



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ÇOCUK KARDİYOLOJİ BİLİM DALI

METFORMİN'İN DENEYSEL RAT MODELİNDE
DOKSORUBİSİN KARDİYOTOKSİSİTESİNE KARŞI
KARDİYOPROTEKTİF ETKİSİ

YANDAL UZMANLIK TEZİ

Uzm. Dr. Mustafa ARGUN

KAYSERİ-2014



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ÇOCUK KARDİYOLOJİ BİLİM DALI

METFORMİN'İN DENEYSEL RAT MODELİNDE
DOKSORUBİSİN KARDİYOTOKSİSİTESİNE KARŞI
KARDİYOPROTEKTİF ETKİSİ

YANDAL UZMANLIK TEZİ

Uzm. Dr. Mustafa ARGUN

Danışman
Prof. Dr. Kazım ÜZÜM

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TTU-2013-4712 kodlu proje ile desteklenmiştir.

KAYSERİ-2014

TEŞEKKÜR

Çocuk kardiyoloji eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan ve eğitimimize katkısı olan hocalarımıza, özellikle yayın yazma konusunda ki teşvikleri nedeniyle Prof. Dr. Nazmi Narin, hastalarla olan iletişimiyle örnek olan ve çalışmanın bütün aşamalarında ki önemli katkıları nedeniyle Prof. Dr. Kazım Üzüm ve güncel bilgiyi takip etmede katkıları nedeniyle Doç. Dr. Ali Baykan’a teşekkür ediyorum.

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim dalı hocalarımıza ve Prof. Dr. Selim Kurtoglu hocamıza eğitime olan katkısı ve destekleri, Yard. Doç. Dr. Ekrem Ünal’a yayın aşamalarında ki önemli desteği, Doç. Dr. Mehmet Fatih Sönmez’in çalışmanın tüm aşamalarının gerçekleşmesinde ki büyük emeği, Dr. Derya Karabulut’un çalışmanın laboratuvar aşamasında katkıları, Yard. Doç. Dr. Ferhan Elmalı’nın çalışmanın istatistiğini yapmış olması, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’nin çalışmanın mali kaynağını sağlaması, Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma merkezinde Dr. Zeynep Soyarsarıca’nın deney uygulamalarında ki yardımları, anjiyo laboratuvar teknisyenleri Ekrem ve Murat Bey, hemşireleri Mehtap ve Fatma Hanım ve personelleri Uğur Bey, Zübeyde Hanım ve poliklinik sekreterleri Nilüfer, Leyla ve Suzan Hanım’a ve çalışma arkadaşlarım Dr. Abdullah Özyurt ve Dr. Özge Pamukçu’ya destekleri için teşekkür ediyorum.

Çalışmamızın “13. Ulusal Pediatrik Kardiyoloji ve Kalp Damar Cerrahisi Kongresinde” sözel sunum dalında birinci olmasında, yazım ve sunum aşamasında ki katkıları olan tüm hocalarıma teşekkür ediyorum.

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan anneme, babama ve her zaman desteğini gördüğüm eşim Fatma Argun’a teşekkür ediyorum. Bu çalışmayı çocuklarım Elif ve Feyza’ya ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
TABLO LİSTESİ.....	IV
RESİM ve ŞEKİL LİSTESİ	V
KISALTMALAR.....	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Doksorubisin Kardiyotoksitesitesi	6
2.1.1.Doksorubisinin Yapısı.....	9
2.1.2. Etki Mekanizması	9
2.1.3. Yan Etkileri.....	10
2.2.1.1.Akut Antrasiklin Kardiyotoksitesitesi	10
2.2.1.2. Erken Başlangıçlı Kronik İlerleyici Antrasiklin Kardiyotoksitesitesi.....	11
2.2.1.3.Geç Başlangıçlı Kronik İlerleyici Antrasiklin Kardiyotoksitesitesi.....	11
2.2.2. Kardiyotoksitesite Mekanizmaları.....	11
2.2.3. Antrasiklin Kardiyotoksitesitesi Risk Faktörleri	13
2.2.4. Doksorubisin Kardiyotoksitesitesinin Tanısı	14
2.2.5. Doksorubisin Kardiyotoksitesitesinin Tedavisi.....	16
2.2.6. Doksorubisin Kardiyotoksitesitesi Gelişimine Karşı Kalbi Koruma Stratejileri.....	17
2.2.7. Doksorubisin Kardiyotoksitesitesine Karşı Kardiyoprotektif Ajanlar.....	17
2.3. Metformin	19
2.3.1. Metforminin Farmakokinetiği.....	19

2.3.3. Metforminin Kardiyoprotektif Etkisi	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. İlaçlar	24
3.2. Dokсорubisin Kardiyotoksitesisi Rat Modelinin Hazırlanması.....	24
3.2.1. Ekokardiyografi	27
3.2.2. Laktat dehidrogenaz Kreatinin kinaz-MB ve Troponin-I Serum Seviyelerinin Ölçülmesi	27
3.2.3. ELİSA.....	27
3.2.3.1. Beyin Natriüretik Peptid ölçümü.....	28
3.2.3.2. C tip Natriüretik Peptid (CNP) ölçümü	28
3.2.3.3 Katalaz Aktivitesi.....	28
3.2.3.5 Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi	29
3.2.3.6. Tümör Nekroz Faktör-alfa Aktivitesi	29
3.2.5. Histolojik Değerlendirme	30
4. BULGULAR	32
4.1. Sol Ventrikül Fonksiyonunun Ekokardiyografik Değerlendirmesi.....	32
4.2. LDH, CK-MB, Troponin I, BNP ve CNP Düzeyleri	36
4.3. Antioksidan Enzim Düzeyleri	37
4.4. Ekokardiyografik Parametreler ile Kardiyak Enzimler, Nörohormonlar ve Antioksidan Enzim Düzeyleri Arasında Korelasyon Analizi.....	37
4.5. Kalp Dokusunun Hematoksilin & Eosin Boyamasının Histopatolojik Değerlendirmesi	38
4.6. TUNEL yöntemi ile apoptotik indeks sonuçları	41
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	45
6. SONUÇLAR.....	52
KAYNAKLAR.....	54

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Çocukluk çağı kanser tiplerinin dağılımı	3
Tablo 2. Antineoplastik ilaçların potansiyel kardiyovasküler yan etkileri ve bu yan etkileri oluşturma riskleri.....	8
Tablo 3. Antrasiklin kardiyotoksitesisi için risk faktörleri	14
Tablo 4. Deneysel çalışmalarda doksorubisin kardiyotoksitesisini önlemek için kullanılan farmakolojik ajanlar.	19
Tablo 5. Kontrol ve doksorubisin grubunun M mod sol ventrikül ekokardiyografi ile ölçülen IVSd, SVIDd, SVPWd, IVSs, SVIDs, SVPWs, EF, FK ortalama $\pm$ SD değerleri.....	33
Tablo 6. Kontrol ve doksorubisin + metformin grubunun M mod sol ventrikül ekokardiyografi ile ölçülen IVSd, SVIDd, SVPWd, IVSs, SVIDs, SVPWs, EF, FK ortalama $\pm$ SD değerleri.	34
Tablo 7. Kontrol ve metformin grubunun M mod sol ventrikül ekokardiyografi ile ölçülen IVSd, SVIDd, SVPWd, IVSs, SVIDs, SVPWs, EF, FK ortalama $\pm$ SD değerleri.....	34
Tablo 8. Kontrol, doksorubisin, metformin ve doksorubisin + metformin grubunun M mod sol ventrikül ekokardiyografi ile ölçülen IVSd, SVIDd, SVPWd, IVSs, SVIDs, SVPWs, EF, FK ortalama $\pm$ SD değerleri	35
Tablo 9. Kontrol, doksorubisin, metformin ve doksorubisin + metformin gruplarının LDH, CK-MB, Troponin I, BNP ve CNP düzeyleri.....	36
Tablo 10. Kontrol, doksorubisin, metformin ve doksorubisin + metformin gruplarının kalp dokusu katalaz, SOD, GPx, TNF- α düzeyleri.....	37
Tablo 11. Kalp dokusundaki apoptotik indeks. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.....	44

RESİM ve ŞEKİL LİSTESİ

Resim 1.	Rata intraperitoneal doksorubisin uygulaması.	25
Resim 2	Rata gavaj yoluyla serum fizyolojik içerisinde çözölmüş metformin uygulaması.	26
Resim 3.	Anestezi uygulanan ratların sol ventriköl M mod ekokardiyografik incelemesi.	26
Resim 4.	Kontrol grubunun kalp dokusu H&E ile boyanması histopatolojik incelemesi normal dokuyu gösteriyor.	38
Resim 5.	Doksorubin grubunun kalp dokusu H&E ile boyanması histopatolojik incelemesi miyokardiyum tabakasındaki kas lifleri arasında organizasyon bozukluğu olduğu ve bazı hücrelerde miyofibrillerde kayıp (ok) olduğu göröldü.	39
Resim 6.	Doksorubin grubunun kalp dokusu H&E ile boyanması histopatolojik incelemesi miyokard tabakasinda bazı alanlarda hücrelerin eozinofilik boyanmasında (*) ve bazı hücrelerin intrasitoplazmik vakuol oluşumunda artış olduğu (ok) tespit edildi	39
Resim 7.	Doksorubin grubunun kalp dokusu H&E ile boyanması histopatolojik incelemesi miyokard tabakasinda bazı alanlarda hücrelerin eozinofilik boyanmasında artış (*) ve bazı damarlarda konjesyon ve hemoraji alanları tespit edildi.	40
Resim 8.	Metformin grubunun kalp dokusu H&E ile boyanması histopatolojik incelemesi normal dokuyu gösteriyor.	40
Resim 9.	Doksorubisin + metformin grubunun kalp dokusu H&E ile boyanması histopatolojik incelemesi normal dokuyu gösteriyor.	41
Resim 10.	Kontrol grubu rat kalp dokusu TUNEL boyamasını gösteren fotoğraf.	42
Resim 11.	Doksorubisin grubu rat kalp dokusu TUNEL boyamasını gösteren fotoğraf.	42
Resim 12.	Metformin grubu rat kalp dokusu TUNEL boyamasını gösteren fotoğraf.	43
Resim 13.	Doksorubisin + metformin grubu rat kalp dokusu TUNEL boyamasını gösteren fotoğraf.	43

Şekil 1. Doksorubisinin kimyasal yapısı.....	9
Şekil 2. Kardiyomyositde doksorubisin kardiyotoksisinin çeşitli mekanizmaları	13
Şekil 3. Metforminin kardiyoprotektif etki mekanizmasını göstermektedir.....	21

KISALTMALAR

ANP	: Atrial natriüretik peptid
AMP	: Adenozin mono fosfat
AMPK	: AMP-aktive protein kinaz
ATP	: Adenozin trifosfat
BNP	: B tip Natriüretik Peptid
CK-MB	: Kreatinin kinaz-MB
CNP	: C tip Natriüretik Peptid
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
H&E	: Hematoksilen-eozin
IVSd	: Diyastolde interventriküler septum kalınlığı
IVSs	: Sistolde interventriküler septum kalınlığı
LDH	: Laktat dehidrogenaz
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
PI3K/Akt	: Fosfatidilinositol-3 kinaz
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SVIDd	: Sol ventrikül end diyastol çapı
SVIDs	: Sol ventrikül end sistol çapı
SVPWd	: Diyastolde sol ventrikül arka duvar kalınlığı
SVPWds	: Sistolde sol ventrikül arka duvar kalınlığı
TNF-alfa	: Tümör nekroz faktör alfa

METFORMİN'İN DENEYSEL RAT MODELİNDE DOKSORUBİSİN KARDİYOTOKSİSİTESİNE KARŞI KARDİYOPROTEKTİF ETKİSİ

ÖZET

Giriş/Amaç: Etkili antineoplastik bir ajan olan doksorubisinin klinik kullanımı kardiyotoksik etkisi nedeniyle sınırlanmaktadır. Tip 2 diyabet hastalarında antihiperglisemik bir ilaç olarak kullanılan metforminin, kalp yetersizliği oluşturulmuş deneysel hayvan modellerinde kardiyoprotektif etki göstererek sol ventrikül fonksiyonlarının korunmasını sağladığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, doksorubisin kardiyotoksitesisi oluşturulmuş rat kalplerinde; metforminin olası kardiyoprotektif etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereçler ve Yöntem: 10 haftalık, erkek, Wistar albino cinsi toplam 40 rat, randomize olarak I. grup kontrol grubu, II. grup doksorubisin grubu, III. grup metformin grubu, IV. grup doksorubisin+metformin grubu olmak üzere dört gruba ayrıldı. Kontrol grubu ratlara, haftada iki defa olmak üzere serum fizyolojik 2,5 ml/kg intraperitoneal 14 gün süre ile uygulandı. Doksorubisin grubu ratlara, haftada iki defa olmak üzere doksorubisin (4 mg/kg, intraperitoneal) kümülatif doz 16 mg/kg olarak uygulandı. Metformin grubu ratlara, metformin gavaj ile 250 mg/kg/gün 14 gün süre ile uygulandı. Doksorubisin + metformin grubu ratlara, haftada iki defa olmak üzere doksorubisin (4 mg/kg, intraperitoneal) kümülatif doz 16 mg/kg ve metformin (250 mg/kg/gün, oral) 14 gün süre ile uygulandı. Son uygulamadan bir gün sonra sol ventrikül fonsiyonları M mod ekokardiyografi ile değerlendirildi. Ekokardiyografik değerlendirme yapıldıktan sonra sakrifikasyon uygulanan ratların serum laktat dehidrogenaz, serum kreatinin kinaz izoform MB, serum troponin-I, serum beyin natriüretik peptid ve serum c tip natriüretik peptid düzeyleri ölçüldü. Kalp dokusunda katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve tümör nekroz faktör alfa aktiviteleri ELİSA yöntemi ile çalışıldı. Kalp dokusu histopatolojik olarak analiz edildi. Kardiyomyosit apoptozisi insitu terminal deoksinükleotid tranferaz assay (TUNEL) yöntemi ile saptandı.

Bulgular: Doksorubisinin grubunda sol ventrikül fonksiyonlarında önemli düzeyde bozulma, kalp doku hasarı ve kardiyomyosit apoptozis indeksinde artış saptandı. Doksorubisin+metformin grubunda sol ventrikül fonksiyonlarının korundu, kalp doku hasarını ve kardiyomyosit apoptozisi azaldı.

Sonuç: Bu çalışmada metforminin doksorubisinin kardiyotoksisitesine karşı kardiyoprotektif etkisi olduğuna dair kanıtlar elde edilmiştir.

METFORMIN PROTECTS AGAINST DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOTOXICITY IN EXPERIMENTAL RAT MODEL

ABSTRACT

Background and Purpose: Doxorubicin is effective antineoplastic agents. However its clinic use is limited by cardiotoxicity. Recent studies established that metformin, an oral antidiabetic drug, protect left ventricular function in experimental heart failure animal model. We aim to investigate cardioprotective effect of metformin against doxorubicin cardiotoxicity.

Methods and Materials: Wistar albino male rats were randomly grouped into control, doxorubicin, metformin, doxorubicin + metformin group (n=10, total= 40 rats). In the first group, rats were injected, twice time of week, with normal saline (2,5 ml/kg, intraperitoneally) within of 14 days. Rats in the second group were injected, twice time of week, with doxorubicin (4 mg/kg, intraperitoneally) to obtain cumulative dose of 16 mg/kg. Rats in the third group received (250 mg/kg, p.o.) over a period of 14 days. Rats of fourth group were injected, twice time of week, with doxorubicin (4 mg/kg, intraperitoneally) to obtain cumulative dose of 16 mg/kg and daily treated with metformin (250 mg/kg, p.o.) over a period of 14 days. One days after the last administratation, left ventricular systolic function was evaluated by M mode echocardiography. Serum was seperated for measurement of lactate dehydrogenase, creatine phosphokinase iso-enzyme MB, troponin I, pro brain natriuretic peptid, c type natriuertic peptid. Catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, tumor necrosis factor alfa were determined in enzyme linked immun assay. The heart tissue from all rats were analyzed histopathologically. Cardiomyocytes apoptosis was detected by insutu terminal deoxynucleotidyl transferase assay (TUNEL method).

Results: Doxorubicin group was compared control and doxorubicin + metformin group. Doxorubicin group revealed significant deteriorations of left ventricular functions, heart tissue damage, high cardiomyocyte apoptosis index. Doxorubicin+metformin group showed improvoment left ventricular function, inhibition of heart tissue damage and cardiomyocyte apoptosis.

Conclusion: The study have provided the some evidence that metformin is cardioprotective agent against doksorubisin induced cardiotoxicity.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Doksorubisin geniş kullanım alanı olan etkili antineoplastik ajanlardandır. Ancak kümülatif dozun (400-550 mg/m²) üzerinde doksorubisin kullanımı kalp dokusunda ciddi hasara, kardiyotoksisiteye ve konjestif kalp yetersizliğine neden olabilmektedir. Doksorubisinin klinik kullanımı doz bağımlı, kümülatif ve geri dönüşümsüz kardiyotoksisite yan etkisi nedeniyle sınırlanmaktadır. Doksorubisin kadar güçlü ve yan etki potansiyelleri doksorubisinden daha düşük ajanlar kullanıma girinceye kadar doksorubisin kullanımı devam edecek gibi gözükmemektedir. Diğer taraftan doksorubisin kardiyotoksisitesini önlemeye yönelik çalışmalara devam edilecektir. Doksorubisin kardiyotoksisitesinin önlenmesine yönelik tedavi stratejileri güncelliğini koruyacaktır.

Antrasiklin kardiyotoksisitesini önlemeye yönelik çalışmalarda; anjiyotensin konverting enzim inhibitörleri ve beta blokerler gibi ajanların kullanımı ile ilgili umut verici sonuçlar elde edilmiş olsa da yeterli veriye ulaşılammıştır. Kardiyoprotektif olduğu kanıtlanmış olan tek ajan bir demir şelatörü olan dekstrazoksandır. Dekstrazoksanın güvenli ve kardiyotoksisite insidansını azalttığına dair çalışmalar varsa da pediatrik onkoloji pratiğinde dekstrazoksan kullanımı sınırlıdır.

Metformin, tip 2 diyabet hastalarında kullanılan oral antihiperglisemik bir ilaç olup kalp yetersizliği oluşturulmuş deneysel modellerde, kardiyoprotektif etki gösterdiği, sol ventrikül fonksiyonlarını önemli derecede koruduğu gösterilmiştir. Metforminin tip II diyabet hastalarında kardiyovasküler hastalık riskini azaltmasından ve vasküler fonksiyonlarını düzeltmesinden yola çıkılarak, metforminin doksorubisin kardiyotoksisitesinin önlenmesinde etkili olabileceği düşünülmüştür.

Doksorubisin kardiyotoksisitesi oluşturulmuş deneysel rat modelinde; sol ventrikül M mod ekokardiyografik incelemesi yapılarak, serum laktat dehidrogenaz (LDH), kreatinin kinaz MB (CK-MB), troponin I, beyin natriüretik peptid (BNP), c tip natriüretik peptid (CNP) düzeyleri, kalp dokusu katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF-alfa) aktiviteleri ölçülerek, histopatolojik değerlendirme ve apoptozis değerlendirilerek doksorubisin kardiyotoksisitesi ve metforminin buna karşı kardiyoprotektif etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Çocuklarda Kanser

Çocuklarda kanser, tüm kanserli hastaların ancak %2'si kadardır. Buna rağmen bir yaşından büyük çocuklarda travmadan sonra ikinci en sık ölüm nedenidir (1). 15 yaş altında bir milyon çocukta 130 yeni kanserli hasta görülmektedir (2). Çocuklarda kanser insidansı hayatın ilk üç yılında daha yüksektir, 3 yaşından 9 yaşına kadar sıklığı azalmakta, adölesan çağda sıklığı giderek artmakta ve ikinci pikini yapmaktadır. Lösemi çocuklarda kanserin en sık görülen şeklidir. Beyin tümörleri ise çocukluk çağının en sık solid tümörleridir. Çocukluk çağı kanser tiplerinin dağılımı tablo 1'de verilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Çocukluk çağı kanser tiplerinin dağılımı

Kanserin tipi	Yüzdesi
Lösemi	30
Beyin tümörü	25
Lenfoma	15
Nöroblastom	8
Sarkoma	7
Wilms tümür	6
Osteosarkom	5
Diğerleri	4

Çocukluk çağı kanser tiplerinin görülme sıklığı yaş ile değişmektedir. Süt çocukluğu döneminde nöroblastom, retinoblastom ve nefroblastom tüm malignitelerin yaklaşık yarısını oluşturur. 1-4 yaş grubu çocuklarda ağırlıklı olarak lösemi görülmektedir. Karsinoma ve germ hücreli tümörler adölesanlarda nispeten daha sık görülmektedir. Lösemi ve santral sinir sistemi tümörleri adölesanlarda nadirdir (3).

Kanserli çocuklar için yaşam beklentisi büyük ölçüde iyileşme göstermiştir. 1960'lı yılların başlarında kanserli çocukların ancak %30'u hayatta kalabiliyordu. 1980'li yılların ortalarında bu oran %65'e, 1990'lı yılların ortalarında %75'e yükselmiştir (4). Günümüzde kanserli çocukların hayatta kalma oranları %80'lere ulaşmıştır. 2010 yılı itibarıyla her 250 yetişkin insandan biri, çocukluk çağı kanserinden tedavi görmüştür (5).

Kanser tedavisinde görülen iyileşme büyük ölçüde kemoterapötik ilaçlar sayesinde olmuştur. Günümüzde 100'den fazla kemoterapötik ajan farklı kanser türlerini tedavi etmek için kullanılmaktadır. Kemoterapik ajanlar kanseri tedavi etmek, kür elde edilemediğinde hastalığı kontrol etmek ve ileri evre kanserlerde kanserin neden olduğu semptomları hafifletmek için de kullanılmaktadır.

Kemoterapötik İlaç Seçimi ve Kemoterapötik İlaçlar

Kemoterapi rejimini oluşturacak ilaçların seçiminde kanserin tipi, evresi, hastanın yaşı, genel sağlık durumu, diğer sağlık problemleri ve geçmişte almış olduğu kanser tedavi tipi etkili olmaktadır.

Kemoterapi ilaçları etki mekanizmalarına ve kimyasal yapılarına göre gruplara ayrılabilirler.

Alkilleyici ajanlar doğrudan DNA hasarı yaparlar ve kanser hücrelerinin çoğalmasını engellerler. Faz spesifik değildirler, hücre döngüsünün tüm aşamalarına etki ederler. DNA'ya zarar verdikleri için kemik iliğinin uzun süreli zarar görmesine ve nadiren de olsa akut lösemiye neden olabilmektedirler.

Antimetabolitler S fazında etki etmektedir. 5-florourasil, 6-merkaptopürin, metotraksat, sitarabin bu grup ilaçlardandır.

Antrasiklinler hücre döngüsünün tüm aşamalarında etki etmektedir. Çeşitli kanser türlerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Daunorubisin, doksorubisin (adriyamisin), epirubisin, idarubisin antrasiklin grubu kemoterapi ilaçlarıdır.

Aktinomisin-D, bleomisin ve mitomisin-C antrasiklin dışı antitümör antibiyotiklerdir.

Topoizomeraz inhibitörleri ise topoizomeraz isimli enzimi inhibe ederek etki etmektedir. Topetesan ve irinotesan topoizomeraz I inhibitörü ilaçlardır. Etoposid ve teniposid ise topoizomeraz II inhibitörü ilaçlardır. Bu grup ilaçlar mitozu engelleyebilir veya protein yapımı için gerekli enzimleri inhibe ederler. Hücre döngüsün M fazında etkilidirler. Bu ilaçların doz sınırlayıcı yan etkisi periferik sinir hasarı yapma potansiyelidir.

Kortikosteroidler lösemi, lenfoma, multipl myeloma gibi bazı kanser türlerini tedavi etmek için kullanılmaktadırlar, kemoterapinin neden olduğu bulantı ve kusmayı önlemek için de kullanılırlar (6).

Kemoterapötik İlaçların Yan Etkileri

Kemoterapi ilaçları kanser hücrelerini yok etmeye çalışırken diğer yandan normal hücrelere de etki ederek oldukça önemli yan etkilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Kemoterapi ilaçlarından en fazla etkilenen hücreler en hızlı çoğalan hücrelerdir. Bununla birlikte bu hücrelerin hızlı çoğalma ve yenilenme özelliği sebebi ile kemoterapi sonrası kemoterapinin olumsuz etkileri hızla düzelir. Bitkinlik en sık belirtilerden biridir. Bulantı ve kusma sık görülen diğer yan etkilerdir. Saç dökülmesi bir diğer sık görülen yan etki olup kemoterapi tamamlandıktan haftalar sonra saçlar tekrar çıkmaktadır.

Kemoterapötikler kemik iliği süpresyonu ile anemiye yol açarak halsizlik ve yorgunluğa, lökopeniye yol açarak enfeksiyonlara, trombositopeniye yol çarak kanamaya eğilime neden olabilmektedirler. Mukozit beslenmede bozulmaya ve enfeksiyona eğilime neden olabilmektedir. İshal sıvı kaybına yol açarak dehidratasyona neden olabilir.

Antrasikler ve Doksorubisin

Antrasiklinler DNA replikasyonuna katılan enzimleri engelleyerek etki gösteren antitümör antibiyotiklerdendir. Doksorubisin, daunorubisin, epirubisin tedavide kullanılan antrasiklin antibiyotiklerdir. Antrasiklinlerin gastrointestinal sistemden absorpsiyonları iyi değildir. Sadece parenteral olarak uygulanabilirler.

Daunorubisin streptomyces peucetius isimli bakteriden elde edilmiştir. DNA çift zincirinde interkalasyon yaparak DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu bozar. Ayrıca topoizomerez II'ye bağlanarak DNA yarılması yapar. Etkinliği S döneminde daha fazla olmakla birlikte döneme özgü değildir. Alopesi, bulantı, kusma, kemik iliği depresyonu yan etkilerindendir. Kardiyomyositlere sitotoksik etki ile oluşturduğu kardiyotoksisite ise en önemli yan etkisidir. Kardiyomyosit dışı hücrelere de sitotoksik etki gösterebilmektedir (7-9).

Doksorubisin daunorubisinin hidroksi türevidir. Hücre dönemine özgü olmayan bir ilaç ise de S dönemindeki hücrelerde etkinliği daha fazladır. Geniş spektrumlu ve güçlü etkili olmasının yanında kardiyotoksisite nedeniyle doz sınırlaması gerekmektedir. Meme, özefagus, lenfoma, osteosarkom, akut lenfositik ve myeloid lösemiler gibi pek çok kanser türünün tedavisinde kullanılmaktadır. İlacın ekstrevasasyonu doku nekrozuna neden olabilir. İdrarı geçici olarak kırmızı renge boyamaktadır.

Epirubisin doksorubisinin epimerizasyon türevidir. Kardiyotoksisitesi doksorubisinden daha az ve tedavi etkinliği daha fazladır (10).

2.1. Doksorubisin Kardiyotoksisitesi

Adriyamisin olarak da bilinen doksorubisin klinikte en sık kullanılan antrasiklindir ve oldukça güçlü bir antineoplastik ajandır. Önemli bir yan etkisi olan kardiyotoksisite kullanımını sınırlandırmaktadır (11).

Kardiyotoksisite, kanser hastalarına ek morbidite ve mortalite riski getirmekle kalmamakta, kemoterapi rejiminde değişikliğe gidilmek zorunda da bırakmaktadır (12). Son yıllarda antikanser tedavide kardiyotoksisitenin önemi artmıştır. Öyle ki birçok hastada kardiyovasküler ölüm riski tümör rekürrens riskinden yüksek olabilmekte ve çocukluk çağı kanserinden hayatta kalanlarda kalp hastalığına bağlı ölüm olasılığı sekiz

kat artmaktadır (13-15). Kalp yetmezliği gelişme riski kanser öyküsü olmayan yaşlıları ile karşılaştırıldığında 15 kat daha fazladır (16). Kemoterapi alan hastalarda sekonder malignensiden sonra ölümün ikinci en sık nedeni kardiyotoksisitedir (17).

Tedaviden 30 yıl sonra, 250 mg/m² antrasiklin alan hastaların %7,5'den daha fazlasında konjestif kalp yetersizliği gelişmektedir (18). Antrasiklin kardiyotoksisitesi genç erişkinlerde kalp transplantasyonu nedenleri arasındadır (19). Detaylı kardiyak değerlendirme antrasiklin tedavisi alan çocukların yarısından fazlasında sol ventrikül kitle ve duvar kalınlığında azalma, artmış sol ventrikül ardyük, azalmış sol ventrikül kontraktilesini içeren anormallikleri göstermektedir (20).

Kardiyotoksisiteye neden olan kemoterapötik ajanların potansiyel yan etkileri ve bu yan etkileri oluşturma riskleri tablo 2'de verilmiştir (21) (Tablo 2). Antrasiklinler doz bağımlı kümülatif, geri dönüşümsüz kardiyotoksisiteye neden olabilen ancak buna rağmen tedavi potansiyelinin yüksek olması nedeniyle yaygın olarak kullanılan güçlü antineoplastik ilaçlardır.

1950'li yıllarda *Streptomyces peucetius* isimli bakteriden daunorubisin identifiye edilmiştir (22). 1960'lı yıllarda daunorubisinin lösemi ve lenfoma tedavisinde etkili olduğu ve daunorubisin türevi olan doksorubisinin, daunorubisinden daha etkili bir antitümör ajan olduğu gösterilmiştir (23,24). Günümüzde antrasiklinler lösemi, lenfoma gibi hematolojik malignensileri, meme kanseri, akciğer kanseri gibi solid organ tümörlerini tedavi etmek için kullanılmaktadır (25).

Tablo 2. Antineoplastik ilaçların potansiyel kardiyovasküler yan etkileri ve bu yan etkileri oluşturma riskleri (21).

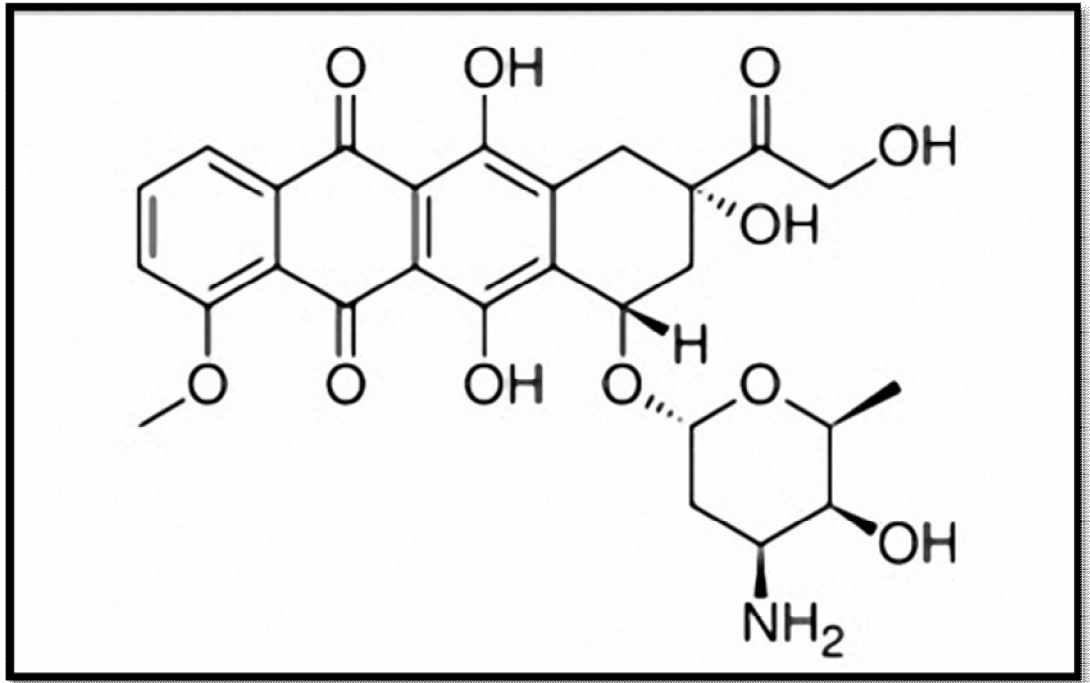
Kardiyovasküler yan etki	Antineoplastik İlaç	Risk
Sol Ventrikül Disfonksiyonu	Antrasiklinler	+++
	Siklofosfamid	++
	Sisplatin	++
Kardiyak iskemi	5-florourasil	++
	İnterferon alfa	++
Hipotansiyon	İnterlökin -2	++++
	Transretinoik asit	++
Hipertansiyon	Bavasizumab	+++
	Sunitinid	+++
Aritmi ve ileti bozuklukları	Talidomid	++
	İfosfamid	++
Ödem	İmatinib	++++
	Talidomid	++
QT uzaması ve Tarsades de pointes	Arsenik tiroksid	++++
	Sorafenib	++
Tromboemboli	Bevasizumab	++
	Sisplatin	+
Perikardit	İmatinib	++
	Bleomisin	+

Doksorubisin kullanımını sınırlayıcı en büyük faktör kardiyotoksitesidir (26). Doksorubisin kardiyotoksitesi akut ya da kronik olarak görülebilmektedir. Yüksek doz kullanımı sonrası oluşan akut kardiyotoksite nadirdir ve akut kalp yetersizliğine neden olabilmektedir. Kronik doksorubisin kardiyotoksitesi ise doz bağımlıdır ve kemoterapi kürü bittikten yıllar sonra görülen dilate kardiyomyopati tablosudur (27,28). Akut veya kronik kardiyotoksite kardiyak disfonksiyona, kardiyomyopatiye, kalp yetersizliğine ve ölüme neden olabilmektedir (29).

Doksorubisin kardiyotoksitesinin moleküler mekanizmasının aydınlatılması çalışmaları sürerken, bir taraftan da kardiyotoksisiteyi önlemeye yönelik stratejiler geliştirilmeye çalışılmaktadır.

2.1.1.Doksorubisinin Yapısı

Doksorubisin aglikon ve şeker bölümlerine sahip selektif olmayan bir antrasiklindir. Aglikon kinin-hidrokinon bitişik grupları ile tetrasiklik halkadan oluşur. Şeker bileşeni bir glikozidik bağ ile halkalardan birine bağlanmıştır. Doksorubisin kimyasal yapısı şekil 1’de verilmiştir (Şekil 1) (30).



Şekil 1. Doksorubisinin kimyasal yapısı.

2.1.2. Etki Mekanizması

Doksorubisin DNA’ya yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Bu bağlanma DNA baz çiftlerinin arasına interkalasyon ile olur. Bu mekanizma ile replikasyon ve transkripsiyonu bozarak antineoplastik etkisini oluşturur.

Doksorubisin, enzimatik elektron azalmasına neden olan bir proteine bağlanarak hücre membranını direkt olarak etkileyebilir. Hidroksil serbest radikallerin son derece reaktif türlerinin oluşmasına neden olabilir.

Hidroksil serbest radikalleri DNA kırıklarına, lipid peroksidasyonuna, proteinlerin ve DNA'nın alkalizasyonuna neden olabilir. Hilmer ve ark. (31), Buchholz ve ark. (32) doksorubisinin bir hücre ölüm mekanizması olan otofajiye neden olduğuna dair kanıtlara ulaşmışlardır.

2.1.3. Yan Etkileri

Antrasiklinlerin yan etkileri çok yönlü sitotoksik etkili olmalarından kaynaklanmaktadır. Ne yazık ki spesifik tümör hedefli antitümör ilaçlar değildir. Doksorubisin tedavisi sırasında bulantı, kusma, ishal, saç dökülmesi, ağız mukozasında ülser, hallüsinasyon ve kemik iliği depresyonu görülebilir. Hipersensitivite ilişkili olarak ateş, ürtiker ve anafilaksiye neden olabilir. Sürekli küçük bir damara uygulandığında damar duvarında kalınlaşmaya yol açabilmektedir. İlacın damar dışına çıkması halinde sellülit ve tromboflebit gelişebilir. Kardiyotoksisite en önemli yan etkisidir (33).

Antrasiklin kardiyotoksisitesi;

1. Akut antrasiklin kardiyotoksisitesi,
2. Erken başlangıçlı kronik ilerleyici antrasiklin kardiyotoksisitesi,
3. Geç başlangıçlı kronik ilerleyici antrasiklin kardiyotoksisitesi

olmak üzere üç kategoriye ayrılır (34).

2.2.1.1. Akut Antrasiklin Kardiyotoksisitesi

İlk antrasiklin infüzyonundan sonra, myokard fonksiyonunda geri dönüşümlü depresyon olarak tanımlanır. Dozdan bağımsız olarak görülen bu kardiyotoksisite, antrasiklin tedavisi kesildiğinde önemli düzelme ile sonuçlanır. Antrasiklin tedavisi alan hastaların <%1' inden azında görülmektedir. Klinik bulgular ilk haftada ve akut olarak görülür. Konjestif kalp yetersizliği de görülebilmekle birlikte nadirdir. Myokardit-perikardit sendromu ve hayatı tehdit edici aritmiler gibi komplikasyonlar da bildirilmiştir (35).

2.2.1.2. Erken Başlangıçlı Kronik İlerleyici Antrasiklin Kardiyotoksitesitesi

Antrasiklin tedavisi tamamlandıktan sonraki bir yıl içinde görülür. Erişkin hastalarda genelde kronik dilate kardiyomyopati ile sonuçlanır. Çocuklarda ise klinik tablonun restriktif kardiyomyopatiye değişimi muhtemeldir (34).

2.2.1.3. Geç Başlangıçlı Kronik İlerleyici Antrasiklin Kardiyotoksitesitesi

Antrasiklin tedavisi tamamlandıktan 1 yıl kadar sonra görülen kardiyotoksitesitedir. Sol ventrikül fonksiyonlarının normal olduğu ve hastaların asemptomatik olduğu latent periyod sonrası, ölümcül olabilen ilerleyici kalp fonksiyonlarında bozulma ile seyretmektedir (34).

Antrasiklin kardiyotoksitesinin derecesi ve ilerleyişinde gözlenen bireysel farklılıklar; genetik yatkınlık ve bazı risk faktörleri ile ilişkilidir. Erken ve geç kardiyotoksitesite ile ilişkili risk faktörleri kümülatif doz, doz uygulama hızı, doz şeması, küçük yaş ve birlikte verilen kemoterapi ve radyoterapi olarak sayılabilir (36).

Lipshultz ve ark. (37) kümülatif antrasiklin dozunun kardiyak hasar için iyi tanımlanmış bir risk faktörü ve en önemli prediktörü olduğunu bildirmişlerdir. Von Hoff ve ark. (38) konjestif kalp yetersizliği insidansını kümülatif doksorubisin dozu 400 mg/m² olduğunda %3, 550 mg/m² olduğunda %7 ve 700 mg/m² olduğunda ise %18 olarak rapor etmişlerdir. Krischer ve ark. (39) 550 mg/m² dozun üzerinde doksorubisin alınmasının, 550 mg/m² dozdan daha düşük dozlara kıyasla beş kat daha fazla erken kardiyotoksitesiteye yol açtığını göstermişlerdir. Ryberg ve ark. (40) konjestif kalp yetersizliği riskini kümülatif doz 550 mg/m², 900 mg/m² ve 1000 mg/m² olduğunda sırasıyla %0,6, %4,3 ve %14,5 olarak raporlamışlardır.

2.2.2. Kardiyotoksitesite Mekanizmaları

Antrasiklinler üç dekadan daha fazla süredir kullanılmasına rağmen kemoterapötik aktiviteleri ve kardiyotoksik değişikliklere nasıl neden oldukları halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Doksorubisinin kardiyotoksitesitesinin multifaktöryel mekanizmalar ile geliştiği düşünülmektedir. Hareke ve ark.(12) doksorubisinin pasif difüzyon ile kardiyomyosit içerisine girdiğini ve hücre hasarına yol açan serbest radikallerin

üretimini teşvik ettiğini, aynı zamanda direkt ya da indirekt gen transkripsiyonunu, mitokondri fonksiyonunu ve enerji üretimini inhibe ettiğini iddia etmişlerdir.

Kardiyotoksisite oluşumunda serbest radikallerin üretimi, enzimatik ve enzimatik olmayan yollar ile demir birikimi aracılığıyla oluşan redox-ilişkili hasar üzerinde durulmaktadır (41-43).

Milei ve ark. (44) ile Outomuro ve ark. (45) antrasiklinler tarafından oluşturulan serbest radikallerin lipid peroksidasyonuna neden olarak, hücre membran hasarına yol açtıkları üzerinde durmuşlardır.

Gozalvez ve ark. (46) mitokondri hasarı, azalmış Na-K ATP az aktivitesi, myokardiyal TNF-alfa down regulasyonu ve doksorubisin ile bağlanan iki değerli katyonların katkısıyla kardiyotoksisite geliştiğini öne sürmüşlerdir.

Pointon ve ark. (47) antrasiklinlerin myosit mitokondri iç zarında bulunan kardiyolipinler üzerine yüksek afinitesi olduğunu, antrasikline maruz kalmanın reaktif oksijen radikalleri bağımlı ve reaktif oksijen radikalleri bağımsız yolları aktive ettiğini, nekroz ve apoptozis yoluyla, kardiyomyositlerin kaybına neden olduğunu ileri sürmüşlerdir (12).

Hilmer ve ark. (31) ile Buchholz ve ark. (32) yaşlanma ve otofaji gibi hücre ölümünün diğer tiplerinin de doksorubisinin neden olduğu kardiyotoksisiteye katkıda bulunabildiğini bildirmişlerdir.

Kardiyomyosit kaybı ve sitoplazmik vakuolizasyon, doksorubisin kardiyotoksisitesinde en sık görülen histolojik bulgulardır. Bu değişiklikler sol ventrikül duvarında incelleme ve fibrozise, myokard kontraktilesinde azalmaya ve sol ventrikül fonksiyonlarında bozulmaya neden olmaktadır (48,49).

Antrasiklin kardiyotoksisitesine katkıda bulunabilecek diğer mekanizmalar, nükleik asit ve protein sentezinin inhibisyonu, vazoaaktif aminlerin salınımı, adrenerjik fonksiyonlarda değişiklikler, mitokondriyal anormallikler, lizozomal değişiklikler, sarkolemmal kalsiyum taşınımında değişiklikler, miyokardiyal elektrolitlerde dengesizlik ve protein oksidasyonu olabilir (50).

Tablo 3. Antrasiklin kardiyotoksitesitesi için risk faktörleri (52).

Risk Faktörü	Yorum
Kümülatif antrasiklin dozu	Kümülatif dozda artış, özellikle 500 mg/m ² dozun üzeri klinik kalp yetersizliği riskini önemli derecede artırır.
Tanıda yaş	Tedavi sırasında <4 yaş ve >65 yaş hastalarda risk artmıştır
Cinsiyet	Kadınlar artmış risk altındadır.
Antrasiklin tipi	Liposomal preperatlar kardiyotoksitesiteyi azaltabilir. Bu konuyla ilgili çelişkili veriler vardır.
Radyasyon tedavisi	Kümülatif radyasyon dozu > 30 Gy
Eşlik eden tedavi	Trastuzumab, siklofosfamid, bleomisin, vinkristin, mitoksantron toksitesiteyi artırabilir.
Önceden mevcut olan kardiyak risk faktörleri	Hipertansiyon, valvüler kalp hastalığı, önceden kardiyotoksik tedavi alınması
Ek hastalık	Diyabet, obezite, böbrek hastalığı, endokrinopati
İlave faktörler	Trizomi 21

2.2.4. Doksorubisin Kardiyotoksitesitesinin Tanısı

Doksorubisin kardiyotoksitesitesinin tanısı, tanıya yönelik özgün bir anemnez almayı içermelidir. S3 gallo ritmi ve juguler venöz dolgunlukta belirginleşme gibi kalp yetersizliğinin varlığını saptayacak kardiyovasküler sistem muayenesi elzemdir. Elektrokardiyografide nonspesifik ST-T dalga değişiklikleri ve QRS voltaj düşüklüğü görülebilir. Teleradiyografi kardiyomegali ve pulmoner venöz konjesyonu değerlendirmede faydalı olabilir.

Sistolik disfonksiyonu göreceli olarak geç saptamakla birlikte çocuk hastalarda sol ventrikül sistolik fonksiyonlarının ve sol ventrikül kavitesinin çap ölçümünün değerlendirilmesi güvenilir bir yöntemdir.

Ewer ve ark. (54) myokardiyumun kompensatuvar rezervinden dolayı sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunun kalp hasarını olduğundan daha az gösterdiğini bildirmişlerdir. Lester ve ark. (55) sol ventrikül disfonksiyonunda sistolik fonksiyonda bozulma

olmadan diyastolik kalp fonksiyonlarında bozulma olabildiğini bildirmişlerdir. Jurcut ve ark. (56) Doppler ekokardiyografinin erken diyastolik ve sistolik disfonksiyonu saptamak için kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Doksorubisin kardiyotoksitesini belirlemek için diyastolik fonksiyon değerlendirmesi yapılabilmektedir. Ancak bu metodun teknik güçlüğü nedeniyle çocukluk çağı kanser tedavisi yapan bütün merkezlerde uygulanması mümkün olamamaktadır.

Egzersiz ekokardiyografi sol ventrikül kontraktilite rezervini değerlendirmek için kullanılabilir. Sol ventrikül sistolik ve diyastolik fonksiyonunu değerlendirmek için radyonüklid ventrikülografi kullanılabilir (57-60).

Nörohormonların ve kardiyak enzimlerin ölçümü kardiyotoksiste tanısında faydalı bilgiler verebilir. Ancak nörohormon ve kardiyak enzim seviyelerinde ki artışlar doksorubisin kardiyotoksitesine özgün değildir (61). Troponinler günümüzde kalp spesifitesi en yüksek biyomarkerlerdir (62). Kardiyak troponin Amerika ve Avrupa kardiyoloji dernekleri tarafından akut myokard hasarının tespiti için önerilen biyomarkerlerdir. Akut koroner sendroma ek olarak, sol ventrikül hipertrofisi, kalp yetersizliği, pulmoner emboli ve antikanser ilaçların neden olduğu kardiyotoksiste gibi kalp hasarı ile karakterize farklı patolojilerin değerlendirilmesinde de kullanılmaktadır (63-66).

Kardiyak troponin yüksekliğinin hastalığın şiddeti ile korele olması myokard hasar tespiti ile birlikte kalp risk sınıflaması yapılmasına da izin verir. İlaçların neden olduğu kardiyotoksitenin tanımlanmasında troponinler yüksek spesifite, yüksek sensitiviteye sahiptir. Lipshultz ve ark. (67) lenfoblastik lösemi tanısı ile antrasiklin ile tedavi edilen çocukların %30'unda troponin T artışı saptadıklarını antrasiklin dozu ile morbidite ve mortalite arasında pozitif korelasyon belirlediklerini rapor etmişlerdir. Aynı yazarlar tedavi sırasında troponin I seviyesinde en az bir kat yükselme olan hastaların 5 yıl süre ile takip edildiklerinde, ekokardiyografi ile kalp fonksiyonlarında önemli ölçüde bozulma olduğunu raporlamışlardır (68). Kilickap ve ark. (69) standart antrasiklin tedavisi verilmesinden sonra 3-5 gün içinde hastaların %34'ünde toponin T seviyelerinde artış ve bu artışın ileride gelişecek sol ventrikül diyastolik fonksiyonu için bir prediktör olabileceğini saptadıklarını bildirmişlerdir.

Natriüretik peptidler ventrikül duvar distansiyonuna cevap olarak kalp tarafından hızla sekrete edilmektedir (70). B tip natriüretik peptid (BNP) ve NT-proBNP kalp yetersizliği tanısında ve prognozun belirlenmesinde kullanılmaktadır (71). Kemoterapinin neden olduğu kardiyotoksisite tanısı ve prognozunu belirlemek üzere BNP ile ilgili çalışmalar vardır. Suzuki ve ark. (61) antrasiklin uygulaması sonrası BNP seviyelerinde ki sürekli yükselmeyi ventrikül disfonksiyonu gelişimi ile ilişkili bulmuşlardır. Nousiainen ve ark. (72) idarubisin tedavisi alan hastalarda BNP plasma seviyesinde artış ile sol ventrikül end-diyastol çapları arasında korelasyon saptadıklarını bildirmişlerdir. Hayakawa ve ark. (73) BNP seviyelerinde artış ile sistolik fonksiyonların ters korelasyon göstererek bozulduğunu bildirmişlerdir.

Endomyokardiyal biyopsi ile doksorubisin kardiyomyopatisinin karakteristik özellikleri ve ciddiyeti tanımlanabilir ise de bu amaçla biyopsi yapılması evrensel değildir.

2.2.5. Doksorubisin Kardiyotoksitesinin Tedavisi

Kardiyotoksisiteyi önlemek için ciddi kümülatif dozu aşmamak başta olmak üzere çok gayret gösteriliyor olsa da bu çocukların önemli kısmında kalp yetersizliği ile karşılaşmaktadır. Kardiyotoksisite geliştikten sonra kardiyotoksisiteyi geri dönderecek spesifik bir tedavi de bulunmamaktadır.

Bununla birlikte erişkinlerde antrasiklin kardiyotoksitesinde randomize kontrollü çalışmalar, anjiyotensin konverting enzim inhibiyonunun kısa süreli klinik fayda sağladığını göstermiştir. Cardinale ve ark. (74) antrasiklin ile tedavi edilen ve ejeksiyon fraksiyonu %45'in altında olan 201 erişkin olguda, erken dönemde enalapril ve karvedilol tedavisi verdiklerini, takipte sol ventrikül fonksiyonlarının normale döndüğünü saptadıklarını raporlamışlardır. Bu verinin geç başlangıçlı antrasiklin kardiyotoksitesinde uygulanabilir olup olmadığı belli değildir.

Karvedilol, bisoprolol ve metoprolol kullanımının erişkin kalp yetersizliği olan hastalarda morbidite ve mortaliteyi azalttığı bildirilmiştir.

Bruns ve ark. (75) konjestif kalp yetersizlikli çocuklarda beta blokajın faydalı olduğunu raporlamışlardır. Petko ve ark. (76) ise sistolik kalp yetersizliği olan çocuklarda

randomize plasebo kontrollü çalışmalarda karvedilolün faydasını gösteremediklerini bildirmişlerdir.

Kalp yetersizliği sistemik ve pulmoner konjesyon semptom ve bulguları olan olgularda, diüretikler ve anjiyotensin konverting enzim inhibitörleri kullanılabilir (77). Arico ve ark. (78) malignensiden kür sağlanmış hastalarda doksorubisin kardiyotoksisitesine bağlı ileri derecede kalp yetersizliği olan olgularda kalp transplantasyonunun uzun dönem prognozda iyileşme sağladığını raporlamışlardır. Kalp transplantasyonuna aday bu hastalarda transplantasyon öncesi dönemde ventriküler destek cihazı kullanımı gerekebilmektedir.

2.2.6. Doksorubisin Kardiyotoksisitesi Gelişimine Karşı Kalbi Koruma Stratejileri

Doksorubisin neden olduğu kardiyotoksisitenin, geri dönüşümsüz olması ve kardiyotoksisite geliştikten sonra yapılan kür sağlayıcı spesifik tedavisinin olmaması nedeniyle, kardiyotoksisite oluşumunu önleyici stratejiler büyük öneme sahiptir.

Doksorubisin kümülatif dozunda artış ile kardiyotoksisite gelişimi arasında direk ilişki olması nedeniyle önlem stratejilerinin en önemlisi doksorubisinin kümülatif dozunun <450 mg/m² ile sınırlandırılmasıdır (79). Doksorubisin kardiyotoksisitesi gelişimini azaltmak için, standart infüzyon protokolleri yerine sürekli infüzyon şeklinde tedaviler uygulanmış ancak bu stratejinin doksorubisin kardiyotoksisitesini azalttığı veya önlediği kanıtlanamamıştır (77).

2.2.7. Doksorubisin Kardiyotoksisitesine Karşı Kardiyoprotektif Ajanlar

Doksorubisin kardiyotoksisitesine karşı koruyucu önlem stratejileri içerisinde kardiyoprotektif ajanların geliştirilme çabaları güncelliğini korumaktadır. Deneysel çalışmalarda, birçok farmakolojik ajanın doksorubisin kardiyotoksisitesine karşı koruyucu etkisinin olduğu yönünde kanıtlara ulaşılmıştır (12).

Dekstrazoksanın antrasiklin alan erişkinlerde akut kardiyotoksisiteyi azalttığı kanıtlanmış olup Amerika klinik onkoloji derneği tarafından spesifik erişkin kanser tedavi protokolünde önerilmektedir (41). Ancak bazı araştırmacılar kardiyomyositler yanında kanser hücrelerine karşı da koruyucu etkisi olabileceği endişesi ile dekstrazoksan kullanımı konusunda isteksiz olmuşlardır. Erişkin ve çocuk

dekstrazoksan metaanaliz çalışmalarında, dekstrazoksan alan hastalarda kalp yetersizliği sıklığında önemli düzeyde azalma saptanmış, tümör cevabında ise istatistiksel önemli azalma saptanmadığı bildirilmiştir (79).

Trachtenberg ve ark (52) dekstrazoksan ile ilgili güncel bilgiler doğrultusunda, dekstrazoksanun antrasiklinle tedavi edilen akut lenfoblastik lösemili çocuklar için güvenli ve kardiyoprotektif etkili olduğunun gösterildiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar antrasiklin içeren pediatri kemeoterapi protokollerinde dektrazoksanın kullanımını önermişlerdir. Gelecekte yapılacak çalışmaların hasta seçimine, dekstrazoksanın uygulama metoduna ve dozuna odaklanacağını iddia etmişlerdir.

Assensio-Lopez ark. (80) deksrazaksonun kemik iliği toksisitesi ve yüksek maliyet gibi dezavantajlarının olduğu üzerinde durmuşlardır.

Siveski-Iliskovic ve ark. (81) ratlarda, lipid düşürücü ve antioksidan bir ajan olan probukolün kardiyomyositlerde doksorubisin tedavisinin toksik etkilerini inhibe ettiğini ve doksorubisinin antitümör etkisini değiştirmedığını bildirmişlerdir.

Karvedilol konjestif kalp yetersizliği, hipertansiyon ve anjina tedavisinde yaygın kullanımı olan bir beta bloker ajandır. Alfa-1 bloke edici vazodilatatör etkisi ve kardiyoprotektif etkisini açıklayan antioksidan özelliği vardır. Karvedilol ile ilgili çocuklarda randomize kontrollü bir çalışma bulunmamaktadır (82).

Nakamae ve ark. (83) antrasiklinlerin neden olduğu kardiyotoksisitenin oluşumunda renin-anjiyotensin-aldesteron sisteminin önemli olduğunu, anjiyotensin II blokleri olan valsartanın doksorubisinin neden olduğu kalp hasarını azalttığını saptadıklarını bildirmişlerdir.

Çocuklarda persistan pulmoner hipertansiyon tedavisinde sildenafilin faydası gösterilmiştir (84). Fisher ve ark. (85) sildenafilin doksorubisin hasarına karşı kardiyoprotektif olarak kullanılabileceğini göstermişler ve geç kardiyotoksisite gelişimine karşı kardiyoprotektif etkisinin olup olmadığının saptanması için ileri araştırmalar gerektiğini bildirmişlerdir.

Eritropoetin hematopozde rolü olan ve böbrekte üretilen bir sitokindir. Hematolojik dokular dışında kalp ve beyin gibi dokularda eritropoetin reseptörleri bulunmaktadır. Li

ve ark. (86) fare modelinde eritropoetin uygulamasının doksorubisin ilişkili kalp doku hasarına karşı bir derece koruyucu etki gösterdiğini raporlamışlardır.

Amifostin bir membrana bağlı alkelen fosfataz olup sitoprotektif bir ajandır. İn vivo rat çalışmalarında kardiyoprotektif etkisi gösterilmiştir (87,88). Deneysel çalışmalarda doksorubisin kardiyoksisitesini önlemek için kullanılan farmakolojik ajanlar tablo 4’de özetlenmiştir.

Tablo 4. Deneysel çalışmalarda doksorubisin kardiyoksisitesini önlemek için kullanılan farmakolojik ajanlar.

Deksrazoksan
Probucol
Karvedilol
Anjiotensin konverting enzim inhibitörleri
Sildenafil
Eritropoetin
Amifostin

2.3. Metformin

Metformin tip 2 diyabet hastalarında kullanılan oral antihyperglisemik bir ilaçtır (10). Monoterapi olarak veya diğer antidiyabetik ajanlar ile birlikte kullanılabilir. Metformin hepatik glukoz üretiminin inhibisyonu, bağırsaktan glukoz emiliminin azaltılması, glukoz alımı ve kullanımının düzenlenmesi ile etki eder. Bazal ve postprandiyal plasma glukoz seviyelerini düşürür. Kan glukoz seviyesini düşürmeye ek olarak kilo verme, plasma lipid seviyelerini düşürme ve bazı vasküler komplikasyonları önleme gibi etkileride vardır (89).

2.3.1. Metforminin Farmakokinetiği

Metformin metabolize edilmez ve 5 saatlik yarılanma ömrü ile idrarla atılır. Vucut dokularına geniş olarak yayılır. Bağırsaktan absorpsiyonu, enterositlerin luminal yüzeyinde eksprese edilen plasma membran monoamin trasporter aracılığıyla olur.

Metforminin hepatik alımına organik katyon transporter 1 aracılık eder. Dolaşımdan böbrek epitelyum hücresine alınması organik katyon transporter 2 ile sağlanır (90).

Metforminin Ateroskleroz Risk Faktörlerine Etkisi

Dişebetik hastalar koroner kalp hastalığı için artmış riske sahiptir ve yoğun ateroskleroz ile birlikte plak progresyonunda hızlanmaya maruz kalırlar. Diyabet ve kalp yetersizliğı olan hastalar diyabeti olmayan kalp yetersizlikli hastlardan daha kötü sonuçlara sahiptir (91). Eurich ve ark. (92) metformin ile tedavi edilen kalp yetersizliğı ve diyabeti olan hastaların diğerk glukoz düşürücü rejimleri kullananlardan daha uzun süre hayatta kaldığını iddia etmişlerdir.

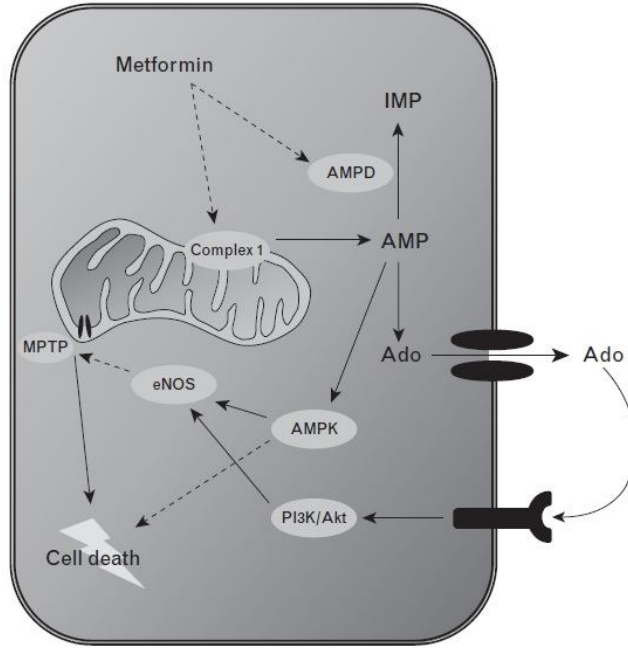
Akut myokard infarktüsünü önleme ve tedavisinde büyük ilerlemelere rağmen myokard infarktüsünde morbidite ve mortalite halen önemlidir. Tıkanan koroner arterin erken ve başarılı reperfüzyonu iskemik myokardiyumu kurtarmak için en etkili tedavidir. Paradoksik olarak reperfüzyon süreci myokardiyal hasarı ağırlaştırabilir ve infarkt alanına katkıda bulunabilir. Bu durum reperfüzyon hasarı olarak adlandırılır (93).

Messaoudi ve ark. (94) metforminin glukoz etkisinden bağımsız, direkt kardiyoprotektif özellikleri oluşunu iddia etmişlerdir. Bu hipotez izole myokard infarktüsü ve kalp yetersizliğı oluşturulmuş deneysel modellerde test edilmiştir. Metforminin ateroskleroz risk faktörlerinde iyileşme sağladığı, iskemi ve reperfüzyona myokardın toleransında artış yaptığı ve infarktı takiben kalp yetersizliğı gelişimini azattığı gösterilmiştir.

Metforminin etki mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olsada, hepatositlerde mitokondriyal respiratuvar zincirde kompleks 1 inhibisyonunda rol oynadığına inanılmaktadır. Kompleks 1 inhibisyonu hücre enerji yükünü azaltır ve adenzin monofosfatın (AMP) adenzin trifosfata oranını artırır. Hücre enerji seviyelerinde bu değişim enerji duyarlı AMP aktive protein kinazı aktive (AMPK) eder. Karaciğerde AMPK aktivasyonu kolesterol ve trigliserid sentezini inhibe, yağ asidi oksidasyonunu stimüle eder. Periferde yağ asid oksidasyonu ve iskelet kasına glukoz alımını stimüle eder (95,96).

2.3.3. Metforminin Kardioprotektif Etkisi

Murry ve ark.'nın (97) 1986 yılında iskemi-reperfüzyonda myokard infarkt alanını azaltabildiğini raporlanmalarından sonra metforminin kardioprotektif etki mekanizmaları üzerine çalışmalar yapılmıştır. Metformin kompleks 1 inhibisyonu ile AMP konsantrasyonu artışına ve AMPK aktivasyonu ile adenzin formasyonunda artışa neden olur. AMPK aktivasyonu endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) fosforilasyonu ile mitokondriyal permabilite geçiş porunun açılmasını engeller. Mitokondri iç zarında yer alan nonselektif porlar iskemi sırasında kapalı olup, reperfüzyondan hemen sonra açılarak ATP tüketimini artırmaktadır. Bahsedilen yollar ile bu porların açılmasının engellenmesi iskemi ve reperfüzyona karşı myokardın toleransını artırır. Ek olarak artmış adenzin reseptör stimülasyonu fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K/Akt) yolunu aktive ederek eNOS aktivasyonuna katkı sağlar. Bu mekanizmalar şekil 3'de gösterilmektedir (94).



Şekil 3. Metforminin kardioprotektif etki mekanizmasını göstermektedir.

Metforminin iskemi reperfüzyon hasarına karşı kardioprotektif etkisi deneysel modellerde araştırılmıştır. Charlon ve ark. (98) ratlarda metformin uygulamasının, koroner arter ligasyonundan 48 saat sonrasında infarkt alanını azalttığını göstermişlerdir.

Calvert ve ark. (99) fare modelinde, iskemiden 18 saat önce intraperitoneal tek doz 125 µg/kg metformin uygulamasının infarkt alanını %50'den daha fazla azalttığını bildirmişlerdir. Paiva ve ark. (100) rat modelinde reperfüzyondan 5 dakika önce intravenöz metformin uygulamasının infarkt alanını azalttığını bildirmişlerdir.

Metforminin Doksorubisin Kardiyotoksitesine Etkisi

Ashour ve ark. (101) ratlarda 11 gün süre ile gün aşırı 3 mg/kg kümülatif 18 mg/kg doksorubisin uygulayarak doksorubisin kardiyotoksitesi oluşturdukları deneysel modelde, metforminin kardiyoprotektif etkisini araştırmışlardır. Doksorubisin serum LDH, CK-MB, glutatyon ve katalaz seviyesinde artışa ve kalp dokusunda hafif inflamasyona, myokard lif hasarına ve bazı myokardiyal hücrelerin sitoplasmasında vakuoler değişikliklere neden olduğunu bildirmişlerdir. Doksorubisin ile eş zamanlı verilen metforminin doksorubisinin neden olduğu biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikleri elimine ettiğini saptadıklarını ve doksorubisin kardiyotoksitesine karşı metforminin kardiyoprotektif etkisi olduğunu iddia etmişlerdir.

Asensio-Lopez ve ark. (80) çalışmalarında elde ettikleri sonuçlarda metforminin doksorubisin kardiyotoksitesine karşı protektif etkisinin major mediatör olarak identifiye edilen ferritin ağır zincir ile sağlandığını bildirmişlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ana bilim dalı akademik kurulu tarafından ve Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı tarafından 13/74 karar numarası ile onaylandı. Çalışmanın mali kaynağı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (TTU-2013-4712 kodlu proje) karşılandı.

Çalışmanın deneysel hayvan modeli 20.12.2013 ile 03.01.2014 tarihleri arasında T.C. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma merkezinde oluşturuldu.

Çalışmada 40 adet rat kullanıldı. Deney protokolünün bitiminde ratlara anestezi altında ekokardiyografik inceleme yapıldı. Ekokardiyografik incelemenin bitiminde Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji anabilim dalında genel anestezi altında ratların karın ciltleri açıldı. Vena kava inferiorlarından kan örnekleri alındı. Kan alma işleminin sonunda kalpleri çıkarıldı. Doku örnekleri histolojik incelemeler ve doku enzim analizleri için saklandı.

Serumda LDH, CK-MB ve troponin I düzeyleri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya anabilim dalında çalışıldı.

Serumda BNP ve CNP düzeyleri ile kalp dokusu katalaz, SOD, GPx, TNF-alfa düzeyleri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji anabilim dalında çalışıldı.

Deney Hayvanları

Çalışmada ağırlıkları 150-210 gram arasında değişen 10 haftalık, erkek Wistar albino ratlar kullanıldı. Ratlar Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma merkezinden temin edildi.

Ratlar 25 C° oda sıcaklığı ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü altındaki çevre koşullarında barındırıldı, pelet diyeti ile beslendi.

40 adet rat randomize olarak her bir grupta 10 rat olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

I. grup: kontrol grubu,

II. grup: doksorubisin grubu,

III. grup: metformin grubu,

IV. grup: doksorubisin + metformin grubunu oluşturdu.

3.1. İlaçlar

Doksorubisin 10 mg/2 ml içeren flakondan kendi çözücüsü ile sulandırıldıktan sonra kullanıldı. Metformin 1 gram tablet (Merk) preparat serum fizyolojikte çözdürülerek hazırlandı.

3.2. Doksorubisin Kardiyotoksitesi Rat Modelinin Hazırlanması

I. grup; kontrol grubu (n= 10); kontrol grubuna 2,5 ml/kg/gün serum fizyolojik, 14 gün süre ile intraperitoneal olarak uygulandı

II.grup; doksorubisin grubu (n= 10); doksorubisin grubuna doksorubisin 4 mg/kg/haftada iki gün, 11 gün sürede toplam 4 dozda 16 mg/kg intraperitoneal olarak uygulandı.

III.grup; metformin grubu (n= 10); metformin grubuna metformin 250/mg/kg/gün ve 14 gün süre ile gavaj yoluyla serum fizyolojikte çözdürülerek uygulandı.

IV.grup; doksorubisin + metformin grubu (n= 10); ; doksorubisin + metformin grubuna doksorubisin 4 mg/kg/haftada iki gün, 11 gün sürede toplam 4 dozda 16 mg/kg intraperitoneal uygulandı. Doksorubisin uygulamasından 3 gün önce başlamak üzere ve

14 gün süre metformin 250/mg/kg/gün serum fizyolojikte çözdürülerek gavaj yoluyla uygulandı (Resim 1, 2).

Ratların ağırlıkları deneye başlamadan önce ve deneyin bitiminde tartıldı. Çalışmanın 15. günü doksorubisinin son dozu uygulandıktan 24 saat sonra, ratlara Xylazine (Rompun 25 ml %2) ve ketamin (ketamin 50 mg) anestezisi uygulandı. Göğüs  n duvar kılları tıraş edildikten sonra deneyimli bir pediatrik kardiyoloji   retim  yesi tarafından M mod ekokardiyografik yöntem ile, diyastolde interventriküler septum kalınlığı (IVSd), sol ventrikül diyastol sonu  apı (SVIDd), diyastolde sol ventrikül arka duvar kalınlığı (SVPWd), sistolde interventriküler septum kalınlığı (IVSs), sol ventrikül sistol sonu  apı (SVIDs) , sistolde sol ventrikül arka duvar kalınlığı (SVPWds)  l  ld . ( ekil 4). Ekokardiyografik incelemeyi yapan   retim üyesine gruplar hakkında bilgi verilmedi.



Resim 1. Rata intraperitoneal doksorubisin uygulaması.



Resim 2 Rata gavaj yoluyla serum fizyolojik içerisinde çözülmüş metformin uygulaması.



Resim 3 Anestezi uygulanan ratların sol ventrikül M mod ekokardiyografik incelemesi.

Ekokardiyografik inceleme tamamlanır tamamlanmaz, ratlar anestezinin etkisi henüz geçmeden Histoloji anabilim dalı laboratuvarına transfer edildi. Karın ciltleri açıldı. Bağırsaklar vena kava inferior görülecek şekilde kenara alındı. Vena kava inferiordan 5 cc kan örneği alındı. Kan örnekleri alınma işlemi tamamlanan ratlar sakrifiye edildi. Kalpleri çıkarıldı.

Kan örnekleri santrifüj edildi. Serumları ayrıldı. Serumlar numaralandırılarak -80 °C’de saklandı.

Kalp dokuları hızlıca uzaklaştırıldı. Kalp dokusunun bir kısmı histolojik incelemeler için %4 formaldehit içinde tespit edildi. Diğer bölümü ise Enzim-Linked Immuno Sorbent Assay (ELİSA) analizleri için -80 °C’de saklandı.

3.2.1. Ekokardiyografi

Ekokardiyografik inceleme Vivid 7 ekokardiyografi cihazı ile (General Electric, Waukesha, Wisconsin, USA) 10 MHz transducer kullanılarak yapıldı. Sol ventrikül fonksiyonları parasternal uzun eksen penceresi kullanılarak, mitral kapak seviyesi altından ölçüldü. İncelemede diyastolde interventriküler septum kalınlığı, sol ventrikül diyastol sonu çapı, diyastolde sol ventrikül arka duvar kalınlığı, sistolde interventriküler septum kalınlığı, sol ventrikül sistol sonu çapı, sistolde sol ventrikül arka duvar kalınlığı ölçüldü. Ejeksiyon fraksiyonu (EF) ve fraksiyonel kısalma (FK) parametreleri ekokardiyografi cihazının yapmış olduğu otomatik hesaplama yolu ile elde edildi

3.2.2. Laktat dehidrogenaz Kreatinin kinaz-MB ve Troponin-I Serum Seviyelerinin Ölçülmesi

Laktat dehidrogenaz, CK-MB ve Troponin-I ölçümü klinik biyokimya laboratuvarında kullanılan alet ve kitler (Beckman Coulter LX-2000, Beckman kids) kullanılarak yapıldı.

3.2.3. ELİSA

Biyokimyasal analizler için ayrılan ve -80 °C saklanan kalp dokuları ELİSA kitlerinin üretici firmalarının talimatlarına uygun olarak homojenize edildi. Santrifüjde 12000

rpm'de 30 dak çevrilen doku homojenatlarının süpernatantları alikotlanarak ELİSA çalışmalarında kullanıldı.

3.2.3.1. Beyin Natriüretik Peptid ölçümü

Serum BNP düzeyleri sensitivitesi 1,445 ng/L ve değerlendirme aralığı 2-400 ng/L arasında olan rat BNP Elisa kit (Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd (katalog numarası: 201-11-0476) kullanılarak Elisa yöntemi ile ölçüldü. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda standartlar hazırlandı. 96'lık ELİSA plate çukurcuklarına önce standartlar eklendikten sonra diğer çukurlara 40 µl örnek ve 10 µl BNP antikoru ile 50 µl stertavidin-HRP eklendi. 37 C°'de 60 dakika inkübe edildi. Kromojen solusyonu A ve B eklenerek 37 C°'de 10 dakika beklendi. Durdurma solusyonu eklendikten sonra 15 dakika içinde 450 nm'de optik yoğunluk ölçüldü.

3.2.3.2. C tip Natriüretik Peptid (CNP) ölçümü

Serum CNP düzeyleri sensitivitesi 2,572 ng/L ve değerlendirme aralığı 3-900 ng/L arasında olan rat CNP Elisa kit (Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd (katalog numarası: 201-11-0056) kullanılarak Elisa yöntemi ile ölçüldü. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda standartlar hazırlandı. 96'lık Elisa plate çukurcuklarına önce standartlar eklendikten sonra diğer çukurlara 40 µl örnek ve 10 µl CNP antikoru ile 50 µl stertavidin-HRP eklendi. 37 C°'de 60 dakika inkübe edildi. Kromojen solusyonu A ve B eklenerek 37 C°'de 10 dakika beklendi. Durdurma solusyonu eklendikten sonra 15 dakika içinde 450 nm'de optik yoğunluk ölçüldü.

3.2.3.3 Katalaz Aktivitesi

Katalaz aktivitesi 25 C°'de kalp doku hemojenatında değerlendirme aralığı 2-35 nmol/min/ml arasında olan rat katalaz kiti (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA (katalog numarası: 707002) kullanılarak ölçüldü. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda 96'lık plate üzerinde çukurlar formaldehit standart, pozitif kontrol ve numune olmak üzere ayrıldı. Daha sonra formaldehid standart için ayrılan her bir çukura deney tamponadından 100 µl, metanol 30 µl, standart 20 µl eklendi. Pozitif kontrol çukuruna 100 µl deney tamponu, 30 µl metanol ve 20 µl katalaz eklendi. Numune çukurlarına ise 100 µl deney tamponu, 30 µl metanol, 20 µl örnek eklendi.

Tüm çukurlara seyreltilmiş hidrojen peroksid eklenerek reaksiyon başlatıldı. Plaka kapağı kapatılarak 20 dakika oda ısısında inkübe edildi. Reaksiyonu sonlandırmak için her bir kuyucuğa 30 µl potasyum hidroksid eklendi ve sonra 30 µl katalaz eklendi. Plaka kapağı ile kapatılarak 10 dakika oda ısısında inkübe edildi. Katalaz potasyum periyodat eklendikten sonra 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Plaka okuyucusu kullanılarak 540 nm’de absorbans okundu.

3.2.3.4 Kalp Dokusunda Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

Süperoksit dismutaz aktivitesi tayini için değerlendirme aralığı 0,025-0,25 ünite/ml arasında olan rat süperoksit dismutaz kiti (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA katalog numarası: 706002) kullanıldı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda SOD Standartları için ayrılan her bir çukura 200 µl seyreltilmiş radikal detektör ve 10 µl standart eklendi. Numuneler için ayrılmış çukurlara ise 200 µl seyreltilmiş radikal detektörü ve 10 µl örnek eklendi. Daha sonra 20 µl seyreltilmiş ksantin oksidazın tüm çukurlara eklenmesi ile reaksiyon başlatıldı. Karışım için plaka dikkatli bir şekilde sallandı ve plaka kapağı ile üzeri kapatıldı. Oda ısısında 20 dakika süre ile inkübe edildi. Plaka okuyucu kullanarak 440-460 nm’de absorbans okundu.

3.2.3.5 Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi

Glutasyon peroksidaz aktivitesi tayini için değerlendirme aralığı 50-344 nmol/min/ml arasında değişen rat glutasyon peroksidaz kiti (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA katalog numarası: 703102) kullanıldı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda enzimatik olmayan çukurlara 120 µl deney tamponatı ve 50 µl ortak substrat karışımı; pozitif kontrol çukurlarına 100 µl deney tamponatı, 50 µl ortak substrat karışımı ve 20 µl seyreltilmiş glutasyon peroksidaz; ve numuneler için ayrılan çukurlara ise 100 µl deney tamponatı, 50 µl ortak substrat karışımı ve 20 µl örnek eklendi. 20 µl hidroperoksidin eklenmesi ile reaksiyon başladı. Karışım için plaka dikkatli bir şekilde sallandı. Plaka okuyucu kullanılarak 340 nm’de absorbans okundu.

3.2.3.6. Tümör Nekroz Faktör-alfa Aktivitesi

TNF alfa aktivitesi tayini için sensitivitesi minimum < 4 pg/ml olan rat TNF alfa kiti (Invitrogen corporation, USA, katalog numarası: KRC3011) kullanıldı. Üretici firmanın

talimatları doğrultusunda standartlar hazırlanarak 100 µl olacak şekilde uygun çukurlara eklendi. Daha sonra 100 µl numuneler çukurlara eklenerek üzeri plaka kapağı ile kapatıldı ve oda ısısında 2 saat inkübe edildi. Otomatik yıkama makinesinde yıkanan plate daha sonra 100 µl biotinli Rt-TNF-alfa biotin konjugat solusyonu eklendi ve oda ısısında 1 saat beklendi. Tekrar yıkanan dokular 100 µl stertavidin-HRP çalışma solusyonu eklenerek oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. 100 µl stabilize kromojen eklendi. Oda ısısında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. 100 µl durdurma solusyonu eklendi. 450 nm’de absorbans okundu.

3.2.5. Histolojik Değerlendirme

Doku örnekleri %4’lük formaldehit solüsyonu ile tespit edildi, tespit solüsyonunda 48 saat bekletildikten sonra, bir gece süre ile akan musluk suyunda bırakıldı. Artan alkol serilerinden geçirilerek sudan kurtarılan dokular ksilol ile şeffaflaştırıldıktan sonra parafine gömülerek bloklandı. Parafin bloklardan alınan 5-6 µm’lik kesitler polilizin kaplı lamlara yayıldı. Standart histolojik yöntemler kullanılarak (ksilol ile) parafin uzaklaştırıldı ve dereceli alkol serilerinden geçirilip sulandırıldı. Genel histolojik yapıyı görmek amacıyla hematoksisilen-eozin (H&E) ile boyanarak önce artan alkol serilerinden, devamında ksilolden geçirilerek incelendi. Apoptozisi göstermek için kesitler TUNEL yöntemiyle boyandı ve Olympus BX-51 fotomikroskopla incelenerek kesit fotoğrafları elde edildi.

TUNEL Yöntemi

Kalp dokusundaki apoptozisi göstermek için DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlayan TUNEL yöntemi uygulandı. Apoptotik parçalanma sonucu DNA uçları deoksinnükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak işaretlenmektedir. TUNEL kelimesi “TdT-dUTP nick-end-labelling” sözcüklerinin kısaltılmasından türemiştir (102).

Uygulama için “*In situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein”(Roche) kiti kullanıldı. İşlem için, 5-6 µm kalınlığında alınan kalp dokuları deparafinize ve ardından rehidrate edildikten sonra fosfat tampon salin ile yıkandı. Kalp dokuları yıkandıktan sonra antijen geri kazanımı için 0.01 M sodyum sitrat tamponunda mikrodalga fırında 350 W’de 5 dakika bekletildi. Oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakıldı. PBS ile 3 defa 5’er dakika yıkanan dokular daha sonra kitin içinden çıkan TUNEL reaksiyon karışımı ile 37 °C’de

nemli ve karanlık ortamda 60 dakika inkübe edildi. PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkanan dokulara 4,6-diamidine-2-fenilindol ile zıt boyama yapıldı. Gliserollü kapatma solüsyonu ile kapatılan dokular Olympus BX-51 floresan mikroskopta 450-500 nm dalga boyunda incelendi.

Her bir kesitten 40X büyütmede 10 farklı alandan görüntüler alındı. Her bir alandaki apoptotik hücre sayısı ve toplam hücre sayısı belirlendi. Apoptotik hücre sayısı/toplam hücre sayısının yüzde ifadesi apoptotik indeks olarak alındı.

İstatistik Analiz

Veriler IBM SPSS Statistics 21 SigmaStat 3.5 istatistik paket programlarında değerlendirildi. Verilerin normal dağılımı Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. İki grup karşılaştırmalarında normal dağılan gruplarda independent samples t test, normal dağılmayan gruplarda Mann-Whitney U testi kullanıldı. Üç grup karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis analizi çoklu karşılaştırma (post hoc test) testi olarak Dunn testi kullanıldı. Kategorik değişkenlerin birbirleri ile karşılaştırılmasında Kikare testinin exact yöntemi kullanıldı (Chi- Square test with Exact method). Sayısal değişkenler arasındaki ilişki Spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi ve $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Doksorubisin kardiyotoksitesisi modeli oluşturmak üzere ilaç uygulamaları sırasında IV. grup; doksorubisin+metformin grubundan 1 rat çalışmanın üçüncü günü öldü. Bu ölüm gavaş uygulaması ile ilgili teknik sorunla ilişkilendirildi.

4.1. Sol Ventrikül Fonksiyonunun Ekokardiyografik Değerlendirmesi

M mod ekokardiyografik inceleme sonucu elde edilen sol ventrikül sistolik fonksiyonları Tablo 2’de verilmiştir. Doksorubisin grubu ile kontrol grubu sol ventrikül fonksiyonları karşılaştırıldığında, doksorubisin grubunun sistolde interventriküler septum kalınlığı $0,15 \pm 0,01$ cm karşın kontrol grubunun $0,19 \pm 0,01$ cm. Doksorubisin grubunun sistolde sol ventrikül arka duvar kalınlığı $0,15 \pm 0,01$ cm karşın kontrol grubunun $0,20 \pm 0,02$ cm. Doksorubisin grubunun ejeksiyon fraksiyonu $\%60,92 \pm 9,25$ karşın kontrol grubunun $\%77,76 \pm 4,95$. Doksorubisin grubunun fraksiyonel kısalması $\%28,76 \pm 6,16$ karşın kontrol grubunun $\%41,32 \pm 4,47$. Doksorubisin grubunun sol ventrikül değerlerinde ki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$).

Doksorubisin grubunun sol ventrikül sistol çapı ortalaması $0,44 \pm 0,04$ cm karşın kontrol grubunun $0,33 \pm 0,04$ cm. Doksorubisin grubunun sol ventrikül sistol çapı ile kontrol grubunun sol ventrikül sistol çapı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$).

Doksorubisin+metformin grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında M mod ekokardiyografik incelemenin bütün parametreleri açısından SVİDd ($0,55 \pm 0,08$ karşın

0,57 ± 0,06 cm), SVIDs (0,35 ± 0,05 karşın 0,33 ± 0,04 cm), EF (71,62 ± 5,40 karşın 77,76 ± 4,95), FK (36,03 ± 4,31 karşın 41,32 ± 4,47) önemli fark saptanmadı.

Metformin grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında sol ventrikül arka duvar kalınlığının arttığı (0,15 ± 0,03 karşın 0,11 ± 0,01 cm), iki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (p<0,05), diğer parametreler açısından fark saptanmadı.

Kontrol ve doksorubisin grubunun M mod sol ventrikül ekokardiyografi ile ölçülen IVSd, SVIDd, SVPWd, IVSs, SVIDs, SVPWs, EF, FK ortalama ± SD değerleri tablo 5’de özetlenmiştir.

Tablo 5. Kontrol ve doksorubisin grubunun M mod sol ventrikül ekokardiyografi ile ölçülen IVSd, SVIDd, SVPWd, IVSs, SVIDs, SVPWs, EF, FK ortalama ± SD değerleri.

	Kontrol (n=10)	DOX (n=10)
IVSd (cm)	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0,01
SVIDd (cm)	0,57 ± 0,06	0,61 ± 0,05
SVPWd (cm)	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01
IVSs (cm)	0,19 ± 0,01	0,15 ± 0,01 ^a
SVIDs (cm)	0,33 ± 0,04	0,44 ± 0,04 ^a
SVPWs (cm)	0,20 ± 0,02	0,15 ± 0,01 ^a
EF (%)	77,76 ± 4,95	60,92 ± 9,25 ^a
FK (%)	41,32 ± 4,47	28,76 ± 6,16 ^a

Tüm sonuçlar ortanca ± SD’dir. n; rat sayısı, IVSd; diyastolde ventriküller arası septum kalınlığı, SVIDd; diyastolde sol ventrikül çapı, SVPWd; diyastolde sol ventrikül arka duvar kalınlığı, IVSs; sistolde ventriküller arası septum kalınlığı, SVIDs; sistolde sol ventrikül çapı, SVPWs; sistolde sol ventrikül arka duvar kalınlığı, EF; ejeksiyon fraksiyonu, FK; fraksiyonel kısalma.

a; kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli değişikliği gösteriyor, P< 0,05.

Kontrol ve doksorubisin + metformin grubunun M mod sol ventrikül ekokardiyografi ile ölçülen IVSd, SVIDd, SVPWd, IVSs, SVIDs, SVPWs, EF, FK ortalama ± SD değerleri tablo 6’da özetlenmiştir.

Tablo 6. Kontrol ve doksorubisin + metformin grubunun M mod sol ventrikül ekokardiyografi ile ölçülen IVSd, SVIDd, SVPWd, IVSs, SVIDs, SVPWs, EF, FK ortalama $\pm$ SD değerleri.

	Kontrol (n=10)	DOX + MET (n=9)
IVSd (cm)	0,12 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,01
SVIDd (cm)	0,57 $\pm$ 0,06	0,55 $\pm$ 0,08
SVPWd (cm)	0,11 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,02
IVSs (cm)	0,19 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,02 ^b
SVIDs (cm)	0,33 $\pm$ 0,04	0,35 $\pm$ 0,05 ^b
SVPWs (cm)	0,20 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,01 ^b
EF (%)	77,76 $\pm$ 4,95	71,62 $\pm$ 5,40 ^b
FK (%)	41,32 $\pm$ 4,47	36,03 $\pm$ 4,31 ^b

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ SD'dir. n; rat sayısı, IVSd; diyastolde ventriküller arası septum kalınlığı, SVIDd; diyastolde sol ventrikül çapı, SVPWd; diyastolde sol ventrikül arka duvar kalınlığı, IVSs; sistolde ventriküller arası septum kalınlığı, SVIDs; sistolde sol ventrikül çapı, SVPWs; sistolde sol ventrikül arka duvar kalınlığı, EF; ejeksiyon fraksiyonu, FK; fraksiyonel kısalma.

b; doksorubisin grubu ile kıyaslandığında önemli değişikliği gösteriyor, P< 0,05.

Kontrol ve metformin grubunun M mod sol ventrikül ekokardiyografi ile ölçülen IVSd, SVIDd, SVPWd, IVSs, SVIDs, SVPWs, EF, FK ortalama $\pm$ SD değerleri tablo 7'de özetlenmiştir.

Tablo 7. Kontrol ve metformin grubunun M mod sol ventrikül ekokardiyografi ile ölçülen IVSd, SVIDd, SVPWd, IVSs, SVIDs, SVPWs, EF, FK ortalama $\pm$ SD değerleri

	Kontrol (n=10)	MET (n=10)
IVSd (cm)	0,12 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,03
SVIDd (cm)	0,57 $\pm$ 0,06	0,55 $\pm$ 0,09
SVPWd (cm)	0,11 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,03 ^{a,b}
IVSs (cm)	0,19 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,03 ^b
SVIDs (cm)	0,33 $\pm$ 0,04	0,34 $\pm$ 0,08 ^b
SVPWs (cm)	0,20 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,03 ^b
EF (%)	77,76 $\pm$ 4,95	75,71 $\pm$ 6,13 ^b
FK (%)	41,32 $\pm$ 4,47	39,60 $\pm$ 5,57 ^b

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ SD'dir. n; rat sayısı, IVSd; diyastolde ventriküller arası septum kalınlığı, SVIDd; diyastolde sol ventrikül çapı, SVPWd; diyastolde sol ventrikül arka duvar kalınlığı, IVSs; sistolde ventriküller arası septum kalınlığı, SVIDs; sistolde sol ventrikül çapı, SVPWs; sistolde sol ventrikül arka duvar kalınlığı, EF; ejeksiyon fraksiyonu, FK; fraksiyonel kısalma.

a; kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli değişikliği gösteriyor, P< 0,05.

b; doksorubisin grubu ile kıyaslandığında önemli değişikliği gösteriyor, P< 0,05.

Kontrol, doksorubisin, metformin ve doksorubisin + metformin grubunun M mod sol ventrikül ekokardiyografi ile ölçülen IVSd, SVIDd, SVPWd, IVSs, SVIDs, SVPWs, EF, FK ortalama $\pm$ SD değerleri tablo 8’de özetlenmiştir.

Tablo 8. Kontrol, doksorubisin, metformin ve doksorubisin + metformin grubunun M mod sol ventrikül ekokardiyografi ile ölçülen IVSd, SVIDd, SVPWd, IVSs, SVIDs, SVPWs, EF, FK ortalama $\pm$ SD değerleri

	Kontrol (n=10)	DOX (n=10)	MET (n=10)	DOX + MET (n=9)
IVSd (cm)	0,12 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,01
SVIDd (cm)	0,57 $\pm$ 0,06	0,61 $\pm$ 0,05	0,55 $\pm$ 0,09	0,55 $\pm$ 0,08
SVPWd (cm)	0,11 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,03 ^{a,b}	0,13 $\pm$ 0,02
IVSs (cm)	0,19 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01 ^a	0,19 $\pm$ 0,03 ^b	0,20 $\pm$ 0,02 ^b
SVIDs (cm)	0,33 $\pm$ 0,04	0,44 $\pm$ 0,04 ^a	0,34 $\pm$ 0,08 ^b	0,35 $\pm$ 0,05 ^b
SVPWs (cm)	0,20 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,01 ^a	0,20 $\pm$ 0,03 ^b	0,17 $\pm$ 0,01 ^b
EF (%)	77,76 $\pm$ 4,95	60,92 $\pm$ 9,25 ^a	75,71 $\pm$ 6,13 ^b	71,62 $\pm$ 5,40 ^b
FK (%)	41,32 $\pm$ 4,47	28,76 $\pm$ 6,16 ^a	39,60 $\pm$ 5,57 ^b	36,03 $\pm$ 4,31 ^b

Tüm sonuçlar ortanca $\pm$ SD’dir. n; rat sayısı, IVSd; diyastolde ventriküller arası septum kalınlığı, SVIDd; diyastolde sol ventrikül çapı, SVPWd; diyastolde sol ventrikül arka duvar kalınlığı, IVSs; sistolde ventriküller arası septum kalınlığı, SVIDs; sistolde sol ventrikül çapı, SVPWs; sistolde sol ventrikül arka duvar kalınlığı, EF; ejeksiyon fraksiyonu, FK; fraksiyonel kısalma.

a; kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli değişikliği gösteriyor, P< 0,05.

b; doksorubisin grubu ile kıyaslandığında önemli değişikliği gösteriyor, P< 0,05.

4.2. LDH, CK-MB, Troponin I, BNP ve CNP Düzeyleri

Doksorubisin grubu ile kontrol ve metformin grupları kıyaslandığında serum LDH, CK-MB, Troponin I ve BNP düzeyleri arasında fark bulunmadı.

Doksorubisin grubunun CNP düzeyleri kontrol ve metformin grubundan düşük ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Doksorubisin + metformin grubu kontrol ve metformin grubu ile kıyaslandığında LDH, CK-MB, Troponin I ve BNP düzeyleri arasında fark bulunmadı.

Doksorubisin + metformin grubunun CNP düzeyleri metformin ve kontrol grubundan düşük ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Kontrol, doksorubisin, metformin ve doksorubisin + metformin gruplarının LDH, CK-MB, Troponin I, BNP ve CNP düzeyleri tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. Kontrol, doksorubisin, metformin ve doksorubisin + metformin gruplarının LDH, CK-MB, Troponin I, BNP ve CNP düzeyleri.

	Kontrol (n=10)	DOX (n=10)	MET (n=10)	DOX + MET (n=9)
LDH (IU/L)	213,3 ± 248,3	118,6 ± 43,09	166,25 ± 177,82	268,11 ± 335,27
CK-MB (IU/L)	300,4 ± 130,8	222,3 ± 52,90	385,81 ± 122,73 ^b	274,68 ± 169,63
Troponin I	2,38 ± 5,92	0,01 ± 0,02	1,22 ± 3,14	0,03 ± 0,02
BNP (ng/L)	29,49 ± 6,27	28,50 ± 4,50	33,43 ± 5,70	34,65 ± 7,40 ^c
CNP (ng/L)	38,06 ± 3,74	29,21 ± 5,81 ^a	39,37 ± 5,94 ^b	30,11 ± 5,07 ^a

Tüm sonuçlar ortanca ± SD’dir. n, rat sayısı;

a, kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli değişikliği gösteriyor, $P<0,05$.

b, doksorubisin grubu ile kıyaslandığında önemli değişikliği gösteriyor, $P<0,05$.

c, DOX-MET ile MET grubu kıyaslandığında önemli değişiklik gösteriyor, $P<0,05$.

4.3. Antioksidan Enzim Düzeyleri

Doksorubisin grubunun kalp dokusu katalaz, SOD, GPx, TNF- α düzeyleri ile kontrol ve metformin grublarının kalp dokusu katalaz, SOD, GPx, TNF- α düzeyleri benzer bulundu.

Doksorubisin + metformin grubunun SOD, GPx, TNF- α düzeyleri ile kontrol ve metformin grublarının kalp dokusu katalaz, SOD, GPx, TNF- α düzeyleri benzer bulundu.

Kontrol, doksorubisin, metformin ve doksorubisin + metformin gruplarının kalp dokusu katalaz, SOD, GPx, TNF- α düzeyleri tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Kontrol, doksorubisin, metformin ve doksorubisin + metformin gruplarının kalp dokusu katalaz, SOD, GPx, TNF- α düzeyleri.

	Kontrol (n=10)	DOX (n=10)	MET (n=10)	DOX + MET (n=9)
Katalaz (nmol/ml)	16,13 $\pm$ 0,30	20,17 $\pm$ 2,26	18,64 $\pm$ 3,85	19,20 $\pm$ 3,76
SOD (IU/L)	0,30 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,06	0,30 $\pm$ 0,06	0,27 $\pm$ 0,09
GPx (nmol/ml)	61,24 $\pm$ 42,19	51,07 $\pm$ 48,27	44,04 $\pm$ 45,11	17,93 $\pm$ 19,27
TNF- α (pg/ml)	112,4 $\pm$ 49,43	150,8 $\pm$ 53,05	121,95 $\pm$ 38,22	124,8 $\pm$ 26,08
Tüm sonuçlar ortanca $\pm$ SD'dir. n, rat sayısı;				

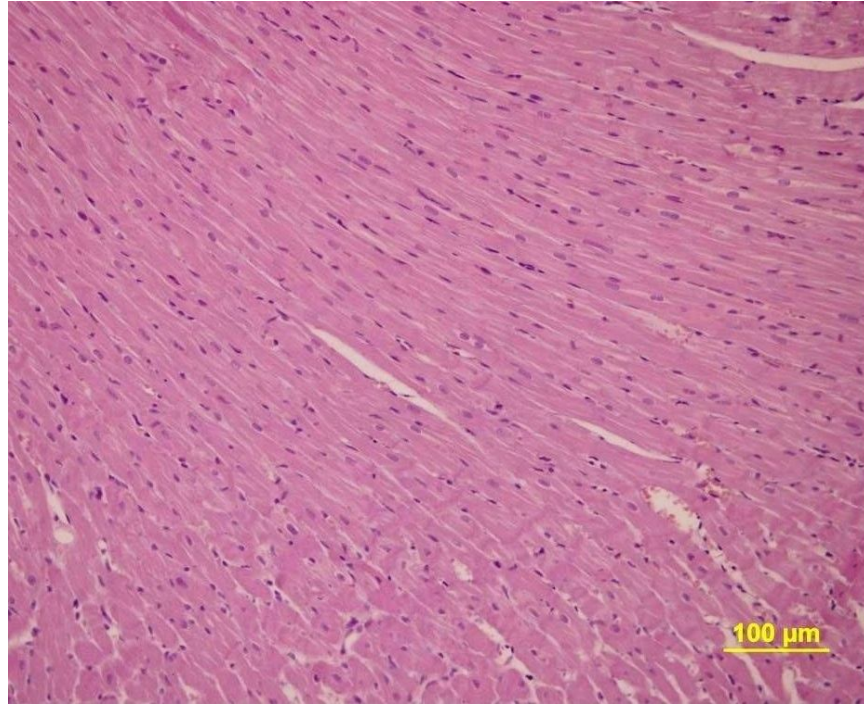
4.4. Ekokardiyografik Parametreler ile Kardiyak Enzimler, Nörohormonlar ve Antioksidan Enzim Düzeyleri Arasında Korelasyon Analizi

C tip natriüretik peptid ile LVPWs, EF, FK arasında önemli pozitif korelasyon saptandı ($p<0,05$). CNP ile LVIDs arasında önemli negatif korelasyon saptandı ($p<0,05$). LDH ile FK arasında önemli pozitif korelasyon saptandı ($p<0,05$). CK-MB ile IVSs, LVPWs, EF, FK, Troponin I arasında önemli pozitif korelasyon saptandı ($p<0,05$). Troponin I ile LVPWs ve FK arasında önemli pozitif korelasyon saptandı ($p<0,05$). Katalaz ile TNF- α arasında pozitif ve katalaz ile SOD arasında negatif korelasyon saptandı ($p<0,05$).

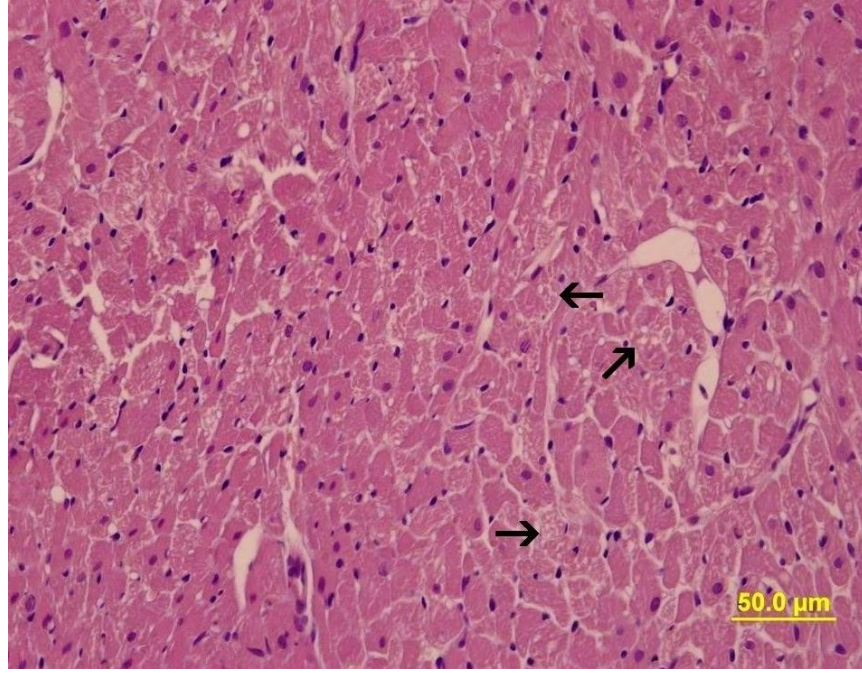
Bunların dışında kalan eko parametreleri, nörohormon, antioksidan enzim seviyeleri arasında korelasyon saptanmadı.

4.5. Kalp Dokusunun Hematoksilen & Eosin Boyamasının Histopatolojik Değerlendirmesi

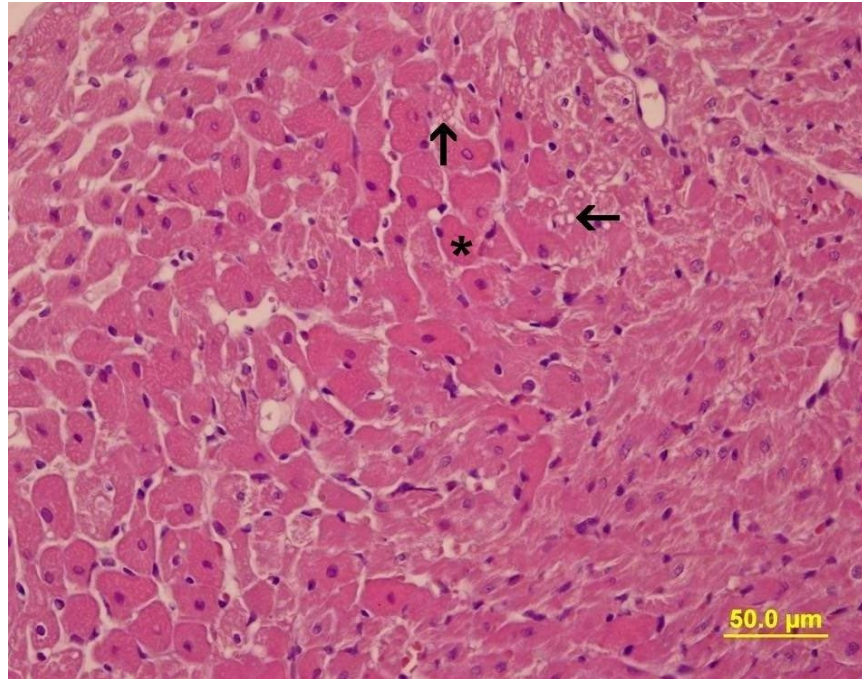
Işık mikroskopik incelemede H&E boyamada kontrol grubu kalp dokusu normal olarak değerlendirildi (Resim 4). Doksorubisin grubu kalp dokusunda miyokardiyum tabakasındaki kas lifleri arasında organizasyon bozukluğu ve bazı hücrelerde miyofibrillerde kayıp (Resim 5), miyokard tabakasında bazı alanlarda hücrelerin eozinofilik boyanmasında ve bazı hücrelerin intrasitoplazmik vakuol oluşumunda artış (Resim 6) ve damarlarda konjesyon ve hemoraji alanları tespit edildi (Resim 7). Metformin grubu (Resim 8) ve doksorubisin + metformin grubu (Resim 9) kalp dokuları normal olarak değerlendirildi.



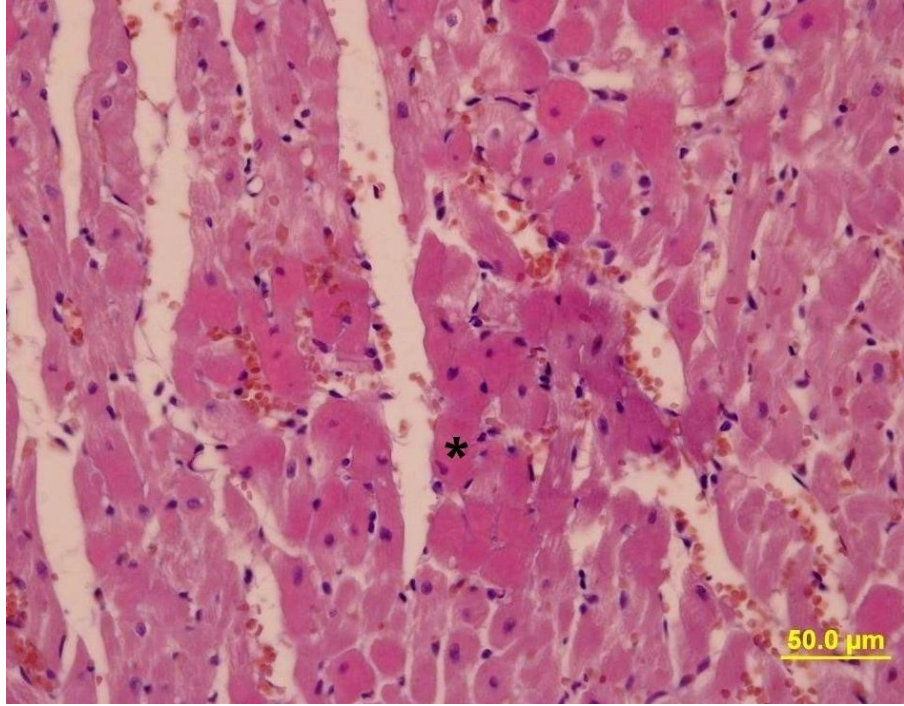
Resim 4. Kontrol grubunun kalp dokusu H&E ile boyanması histopatolojik incelemesi normal dokuyu gösteriyor.



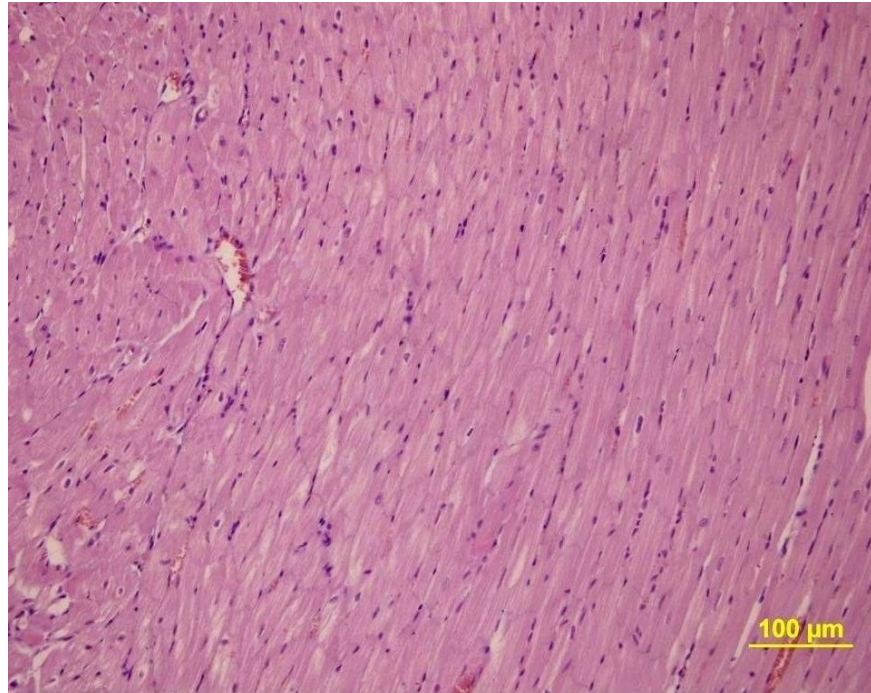
Resim 5. Dokсорubin grubunun kalp dokusu H&E ile boyanması histopatolojik incelemesi miyokardiyum tabakasındaki kas lifleri arasında organizasyon bozukluğu olduğu ve bazı hücrelerde miyofibrillerde kayıp (ok) olduğu görüldü.



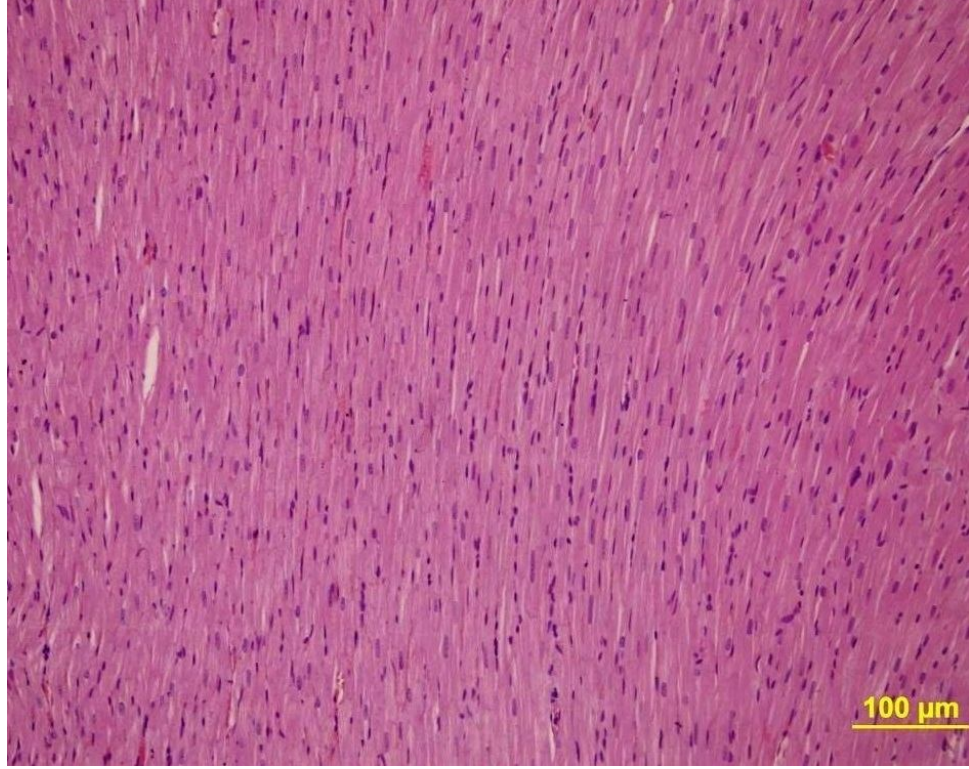
Resim 6. Dokсорubin grubunun kalp dokusu H&E ile boyanması histopatolojik incelemesi miyokard tabakasında bazı alanlarda hücrelerin eozinofilik boyanmasında (*) ve bazı hücrelerin intrasitoplazmik vakuol oluşumunda artış olduğu (ok) tespit edildi



Resim 7. Doksorubin grubunun kalp dokusu H&E ile boyanması histopatolojik incelemesi miyokard tabakasında bazı alanlarda hücrelerin eozinofilik boyanmasında artış (*) ve bazı damarlarda konjesyon ve hemoraji alanları tespit edildi.



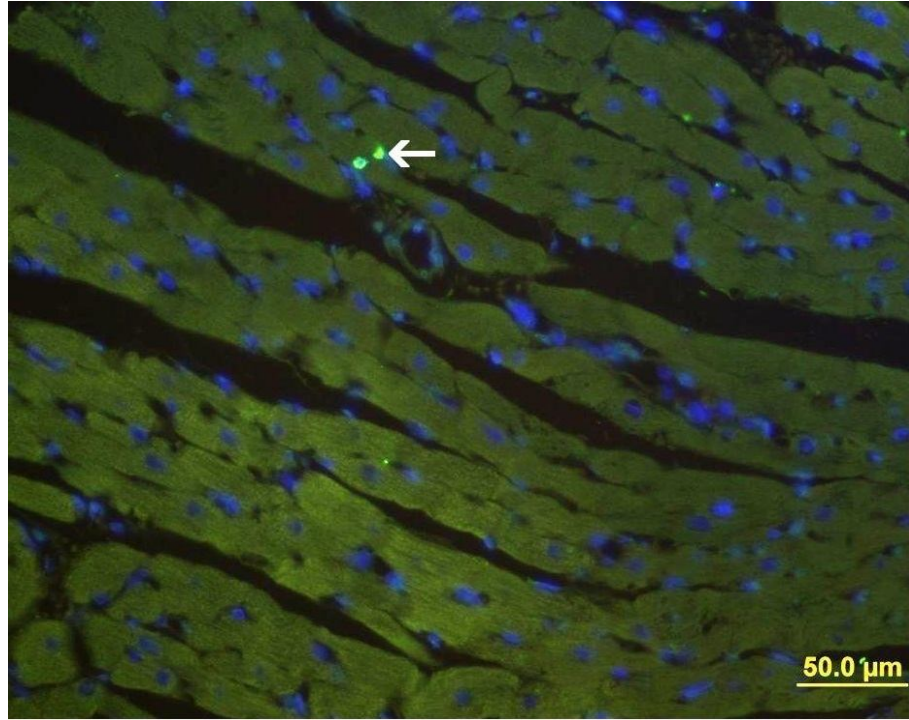
Resim 8. Metformin grubunun kalp dokusu H&E ile boyanması histopatolojik incelemesi normal dokuyu gösteriyor.



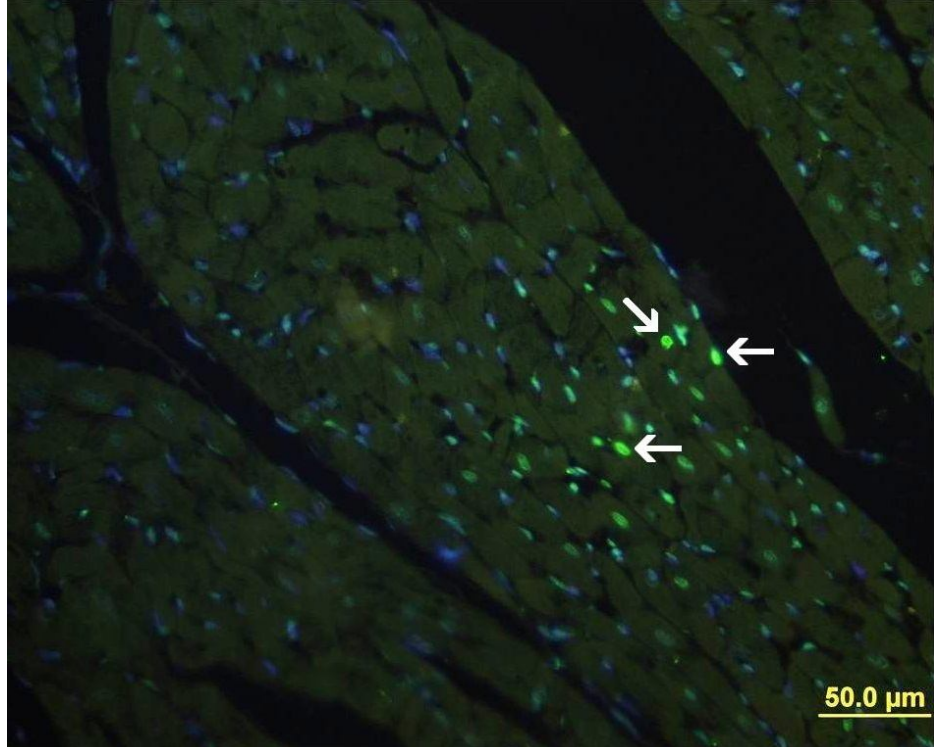
Resim 9. Doksorubisin + metformin grubunun kalp dokusu H&E ile boyanması histopatolojik incelemesi normal dokuyu gösteriyor.

4.6. TUNEL yöntemi ile apoptotik indeks sonuçları

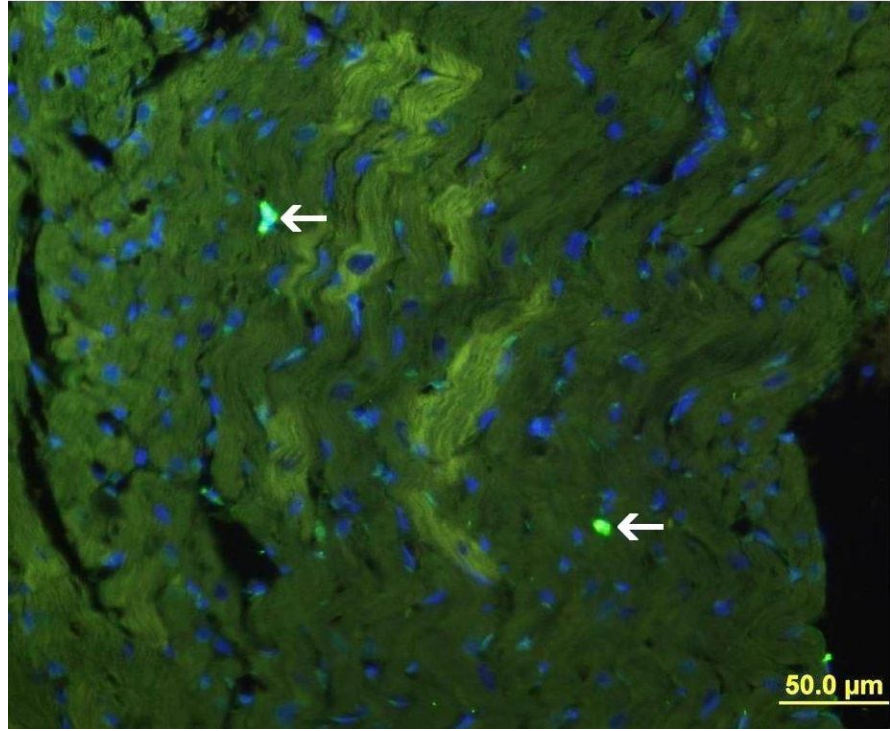
TUNEL yöntemi uygulanarak hazırlanan kalp dokusu preparatlarında TUNEL pozitif boyanan hücrelerin tüm hücrelere oranlandığı apoptotik indeks değerlendirmesinde doksorubisin grubunda apoptotik indekste kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış belirlendi ($p=0,030$). Doksorubisin + metformin grubunda apoptotik indeks kontrol grubuna benzerdi ($p=0,676$). Doksorubisin + metformin grubu doksorubisin grubu ile kıyaslandığında ise metforminin doksorubisin neden olduğu apoptozisi azalttığı ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. (Tablo 11). Apoptotik hücre çekirdekleri (ok) yeşil floresan, diğer hücreler ise 4,6-diamidine-2-fenilindol ile mavi floresan sergilemektedir (Resim10-13).



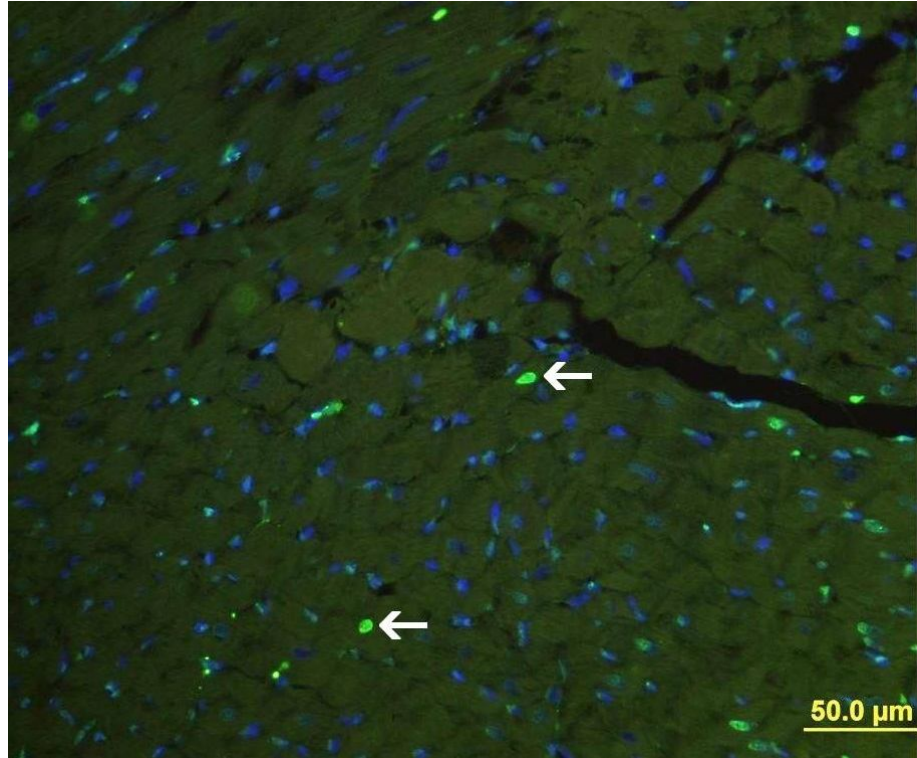
Resim 10. Kontrol grubu rat kalp dokusu TUNEL boyamasını gösteren fotoğraf.



Resim 11. Dokсорubisin grubu rat kalp dokusu TUNEL boyamasını gösteren fotoğraf.



Resim 12. Metformin grubu rat kalp dokusu TUNEL boyamasını gösteren fotoğraf.



Resim 13. Doksorubisin + metformin grubu rat kalp dokusu TUNEL boyamasını gösteren fotoğraf

Tablo 11. Kalp dokusundaki apoptotik indeks. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir

	Kontrol	Doksorubusin	Metformin	Doksorubusin + Metformin
Apoptotik indeks (%)	0,43 $\pm$ 0,26	0,71 $\pm$ 0,27	0,35 $\pm$ 0,08	0,48 $\pm$ 0,25

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Doksorubisin geniş kullanım alanı olan en etkili antineoplastik ajanlardan biridir. Ancak klinik kullanımı kardiyotoksisite nedeniyle sınırlanmaktadır. Bu önemli yan etkisi doz bağımlı, kümülatif ve geri dönüşümsüzdür. Kalp dokusunda ciddi hasara, kardiyomyopatiye ve konjestif kalp yetersizliğine neden olabilmektedir.

Çalışmamızda ratlara kümülatif 16 mg/kg intraperitoneal uygulanan doksorubisin ile, M mod ekokardiyografi ile sol ventrikül sistolik fonksiyonları, serum LDH, CK-MB, troponin-I, kalp dokusu katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, TNF-alfa düzeyleri, kalbin ışık mikrokopisinde histopatolojik değerlendirmesi ve TUNEL yöntemi kullanılarak apoptotik indeks çalışılarak doksorubin verilen gruba, doksorubisin + metformin verilen grup arasında fark olup olmadığı araştırılmıştır. Doksorubisin grubu ile doksorubisin + metformin grubu arasında sistolde interventriküler septum kalınlığı, sistolde sol ventrikül arka duvar kalınlığı, ejeksiyon fraksiyonu ve fraksiyonel kısalmada azalma, sistolde sol ventrikül genişliğinde artma saptanmıştır. Ratlara doksorubisin uygulamasından 3 gün önce başlamak üzere on dört gün süre ile 250 mg/kg/gün gavaj yolu ile metformin uygulaması, doksorubisinin sol ventrikül fonksiyonunu bozucu etkisine karşı koruyucu etki gösterdi.

Doksorubisin grubunda kalp dokularının ışık mikrokopi incelemesinde miyokardiyum tabakasındaki kas lifleri arasında organizasyon bozukluğu ve bazı hücrelerde miyofibrillerde kayıp, miyokard tabakasında bazı alanlarda hücrelerin eozinofilik boyanmasında ve bazı hücrelerin intrasitoplazmik vakuol oluşumunda artış ve damarlarda konjesyon ve hemoraji alanları şeklinde histopatolojik değişiklikler

saptandı. Doksorubisin + metformin grubunda söz konusu patolojik değişiklikler saptanmadı. Metforminin doksorubisinin neden olduğu histopatolojik değişikliklere karşı kalp dokusunu koruduğu belirlendi.

TUNEL yöntemi kullanılarak apoptotik indeks belirlemede, doksorubisinin apoptotik indekste kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olduğu belirlendi. Metforminin doksorubisinin neden olduğu apoptozise karşı kardiyoprotektif etki göstererek apoptotik indeksi azalttığı ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi.

Doksorubisin, serum LDH, CK-MB, troponin I düzeylerinde ve kalp yetersizliği takibinde kullanılan ve sol ventrikül dilatasyonunu yansıtan serum BNP ve CNP düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi.

Doksorubisin kalp dokusu antioksidan enzimleri (katalaz, süperoksit dismutaz, glutatayon peroksidaz) ve TNF- α düzeylerinde de anlamlı değişikliğe neden olmadı.

Doksorubisinin güçlü bir antineoplastik ajan olması nedeniyle, doksorubisine eş değer ve yan etki potansiyeli düşük kemoterapi ajanları geliştirilinceye kadar kullanımına devam edilecek gibi gözükmektedir. Bu nedenle doksorubisin kardiyotoksisitesini önlemeye yönelik tedavi stratejileri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Araştırmacılar deneysel çalışmalarda, birçok farmakolojik ajanın doksorubisin kardiyotoksisitesine karşı koruyucu etkisinin olduğu yönünde kanıtlara ulaşmışlardır (12). Ancak günümüzde sadece deksrazoksanın kullanımı onay almıştır. Deksraksoksan kullanımının kemik iliği toksisitesi ve yüksek maliyet gibi dezavantajları kardiyotoksisiteyi önleyebilecek yeni farmakolojik ajanlar üzerinde çalışmaların devam etmesinin gerekli olduğunu düşündürmektedir.

Metformin tip 2 diyabet hastalarında sıklıkla kullanılan oral antihiperglisemik bir ilaçtır (91). Metforminin kan glukoz seviyesini düşürmenin yanı sıra, kilo verme, plasma lipid seviyelerini düşürme ve bazı vasküler komplikasyonları önlemeyi içeren faydaları da vardır (89). Myokard iskemisi oluşturulan deneysel modellerde kardiyoprotektif etkisi araştırılmıştır (94, 98, 100, 103, 104).

Literatürde metforminin, doksorubisin kardiyotoksisitesine karşı kardiyoprotektif etkisinin araştırıldığı iki çalışma mevcuttur. Her iki çalışmada da metforminin doksorubisin kardiyotoksisitesine karşı koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir (80,101). Ashour ve ark. (101) ratlarda 11 gün süre ile gün aşırı 3 mg/kg kümülatif 18 mg/kg intraperitoneal doksorubisin uygulayarak doksorubisin kardiyotoksisitesi oluşturdukları deneysel modelde, metforminin 50 mg/kg ve 500 mg/kg ağızdan uygulamasının biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikleri elimine ettiğini, neticede doksorubisin kardiyotoksisitesine karşı metforminin kardiyoprotektif etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Asensio-Lopez ve ark. (80) çalışmalarında elde ettikleri sonuçlarda identifiye edilen ferritin ağır zincir ile doksorubisin kardiyotoksisitesine karşı metforminin kardiyoprotektif etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamız metforminin doksorubisin kardiyotoksisitesine karşı koruyucu etkisi olduğu hipotezini; M mod ekokardiyografide sol ventrikül sistolik fonksiyonu; kardiyak enzimler LDH, CK-MB, Troponin I düzeyleri; nörohormonlar BNP ve CNP düzeyleri; kalp dokusu antioksidan enzimler katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz aktivitesi ile TNF alfa düzeyleri ve kalp dokusunun histopatolojik incelemesi ile apoptotik indeks çalışılarak araştırıldı.

Doksorubisin kardiyotoksisitesinin saptanmasında sıklıkla kullanılan M mod sol ventrikül sistolik fonksiyon değerlendirmesini kullanmış olmamız diğer iki çalışmadan farklı kılmaktadır. Bu incelemenin klinikte doksorubisin kullanan hastalarda en sıklıkla başvuru tanı aracı olması nedeniyle deneysel çalışmanın kliniğe ışık tutacak bilgiler sunması açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Doksorubisin kardiyotoksisitesi oluşturmak üzere ratlara haftada 2 gün olmak üzere 11 gün içerisinde 4 dozda kümülatif 16 mg/kg doksorubisin intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Sol ventrikül fonksiyonlarının değerlendirilmesi, serum ve doku örneklerinin alınması, ilaç uygulamalarının bitiminden bir gün sonra yapılmıştır. Literatürde deneysel rat modelinde doksorubisin kardiyotoksisitesi için uygulanmış doksorubisin dozları 1 mg/kg dozdan, 10 mg/kg doza kadar değişmektedir. Farklı doz şemalarını içerecek şekilde kümülatif doz ise 10 mg/kg'dan 20 mg/kg'a değişen dozlar şeklindedir (105-110).

Literatürde ilaç uygulamasından sonra, laboratuvar değerlendirmesi için son doz ilaç uygulamasından 1 gün sonra ile aylar sonrasını içeren zaman dilimleri bildirilmiştir

(105-110). Çalışmamızda kümülatif 16 mg/kg doz doksorubisin intraperitoneal uygulamasının tamamlanmasından bir gün sonra ekokardiyografik inceleme, serum ve doku örneklerinin alınması işlemleri gerçekleştirilmiştir. Uygulanan doksorubisin doz şeması ile doksorubisin grubunda, kontrol grubuna kıyasla sol ventrikül fonksiyonlarında ve kalp dokusu histopatolojisinde bozulma olduğu gösterilmiştir. Ancak serum LDH, CK-MB, troponin I, BNP, CNP, kalp dokusu katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, TNF-alfa düzeylerinde değişiklik olmadı. Bundan yola çıkarak Wistar albino erkek ratlarda daha ciddi doksorubisin kardiyotoksisitesi oluşturmak için daha yüksek doz doksorubisin uygulaması yapılabilir. Diğer taraftan doksorubisin uygulamasını takiben yapılacak incelemelerin, kardiyotoksisitenin oluşmasına kadar geçecek zaman düşünülerek daha geç yapılmasının kardiyotoksisite oluşmasına katkı sağlayabileceğini düşünüyoruz. Bu sonuçlarla ekokardiyografi, kardiyak enzimler, nörohormonlar ve antioksidan enzim incelemelerinin doksorubisin doz şemasının sonlandırılmasından örneğin 1 hafta, 1 ay, 6 ay, 1 yıl sonraki sonuçların değerli olacağı düşünülebilir.

Doksorubisin kardiyotoksisitesinin erken saptanması, geri dönüşümsüz hasar gelişmeden kardiyotoksisiteye karşı önlem alınmasına olanak sağlayabilir. Bu amaçla çeşitli tanısal yaklaşımlar üzerinde durulmaktadır. Schimmel ark. (111) tedavi başlangıcından önce kardiyotoksisite için bazal riskin belirlenmesi ve serum LDH, CK-MB, troponin I, BNP, CNP düzeyleri ile ekokardiyografik incelemenin tanısal önemini vurgulamışlardır. Doksorubisin kardiyotoksisitesini saptamada en sık kullanılan metodların başında ekokardiyografi ile EF ve FK ölçümü yapılarak sol ventrikül sistolik fonksiyonunun değerlendirilmesi gelmektedir (112).

Sistolik disfonksiyonu göreceli olarak geç saptamakla birlikte çocuk hastalarda sol ventrikül sistolik fonksiyonlarının ve sol ventrikül kavitesinin çap ölçümünün değerlendirilmesi güvenilir ve sıklıkla uygulanan bir yöntemdir. Bu ölçümler myokard performans ve yapısında kemoterapi etkisinin ölçülmesine olanak sağlarken, kolay tekrarlanabilmesi nedeniyle takip imkanı da sağlamaktadır.

Çalışmamızda doksorubisin kardiyotoksisitesinin tanı ve izleminde klinikte en sık kullanılan metod olan M mod sol ventrikül sistolik fonksiyonlarının değerlendirilmesi yöntemi kullanılmıştır. EF ve FK ölçümü, sol ventrikül sistol ve diyastol çapları, IVS ve

sol ventrikül arka duvar kalınlıkları ölçülmüştür. Doksorubisin EF, FK da önemli derecede azalmaya, IVSs ve SVPWs de azalmaya, sistolde sol ventrikül diyastol sonu çapında genişlemeye neden olmuştur. Doksorubisin + metformin grubunda ise ekokardiyografik değerlendirmede kontrol grubu ile benzer değerler elde edilmiştir. Bu bulgular doksorubisin kardiyotoksitesine karşı, metforminin ekokardiyografik parameterler üzerinde olumlu etki yaptığını ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda sadece metformin uygulanan ratların sol ventrikül arka duvar kalınlığında kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde artışa neden olduğu belirlenmiştir. Metforminin ventrikül duvar kalınlığında artışa yol açtığına dair daha önce yayınlanmış bir rapora rastlanmadı.

Literatürde doksorubisin kardiyotoksitesine metforminin protektif etkisinin çalışıldığı iki çalışmada da ekokardiyografik değerlendirme yapılmamıştır. Çalışmamızda ekokardiyografik değerlendirme 14 günlük deney süresinden 1 gün sonra yapılmıştır. Çalışmamız ön çalışma kabul edilerek yeni çalışmalarda ekokardiyografik değerlendirmenin daha geç dönemde yapılmasının kardiyotoksitesinin geç dönem bulgularını yansıtacağını düşünmekteyiz.

Richard ve ark. (110) doksorubisin verilen ratlarda ekokardiyografik incelemede sol ventrikül diyastol sonu çaplarının belirgin olarak arttığını raporlamıştır. Aynı şekilde Bertinchant ve ark. (113) ratlarda doksorubisinin sol ventrikül diyastol sonu çaplarını artırdığını raporlamışlardır. Chen ve ark. (114) ratlarda doksorubisinin sol ventrikül diyastol sonu çapında ve sol ventrikül sistol sonu çapında artışa, EF ve FK'da ise azalmaya neden olduğunu, sol ventrikül fonksiyonlarının bozulduğunu raporlamışlardır. Çalışmamızda doksorubisin grubunda elde ettiğimiz ekokardiyografik veriler bu çalışmalar ile benzerdir. Çalışmamızda sol ventrikül sistol ve diyastol sonu çaplarında artış saptanmış olsa da sistol sonu çaplarında artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu, diyastol sonu çaplarında ki artış ise anlamlı bulunmadı. Bu bulgu bize sol ventrikülün sistol sonu çapının diyastol sonu çapına kıyasla doksorubisin kardiyotoksitesine daha duyarlı şeklinde yorumlanabileceğini telkin etmektedir.

Doksorubisin 11 gün süre kümülatif 16 mg/kg uygulaması serum LDH, CK-MB, troponin I, BNP ve CNP düzeylerinde değişikliğe neden olmamıştır. Richard ve ark.

(110) da kümülatif 10 mg/kg doksorubisin uyguladıkları ratlarda troponin I ve BNP düzeylerinde artış saptamamıştır. Çalışmamızda serum troponin I ve BNP düzeylerinde yükselme saptanmaması Richard ve ark. (110) çalışması ile benzerdir. Bertinchant ve ark. (113) da benzer sonuçlar elde etmişlerdir ve bunun nedeni olarak minör miyosit hasarını göstermişlerdir. Bernardini ve ark. (115) ise dişi Wistar albino ratlara tek doz 10 mg/kg intravenöz doksorubisin uygulamasından 3-6 saat sonra plasma atriyal natriüretik peptid (ANP) seviyelerinde önemli düzeyde azalma olduğunu, 3 mg/kg intravenöz haftada tek doz içeren daha kronik rejim uygulamalarından 21 ve 31 gün sonra plasma ANP seviyelerinde önemli düzeyde artış gözlemişlerdir. Bu durumu doksorubisine akut miyosit toksisitesinde erken süpresyon ve izlemde ise gelişen kalp yetersizliği ile stimülasyon şeklinde bifazik seyir olarak yorumlanmıştır.

Ashour ve ark. (101) ratlarda kümülatif 18 mg/kg intraperitoneal doksorubisin uygulayarak doksorubisin kardiyotoksitesisi oluşturdukları deneysel modelde, serum LDH ve CK-MB seviyelerinde artış, doksorubisin ile eş zamanlı verilen metforminin doksorubisinin neden olduğu biyokimyasal değişiklikleri elimine ettiğini ve bunun doksorubisinin neden olduğu kardiyomyosit hücre membranının bozulmasına bağlı hücre içi proteinlerin salınması neticesi gerçekleştiğini düşündüklerini bildirmişlerdir.

Chen ve ark. (116) doksorubisinin yeni doğan rat miyositlerinde BNP gen ekspresyonunu inhibe ettiğini raporlamışlardır.

Çalışmamızda kalp dokusunda antioksidan enzimler katalaz, süperoksid dismutaz, glutatyon peroksidaz ve TNF alfa düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptanmadı. Richard ve ark. (110) benzer şekilde antioksidan enzim seviyelerinde önemli değişiklik saptamadıklarını ve bunun antrasiklinler ile indüklenen serbest radikallerin endojen antioksidan defans ile engellenmesi nedeniyle antioksidan enzimlerin kullanılmasına bağlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda doksorubisin grubunda miyokardiyumda kas lifleri arasında organizasyon bozukluğu, miyofibrillerde kayıp, bazı hücrelerin intrasitoplazmik vakuol oluşumunda artış, hücrelerin eozinofilik boyanmasında artış, damarlarda konjesyon ve hemorajiye neden olduğu belirlendi. Metformin verilen grupta ise bu etkilerin olmadığı belirlendi. Doksorubisinin kalp dokusu üzerine olan olumsuz etkilerine karşı

metforminin belirgin koruyucu etki gösterdiği ve doksorubisin + metformin grubunun kalp dokusu histopatolojik bulgularının kontrol grubu kalp dokusu histopatolojik bulguları ile aynı oluşu ümit verici olarak değerlendirildi. Chen ve ark. (114) deneysel rat modelinde kümülatif 15 mg doksorubisin uygulamasından 2 hafta sonra myokardiyal doku örneğinin histopatolojik incelemesinde myosit dejenerasyonuna, myosit kaybına, myosit atrofisine, rezidü myositlerde hipertrofi ve interstisyel fibroziste artışa neden olduğunu raporlamışlardır. Doksorubisin grubunda elde ettiğimiz bulgular Chen ve ark. bulguları ile benzerdir.

Deneysel hayvan modellerinde apoptotik indeks sonuçlarını Hou ve ark. (107) $13,64 \pm 2,46$, Nakamura ve ark. (117) $0,86 \pm 0,11$, Fisher ve ark. (118) $0,61 \pm 0,09$, Chen ve ark. (114) $0,93 \pm 0,08$ olarak raporlamışlardır. Çalışmamızda elde ettiğimiz apoptotik indeks $0,71 \pm 0,27$ olup Nakamura ve ark., Fisher ve ark., Chen ve ark. çalışmalarında bildirdiği değerler ile benzerdi. Bu sonuç doksorubisinin kardiyotoksitesinde hücre ölümünün sadece apoptozis ile olmayıp, nekroz ve otofaji gibi diğer mekanizmalarında etkili olabileceğini düşündürmektedir. Metforminin doksorubisin ile birlikte uygulanması istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte apoptotik indekste azalmaya neden olmuştur.

Çalışmamızın kısıtlılığı doksorubisin kardiyotoksitesisi oluşturulan ratlarda biyokimyasal ve histopatolojik incelemenin son uygulanan doksorubisin dozundan hemen 1 gün sonra yapılması nedeniyle daha sonra gelişebilecek kardiyotoksitenin ve metforminin uzun dönemde koruyuculuğunun olup olmadığının belirlenememiş olmasıdır.

6. SONUÇLAR

1. Wistar erkek albino ratlara 11 günlük sürede kümülatif 16 mg/kg intraperitoneal uygulanan doksorubisin, uygulamanın hemen bitiminde; M mod ekokardiyografik incelemede sistolde interventriküler septum ve sistolde sol ventrikül arka duvar kalınlığında incelmeye, sistolde sol ventrikül kavitesinde dilatasyon, sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ve fraksiyonel kısalmasında azalmaya neden olmuştur.
2. Histopatolojik incelemede doksorubisinin kümülatif 16 mg/kg uygulaması erken dönemde miyokardiyumda kas lifleri arasında organizasyon bozukluğuna, miyofibrillerde kayıba, bazı hücrelerin intrasitoplazmik vakuol oluşumunda artışa, hücrelerin eozinofilik boyanmasında artışa, damarlarda konjesyon ve hemorajiye neden olmuştur. Doksorubisin apoptotik indekste istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olmuştur. Metformin apoptotik indekste azalma yapmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
3. Doksorubisinin kümülatif 16 mg/kg uygulanması erken dönemde serumda LDH, CK-MB, Troponin I, BNP ve CNP düzeylerinde değişikliğe neden olmamıştır.
4. Doksorubisin erken dönemde kalp dokusu katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve TNF- α düzeylerinde de değişikliğe neden olmamıştır.
5. Doksorubisin verilen ratlara doksorubisinle birlikte 250 mg/kg/gün, gavaj yolu ile, metformin verilmesi, doksorubisinin sol ventrikül fonksiyonunlarını bozucu etkisine karşı koruyucu etki göstermiştir.

6. Doksorubisin verilen ratlara doksorubisinle birlikte 250 mg/kg/gün gavaj yolu ile metformin verilmesi, doksorubisinin neden olduğu histopatolojik değişikliklere ve apoptozisteki artışa karşı da koruyucu etki göstermiştir.

7. Doksorubisin verilen ratlara doksorubisinle birlikte 250 mg/kg/gün gavaj yolu ile metformin verilmesi, erken dönemde serum LDH, CK-MB, troponin I, BNP, CNP düzeylerinde değişikliğe neden olmamıştır.

Bu bulgularla 16 mg/kg kümülatif dozda doksorubisin verilen ratlarda metforminin doksorubisin kardiyotoksisitesine karşı koruyucu etkisi olduğuna dair kanıtlara ulaşılmış, metforminin doksorubisin kardiyotoksisitesine karşı daha uzun süreli kullanımlardaki etkilerinin araştırılacağı yeni çalışmalar ile metforminin doksorubisin kardiyotoksisitesine karşı koruyucu etkisinin teyit edilmesi ile klinik çalışmaların önünün açılacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Dawidoff AM. Pediatric Oncology. Semin Pediatr Surg 2010; 19: 225-233.
2. Young JL, Ries LG, Silverberg E, et al. Cancer incidence, survival, and mortality for children younger than age 15 years. Cancer 1986; 58: 598–602.
3. Kaatsch P. Epidemiology of childhood cancer. Cancer Treatment Reviews 2010; 36: 277-285.
4. Ries LG. Childhood Cancer Mortality. In: Ries LG, Smith MA, Gurney JG, Linet M, Tamura T, Young JL, et al, editors. Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975–1995. National Cancer Institute, SEER Program; Bethesda, MD: 1999. p. 165-169.
5. Bleyer WA. The impact of childhood cancer on the United States and the world. CA Cancer J Clin 1990; 40: 355–67.
6. Yarbro CH, Frogge MH, Goodman M. Cancer Nursing: Principles and Practice. 6th ed. Sudbury, Mass: Jones and Bartlett; 2005.
7. Rabbani A, Finn RM, Ausio J. The anthracycline antibiotics: antitumor drugs that alter chromatin structure. BioEssays 2004; 27: 50-56.
8. Arcamone F. Doxorubicin anticancer antibiotic. New York: Academic Press.
9. Behal V. Bioactive products from Streptomyces. Adv Appl Microbiol 2000; 47: 113-156.
10. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji (9. baskı). Haccettepe-taş kitapçılık. 2000, 1. Cilt, sayfa 394-395.
11. Park MK, Salamat M. Doxorubicin cardiomyopathy. Pediatric Cardiology for practitioner. 5th. Philadelphia, 2008.
12. Hareke D, Franco VI, Henkel JM, Miller TL, Lipshultz SE. Cardiotoxicity in childhood cancer survivors: strategies for prevention and management. Future Cardiol 2012; 8: 647-670.
13. Yeh ET. Cardiotoxicity induced by chemotherapy and antibody therapy. Annu Rev Med 2006; 57: 485–98.

14. Hanrahan EO, Gonzalez-Angulo AM, Giardona SH, et al. Overall survival and cause-specific mortality of patients with stage T1a, bN0M0 breast carcinoma. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4952–4960.
15. Mertens AC, Yasui Y, Neglia JP, et al. Late mortality experience in five-year survivors of childhood and adolescent cancer: the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3163–3172.
16. Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, et al. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med* 2006; 355:1572–1582.
17. Rusconi P, Gomez-Marin O, Rossique-Gonzalez M, et al. Carvedilol in children with cardiomyopathy: 3-year experience at a single institution. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23: 832–838.
18. Mulrooney DA, Yeazel MW, Kawashima T, et al. Cardiac outcomes in a cohort of adult survivors of childhood and adolescent cancer: retrospective analysis of the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *BMJ* 2009; 339: b4606.
19. Levitt G, Anazodo A, Burch M, Bunch K. Cardiac or cardiopulmonary transplantation in childhood cancer survivors: an increasing need? *Eur J Cancer* 2009; 45: 3027–3034.
20. Lipshultz SE, Colan SD. Cardiovascular trials in long-term survivors of childhood cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 769–773.
21. Senkus E, Jassem J. Cardiovascular effects of systemic cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews* 2011; 37: 300-311.
22. Di Marco A, Cassinelli G, Arcamone F. The discovery of daunorubicin. *Cancer Treat Rep* 1981; 65: 3-8.
23. Tan C, Tasaka H, Yu KP, et al. Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer* 1967; 20: 333-353.
24. Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, et al. Adriamycin, 14hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. Peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng* 1969; 11: 1101-1110.
25. Volkova M, Russell R. Anthracycline Cardiotoxicity: Prevalence and Treatment. *Current Cardiology Reviews* 2011; 7: 214-220.
26. Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1998; 339: 900–905.

27. Zhang Y-W, Shi J, Li Y-J, Wei L. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2009; 57: 435-445.
28. Aktürk E, Kurtoğlu E, Harputluoğlu H. Kanser ilaçlarının kardiyovasküler yan etkileri: Bu yan etkiler nasıl belirlenmeli, tedavi ve takip nasıl yapılmalı? İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2011; 18: 137-142.
29. Wallace KB. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacol Toxicol* 2003; 93: 105–115.
30. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2013; 65: 157-170.
31. Hilmer SN, Cogger VC, Muller M, Le Couteur DG. The hepatic pharmacokinetics of doxorubicin and liposomal doxorubicin. *Drug Metab Dispos* 2004; 32: 794-799.
32. Buchholz TA, Stivers DN, Stec J, et al. Global gene expression changes during neoadjuvant chemotherapy for human breast cancer. *Cancer J* 2002; 8: 461-468.
33. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, et al. Doxorubicine: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med chem* 2009; 16: 3267-3285.
34. Giantris A, Abdurrahman L, Hinkle A, Asselin B, Lipshultz SE. Anthracycline-induced cardiotoxicity in children and young adults. *Clinical Reviews in Oncology/Hematology* 1998; 27: 53-68.
35. Bristow MR, Billingham ME, Mason JW, et al. Clinical spectrum of anthracycline antibiotic cardiotoxicity. *Cancer Treat Rep* 1978; 62: 873-880.
36. Lipshultz SE, Alvarez JA, Scully RE. Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Heart* 2008; 94: 525-533.
37. Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD, et al. Late cardiac effects of doxorubicine therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *New Engl J Med* 1991; 324: 808-815.
38. Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, et al. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med* 1979; 91: 710–717.
39. Krischer JP, Epstein S, Cuthbertson DD, Goorin AM, Epstein ML, Lipshultz SE. Clinical cardiotoxicity following anthracycline treatment for childhood cancer: the Pediatric Oncology Group experience. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1544–1552.

40. Ryberg M, Nielsen D, Skovsgaard T, Hansen J, Jensen BV, Dombernowsky P. Epirubicin cardiotoxicity: an analysis of 469 patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3502–3508.
41. Wouters KA, Kremer LC, Miller TL, Herman EH, Lipshultz SE. Protecting against anthracycline induced myocardial damage: a review of the most promising strategies. *Br J Haematol*. 2005; 131: 561–578.
42. Gianni L, Zweier JL, Levy A, Myers CE. Characterization of the cycle of iron-mediated electron transfer from adriamycin to molecular oxygen. *J Biol Chem*. 1985; 260: 6820–6826.
43. Olson RD, Mushlin PS. Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypothesis. *FASEB J*. 1990; 4: 3076–3086.
44. Milei J, Boveris A, Llesuy S, et al. Amelioration of adriamycin-induced cardiotoxicity in rabbits by prenylamine and vitamins A and E. *Am Heart J*. 1986; 111: 95–102.
45. 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.
46. Gozálvez M, Blanco M. Inhibition of NA-K ATPase by the antitumor antibiotic adriamycin. 5th International Biophysics Congress, Copenhagen. *Cancer Res*. 1979; 39: 257–261.
47. Pointon AV, Walker TM, Phillips KM, et al. Doxorubicin in vivo rapidly alters expression and translation of myocardial electron transport chain genes, leads to ATP loss and caspase 3 activation. *PLoS ONE*. 2010; 5: e12733.
48. Adams MJ, Lipshultz SE. Pathophysiology of anthracycline- and radiation-associated cardiomyopathies: implications for screening and prevention. *Pediatr Blood Cancer*. 2005; 44: 600–606.
49. Sorensen K, Levitt G, Bull C, Chessells J, Sullivan I. Anthracycline dose in childhood acute lymphoblastic leukemia: issues of early survival versus late cardiotoxicity. *J Clin Oncol*. 1997; 15: 61–68.
50. Wojtacki J, Lewicka-Nowak E, Leśniewski-Kmak K. Anthracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention--review of the literature. *Med Sci Monit*. 2000; 6: 411–420.
51. Singal PK, Iliskovic N, Li T, Kumar D. Adriamycin cardiomyopathy: Pathophysiology and prevention. *FASEB J*. 1997; 11: 931–936.

52. Trachtenberg BH, Landy DC, Franco VI, et al. Anthracycline-associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Pediatr Cardiol* 2011; 32: 342-353.
53. Lipshultz SE, Lipsitz SR, Sallan SE, Dalton VM, Mone SM, Gelber RD. Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2629–2636.
54. Ewer MS, Lenihan DJ. Left ventricular ejection fraction and cardiotoxicity: is our ear really to the ground? *J Clin Oncol* 2008; 26: 1201–1203.
55. Lester SJ, Tajik AJ, Nishimura RA, et al. Unlocking the mysteries of diastolic function: deciphering the Rosetta Stone 10 years later. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 679–689.
56. Jurcut R, Wildiers H, Ganame J, D’hooge J, Paridaens R, Voigt J-U. Detection and monitoring of cardiotoxicity-what does modern cardiology offer? *Support Care Cancer* 2008; 16: 437-445.
57. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin Cardiomyopathy. *Cardiology* 2010; 115: 155-162.
58. Cardinale D, Colombo A, Lamantia G, et al. Anthracycline-induced cardiomyopathy: clinical relevance and response to pharmacologic therapy. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55: 213–220.
59. Steinherz LJ, Graham T, Hurwitz R, et al. Guidelines for cardiac monitoring of children during and after anthracycline therapy: report of the Cardiology Committee of the Children Cancer Study Group. *Pediatrics* 1992; 89: 942–949.
60. Meinardi MT, Graaf WT, Veldhuisen DJ, et al. Detection of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cancer Treat Rev* 1999; 25: 237–247.
61. Suzuki T, Hayashi D, Yamazaki T, et al. Elevated B-type natriuretic peptide levels after anthracycline administration. *Am Heart J* 1998; 136: 362–363.
62. Panteghini M. The new definition of myocardial infarction and the impact of troponin determination on clinical practice. *Int J Cardiol* 2006; 106:298–306.
63. O’Brien PJ. Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. *Toxicology* 2008; 245: 206–218.
64. Giannitsis E, Katus HA. Troponins and high-sensitivity troponins as markers of necrosis in CAD and heart failure. *Herz* 2009; 34: 600–606.

65. Adamcova M, Sterba M, Simunek, T et al. Troponin as a marker of myocardiac damage in drug-induced cardiotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* 2005; 4: 457–472.
66. Sparano JA, Brown DL, Wolff AC. Predicting cancer therapy-induced cardiotoxicity. The role of troponins and other markers. *Drug Saf* 2002; 25: 301–311.
67. Lipshultz SE, Rifai N, Sallan SE, et al. Predictive value of cardiac troponin T in pediatric patients at risk for myocardial injury. *Circulation*. 1997; 96: 2641-2648.
68. Lipshultz SE, Scully RE, Lipsitz SR, 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. *Lancet Oncol*. 2010; 10: 950-61.
69. Kilickap S, Barista I, Akgul E et al. cTnT can be a useful marker for early detection of anthracycline cardiotoxicity. *Ann Oncol* 2005; 16: 798–804.
70. Goetze JP. Biochemistry of pro-B-type natriuretic peptide-derived peptides: the endocrine heart revisited. *Clin Chem* 2004; 50: 1503–1510.
71. Berliner D, Angermann CE, Ertl G, Stork S. Biomarkers in heart failure – better than history or echocardiography. *Herz* 2009; 24: 581–588.
72. Nousiainen T, Jantunen E, Vanninen E, et al. Acute neurohumoral and cardiovascular effects of idarubicin in leukemia patients. *Eur J Haematol* 1998; 61: 347–353.
73. Hayakawa H, Komada Y, Hirayama M, et al. Plasma levels of natriuretic peptides in relation to doxorubicin-induced cardiotoxicity and cardiac function in children with cancer. *Med Pediatr Oncol* 2001; 37: 4–9.
74. Cardinale D, Colombo A, Lamantia G, et al. Anthracycline-induced cardiomyopathy: clinical relevance and response to pharmacologic therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2010 19; 55: 213-20.
75. Bruns LA, Chrisant MK, Lamour JM, et al. Carvedilol as therapy in pediatric heart failure: an initial multicenter experience. *J Pediatr* 2001; 138: 505–511.
76. Petko C, Minich LL, Everitt MD, Holubkov R, Shaddy RE, Tani LY. Echocardiographic evaluation of children with systemic ventricular dysfunction treated with carvedilol. *Pediatr Cardiol* 2010; 31: 780–784.
77. Takemura G, Fujiwara H: Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis* 2007; 49: 330–352.

78. Arico M, Pedroni E, Nespoli L, Vigano M, Porta F, Burgio GR: Long-term survival after heart transplantation for doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Arch Dis Child* 1991; 66: 985–986.
79. Van Dalen EC, Caron HN, Dickinson HO, Kremer LC. Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; 1:CD003917
80. Asensio-Lopez MC, Sanchez-Mas J, Pascual-Figal DA, et al. Involvement of ferritin heavy chain in the preventive effect of metformin against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine* 2013; 157: 188-200.
81. Siveski-Iliskovic N, Hill M, Chow DA, Singhal PK. Probucol protects against doxorubicin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circulation*. 1995; 91: 10–15.
82. Frishman WH. Carvedilol. *Drug Therapy*. 1998; 339: 1759–1765.
83. Nakamae H, Tsumura K, Terada Y, 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: 2492–2498.
84. Raja SG, Danton MD, MacArthur KJ, Pollock JC. Effects of escalating doses of sildenafil on hemodynamics and gas exchange in children with pulmonary hypertension and congenital cardiac defects. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2007; 21: 203–207.
85. Fischer PW, Salloum F, Das A, Hyder H, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 inhibition with Sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. *Circulation*. 2005; 111: 1601–1610.
86. Li L, Takemura G, Li Y, et al. Preventive effect of erythropoietin on cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Circulation*. 2006; 113: 535–543.
87. Yang JL, Fernandes DJ, Speicher L, Capizzi RL. Biochemical determinants of the cytoprotective effect of amifostine. *Proc Am Cancer Res*. 1995; 36: 3725.
88. Nazeyrollas P, Frances C, Prevost A, et al. Efficiency of amifostine as a protection against doxorubicin toxicity in rats during a 12-day treatment. *Anticancer Res*. 2003; 23: 405–409.

89. Gong L, Goswami S, Giacomini KM, Altman RB, Klein TE. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics* 2012; 22: 820-827.
90. Takane H, Shikata E, Otsubo K, Higuchi S, Ieiri I. Polymorphism in human organic cation transporters and metformin action. *Pharmacogenomics*. 2008; 9: 415–422.
91. Van Staa TP, Patel D, Gallagher AM, de Brui ML. Glucose-lowering agents and the patterns of risk for cancer: a study with the general practice research database and secondary care data. *Diabetologia* 2012; 55: 654–665.
92. Eurich DT, McAlister FA, Blackburn DF, et al. Benefits and harms of antidiabetic agents in patients with diabetes and heart failure: systematic review. *BMJ* 2007; 335: 497.
93. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 2007; 357:1121–1135.
94. Messaoudi SE, Rongen GA, de Boer RA, Riksen NP. The cardioprotective effects of metformin. *Current Opinion in Lipidology* 2011; 22: 445-453.
95. Shackelford DB, Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9: 563–575.
96. Shu Y, Sheardown SA, Brown C, et al. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest*. 2007; 117:1422–1431.
97. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124–1136.
98. Charlon V, Boucher F, Mouhieddine S, de Leiris J. Reduction of myocardial infarct size by metformin in rats submitted to permanent left coronary artery ligation. *Diabetes Metab* 1988; 14: 591–595.
99. Calvert JW, Gundewar S, Jha S, et al. Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling. *Diabetes*. 2008; 57: 696-705.
100. Paiva M, Riksen NP, Davidson SM, et al. Metformin prevents myocardial reperfusion injury by activating the adenosine receptor. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009; 53: 373–378.

101. Ashour AE, Sayed-Ahmed MM, Abd-Allah AR, et al. Metformin rescues the myocardium from doxorubicin-induced energy starvation and mitochondrial damage in rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012; doi 10.1155/2012/434195.
102. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Y.Y.Ü.Veteriner Fakültesi Dergisi* 2008; 2: 73-78.
103. Solskov L, Lofgren B, Kristiansen SB, et al. Metformin induces cardioprotection against ischaemia/reperfusion injury in the rat heart 24 h after administration. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103: 82–87.
104. Sasaki H, Asanuma H, Fujita M, et al. Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase. *Circulation* 2009; 119: 2568–2577.
105. Karagoz B, Suleymanoglu S, Uzun G, et al. Hyperbaric oxygen therapy does not potentiate doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2007; 102: 287-292.
106. Özdoğan K. Sıçanlarda adriyaminin ile oluşturulan kalp iskemisi üzerine karnozinin koruyucu etkisinin incelenmesi. *Fizyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans tezi*.2009
107. Hou XW, Son J, Wang Y, et al. Granulocyte colony-stimulating factor reduces cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Cardiovasc Drug Ther* 2006; 20: 85-91.
108. Hamed S, Barschack I, Loboshits G, et al. Erythropoietin improves myocardial performance in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *European Heart Journal* 2006; 27: 1876-1883.
109. Li Karen, Sung RYT, Huang WZ, et al. Thrombopoietin protects against in vitro and in vivo cardiotoxicity induced by doxorubicin. *Circulation* 2006; 113: 2211-2220.
110. Richard C, Lauzier B, Delemasure S, et al. Effects of angiotensin-1 converting enzyme inhibition on oxidative stress and bradykinin receptor expression during doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008;52: 278-285.
111. Schimmel KJ, Richel DJ, Brink RB, et al. Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev* 2004; 30: 181–91.

112. Migrino RQ, Aggarwal D, Konorev E, Brahmabhatt T, Bright M, Kalyanaraman B. Early detection of doxorubicin cardiomyopathy using two-dimensional strain echocardiography. *Ultrasound Med Biol*. 2008; 34: 208-14.
113. Berctinchant JP, Polge A, Juan JM, et al. Evaluation 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: 39-51.
114. Chen X, Chen Y, Bi Y, et al. Preventive cardioprotection of erythropoietin against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Drug ther* 2007;21: 367-374.
115. Bernardini N, Agen C, Favilla S, Danesi R, Tacca MD. Doxorubicin cardiotoxicity is associated with alterations of plasma levels of atrial natriuretic factor. *J Endocrinol Invest*. 1992;15: 79–84.
116. Chen S, Garami M, Gardner DG. Doxorubicin selectively inhibits brain versus atrial natriuretic peptide gene expression in cultured neonatal rat myocytes. *Hypertension* 1999, 34: 1223-1231.
117. Nakamura T, Ueda Y, Guan Y, et al. Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: in vivo study. *Circulation* 2000; 102: 572-580.
118. Fisher PW, Saloum F, Das A, et al. Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. *Circulation* 2005; 111: 1601-1610.

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Mustafa ARGUN'a ait "Metformin'in Deneysel Rat Modelinde Doksorubisin Kardiyotoksitesine Karşı Kardiyoprotektif Etkisi" adlı çalışma, jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Kardiyoloji Bilim dalında Yandal Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 30.04 / 2014

Başkan : Prof. Dr. Kzım Üzüm

İmza

Üye Prof. Dr. Azmi N. N. N.

Üye : Doç. Dr. Ali B. B.