup 1 (Kontrol) (n:7): Bu gruptaki sıçanlara herhangi bir uygulama yapılmadı.

Grup 2 (AL) (n:7): 14 gün boyunca 30 mg/kg/gün dozunda alüminyum klorür (Sigma-Aldrich, Lot: BCBC6095V), intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı.

Grup 3 (AL+NAC) (n:7): 14 gün boyunca 30 mg/kg/gün dozunda alüminyum klorür i.p. uygulandıktan 1 saat sonra 150 mg/kg/gün N-asetilsistein (Asist® 300 mg/3 mL (%10) solüsyon içeren ampul) Hüsnü Arsan İlaçları AŞ) 14 gün boyunca i.p. uygulandı.

Grup 4 (NAC) (n:7): 14 gün boyunca 150 mg/kg/gün N-asetilsistein, i.p. uygulandı.

Deney modeli, uygulama süreleri, alüminyum klorür ve N-asetilsistein dozları yapılan çalışmalardan refere edilmiştir (17-20).

Bütün uygulamaların tamamlanmasıyla (14. gün) deney sonlandırıldı. Deneyde kullanılan sıçanlar, anestezi altında (ketamin (75 mg/kg) ve xylazine (10 mg/kg) i.p. uygulama) intrakardiak olarak kan alındıktan sonra dekapitasyon yöntemi ile çalışma sonlandırıldı. Kalp dokuları hızlıca çıkarıldı. Alınan kan serum örnekleri çalışma gününe kadar -80 °C'de muhafaza edildi ve sadece bir defa çözüldü. Kalp dokuları histopatolojik inceleme amacıyla %10'luk formalin solüsyonuna alınarak fiksasyon işlemi yapıldı.

Biyokimyasal Analizler: Aspartat transaminaz (AST), Kreatin kinaz (CK), Kreatin kinaz izoenzimi (CKMB) ve Laktat dehidrogenaz (LDH) enzimleri ile Troponin I (TnI) düzeylerinin ölçümü, bir üniversitenin merkez laboratuvarında otomatik biyokimyasal analiz cihazı ve kitleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Histopatolojik Değerlendirmeler: Kalp dokuları hızlıca çıkarıldıktan sonra histopatolojik değerlendirmeler için %10'luk formalin solüsyonuna alındı. Fiksasyonu sağlanan kalp dokuları rutin histolojik takip serilerinden geçirilip parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Genel histopatolojik değerlendirmeler için Hematoksilen Eozin (HE), kas lifleri arasındaki kollajen lif yoğunluğunun belirlenmesi için Masson trikrom histolojik boyama prosedürleri uygulandı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu (DM2500 LED, Leica, Almanya) ile incelendi ve fotoğraflandı (MC170 HD, Leica, Almanya). Gözlemlenen histopatolojik değişiklikler şiddetine göre; 0: yok, 1: hafif, 2: orta ve 3: şiddetli olarak değerlendirildi. Tüm grupların skorlaması yapıldıktan sonra ortalama değerler belirlendi. Masson trikrom ile boyanan preparatlarda kollajen lif yoğunluğu (fibroz); fibroz yok (0), kesit alanının %25'inden azında fibroz var (1), kesit alanının %25- 50'sinde fibroz var (2) ve kesit alanının %50'sinden fazlasında fibroz var (3) şeklinde değerlendirildi. Tüm değerlendirmeler yapıldıktan sonra histoskor tablosu oluşturuldu.

İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler: Kalp dokularında Kaspaz 3 ve TRPM2 immünreaktivitesinin belirlenmesi için, Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks yöntemi uygulandı. Parafin bloklardan, polizimli lamalara alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler deparafinizasyon ve şeffaflaştırma işlemlerinden sonra azalan dreceli alkol serilerinden geçirildi. Dokular mikrodalga fırında (750W), sitrat tampon solüsyonunda (pH=6.0), 7+5 dakika

kaynatıldıktan sonra soğutmak için oda ısısında yaklaşık 20 dakika bekletildi. PBS (Phosphate Buffered Saline, P4417, Sigma-Aldrich, ABD) ile 3x5 dakika yıkanan dokular daha sonra endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için hidrojen peroksid blok (H₂O₂ blok) solüsyonu ile 5 dakika inkübe edildi (Hydrogen Peroxide Block, TA-125-HP, Lab Vision Corporation, ABD). PBS ile 3x5 dakika yıkanan dokularda zemin boyasını önlemek için 5 dakika Ultra V Blok (TA-125-UB, Lab Vision Corporation, ABD) uygulandıktan sonra primer antikorlar damlatıldı. Kaspaz 3 primer antikor (PA5-16335, Thermo Scientific, ABD)/ TRPM2 primer antikor (PA2231, Boster, Pleasanton, ABD) ile 37°C sıcaklığındaki etüv içerisinde 60 dakika inkübasyona bırakıldı. PBS ile yıkanan preparatlar karanlık ve nemli ortamda oda sıcaklığında 30 dakika sekonder antikorla (TP-060-BN, Thermo Scientific, İngiltere) inkübe edildi. Inkübasyon sonrası PBS ile yıkanan dokulara Horse Radish Peroksidaz (HRP) enzimi (TS-060-HR, Thermo Scientific, İngiltere) damlatıldı ve nemli ortamda oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Dokulara 3-Amino-9-ethyl carbazole (AEC) substrat solüsyonu (TA-060-HA, Thermo Scientific, İngiltere) uygulandı. Işık mikroskopunda kontrol edilen dokularda görüldü sinyalinin alınmasıyla reaksiyon, tüm dokularda distile su ile eş zamanlı olarak sonlandırıldı. Tüm dokulara zıt boyama olarak Harris hematoksilen yapıldı. Preparatlar distile su ile yıkandıktan sonra su bazlı kapama solüsyonu (TA-125-UG, Lab Vision Corporation, ABD) ile kapatıldı. Preparatlar, ışık mikroskopunda (DM2500 LED, Leica, Almanya) incelenip fotoğraflandı (MC170 HD, Leica, Almanya).

İmmünohistokimyasal değerlendirme; immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: <%25, 0.4: %26-50, 0.6: %51-75, 0.9: %76-100) ve şiddeti (0: yok, 0.5: çok az, 1: az, 2: orta, 3: şiddetli) şeklinde değerlendirildi. "İmmünreaktivite = yaygınlık x şiddet" formülüne göre hesaplanarak histoskor tablosu oluşturuldu.

İstatistiksel Analizler: Araştırma kapsamında elde edilen verilerin analizinde Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 22.0 paket programı kullanıldı. Elde edilen verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilks testi ile kontrol edildi. Normal dağılım gösteren parametrelerin gruplar arasındaki farklarını belirlemede, Tek Yönlü Varyans Analizi (One-way ANOVA) Post-hoc

Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Veriler, ortalaması standart sapma olarak sunuldu. Normal dağılım göstermeyen parametreler ise Kruskal-Wallis ardından Mann-Whitney U ve Bonferroni düzeltmesi kullanılarak analiz edildi. Veriler, medyan (min-maks) olarak sunuldu. İstatistiksel anlamlılık, p<0.05 olarak kabul edildi.

Güç Analizi: G*Power sürüm 3.1'de yapılmıştır (University Kiel, Almanya). Tip 1 hatası (α) 0.05 ve gücü 0.90 olan güç analizi ile her gruptaki örneklem büyüklüğü 7 sıçan olarak belirlendi (20, 21).

Bulgular

Biyokimyasal Değerlendirmeler: Bu çalışmada sıçanların miyokardiyal enzim ve Tnl seviyeleri, kardiyak toksisitenin patogenezi ve AL'nin etkisini anlamak için belirlendi ve sonuçlar Tablo 1'de sunuldu. Kontrol ve NAC gruplarında AST, LDH, CK, CK-MB ve Tnl düzeyleri benzerdi (sırasıyla; p=.945, p=.996, p=.983, p=.994, p=1.000). AL maruziyeti, kontrol grubuna kıyasla AST, LDH, CK-MB ve Tnl düzeylerini anlamlı biçimde artırdı (sırasıyla; p=.003, p<.001, p=.002, p<.001). AL+NAC grubunda ise AL grubu ile karşılaştırıldığında LDH ve Tnl düzeylerinin belirgin biçimde azaldığı belirlendi (sırasıyla; p=.032, p<.001).

Miyokard Dokusunun Histopatolojik Değerlendirmesi: AL maruziyetinin miyokardiyal morfolojik değişiklikler üzerindeki etkisi HE ve masson trikrom boyamaları ile gözlemlendi. Kontrol ve NAC gruplarında kardiyomiyositlerin sınırları belirgin, bol sitoplazmaları ile yakın düzenlenmiş ve tek tip boyama göstermiştir. Ayrıca dokularda belirgin bir inflamasyon, vasküler konjesyon, miyofibril kaybı, sitoplazmik vakuolizasyon ve kollojen lif birikimi gözlemlenmedi (Şekil 1, 2; a, d). AL grubunda kontrol grubuna kıyasla; kollojen lif birikiminin arttığı (p=.002, Şekil 1; b), yoğun vasküler konjesyon ve inflamatuvar hücre artışı olduğu tespit edildi (p=.001, Şekil 2; b). Ayrıca miyofibril kaybı ve intrastoplazmik vakuolisasyon varlığı belirlendi (sırasıyla; p=.002, p=001, Şekil 2; b). AL+NAC grubunda ise AL grubu ile karşılaştırıldığında kollojen lif birikimi, vasküler konjesyon ve inflamatuvar hücrelerin belirgin biçimde azaldığı tespit edildi (sırasıyla; p=.006, p=004, p=004, Şekil 1, 2; c, Tablo 2).

Tablo 1. Çalışma gruplarının biyokimyasal analiz sonuçları

	Kontrol (n=7)	AL (n=7)	AL+NAC (n=7)	NAC (n=7)	P*
AST (U/L)	144.57±20.93	237.14±58.74 ^a	219.85±44.21 ^a	157.57±44.26 ^{ab}	=.001
LDH (U/L)	1208.42±177.130	2139.14±345.74 ^a	1589.71±451.43 ^b	1166.28±352.35 ^b	<.001
CK (U/L)	1035.14±622.58	1738.85±673.27	1316.28±496.11	1141.14±327.44	=.108
CK-MB (U/L)	1030.42±160.60	1910.28±496.15 ^a	1438.42±552.56	1083.71±194.56 ^b	=.001
Tnl (ng/L)	10.81±3.67	407.37±176.77 ^a	152.11±46.90 ^{ab}	10.22±2.18 ^b	<.001

Değerler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur.

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında,

^b: AL grubu ile karşılaştırıldığında (p<0.05).

* Oneway ANOVA

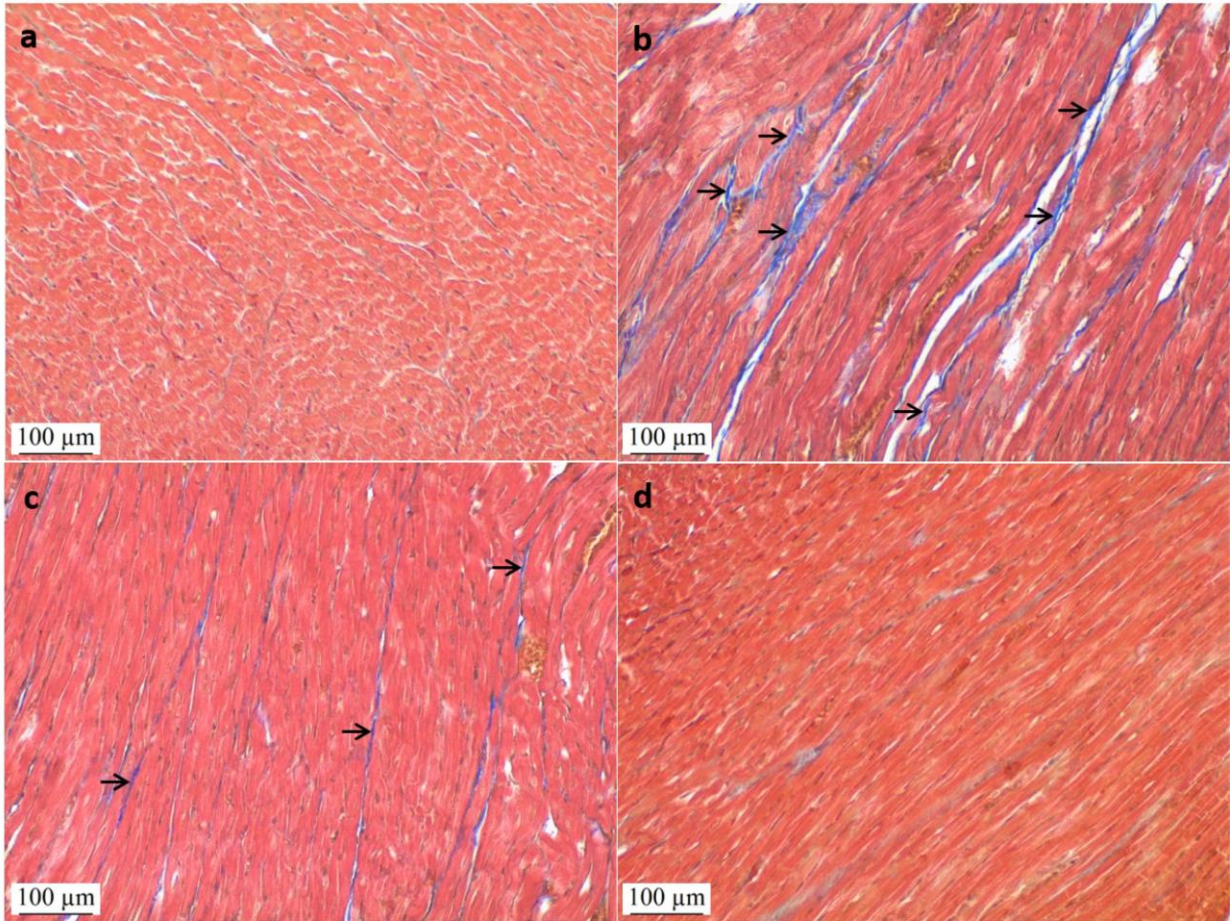
Tablo 2. Çalışma gruplarının histopatolojik değerlendirme sonuçları

	Kontrol (n=7) Median(Min-Max)	AL (n=7) Median(Min-Max) ^a	AL+NAC (n=7) Median(Min-Max) ^{a,b}	NAC (n=7) Median(Min-Max) ^b	P*
Kollajen lif yoğunluğu	0.00 (0.00-1.00)	3.00 (2.00-3.00) ^a	1.00 (1.00-2.00) ^{a,b}	0.00 (0.00-1.00) ^b	<0.001
İntrastoplazmik vakuolisasyon	0.00 (0.00-1.00)	2.00 (1.00-3.00) ^a	2.00 (1.00-3.00) ^a	0.00 (0.00-1.00) ^b	<0.001
Vasküler konjesyon	0.00 (0.00-0.00)	3.00(2.00-3.00) ^a	1.00 (1.00-2.00) ^{a,b}	0.00 (0.00-0.00) ^b	<0.001
Miyofibril kaybı	0.00 (0.00-1.00)	2.00 (2.00-3.00) ^a	1.00 (1.00-3.00) ^a	0.00 (0.00-1.00) ^b	<0.001
İnflamatuar hücre varlığı	0.00 (0.00-0.00)	3.00 (2.00-3.00) ^a	1.00 (1.00-2.00) ^{a,b}	0.00 (0.00-0.00) ^b	<0.001

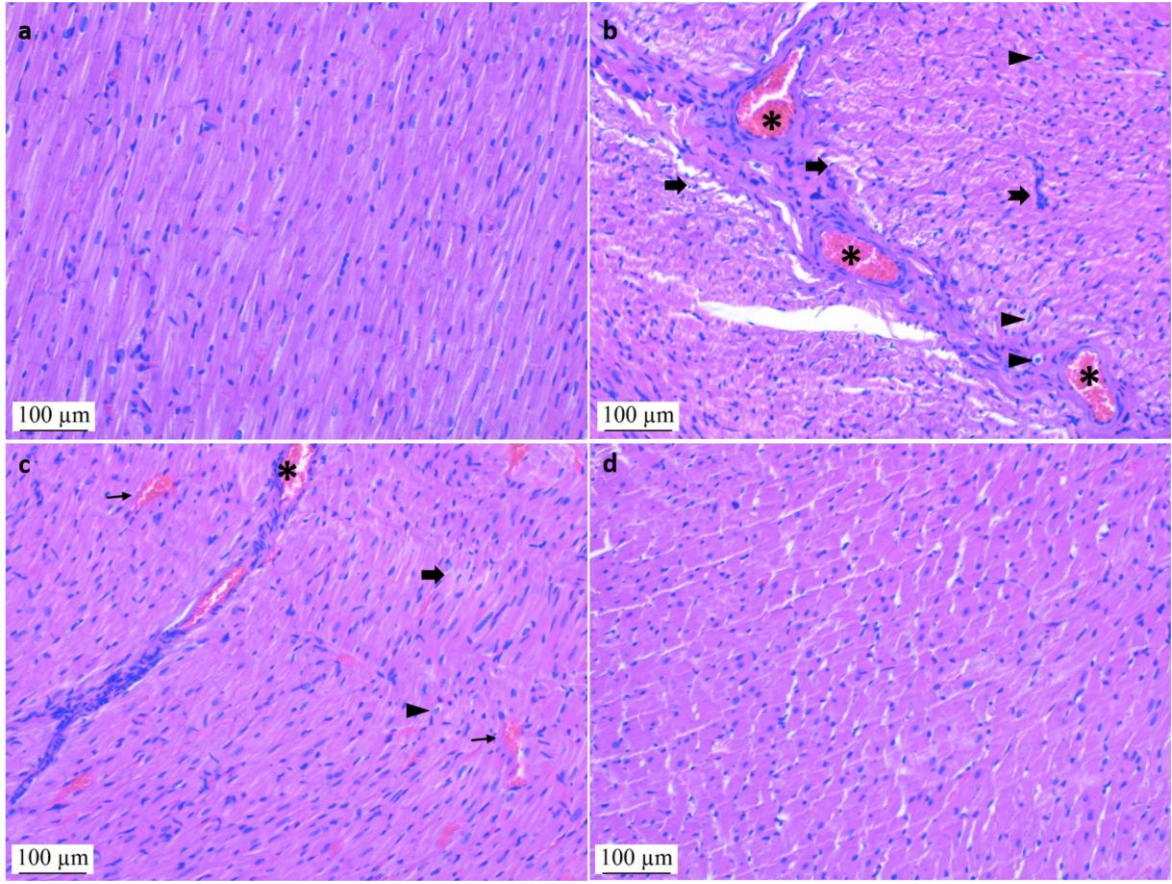
^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında,

^b:AL grubu ile karşılaştırıldığında (p<0.05).

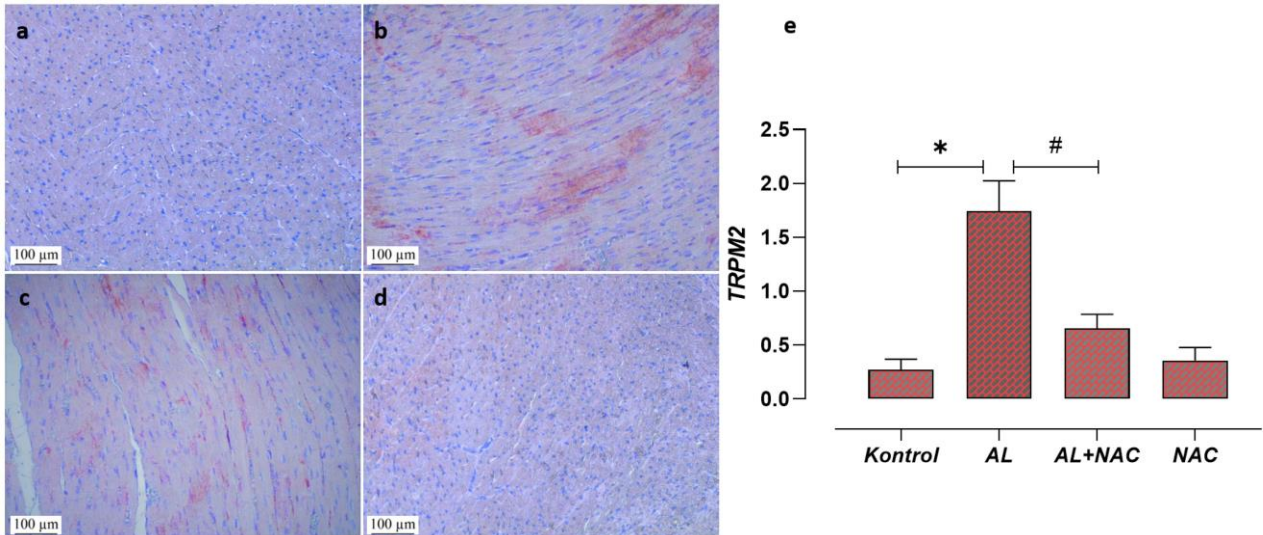
* Kruskal Wallis



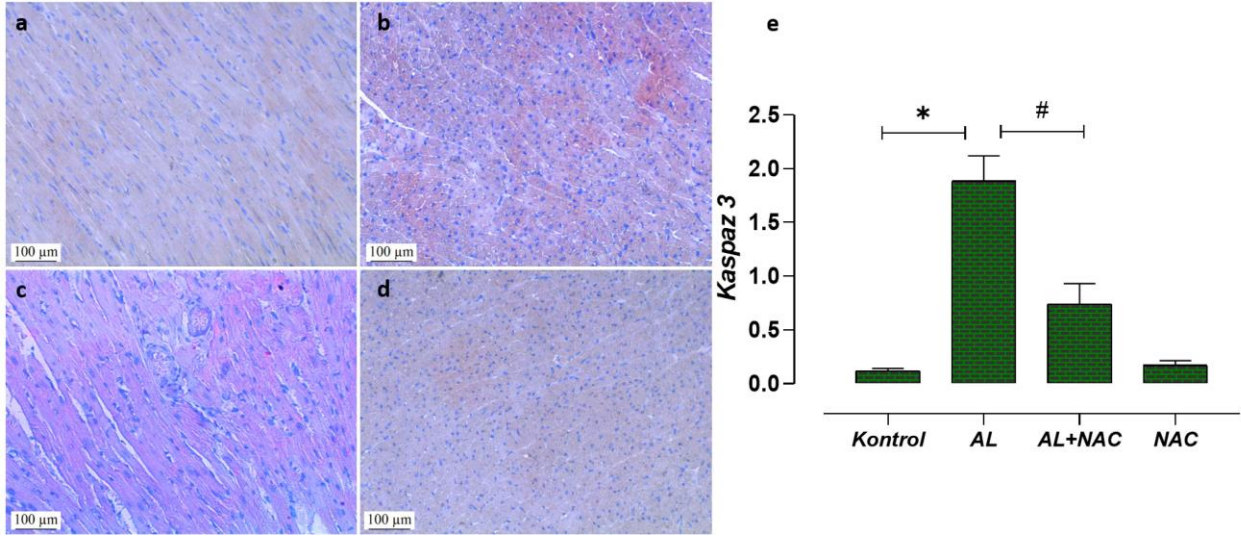
Şekil 1. AL ve/veya NAC uygulamalarının kalp dokusunda kollajen lif yoğunluğu üzerindeki etkilerinin fotomikrografları: Kontrol (a), AL (b), AL+NAC (c) ve NAC (d) gruplarına ait miyokard tabakası, (ince ok); kollajen lifler. Masson trikrom, skala bar: 100µm.



Şekil 2. AL ve/veya NAC uygulamalarının kalp dokusu üzerindeki etkilerinin fotomikrografları: Kontrol (a) ve NAC (d) gruplarına ait miyokard tabakası. AL grubuna ait miyokard tabakası (b); vasküler konjesyon (asteriks), intrasitoplazmik vakuolizasyon (ok başı), inflamatuvar hücre artışı (çentikli ok) ve miyofibril kaybı (kalın ok). AL+NAC grubuna ait miyokard tabakası (c); vasküler konjesyon (asteriks), intrasitoplazmik vakuolizasyon (ok başı), hemorajik alanlar (ince ok) ve miyofibril kaybı (kalın ok). Hematoksilen Eozin, skala bar: 100µm.



Şekil 3. AL ve/veya NAC uygulamalarının kalp dokusunda TRPM2 immünreaktivitesi üzerindeki etkilerinin fotomikrografları ve immünohistoskor grafiği: Kontrol (a), AL (b), AL+NAC (c) ve NAC (d) gruplarında TRPM2 immünreaktivitesi. Kalp dokusunda TRPM2 immünohistoskor grafiği (e). Skala bar: 100µm



Şekil 4. AL ve/veya NAC uygulamalarının kalp dokusunda Kaspaz 3 immünreaktivitesi üzerindeki etkilerinin fotomikrografları ve immünohistoskor grafiği: Kontrol (a), AL (b), AL+NAC (c) ve NAC (d) gruplarında Kaspaz 3 immünreaktivitesi. Kalp dokusunda Kaspaz 3 immünohistoskor grafiği (e). Skala bar: 100µm

TRPM2 ve Kaspaz 3 Düzeyleri: AL maruziyetinin TRPM2 ve Kaspaz 3 seviyelerine etkisi immünohistokimyasal olarak belirlendi. İmmünreaktivite sonuçları kontrol ve NAC gruplarında benzerdi (Şekil 3, 4; a, d). AL grubunda TRPM2 immünreaktivitesinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı gözlemlendi (Şekil 3; b, *, p=.002). AL+NAC grubunda ise TRPM2 immünreaktivitesinin AL grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığı belirlendi (Şekil 3; c, #, p=.006). Benzer şekilde, AL grubu miyokardında Kaspaz 3 immünreaktivitesinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı gözlemlendi (Şekil 4; b, *, p=.001). NAC uygulamasının ise (AL+NAC grubu) AL grubuna kıyasla Kaspaz 3 immünreaktivitesini önemli ölçüde azalttığı tespit edildi (Şekil 4; c, #, p=.006).

Tartışma

Kalp, biyotoksik ajan olan AL birikimi için önemli bir hedef organdır (4). Her iki ventriküler kalp fonksiyonunda azalma ile sonuçlanan şiddetli alüminyum fosfit kardiyotoksitesi tıbbi bir vaka raporunda tanımlanmıştır (22). Kardiyovasküler toksik maddelerin kısa vadeli etkisine karşı kalbin erken reaksiyonu, miyokardiyal enzim aktivitesi, enerji metabolizması ve iyon homeostazındaki değişiklikler gibi biyokimyasal değişimlerdir (23). Kardiyomiyositlerin bir dizi hücresel ve moleküler olayı, toksik maddelerin sürekli etkisi ile tetiklenebilir. Miyokardiyal hipertrofi, hipertrofik genlerin aktivasyonu ve transkripsiyon faktörlerinin yukarı regülasyonu ile indüklenebilir (24). Toksik maddelere uzun süre maruziyet, kalbin yapı ve işlevinde bir dizi değişiklik ortaya çıkararak kardiyomiyosit apoptozu ve nekroz ile karakterize kardiyomiyosit ölümüne yol açacaktır (25). Miyokardiyal enzimler, miyokard hasarının teşhisi için önemli belirteçlerdir. Kardiyomiyosit hasarı, kardiyomiyositlerdeki enzimlerin hücre dışına sızmasına neden olur, bu nedenle bu enzimlerin salınımı

hücre hasarının derecesinin bir göstergesi olarak kullanılabilir (26).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, AL grubunda AST, LDH, CKMB ve TnI düzeylerinin kontrol ve NAC gruplarına kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğunu göstermiştir. Bu verilerle tutarlı bir şekilde yakın zamanlı bir araştırma, AL maruziyetinin miyokardiyal enzim seviyelerini arttırdığını bildirilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada bu maruziyetin miyokard tabakasında ciddi histopatolojik değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir (7). Bu çalışmada AL'nin miyokard tabakasında vasküler konjesyon, miyofibril kaybı, inflamatuvar hücre artışı, intrastoplazmik vakuolisasyon ve kollojen lif birikimi gibi histopatolojik değişikliklere sebep olduğu tespit edildi. Benzer şekilde yapılan bir başka çalışma ise AL'ye maruz kalan sıçanların kardiyomiyositlerinin, esas olarak vakuolar dejenerasyon ve miyokardiyal hipertrofi olarak ortaya çıkan patolojik hasarlar gösterdiğini ortaya koydu. Kardiyak hipertrofi, kardiyomiyositlerin işlevini azaltan Ca^{2+} akışının eksikliği de dahil olmak üzere, hücrelerin iyonları taşıma yeteneğini zayıflatmaktadır (27).

Oksidatif hasar, AL toksisitesinde hayati bir rol oynar (28). Ayrıca apoptozun kritik bir düzenleyici sinyali olarak kabul edilir (29). Oksidatif hasar Ca^{2+} aşırı yüklenmesine, Malondialdehit (MDA), mitokondriyal matriks ve geçirgenlik artışına, sitokrom C'nin ise salınımına yol açar. Sitoplazmadaki serbest sitokrom C, hücre içi apoptoz sinyal yolunu başlatmak için kaspazla ilgili proteinleri aktive edebilir, böylece geri dönüşümsüz kardiyomiyosit hasarına ve apoptozu neden olabilir (30). Kardiyomiyositlerin yenilenemez yapısı nedeniyle apoptoz, bazı kardiyak fonksiyonların kalıcı olarak kaybolmasına neden olabilir. Kaspaz ailesi, apoptoz düzenlemesindeki çekirdek proteinlerden biridir. Ortaya çıkan kanıtlar, kardiyomiyosit apoptozunda yer alan kaspaz ailesi proteinlerinin esas olarak Kaspaz 8 ve Kaspaz 3 olduğunu bulmuştur. Kaspaz 8, apoptoz

yolağında Kaspaz 3'ü uyarabilen apoptotik yolun yukarısında bulunur (31). Kaspaz ailesindeki apoptozun anahtar yürütücü molekülü olan Kaspaz 3, apoptozun erken evresinde aktive olur ve apoptozu indükler (32). Bu çalışma, AL maruziyetinin sıçanların miyokardiyal dokularında proapoptotik protein olan Kaspaz 3'ün immünreaktivitesinde artış olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar Kaspaz 3'ün, AL kaynaklı kardiyomiyosit apoptozunda rol oynayabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde yapılan çalışmalar, AL maruziyetinin sıçanlarda kardiyomiyositlerin apoptozunu önemli ölçüde arttırdığını bildirmiştir (7, 16).

Proapoptotik sitokin tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ile indüklenen TRPM2 aktivasyonunun, kardiyomiyosit hücre ölümünde rol oynayabileceği bildirilmiştir (30). Bunun yanı sıra mitokondri tarafından oluşturulan ve ayrıca nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidazların (NOX) aracılık ettiği ROS oluşumundan kaynaklanan oksidatif stres, iskemi/reperfüzyon (I/R) kaynaklı kardiyomiyosit ölümü ve miyokard hasarının başlıca nedenlerinden biridir (33, 34). Genel olarak, in vitro ve in vivo çalışmalardan elde edilen bulgular, TRPM2 kanallarını, I/R hasarı ile indüklenen kardiyomiyosit ölümü ve miyokardiyal hasara aracılık eden önemli bir moleküler mekanizma olarak tanımlamaktadır (15). Bunun yanı sıra, TRPM2 kanallarının kardiyomiyositlerdeki karşıt rolünü destekleyen, yani TRPM2 kanallarının ROS kaynaklı kardiyomiyosit ölümü ve miyokardiyal I/R hasarına karşı koruyucu etki göstererek kardiyak fonksiyonları düzenlediğine dair kanıtlarda bulunmaktadır (35, 36). Bu çalışmada ise AL kaynaklı kardiyotoksistide TRPM2 kanalları ekspresyonunun artışına bağlı olarak proapoptotik protein olan Kaspaz 3 aktivasyonunun artmasının rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Ali AA, Abd El-Latif DM, Gad AM, et al. Nephrotoxicity and hepatotoxicity induced by chronic aluminum exposure in rats: Impact of nutrients combination versus social isolation and protein malnutrition Arab. J Lab Med 2018; 43(2): 195-213.
2. Sanaa AA, Walaa IM. Carvedilol induces the antiapoptotic proteins Nrf2 and Bcl2 and inhibits cellular apoptosis in aluminum-induced testicular toxicity in male Wistar rats. J Biopha Biomedicine & Pharmacotherapy 2021; 139:111594
3. Balgoon MJ. Assessment of the protective effect of *Lepidium sativum* against aluminum-induced liver and kidney effects in albino. Rat BioMed Research International 2019; 9: 4516730.
4. González, MA, Bernal CA, Mahieu S, et al. The interactions between the chronic exposure to aluminum and liver regeneration on bile flow and organic anion transport in rats. Biological Trace Element Research 2009; 127(2): 164-176.
5. Ghorbel I, Khemakhem M, Boudawara O, et al. Effects of dietary extra virgin olive oil and its fractions on antioxidant status and DNA damage in the heart of rats co-exposed to aluminum and acrylamide. Food & Function 2015; 6(9): 3098-3108.
6. Neophytou AM, Noth EM, Liu S, et al. Ischemic heart disease incidence in relation to fine versus total particulate matter exposure in a US aluminum industry cohort. PLoS One 2016; 11(6): e0156613.
7. Galal SM, Hasan HF, Abdel-Rafei MK, et al. Synergistic effect of cranberry extract and losartan against aluminium chloride-induced hepatorenal damage associated cardiomyopathy in rats. Arch Physiol Biochem 2019; 125:4, 357-366.
8. Kumar V, Bal A, Gill KD. Aluminium-induced oxidative DNA damage recognition and cell-cycle disruption in different regions of rat brain. Toxicology 2009; 264:137-144.
9. Mokhtari V, Afsharian P, Shahhoseini M, et al. A review on various uses of N-acetyl cysteine. Cell J 2017; 19(1):11-17.
10. Elizabeth MA, Samson P, Itohan OR. Histomorphological evaluations on the frontal cortex extrapyramidal cell layer following administration of N-Acetyl cysteine in aluminum induced neurodegeneration rat model. Metab Brain Dis 2020; 35(5): 829-839.
11. Yu H, Zhang J, Ji Q, et al. Melatonin alleviates aluminium chloride-induced immunotoxicity by inhibiting oxidative

Yapılan bir araştırma, NAC'ın nöron hücre ölümü, kromatoliz ve gliozis ile bağlantılı AL kaynaklı nörotoksistide nöroprotektif etkiye sahip olduğunu ve böylece stres aracılı oksidatif doku hasarıyla mücadele etmek için endojen glutatyonu arttırdığını göstermiştir. NAC etkileşiminin nöron ortamında, astrositler ve ribozomlarla olan bu etkisi, Alzheimer hastalığı için etki mekanizması olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (10). Bu çalışmada ise AL kaynaklı kardiyotoksistide üzerine NAC uygulamasının biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikleri azaltarak/hafifleterek kardiyoprotektif etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca NAC uygulamasının, TRPM2 kanalı ekspresyonu ve Kaspaz 3 immünreaktivitesindeki azaltıcı/hafifletici etkisi ile de bu süreci desteklediği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, NAC müdahalesinin AL kaynaklı kardiyotoksik sıçan modelinde biyokimyasal histolojik ve immünohistokimyasal olarak kardiyoprotektif etki gösterebileceği belirlendi. Ayrıca, TRPM2 ekspresyonunun AL kaynaklı kardiyotoksistide artış göstermesi ve NAC uygulaması ile azalması dikkat çekiciydi. TRPM2 kanalı işlev mekanizması üzerine son zamanlarda oldukça ilerleme kaydedilmiştir. Ancak TRPM2 kanalının yapısı, biyolojisi ve regülasyonu konusunda hala birçok eksik parça bulunmaktadır. Bu karmaşık katyon kanalını daha iyi anlamamıza ve TRPM2 hedefleme stratejilerinin gelişimini önemli ölçüde hızlandırmamıza yardımcı olacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Teşekkür: Yazar, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Tuba YALÇIN'a çalışmaya katkılarından dolayı teşekkürlerini sunar.

- stress and apoptosis associated with the activation of Nrf2 signaling pathway. *Ecotoxicol Environ Saf* 2019; 173: 131-141.
12. Xu J, Lin C, Wang T, et al. Ergosterol attenuates LPS-induced myocardial injury by modulating oxidative stress and apoptosis in rats. *Cell Physiol Biochem* 2018; 48(2): 583-592.
 13. Sergio L, Thomé AMC, Trajano L, et al. Photobiomodulation prevents DNA fragmentation of alveolar epithelial cells and alters the mRNA levels of caspase 3 and Bcl-2 genes in acute lung injury. *Photochem Photobiol Sci* 2018; 17(7): 975-983.
 14. Yu X, Xie Y, Zhang X et al. Structural and functional basis of the selectivity filter as a gate in human TRPM2 channel, *Cell Reports* 2021; 37(7): 110025.
 15. Malko P, Jiang LH. TRPM2 channel-mediated cell death: An important mechanism linking oxidative stress-inducing pathological factors to associated pathological conditions, *Redox Biology* 2020; 37: 101755.
 16. Zhou L, He M, Li X, et al. Molecular Mechanism of Aluminum-Induced Oxidative Damage and Apoptosis in Rat Cardiomyocytes. *Biol Trace Elem Res* 2021; 200: 308-317.
 17. Kaya Tektemur N, Erdem Güzel E, Gül M, et al. The combination of N-acetylcysteine and cyclosporin A reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Ultrastructural Pathology* 2021; 45(1): 19-27.
 18. Yang X, Yuan Y, Niu Q. Effects of aluminium chloride on the methylation of app in hippocampal of rats. *Journal of Hygiene Research* 2016; 45(3): 345-349.
 19. Ozcan Yildirim S, Colakoglu N, Ozer Kaya S. Protective effects of L-arginine against aluminium chloride-induced testicular damage in rats. *Andrologia* 2022; e14569.
 20. Kaya S, Yalçın T, Boydak M, et al. Protective effect of N-acetylcysteine against aluminum-induced kidney tissue damage in rats. *Biol Trace Elem Res* 2022; 1-10.
 21. Faul F et al. Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods* 2009; 41: 1149-1160.
 22. Elabbassi W, Chowdhury MA, Fachartz AAN. Severe reversible myocardial injury associated with aluminium phosphide toxicity: A case report and review of literature. *J Saudi Heart Assoc* 2014; 26: 216-221.
 23. Sun X, Sun H, Yu K, et al. Aluminum chloride causes the dysfunction of testes through inhibiting the ATPase enzyme activities and gonadotropin receptor expression in rats. *Biol Trace Elem Res* 2018; 183(2): 296-304.
 24. Martínez-Martínez S, Lozano-Vidal N, López-Maderuelo MD, et al. Cardiomyocyte calcineurin is required for the onset and progression of cardiac hypertrophy and fibrosis in adult mice. *Febs J* 2019; 286(1): 46-65.
 25. Ge J, Yu H, Li J, et al. Assessment of aflatoxin B1 myocardial toxicity in rats: Mitochondrial damage and cellular apoptosis in cardiomyocytes induced by aflatoxin B1. *J Int Med Res* 2017; 45(3): 1015-1023.
 26. Lu Y, Feng Y, Liu D, et al. Thymoquinone attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through activation of SIRT1 signaling. *Cell Physiol Biochem* 2018; 47(3): 1193-1206.
 27. Kumar S, Wang G, Liu W, et al. Hypoxia-induced mitogenic factor promotes cardiac hypertrophy via calcium-dependent and hypoxia-inducible factor-1 α mechanisms. *Hypertension* 2018; 72(2): 331-342.
 28. Aminjan H, Abtahi SR, Hazrati E, et al. Targeting of oxidative stress and inflammation through ROS/NF-kappaB pathway in phosphine-induced hepatotoxicity mitigation. *Life Sci* 2019; 232: 116607.
 29. Zhang M, Zhu J, Qin X, et al. Cardioprotection of tetrahedral DNA nanostructures in myocardial ischemia-reperfusion injury. *ACS Appl Mater Interfaces* 2019; 11(34): 30631-30639.
 30. Onaolapo AY, Ayeni OJ, Ogundeji MO, et al. Subchronic ketamine alters behaviour, metabolic indices and brain morphology in adolescent rats: involvement of oxidative stress, glutamate toxicity and caspase-3-mediated apoptosis. *J Chem Neuroanat* 2019; 96: 22-33.
 31. Martínez MA, Ares I, Rodríguez JL, et al. Pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin induces hepatic cytochrome P450 enzymes, oxidative stress and apoptosis in rats. *Sci Total Environ* 2018; 631-632: 1371-1382.
 32. Choudhary GS, Al-Harbi S, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods Mol Biol* 2015; 1219: 1-9.
 33. Heusch G. Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective. *Nat Rev Cardiol* 2020; 10(1038): 41569.
 34. Bugger H, Pfeil K. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Basis Dis* 1866 2020; 165768.
 35. Hoffman NE, Miller BA, Wang J, et al. Ca²⁺ entry via Trpm2 is essential for cardiac myocyte bioenergetics maintenance. *J Physiol* 2015; 308(6): H637-H650.
 36. Miller BA, Wang J, Hirschler-Laszkiwicz I, et al. The second member of transient receptor potential-melastatin channel family protects hearts from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 304(7): H1010-H1022.