

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIÇANLARDA ADRIYAMİSİN İLE İN VİVO OLUŞTURULAN
KALP FONKSİYON BOZUKLUĞUNDA RENİN-
ANJİYOTENSİN SİSTEMİNİN ROLÜ**

**Tezi Hazırlayan
Eylem TAŞKIN**

**Tezi Yöneten
Prof.Dr.Nurcan DURSUN**

**Fizyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Kasım 2010
KAYSERİ**

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIÇANLARDA ADRIYAMİSİN İLE İN VİVO OLUŞTURULAN
KALP FONKSİYON BOZUKLUĞUNDA RENİN-
ANJİYOTENSİN SİSTEMİNİN ROLÜ**

**Tezi Hazırlayan
Eylem TAŞKIN**

**Tezi Yöneten
Prof.Dr.Nurcan DURSUN**

**Fizyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Bu Çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TSD-09-733 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Kasım 2010
KAYSERİ**

Prof.Dr.Nurcan DURSUN danışmanlığında **Eylem TAŞKIN** tarafından hazırlanan **“Sıçanlarda Adriyamin ile *in vivo* Oluşturulan Kalp Fonksiyon Bozukluğunda Renin-Anjiyotensin Sisteminin Rolü”** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Fizyoloji** Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

09/11/2010

JÜRİ

İmza

Başkan : Prof.Dr.Deniz ERBAŞ

Üye : Prof.Dr. Cem SÜER

Üye : Prof.Dr. Meral AŞÇIOĞLU

Üye : Prof.Dr.Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ

Üye : Prof.Dr.Nurcan DURSUN

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

TEŞEKKÜR

Uzun ve zorlu doktora çalışmam boyunca engin bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, doktora eğitimimin her aşamasında sabırla yol gösteren, her zaman yanımda olduğunu hissettiren ve destekleyen tez yöneticim kıymetli tez danışmanım Prof. Dr. Sn. Nurcan DURSUN' a,

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini bana aktaran değerli hocalarım Prof. Dr. Sn. Cem SÜER, Prof. Dr. Sn. Sami AYDOĞAN, Prof. Dr. Sn. Meral AŞÇIOĞLU, Prof. Dr. Sn. Asuman GÖLGELİ, Prof. Dr. Sn. Nazan DOLU ve Prof. Dr. Sn. Bekir ÇOKSEVİM' e,

Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Laboratuvarı'nda bulunan Biotek cihazında ölçüm yapmamıza izin veren ve bilgilerini bizimle paylaşan, Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Sn. Mükkerrem Betül YERER-AYCAN' a,

İstatistik analizdeki yardımları için Erciyes Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Üretim Yönetimi ve Pazarlama Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sn. Yunus DURSUN' a

Çalışmamın deneysel ve yazım aşamasında desteklerini benden esirgemeyen Dr. Leyla ŞAHİN' e, Fizyoloji Anabilim Dalı doktora öğrencisi Kalender ÖZDOĞAN' a ve yüksek lisans öğrencisi Elvan KUNDUZ' a

Çalışmanın yazım aşamasındaki katkılarından dolayı ev arkadaşım Dilek BİLDİK' e,

Hayvanlarla ilgili bilgilerini, tecrübelerini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Klinik ve Araştırma Merkezi Veteriner hekimi Sn. Erkut SOMAK' a

Hayatımın her aşamasında bana maddi ve manevi destek olan aileme,

Sonsuz Teşekkürlerimi Sunarım.

SIÇANLARDA ADRIYAMİSİN İLE İN VİVO OLUŞTURULAN KALP FONKSİYON BOZUKLUĞUNDA RENİN-ANJİYOTENSİN SİSTEMİNİN ROLÜ

ÖZET

Adriyamisın (ADR) vücutta reaktif oksijen ürünlerini (ROS) artırır ve bu etkisi ile mitokondriyal fonksiyonları azaltır. Anjiyotensin II (Anj-II) mitokondriyal ROS oluşumunu uyarır. Bu çalışmanın amacı ADR'nin neden olduğu azalmış mitokondri fonksiyonu üzerine anjiyotesin dönüştürücü enzim (ACE) ve renin inhibitörlerinin (kaptopril ve/veya aliskiren) etkilerini araştırmaktır.

Çalışma için her bir grupta 14 sıçan olmak üzere 5 grup oluşturuldu. Kontrol grubuna 8 gün ip ve intragastrik serum fizyolojik uygulandı. Diğer gruplara iki günde bir 4mg/kg ADR intraperitoneyal (ip) uygulandı. İkinci gruba ADR ile birlikte her gün serum fizyolojik intragastrik, üçüncü gruba ADR ile birlikte 10 mg/kg dozunda Kaptopril, dördüncü gruba ADR ile birlikte 50 mg/kg Aliskiren uygulandı. Son gruba ADR, Kaptopril ve Aliskiren aynı dozlarda uygulandı. Aliskiren ve Kaptopril gavajla 7 defa günlük olarak verildi. Enjeksiyon periyodundan sonra, sol ventriküler fonksiyon, EKG ve kan basıncı kaydedildi. Kalpler çıkartılıp homojenize edildi ve mitokondride, sitozolde ve plazmada biyokimyasal ölçümler yapıldı. Mitokondri membran potansiyeli (MMP) ve ATP seviyesi değerlendirildi.

ADR sol ventrikül basınç gelişimini (LVDP), basınç gelişim hızını (+dP/dt) azalttı ve diyastol sonu sol ventrikül basıncını (LVEDP) artırdı. ADR ST'yi uzattı ve ortalama kan basıncını azalttı. ADR; mitokondride, sitozolde ve plazmada oksidatif stresi arttırdı. ADR miyosit mitokondrilerindeki ATP üretimini ve membran potansiyelini azalttı. ADR ile birlikte renin ve ACE inhibitörleri verildiğinde MMP'deki azalma düzeldi. Normal mitokondriyal ATP üretiminin ve membran potansiyelinin etkisiyle, kaptopril ve aliskiren verilen grupların EKG, kan basıncı ve sol ventrikül fonksiyonları kontrol değerlerine yakın sonuçlar elde edilmiştir.

ACE ve renin inhibitörleri ATP üretimini, MMP'yi restore ederek ve in vivo mitokondriyal hasarı önleyerek adriyamisinin kardiyotoksitesinin önlenmesinde karşı etkili olabilir.

Anahtar Kelimeler: Adriyamisın, Anjiyotensin II, Mitokondriyal ATP, Mitokondri membran potansiyeli, Oksidatif stres indeksi.

THE ROLE OF RENIN ANGIOTENSIN SYSTEM ON ADRIAMYCIN INDUCED IN VIVO RAT HEART DYSFUNCTION

ABSTRACT

Adriamycin (ADR) increases the production of reactive oxygen species, which diminishes mitochondrial function. Angiotensin-II stimulates mitochondrial-ROS generation. The aim of the study was to examine whether angiotensin converting enzyme (ACE) or renin inhibitors (captopril and/or aliskiren) protect against ADR-induced mitochondrial function impairment.

Rats were divided into five groups consist of 14 rats each. The control group was treated with normal saline. Adriamycin was administered to the second group at a dose of 4 mg/kg ip every other 2 days. Captopril were administered to the third group at a dose 10 mg/kg plus ADR. Aliskiren was administered to the fourth group at a dose 50 mg/kg plus ADR. Captopril, Aliskiren and ADR were administered to the last group at the same dose. Captopril and aliskiren were gavage administration daily for 8 times. Left ventricular function, ECG variables and blood pressure were assessed at the end of treatment period. The hearts were homogenized and biochemical measurements were made in mitochondria, cytosol and plasma. Mitochondria membrane potential (MMP), ATP levels were determined.

ADR decreased in the left ventricular developed pressure (LVDP), the maximal rate of rise of pressure (+dP/dt), and increased in the left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP). ADR increased ST interval and decreased mean blood pressure. ADR increased oxidative stress in mitochondrial, cytosolic and plasma. ADR decreased MMP and ATP level in myocyte mitochondria. ADR co-administration with renin and ACE inhibitors improved the dissipation of MMP. The decreased in ATP level was restored by treatment with inhibitors of ACE and renin. By maintaining normal levels of mitochondrial MMP and ATP, captopril and aliskiren treatment prevented the pathologic changes in ECG, blood pressure and left ventricular function.

We concluded that inhibitors of ACE and renin are effective against ADR cardiotoxicity via the restoration of MMP and ATP production and prevention of mitochondrial damage in vivo.

Keywords: Adriamycin, Angiotensin II, Mitochondrial ATP, Mitochondrial membrane potential, Oxidative stress index.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK	I
KABUL VE ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VI
KISALTMALAR	VIII
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	X
 1. GİRİŞ VE AMAÇ	 1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. ANTRASİKLİNLER	3
2.2. ADRIYAMİSİN	5
2.2.1. Adriyamisinin Farmakokinetiği	6
2.2.2. Adriyamisinin Antitümör Aktivitesi.....	7
2.2.3. Adriyamisinin Kardiyotoksitesinin Tipleri, İnsidansı ve Risk Faktörleri .	7
2.2.4. Adriyamisinin Kalp Fonksiyonlarına Etkisi.....	8
2.2.5. Adriyamisinin Kalp Yapısına Etkisi.....	9
2.2.6. Adriyamisinin Hücre İçi Etkisi.....	10
2.2.6.1. Adriyamisinin Mitokondriye Etkisi.....	10
2.2.6.2. Adriyamisinin Sarkoplazmik Retikulum Etkisi.....	11
2.2.7. Adriyamisinin Neden Olduğu Kalp Yetmezliğinin	
Moleküler Patofizyolojisi.....	11
2.2.7.1. Adriyamisinin Neden Olduğu Kalp Yetmezliğinin Oksidatif Stres	
ile İlişkisi.....	13
2.2.7.2. Adriyamisinin Neden Olduğu Kalp Yetmezliği,	
Apoptozis ve İlişkisi.....	17
2.2.7.2.1. Adriyamisinin Neden Olduğu Apoptoziste p53'ün, Bcl-2	
Protein Ailesinin ve Kaspazların Rolü	18
2.3. RENİN ANJİYOTENSİN SİSTEMİ.....	21
2.3.1. Kalbin Lokal Renin Anjiyotensin Sisteminin Elemanları.....	22
2.3.1.1. Renin.....	23
2.3.1.2. Prorenin ve renin reseptörleri.....	23
2.3.1.3. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim.....	25
2.3.1.4. Kimaz	26
2.3.1.5. Anjiyotensinojen, Anjiyotensin I ve Anjiyotensin II.....	26
2.3.1.6. Anjiyotensin Reseptörleri.....	27
2.3.2. Kalbin Lokal Renin Anjiyotensin Sisteminin Fonksiyonları.....	27
2.3.2.1. Kalbin Lokal Renin Anjiyotensin Sisteminin İnotropik Etkisi.....	27

2.3.2.2. Kalbin Lokal Renin Anjiyotensin Sisteminin Hipertrofik Etkisi	28
2.3.2.3 Kalbin Lokal Renin Anjiyotensin Sisteminin Mekaniksel Gerilime Etkisi.....	29
2.3.2.4. Kalbin Lokal Renin Anjiyotensin Sisteminin “Remodelling”e Etkisi.....	29
2.3.2.5 Kalbin Lokal Renin Anjiyotensin Sisteminin Apoptozise Etkisi	30
2.3.3. Anjiyotensin II, Oksidatif Stres ve Mitokondri ilişkisi.....	30
3.GEREÇ ve YÖNTEM.....	34
3.1. DENEY GRUPLARI.....	34
3.2. EKG KAYDI VE KALP FONKSİYONLARININ ÖLÇÜMÜ.....	36
3.3. ARTERYAL KAN BASINCININ ÖLÇÜMÜ.....	39
3.4. KARDİYOMİYOSİT MİTOKONDRİLERİNİN VE SİTOZOLÜNÜN İZOLASYONU.....	40
3.5. KARDİYOMİYOSİT MİTOKONDRİ MEMBRAN POTANSİYELİNİN ÖLÇÜMÜ.....	40
3.6. KARDİYOMİYOSİT MİTOKONDRİSİNDE ATP MİKTARININ ÖLÇÜMÜ.....	41
3.7. BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER.....	41
3.7.1. Total Oksidan Seviyenin Ölçümü.....	41
3.7.2. Total Antioksidan Seviyenin Ölçümü.....	42
3.7.3 Oksidatif Stres İndeksinin Hesaplanması.....	42
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. GRUPLARIN VÜCUT VE KALP AĞIRLIKLARI DEĞİŞİMİ.....	44
4.2. GRUPLARIN EKG’SİNİN VE KALP FONKSİYONLARININ DEĞİŞİMİ.....	45
4.3. GRUPLARIN ARTERYAL KAN BASINCINDAKİ VE KALP ATIM HIZINDAKİ DEĞİŞİM.....	47
4.4. BİYOKİMYASAL ÖLÇÜM DEĞİŞİMLERİ	48
4.4.1. Grupların Total Oksidan Seviyesindeki Değişim.....	48
4.4.2. Grupların Total Antioksidan Seviyesindeki Değişim.....	49
4.4.3. Grupların Oksidatif Stres İndeksindeki Değişim.....	49
4.5. GRUPLARIN MİTOKONDRİ MEMBRAN POTANSİYELİNDEKİ DEĞİŞİM	52
4.6. GRUPLARIN MİTOKONDRİLERİNDE ATP MİKTARININ DEĞİŞİMİ.....	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	54
6. KAYNAKLAR	69
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

- dP/dt	: Basınç bozulmuş hızı
+dP/dt	:Basınç gelişim hızı
8-OHdG	:8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
ACE	:Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ADR	:Adriyamin
AL	:Aliskiren
Anj-I	:Anjiyotensin I
Anj-II	:Anjiyotensin II
AOGEN	:Anjiyotensinojen
ANT	:Adenin nükleotid translokaz
AT1	:Anjiyotensinin tip 1 reseptörü
AT2	:Anjiyotensinin tip 2 reseptörü
ATP	:Adenin trifosfat
Ca²⁺	:Kalsiyum
CAD	:Kaspazla aktive olan DNaz
cTnT	:Kardiyak troponin T
CuZn-SOD	:Bakır çinko süperoksit dismutaz
DNA	:Deoksiribonükleik asit
DNR	:Daunorubisin
EKG	:Elektrokardiyografi
EKO	:Elektrokardiyografi
EPI	:Epirubisin
eNOS	:Endotelial nitrik oksit sentaz
Fe²⁺	:Ferro
Fe³⁺	:Ferri
GSH	:Redükte glutatyon
GSH-Px	:Glutatyon peroksidaz
H₂O₂	:Hidrojen peroksit
HO[·]	:Hidroksil radikali
iNOS	:İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
ip	:İntraperitoniyal
JC-1	:5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethyl benzimidazolyl carbocyanine iodide
KAP	:Kaptopril

KAS	:Kaspaz
LVDP	:Sol ventrikül basınç gelişimi
LVEDP	:Sol ventrikül diyastol sonu basıncı
LVSP	:Sol ventrikül sistolik basıncı
M6P	:Mannoz-6-fosfat reseptörleri
MAO	:Monoaminoksidaz
MAPK	:Mitojenle-aktive olan protein kinazı
MDA	:Malondialdehit
MMP	:Mitokondri membran potansiyeli
Mn-SOD	:Mangan süperoksit dismutaz
mPTP	:Mitokondriyal permeabilite geçiş porları
mtK_{ATP}	:Mitokondriyal ATP-duyarlı potasyum kanalları
mtROS	:Mitokondriyal reaktif oksijen türleri
NFκB	: Nükleer faktör kappa B
NO	:Nitrik oksit
O₂^{•-}	:Süperoksit radikali
OSI	:Oksidatif stres indeksi
PARP	:Poli ADP-riboz polimeraz
RAS	:Renin anjiyotensin sisteminin
RNA	:Ribonükleik asit
ROS	:Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	:Real-time reverse-transcriptase
SERCA	:Sarkoplazmik retikulum kalsiyum pompası
SR	:Sarkoplazmik retikulum
TAS	:Total antioksidan seviye
TGF-β	:Transforme edici büyüme faktörü-β
TNF- α	:Tümör nekroz faktör-α reseptörü
TOS	:Total oksidan seviye
TRAIL	:TNF- α ile ilişkili apoptozisi başlatıcı ligand
VDAC	:Voltaja duyarlı anyon kanalı

TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

Sayfa no

Tablo 4.1. ADR ile tedavi edilen sıçanların vücut ve kalp ağırlıkları üzerine renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin etkisi.	45
Tablo 4.2. ADR ile tedavi edilen sıçanların EKG parametreleri üzerine renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin etkisi.	46
Şekil 2.1. Adriyaminin (ADR) nin, daunorubisin (DNR), epirubisinin (EPI) ve idarubisinin (IDA) kimyasal yapıları.	5
Şekil 2.2. Antrasiklinlerin kardiyotoksik etki mekanizmasını açıklayan şematik şekil.	12
Şekil 2.3. Adriyaminin kuinonun redoks döngüsü ile reaktif oksijen ürünlerini oluşturması.	14
Şekil 2.4. Adriyaminin-Fe kompleksinin ROS oluşturma mekanizması.	15
Şekil 2.5. Sistemik renin anjiyotensin sistemi.	22
Şekil 2.6. Kalpteki renin anjiyotensin sistem.	25
Şekil 2.7. Mitokondriyal geçiş porlarının oksidasyon ile açılması.	32
Şekil 2.8. Anjiyotensin II'nin NADP oksidaz kaynaklı sitozolik reaktif oksijen ürünleri ile mitokondriyal reaktif oksijen ürünlerini oluşturma mekanizması.	33
Şekil 3.1. Deney protokolü.	35
Şekil 3.2. Sadece adriyamin verilen grubuna (ADR) ait bir deney kaydı.	38
Şekil 3.3. Oksidatif stres indeksi şekli.	42
Şekil 4.1. ADR ile tedavi edilen sıçanların sol ventrikül basınçları (A) ve hızları (B) üzerine renin ve anjiyotensin enzim inhibitörlerinin etkisi.	47
Şekil 4.2. ADR ile tedavi edilen sıçanların kan basınçları (A) ve kalp atım hızları (B) üzerine renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin etkisi.	48
Şekil 4.3. ADR ile tedavi edilen sıçanların total oksidan (A), antioksidan seviyeleri (B) ve oksidatif stres indeksleri (C) üzerine renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin etkisi.	51
Şekil 4.4. ADR ile tedavi edilen sıçanların miyosit mitokondri membran potansiyeli üzerine renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin etkisi.	52
Şekil 4.5. ADR ile tedavi edilen sıçanların miyosit ATP üretimi üzerine renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin etkisi.	53
Resim 3.1. Ventrikül ve kan basıncı kaydı alma işlemleri.	37
Resim 3.2. Kan basıncı kaydı için <i>A.femoralis</i> 'e "tübing" yerleştirilmiş bir deney hayvanı.	39

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Adriyamisın (ADR) çeşitli tümörlerin tedavisinde kullanılan çok etkili bir antineoplastik antibiyotiktir. Klinikte akut ve kronik olarak sınıflandırılan kardiyotoksik etkileri nedeniyle tümör tedavisinde kullanımı sınırlıdır. Kardiyotoksik etkisi doza bağımlı olarak meydana gelmekte, kardiyomiyopati ve konjestif kalp yetmezliğine neden olmaktadır. Adriyamisinin neden olduğu kalp yetmezliğinde serbest oksijen radikallerinin, miyosit apoptozisinin, mitokondri fonksiyon bozukluğunun meydana gelmesinde rolünün olabileceği bilinmesine rağmen, kalp yetmezliğinin oluşmasına neden olan mekanizmalar günümüzde hala tam olarak aydınlatılamamıştır (1). Sıçanlarda, adriyamisın kaynaklı kalp yetmezliğinde anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri ile yapılan bir çalışmada kardiyak fonksiyon bozukluğunda iyileşme ve mortalite oranında düşme gözlenmiştir (2). Bu sonuçlar ADR kaynaklı kalp yetmezliğinin gelişmesinde anjiyotensin II'nin (Anj-II) önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Günümüzde renin anjiyotensin sisteminin (RAS) kardiyak hipertrofi, yetmezlik, reperfüzyon hasarı gibi patolojik olaylarda önemli rol oynadığına dair kanıtlar artmaktadır. Bu sistemin baskılanması kalpte meydana gelen “remodelling” olayını, hipertrofiyi, yetmezliği ve reperfüzyon aritmisini azaltığı hem deneysel modellerde hem de insan çalışmalarında gösterilmiştir. Renin anjiyotensin sisteminin sistemik ve yerel (doku) olmak üzere iki ayrı bölümü bulunur. Renin anjiyotensin sisteminin komponentleri otokrin/parakrin kardiyak doku RAS'ını oluşturmaktadır. Anj-II'nin reseptörleri kardiyomiyositlerde ve kardiyak fibroblastlarda bulunur (3). Anj-II'nin

NADPH oksidaza bağlı yoldan reaktif oksijen ürünlerini oluşturduğuna dair kanıtlar artmaktadır (4).

Bu gerekçe ile çalışmamızda bir çok kardiyovasküler hastalığın tedavisinde kullanılan renin ve ACE inhibitörlerinin günümüzde kanser tedavisinde kullanılan antrasiklin antibiyotiklerinden adriyamisin ile birlikte kullanıldığında kalp fonksiyonu, oksidatif stres, mitokondri membran potansiyeli ve ATP üretim miktarı üzerine etkileri araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

Kalp yetmezliği, kalbin yapısal veya fonksiyonel bozukluğundan kaynaklanan, dolum veya pompa fonksiyonlarındaki bozulmayı izleyen yorgunluk, nefes darlığı (ileri evrelerde dinlenme halinde), ortopne, paroksizmal nokturnal dispne, nokturi, mental durum değişiklikleri, anoreksi ve abdominal ağrı ile karakterize olabilen kompleks klinik bir sendromdur.

Kalp yetmezliğinin asıl nedeni sol ventrikül fonksiyonlarındaki bozulmadır. Sol ventrikülün sistolik ya da diyastolik fonksiyonlarındaki bozukluk, kalp yetmezliğine neden olabilir. Diyastolik fonksiyon bozukluğundaki sorun sol ventrikül doluşu ile ilgilidir. Sol ventrikül boyutu normaldir, ancak diyastol sonu basınç artmıştır. Sistolik disfonksiyonda ise sol ventrikül genellikle dilate olmuş ve duvar hareketleri azalmıştır (5).

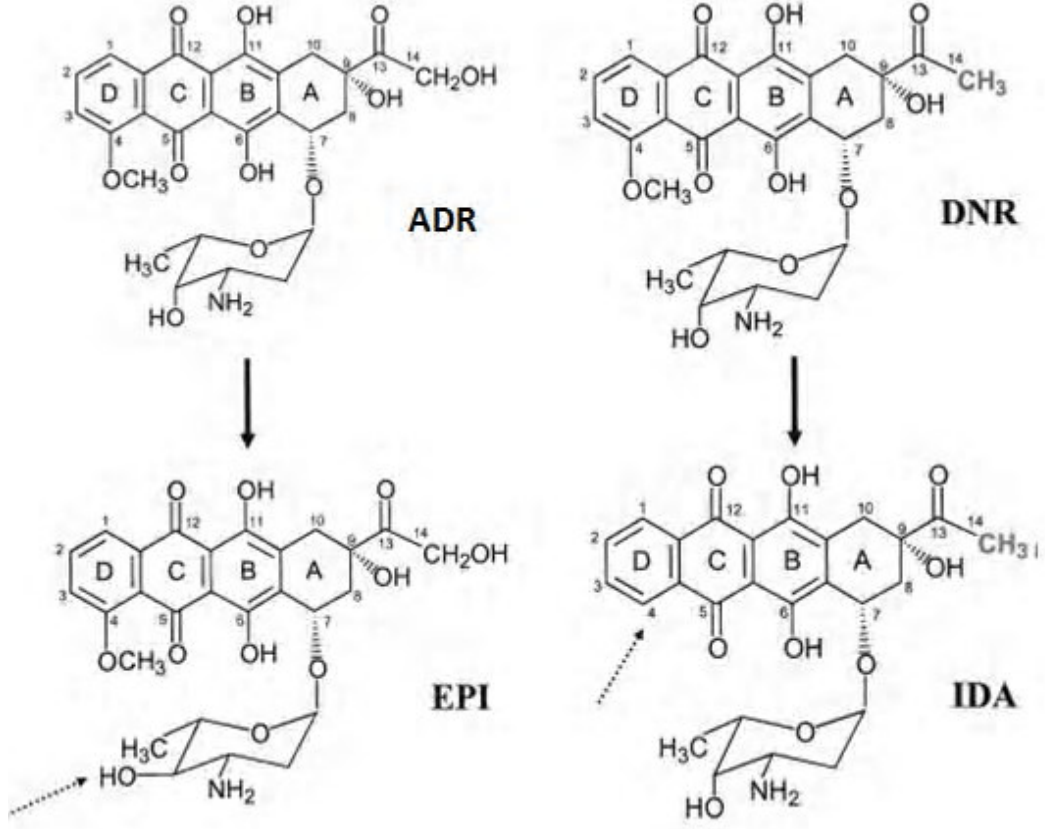
Çocukluk çağı kanserlerinin tedavisinde önemli rol oynayan antrasiklin grubu ilaç uygulanmış hastalar, uygulanan ilaca bağlı kalp yetmezliği ile sonuçlanan kardiyotoksik yan etki nedeniyle risk altındadırlar (1).

2.1. ANTRASİKLİNLER

Antineoplastik antibiyotiklerden antrasiklinler, kanser tedavisinde yaygın kullanılan ilaçlar arasında yer almaktadır. Çocukluk çağı kanseri tedavisinde antrasiklin almış

kişilerde, 5 yıllık sağ kalım oranı 1960'larda yaklaşık %30 iken, günümüzde bu oran %70-80'lere kadar çıkmıştır (6).

İlk antrasiklinler olan daunorubisin (rubidomisin ya da daunomisin) ve adriyamisin (doksorubisin), *Actinobacteria* türü olan *Streptomyces peucetius*'dan 1960'larda izole edilmiştir. Bu iki antrasiklinin fizikokimyasal yapısı birbirine benzese de biyolojik aktiviteleri ve metabolizmaları açısından bazı farklılıklar vardır. Adriyamisin ve daunorubisin kimyasal yapılarında aglikan ve şeker içerir. Aglikan tetrasiklik halkadan (A-D) oluşur ve C-B halkalarında kuinon-hidrokuinon, D halkasında C4'de metoksi ve C13'de karbonil ile C9'da kısa bir yan zincirden oluşur. Yapılarında daunozaamin adlı bir şeker bulunur ve A halkasındaki C7'e glikozit bağı ile bağlanmıştır (7). Adriyamisin ve daunorubisin arasındaki tek fark, ADR'nin yan zincirinin primer bir alkolle sonlanmasıdır. Daunorubisin yan zinciri ise bir metil ile sonlanır (Şekil 2.1). Bu küçük farklılık ADR ve daunorubisin arasında aktivite spektrumunu açısından önemli farklılıklar göstermelerine neden olur. Daunorubisin akut lenfoblastik ve miyeloblastik lösemiye karşı çok etkili iken, ADR birçok yumuşak doku ve hematolojik tümörleri içeren çok daha geniş bir antikanser spektruma sahiptir. Bununla beraber terapötik kullanımları yan etkileri nedeniyle sınırlıdır. İstenmeyen bu yan etkileri engellemek amacıyla belirlenen maksimum toplam doz, daunorubisin için 500 mg/m^2 , ADR için $450\text{-}600 \text{ mg/m}^2$ 'dir. 40 yıllık bir geçmişe sahip olmasına rağmen, antrasiklinler halen klinikte en sık kullanılan antikanserojen ilaçlardır (7).



Şekil 2.1. Adriyamisin (ADR), daunorubisin (DNR), epirubisinin (EPI) ve idarubisin (IDA) kimyasal yapıları. Gri işaretli residüler ADR veya EPI ile karşılaştırıldığında alkol yerine metil ile sonlanan DNR ve IDA'nın yan zincirlerini gösteriyor. Noktalı oklar ADR ile karşılaştırıldığında EPI'nin veya DNR ile karşılaştırıldığında IDA'da ki yapısal modifikasyonları gösteriyor (7).

Yüzlerce antrasiklin türevi geliştirilmiş ve test edilmiş olmasına rağmen, sadece birkaç tanesi klinik kullanım için uygundur. Özellikle epirubisin ve idarubisin bazı açılardan daunorubisin ve ADR yerine alternatif olarak kullanılmaktadır. Epirubisin, daunozaminin C4'de hidroksil grubunun ekvatoryal eksene epimerizasyonu ile oluşan yarı sentetik ADR türevidir. İdarubisin D halkasında 4-metoksi grubunun çıkartılması ile oluşan daunorubisin türevidir (Şekil 2.1). İki türevin de antitümör etkisi daha zayıftır ve maalesef kardiyotoksik etkisi beklenilenden fazladır (7-8).

2.2. ADRIYAMİSİN

Adriyamisin, epirubisin gibi antrasiklinler, 1960'lardan itibaren çeşitli hematolojik ve solid tümörlerin tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Fakat konjestif kalp yetmezliği ile sonuçlanabilen kardiyotoksik etkisi terapötik kullanımını sınırlamaktadır. Kardiyotoksiste, antrasiklin uygulamasından kısa bir süre sonra veya yıllar sonra da

ortaya çıkabilir (9). Sorunun büyüklüğü, antrasiklin içeren kemoterapi uygulaması ile kanseri yenen kişilerin sayısındaki artışın bir sonucu olarak artmaktadır (10).

Preklinik çalışmalardan önce daunorubisin ve ADR'nin kardiyotoksik etkileri, klinik değerlendirmeler sırasında fark edilmiştir. 1970'lerin sonunda ilk klinik çalışmalar yayınlanmış ve bu çalışmalar ile daunorubisin ve ADR'nin kardiyak hasara yol açtığı belgelenmiştir. Aynı zamanda bu çalışmalar ile kardiyotoksisite riskini artıran esas faktörün, toplam uygulanan ADR dozuna bağlı olduğuna karar verilmiştir (11-12).

Adriyaminin klinik olarak genellikle 3-4 haftada, aralıklı olarak 40-75 mg/m² lik bir dozda devamlı infüzyonla verilir. Hastalara verilen ilacın toplam dozu, vücut yüzey alanının m²'sine düşen miktar 550 mg'ı aştığı durumlarda hastaya ADR verilmesi sonlandırılır. Bu toplam doz üzerindeki değerler, klinik kardiyotoksisite riskinde önemli bir artış yapar, konjestif kalp yetmezliğine ve ölüme neden olur. Vücut yüzey alanının m²'sine 500 mg'dan daha yüksek kümülatif dozda ADR uygulanan hastaların %20'sinden fazlasında kalp yetmezliğinin geliştiği tahmin edilmektedir (13). Lefrak ve ark. 550 mg/m² den daha yukarı kümülatif dozlarda ADR ile tedavi edilen hastaların %30'unda konjestif kalp yetmezliğinin geliştiğini rapor etmişlerdir (14). Von Hoff ve ark. 550 mg/m² altında bir kümülatif doz uygulanmasının ADR kaynaklı konjestif kalp yetmezliği riskinin % 10'dan daha az olduğunu, riskin bu doz üzerindeki uygulamalarda artış gösterdiğini bildirilmiştir (11). Bu bulgular, m² ye 550 mg ADR uygulamanın maksimum güvenli kümülatif doz olabileceğini düşündürmektedir. Kardiyotoksisitesi daha az ADR analogu olan epirubisin için, karşılaştırılabilir bir eşik tanımlanmamıştır, fakat 900-1000 mg/m² olarak kabul edilir (8).

Adriyaminin verilen kişilerde, çeşitli taşikardiler, T dalga düzleşmesi, QT uzaması, R dalga voltajında azalma gibi anormal EKG kaydedilmiştir (15). Adriyaminin verilen kişilerin ekokardiyografik analizlerinde, sistolik ve diyastolik sol ventrikül fonksiyonlarının azaldığı ve buna bağlı olarak sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunun azaldığı görülür. Azalan ejeksiyon fraksiyonu sol ventrikül diyastol sonu basıncını artırır (16). Adriyaminin, miyofibril kaybı, sarkoplazmik retikulumda şişme ve sitoplazma da vakuolizasyon gibi histomorfolojik değişikliklere neden olur (15).

2.2.1. Adriyaminin Farmakokinetiği

Adriyaminin plazma doruk konsantrasyonu 5-15 µmol/L arasındadır ve yarılanma ömrü 20-30 saattir (17). Adriyaminin vücutta en fazla karaciğerde metabolize edilir.

Adriyamisinin büyük bir bölümü feçesle, daha az bir bölümü idrarla atılır. Kalpte ADR önemli miktarda metabolize edilmez. Ama ADR'nin alkol türevleri kalp dokusunda birikim gösterir. (18). Ayrıca yapılan çalışmalarda ADR'nin mitokondrilerde ve nükleuslarda biriktiği gösterilmiştir (19).

2.2.2. Adriyamisinin Antitümör Aktivitesi

Klinikte yaygın kullanımlarına rağmen, ADR'nin antineoplastik etki mekanizması halen tartışma konusudur. Adriyamisinin antitümör etkisini açıklayan birkaç mekanizma vardır (7). Adriyamisin, DNA zincirlerindeki baz çiftleri arasına bağlanır, hızlı büyüyen kanser hücrelerinin replikasyonunu engeller ve böylece anti kanser etki meydana gelir. Günümüzde, topoizomerez II inhibisyonunun ADR'nin primer sitotoksik mekanizması olduğu kabul edilmektedir. Antrasiklinler “topoizomerez zehir” olarak da bilinir. Süper sarmal DNA oluşumundaki başarısızlık, DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu bloklar. Ayrıca DNA zincirindeki kırıklar kanserli hücrelerin apoptozunu p53'e bağımlı yolak üzerinden başlatabilir. Bazı çalışmalar reaktif oksijen türleri (ROS) ve lipid peroksidasyon oluşumunun, ADR sitotoksitesine katkı sağladığını belirtmesine rağmen, son yapılan araştırmalar bu görüşü desteklememektedir. Genel kabul gören görüş, oksidatif stresin ADR'nin antitümör aktivitesine önemli katkı sağlamadığı şeklindedir (1,7). Spesifik mekanizması ne olursa olsun ADR, DNA, RNA ve protein sentezini tamamiyle inhibe etmekte, hücre siklusunun S fazındaki proliferasyonu durdurmaktadır (13).

2.2.3. Adriyamisinin kardiyotoksitesinin tipleri, insidansı ve risk faktörleri

Adriyamisinin bilinen 4 tip kardiyotoksik etkisi vardır. Bunlar:

1. **Akut kardiyotoksik etki:** Adriyamisin uygulanması sürecinde ya da uygulama biter bitmez görülen etkilerdir. Bolus ya da hızlı intravenöz infüzyon gibi ilaç uygulaması ile meydana gelen vazodilatasyon, hipotansiyon ve geçici kardiyak aritmileri tanımlar.
2. **Subkronik kardiyotoksik etki:** Nadiren görülür. Adriyamisin tedavisi başlamasından itibaren bir-üç gün içerisinde perikarditis, miyokarditis olarak kendini gösteren etkilerdir. Yüksek doz Adriyamisin verilen uygulamalarda görülme sıklığı artmaktadır.

3. **Erken kronik kardiyotoksik etki:** Bu etkiler uygulama evresinden daha sonra ya da kemoterapinin bitiminden haftalar, aylar sonra ortaya çıkar. Etki, sol ventrikül sistolik disfonksiyonu ve konjestif kalp yetmezliğini içeren dilate kardiyomiyopati ile karakterizedir. Histopatolojik incelemelerde, miyosit mitokondrisinde ve sarkoplazmik retikulumda şişme, sitoplazmik vakuolizasyon artışı, miyofibrillerde dağılma ve kayıp görülür(20).
4. **Gecikmiş tip kardiyotoksik etki:** Diğer bir adı ise “geç başlayan kronik etki”dir. Bu tip, 1990’ların başında çocukluk çağı kanserlerinden kurtulanlar arasında tanımlanmıştır. Günümüzde, antikanser tedavinin tamamlanmasından yıllar sonra bile Adriyaminin kardiyotoksik etkisinin ortaya çıkabileceği bilinmektedir (1).

Akut kardiyotoksik etki, infüzyonun bitiminden kısa bir süre sonra ortadan kalktığı için önemli klinik problem teşkil etmez. Kronik tip toksisite uzun süre terapi gerektirdiği, mortalite ve morbiditeyi etkilediği için ciddi ve önemli klinik problem oluşturmaktadır. Kemoterapiden haftalar ve aylar sonra kronik kardiyotoksitenin ve konjestif kalp yetmezliğinin görülme sıklığı %1-16’dır. Von Hoff ve ark.’larının 1979 da yaptıkları bir çalışmada, 550 mg/m² kümülatif doz uygulamasından sonra hastaların %7’sinde ADR-ilişkili konjestif kalp yetmezliğinin meydana geldiği belirtilmiştir (11). Bu doz sonraki yıllarda ADR ve daunomisin için yüksek doz olarak kabul edilmiştir. Swan ve ark. tarafından 2003 de yapılan araştırmaya göre, 550 mg/m² kümülatif doz uygulamasından sonra hastaların %26’sında ADR-ilişkili konjestif kalp yetmezliği gelişmiştir (21). 2006 yılında çocukluk çağı kanserinden kurtulanlar arasında yapılan retrospektif bir analiz, beklenen değerler ile karşılaştırıldığında, kalp yetmezliğinin 15 kat, diğer kardiyovasküler hastalıkların tahmin edilenden 10 kat ve inmenin 9 kat daha yüksek oranda olduğunu göstermiştir (22). Kümülatif doza ek olarak kardiyotoksitenin ortaya çıkmasında önemli diğer risk faktörleri ise hastanın yaşı, beraberinde toksisiteyi artırabilecek başka kemoterapotik ilaç kullanması, mediastinal ışın tedavisi, hastanın anemnezinde kardiyak hastalık bulunmasıdır (1,15).

2.2.4. Adriyaminin Kalp Fonksiyonlarına Etkisi

Fare, sıçan, tavşan ve köpeklere ADR enjeksiyonu ile kardiyotoksisite oluşturulabilir (23). Sıçanlarda ADR enjeksiyonu sonrası birkaç saat içerisinde kardiyak debide %42’lik, sol ventrikül pik sistolik basıncında %36’lık azalma görülmüştür (24). Çoklu

ADR enjeksiyon sonrası (ilk 8 hafta 1mg/kg/hafta, sonra 2 haftada bir 1mg/kg/8 hafta) sistolik ve diyastolik sol ventrikül fonksiyonların ilerleyen şekilde azaldığı belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada 16 haftalık ADR tedavisinin, sistolik dP/dt de %25'lik, kardiyak indeksde %40'lık bir azalmaya, sol ventrikül diyastol sonu basınç da %250'lik bir artışa neden olduğu ifade edilmiştir (25). Adriyaminin kaynaklı kardiyotoksikite belirtileri ilk önce diyastolik fonksiyonlarda görülmesine rağmen; yüksek doz ADR, hem sistolik hem de diyastolik fonksiyon bozukluğuna neden olur. Ayrıca bazen ADR verilen hayvanlarda, kardiyak ritim bozukluğu da gözlenmiştir (26).

2.2.5. Adriyaminin Kalp Yapısına Etkisi

Kardiyomiyositlerin sayıca azalması, ADR verilmiş hastalarda yapılan otopsi sonucunda belirlenmiştir (14). Yapısal değişiklikler dozla ilişkili olduğu kadar zamanlada ilişkilidir. Bu yapısal değişiklikler, ADR verilmesinden aylar sonra bile meydana gelebilir (27). Hastalarda ADR verilmesinden sonra meydana gelen ilk değişiklik sarkoplazmik vakuolizasyondur, bu değişiklik miyosit tübüler sistemdeki şişme nedeniyle meydana gelir (28). Sonuç olarak, vakuolar dejenerasyon sitoplazmada geniş bir alana yayılır; miyofibril ve diğer yapıların hasarlanmasına neden olur. Mitokondriyal vakuolizasyon, şişme ve krista bozulması da tanımlanmıştır (29). Hastalardan alınan biyopsiler, patolojik hasarın ilerleyici olduğunu ve elektron mikroskopu görüntülerinde gözlenen değişikliklere göre derecelendirilebileceğini göstermiştir. Billingham ve ark'larına göre bu değişiklikler 0 ile 3 arasında derecelendirilir (30). 0, değişiklik yok anlamına gelirken; 1, miyofibriller kayıp ya da sarkoplazmik retikulumda şişme gibi hafif derecede hücresel hasarı tanımlar. 2, kontraktıl elemanların kaybı ve sitoplazmik vakuolizasyon gibi hücre gruplarının etkilendiğini belirtir. 3, total kontraktıl eleman veya organel kaybı, mitokondriyal ve nükleer dejenerasyon gibi önemli hücresel hasarları tanımlar.

Erken ve geç kardiyak morfolojik değişiklikler birçok çalışmada araştırılmıştır (31). Fokal krista topaklanması (clumping), matriks yoğunlaşması veya şişmesi ve nükleolar ayrılma gibi mitokondriyal hasarlar, farelere ADR verildikten sonraki 24 saat içinde gözlenebilir (32). Adriyamin enjeksiyonundan 1-3 ay sonra mitokondriyal hasar gözlenmezken, birçok kardiyomiyositte sarkoplazmik vakuolizasyon, miyofibril kayıpları, sarkomerler ve interkale disklerde hasar gelişmektedir (33). Tek ve çoklu ADR dozu verilen farelerin histopatolojik bulguları neredeyse aynıdır (33).

Histopatolojik bulgular ADR'ye bağı kardiyotoksisite belirleyicisi olarak kullanılmaktadır, ancak kardiyak fonksiyon bozukluğunun şiddeti ile her zaman örtüşmediği bildirilmiştir (34). Histopatolojik hasarın Adriyamisinin oluşturduğu ROS sonucu olduğu düşünülmektedir. Antioksidan olan probukol (35), iyon şelatörü olan deksrazoksan ile birlikte ADR verilen (36) ya da katalaz (37), manganez süperoksit dismutaz (38) veya metallotionin (39) gibi ekzojen antioksidanların aşırı eksprese edildiği transgenik hayvanlarda ADR'nin yaptığı hasarın az olması bu görüşü desteklemektedir.

2.2.6. Adriyamisinin Hücre İçi Etkisi

Ultra yapısal değişikliklere ek olarak, ADR verilen hayvan kalplerinde sarkoplazmik retikulum ve mitokondri fonksiyon bozukluğu da görülür. Sarkoplazmik retikulum (SR) kalsiyumu depolar ve salgılar. SR fonksiyon bozukluğu, kardiyak disfonksiyonun belirgin nedenlerindendir. Mitokondri oksidatif fosforilasyon ile ATP sentezinin yapıldığı enerji merkezidir. Bu organallerde bir hasar meydana gelirse, kardiyak kontraktıl fonksiyon bozukluğuna neden olur.

2.2.6.1. Adriyamisinin Mitokondriye Etkisi

Adriyamisinin neden olduğu mitokondriyal fonksiyon bozuklukları kardiyotoksisitenin meydana gelmesinde önemli paya sahiptir. 4 ya da 8 hafta ADR uygulanan sıçanların kalplerinden mitokondriler izole edildiğinde, kristada hasar, şişme ve Ca^{+2} depolama kapasitesinde azalma görülmüştür (40). Adriyamis, ayrıca izole mitokondrilerde doz bağımlı olarak solunumu da inhibe ettiği belirtilmiştir (41). Mitokondri fonksiyonunda görülen bu hasar adenin nükleotid translokaz-1 (ANT-1) proteinin down regülasyonu ile ilişkilidir. ANT-1, mitokondri iç membranında bulunan aerobik enerji metabolizmasında ve kardiyomiyositlerde mitokondriyal membran por transmisyonunun (mPTP) düzenlenmesinde önemli rol oynayan proteindir (42).

Adriyamis ayrıca mitokondri için çok önemli bazı enzimleri kodlayan kardiyak mitokondriyal DNA'da hasar yapar. Yapılan çalışmalarda ADR, mitokondriyal DNA heliksinde kırıklıklara neden olduğu ve mitokondriyal DNA sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (43). Kronik ADR uygulanan fare ya da sıçan kalplerinde, mitokondriyal DNA delesyonlarının da meydana gelebileceği belirtilmektedir (44). Mitokondriyal delesyonların insidansı doza ve ADR'nin verilme süresi ile ilişkili olarak artmaktadır. Adriyamis ile antioksidan enzim olan Q10'nun birlikte verilmesi durumunda

mitokondriyal DNA delesyonlarının azalması, DNA delesyonlarının ROS ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (45). Reaktif oksijen ürünlerinin DNA'da yaptığı hasar ürünlerinden en sık karşılaşılan ve mutajenitesi en iyi bilinen 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG)'dir. Bu ürün, normal oksidatif metabolizma sırasında üretilen endojen veya ekzojen kaynaklı ROS tarafından DNA'da şekillenen bir mutajendir. OH radikali, guaninin 4, 5 ve 8. pozisyonlarındaki karbon atomları ile reaksiyona girer ve DNA kaynaklı radikalleri oluşturur. OH- radikalinin C-8'e katılması ile oluşan radikal (C8-OH) bir elektron ve proton kaybederek 8-OHdG'e okside olur (46). DNA replikasyonu sırasında, G-C'den A-T'ye dönüşüme neden olarak mutasyona eğilimini artırır (47).

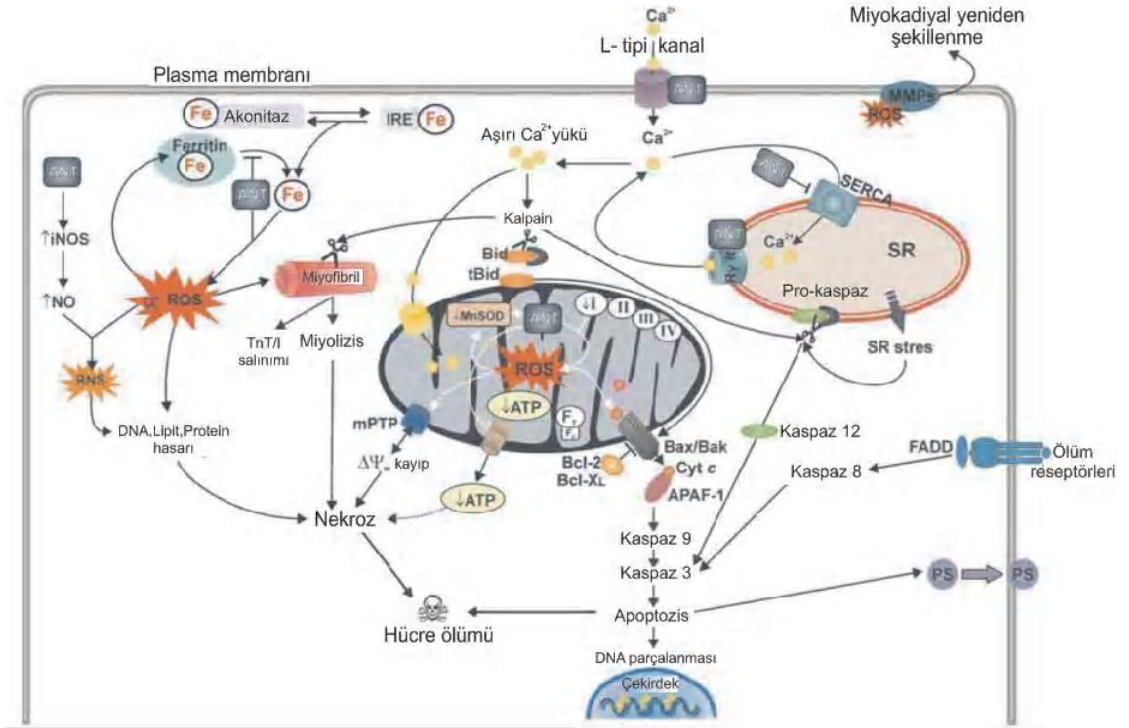
2.2.6.2. Adriyaminin Sarkoplazmik Retikulum Etkisi

Sarkoplazmik retikulumda (SR) longitudinal tübül ve terminal sisterna olmak üzere iki primer fonksiyon alanı bulunur. Longitudinal tübüller boylamasına uzanır ve terminal terminalar Ca^{+2} 'u transport eder. Terminal sisternalardan salınan Ca^{+2} 'lar, intrasellüler Ca^{+2} 'u daha fazla artıracak şekilde SR'ı uyarırlar. Kronik ADR uygulaması SR fonksiyonlarını bozar (48). Bu bozukluk, ryanodin reseptör ekspresyonundaki ve kalsiyum kanallarından kalsiyum salınmasındaki azalmalarla ilişkilidir (49). Ca^{+2} alınması (SR Ca^{+2} -ATPaz) ya da salınımı ile ilgili genlerin spesifik olarak inhibe edildiği belirtilmektedir. Bu inhibisyonun ADR'nin neden olduğu H_2O_2 artışının mitojenle-aktive olan protein kinazı (MAPK) aktive etmesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (50). Diğer bazı çalışmalar ise tam tersine ADR'nin SR'den Ca^{+2} salınmasını uyardığı ve terminal sisternalarda bulunan Ca^{+2} kanallarını selektif olarak açtığını belirtmektedir (51). Yüksek dozlarda ADR, izole SR preparatlarında adenilaz ve guanilaz siklaz enzim aktivitesini inhibe etmektedir. Bu inhibisyonun, serbest radikallerin oluşumu ve buna bağlı lipid peroksidasyonu ile olduğuna inanılmaktadır (52). Sonuç olarak ADR, SR'de bazı önemli enzimlerin gen ekspresyonunu inhibe edebilir.

2.2.7. Adriyaminin Neden Olduğu Kalp Yetmezliğinin Moleküler Patofizyolojisi

Adriyaminin kardiyotoksik etkisine, DNA interkalasyonu (baz çiftleri arasına bir molekülün tersinir şekilde girmesidir) ve topoizomerez II inhibisyonu gibi antitümör etkilere farklı mekanizmaların aracılık ettiğine inanılmaktadır. Adriyamin kardiyotoksikite mekanizmaları, birçok araştırmada incelenmiş ve çeşitli olası

mekanizmalar öne sürülmüştür. Adriyaminin miyokardiyum üzerindeki birçok etkisi ROS oluşumu ile ilgilidir. Önerilen diğer kardiyotoksik mekanizmalar ise; ADR'nin daha hidrofilik, kardiyotoksik maddelere metabolize edilmesi ve bunların kardiyomiyositlerde birikmesi sonucu bazı önemli kardiyak proteinlerin ekspresyonunun bozulması, hücresel ve mitokondriyal Ca^{+2} homeostazisinin bozulması, mitokondriyal DNA kırıklarının indüksiyonu, mitokondriyal enerji üretiminin bozulması, titin ve distrofin dahil miyofilament ve hücre iskeleti proteinlerinin yıkımıdır (1,7). Bu yollardan her biri, kardiyak hücre hasarına ve sonuçta nekroz ya da apoptozis yolu ile miyosit ölümlerine katkıda bulunabilir (1) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Antrasiklinlerin kardiyotoksik etki mekanizmasını açıklayan şematik şekil. ANT: Antrasiklin, FADD: Fas ile ilişkili ölüm proteini, iNOS: İndüklenebilen nitrik oksit sentaz, MMP: Matris metalloproteinaz, MnSOD: Mangan (mitokondriyal) süperoksit dismutaz, mPTP: Mitokondriyal permeabilite geçiş porları, PS: Fosfatidilserin, ROS: Reaktif oksijen ürünü, RNS: Reaktif nitrojen ürünü, NO: Nitrik oksit, RyR: Riyanodin reseptör, SR: Sarkoplazmik retikulum, TnT/I: Troponin T/I (1).

Adriyaminin, miyokardın adrenerjik fonksiyonu üzerinde doğrudan toksik etkiye sahiptir (53). Bu etkisi ile ADR, miyokardın kontraktilesini bozar. Kalp debisinde bir düşüş olduğunda bunu telafi etmek için, kalbin pompalama gücünü arttıracak bazı adaptif mekanizmalar aktive edilir. Bu mekanizmalar ile kalp atım hızı, kasılabilirlik, ön yük ve kontraktil eleman sayısı artar. Diğer kalp yetmezliklerinde oluşan bu adaptif etkiler ADR kaynaklı kalp yetmezliğinde de meydana gelir. Bu ayarlamalar, birbiri ile

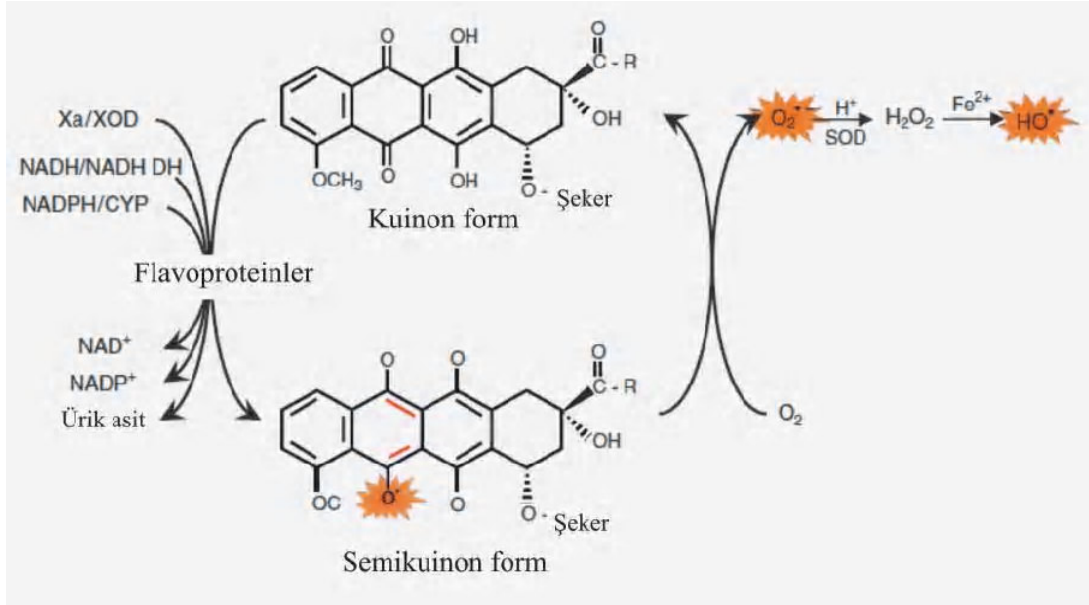
nörohormonal/otokrin-parakrin ilişkili adrenerjik ve renin anjiyotensin sistemi aktivitelerinde artışa neden olur. Sonuç olarak, duvar stresi (ard yük) artar ve ventriküller dilate olur. Bunlar, ventrikül (beyin natriüretik peptid) ve atriyum (atriyal natriüretik peptid) tarafından salgılanan natriüretik peptidlerin salgılanmasına yol açar. Mekanistik düzeyde, sistolik fonksiyonlarda bozukluk olmadan önce, ilk olarak kalbin diyastolik fonksiyonlarında bozukluk olacağı düşünülmektedir. Sistolik fonksiyon ciddi düzeyde azaldığı zaman, konjestif kalp yetmezliği ortaya çıkabilir (54).

2.2.7.1. Adriyaminin Neden Olduğu Kalp Yetmezliğinin Oksidatif Stres ile İlişkisi

Adriyaminin kardiyotoksitesini açıklamada en çok kullanılan ve en çok araştırılan konu serbest radikallerdir. Adriyaminin yapısında bulundurduğu kuinon nedeniyle ROS yapımında artışa neden olduğu tahmin edilmektedir. Adriyaminin serbest oksijen radikalleri oluşturması in vitro çalışmalarda da gösterilmiştir (55). Akut ADR kardiyotoksitesite modeli kullanılarak yapılan çalışmada, antioksidan olan alfa tokoferolün toksisiteyi azalttığı gösterilmiştir (56). Bu çalışmalar ADR'nin antitümör etkisini oluşturmada kullandığı DNA replikasyon inhibisyonunun, kardiyotoksitesitenin meydana gelmesinde rolünün olmadığını göstermiştir. Adriyamin kaynaklı ROS oluşumunun, ADR'nin antitümör etkinliğini etkilemeden ortadan kaldırılabileceği belirtilmiştir (57). Bu düşünce dekstrazoksanın kardiyoprotektif etkisinin görülmesi ile popülerlik kazanmıştır. Dekstrazoksan, hücre içindeki demire bağlanarak antrasiklin-demir kompleksinden demiri ayırır, böylelikle serbest radikal oluşumunu önlemiştir (58). Sonraki çalışmalarda da, ADR kardiyotoksitesitesinden ROS'un sorumlu olabileceği gösterilmiştir (40,59-61). Katalaz (37), mitokondriyal süperoksit dismutaz (38), tiyoredoksin-1 (62) ya da metallothionein (39) gibi antioksidanların aşırı eksprese edildiği transgenik hayvanların kullanıldığı çalışmalarda, ADR kardiyotoksitesitesine karşı artmış antioksidan savunmanın yararlı etkileri gösterilmiştir. Ayrıca bazı çalışmalarda da, glutatyon peroksidaz-1'den yoksun farelerin akut ADR kaynaklı kardiyotoksitesiteye daha fazla duyarlı oldukları gösterilmiştir (63). Bütün bu sonuçlar ADR'nin neden olduğu kardiyotoksitesitede ROS'un önemli rol oynadığını göstermektedir.

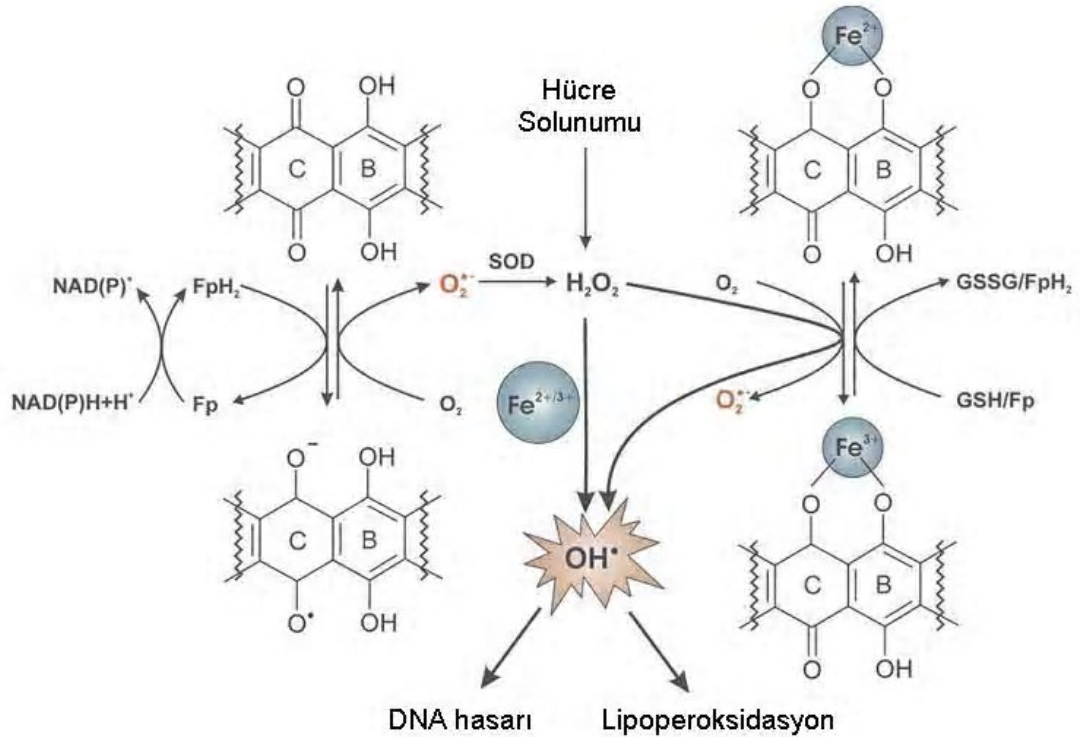
Adriyaminin serbest oksijen radikallerini enzimatik ve enzimatik olmayan yollar aracılığı ile oluşturmaktadır. Kardiyomiyositlerde, ADR'nin enzimatik yollar aracılığıyla serbest radikalleri oluşturduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. Adriyaminin

bir amino şeker grubu ve aglikan yapıdan oluşur (Şekil. 2.1). Bu tetrasiklik yapının C halkasında kuinon bulunur (64). Kuinon NADPH, sitokrom P-450 redüktaz, NADH ve NADH dehidrojenaz gibi elektron dönörlerinden tek elektron alarak semikuinon formuna indirgenir (61,65). Bir kez semikuinon meydana geldiğinde, tekrardan kuinon formuna dönmek için bir elektron moleküler oksijene transfer edilir ve bu transfer sonucunda süperoksit anyonu oluşur (Şekil 2.3). Redoks döngüsü olarak bilinen bu reaksiyonlar, çok sayıda ADR kaynaklı süperoksit radikalleri oluşturur ve son derece zarar vericidir (64). Anoksik koşullarda ADR çok fazla radikal oluşturmazken, normoksik şartlarda daha fazla süperoksit radikali oluşturur. Redoks döngüsü sitoplazma da, mitokondride ya da sarkoplazmik retikulumda gerçekleşebilir (66). Adriyaminin süperoksit radikalini karaciğer mikrozomlarında, kardiyak mitokondride, kardiyak miyosit kültürlerinde ve sıçan kalplerinde oluşturduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (61,66-67). Adriyaminin-aracılı serbest radikallerin ilk hedefi, lipid peroksidasyon eğilimin fazla olduğu çeşitli hücresel membranlardır. Bu radikal hasar, malondialdehit (MDA) gibi nispeten çok toksik birçok aldehitlerin oluşmasına neden olur. Bu aldehitler kolayca hücre içine diffüze olabilir veya plazma zarından geçebilir, "ikinci sitotoksik haberciler" olarak hareket eden makromolekülleri etkiler (24).



Şekil 2.3. Adriyaminin kuinonun redoks döngüsü ile reaktif oksijen ürünlerini oluşturması. NADPH/CYP: NADPH'e bağlı sitokrom P450 redüktaz; NADH DH: NADH dehidrojenaz (kompleks I); Xa: Ksantin; XOD, Ksantin oksidaz; SOD: Süperoksit dismutaz.

Serbest radikaller ayrıca ADR-demir etkileşimi gibi non-enzimatik mekanizmalar aracılığıyla da oluşturulur. Fe^{+3} , ADR'nin C11'deki keton ve C12'deki hidroksil grupları ile birleşerek bir kompleks oluşturur. Bu kompleks sırasında internal redoks reaksiyonu ile C-14 hidroksil grubundan bir elektron demire aktarılır ve Fe^{+2} -ADR serbest radikal kompleksine dönüşür. Fe^{+2} -ADR serbest radikal kompleksinden de bir elektron ayrılarak tekrar Fe^{+3} -ADR serbest radikal kompleksini oluşturmaktadır. Bu reaksiyon sırasında da bir elektron, ortamdaki oksijeni süperoksit anyonuna indirger. Bu kompleks daha sonra Fe^{+3} -ADR (aldehit) okside olarak, Fe^{+2} -ADR (aldehit)'e yeniden düzenlendiğinde başka bir moleküler oksijen süperoksit anyonuna indirgenir (68). Demir şelatörü deksrazoksanın ADR'nin oluşturduğu akut ve kronik kardiyotoksisiteyi engellediği gösterilmiştir (36) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Adriyamisin-Fe kompleksinin ROS oluşturma mekanizması. Fe: Demir, $\text{O}_2^{\bullet -}$: Süperoksit radikali, SOD: Süperoksit dismutaz, H_2O_2 : Hidrojen peroksit, $\text{OH}^\bullet$: Hidroksil radikali, NAD(P): Nikotinamit adenin dinükleotid (fosfat), Fp: Flavoprotein, GSH/GSSG: İndirgenmiş/yükseltgenmiş glutatyon (1).

Reaktif oksijen ürünlerine ek olarak, reaktif nitrojen ürünleri de ADR kaynaklı kardiyotoksisitenin meydana gelmesinde önemlidir (69). Adriyamisin ve NO ürünleri arasında çapraz bağlar oluşur. Adriyamisinin, miyokartda indüklenebilen NO sentazın (iNOS, NOS2) mRNA ve protein seviyelerini artırarak, NO üretimine neden olduğu gösterilmiştir. Fakat ADR, NO'nin diğer iki izoformunun ekspresyonunu etkilemediği

belirtilmiştir (70). Akut ADR kardiyotoksite modelini kullanan bir çalışmada, endotelial NOS izoformunun da (eNOS, NOS3) değiştiği belirtilmiştir (71). Bu modeli kullanan çalışmalarda, “knockout” iNOS hayvanlarda ADR kardiyotoksitenin paradoksal olarak arttığı (72), eNOS “knockout” hayvanlarda kardiyotoksitenin azaldığı gösterilmiştir (71). Son yıllardaki çalışmalarda ise, eNOS redüktaz’ın ADR’ye maruz kalmış miyokardiyumda süperoksit oluşumundan sorumlu olabileceği belirtilmektedir. Endotel hücre kültüründe yapılan çalışma, ADR’nin redoks aktivasyonu ve buna bağlı gelişen apoptotik hücre ölümünde eNOS’un rolünü göstermiştir (73).

Diğer dokulara oranla kalp dokusunda ADR’nin neden olduğu oksidatif strese daha duyarlı olmasını açıklayan nedenler vardır. Bunlar;

1. Kardiyomiyositler diğer tip hücrelere göre daha az antioksidan savunmaya sahiptir (74). Kalp dokusunun katalaz enzimi olmadığı için antioksidan aktivitesinin zayıf olduğu öne sürülmüştür (75). Ayrıca kardiyomiyositlerin yüksek düzeyde hidrojen peroksit maruz kaldığı ve bundan dolayı ADR’nin selektif olarak glutatyon peroksidazı down regüle ettiği gösterilmiştir (76).
2. Kardiyomiyositler, toplam kütle ağırlıklarının %50’sinden fazla mitokondri içerir. Fazla mitokondri ihtiva etme daha çok ROS oluşuma ve dokunun oksidatif strese maruz kalmasına neden olmaktadır (59,77). Ayrıca, ROS oluşumunda NADH dehidrojenaz önemli bir role sahiptir. Kardiyak mitokondrilerin aksine, karaciğer mitokondrilerinde NADH ilişkili yol zayıftır. Sonuçta karaciğer mitokondrilerinde önemli miktarda ADR semikuinonları oluşmaz (78). Son olarak ADR mitokondrilerde birikir ve kardiyolipine bağlanarak solunum zincirini inhibe eder. Kardiyolipin doymamış yağ asitlerince zengin kardiyospesifik fosfolipit olup mitokondri içi zarında bulunur. Adriyaminin kardiyolipine yüksek affinitesi vardır (79).

Farelerde yapılan çalışmada, kalbin yapımda bulunan endojen antioksidanlardan süperoksit dismutaz ve katalaz seviyesinin karaciğer dokusunda bulunan miktara oranla daha düşük olduğu gösterilmiştir (76). Kalp, ADR’nin oluşturduğu ROS’a karşı savunmasızdır. Adriyaminin oluşturduğu süperoksit anyonlar, süperoksit dismutaz tarafından hidrojen peroksit dönüştürülür. Sıçan kalbinden izole edilen mitokondriler ADR ile inkübe edildiğinde, büyük miktarda süperoksit anyonu oluşur. Süperoksit

anyonlar da mitokondriyal fonksiyonları bozar (66). Süperoksit anyonu, Fe^{+2} varlığında Fenton reaksiyonu ile çok daha toksik hidroksil radikallerine dönüştürülür (80). Diğer taraftan, süperoksit anyonu ve nitrik oksit reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturabilir (81). Hem hidroksil radikalleri hem de peroksinitrit son derece toksik ROS'lardır ve bunlar kardiyomiyositlerde, protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonu ve membran hasarını başlatabilirler. Örneğin peroksinitrit proteine bağlı trozini, 3-nitrotirozine modifiye eder. 3-nitrotirozin ise protein fonksiyonlarının bozulmasına neden olur (82). Yapılan çalışmalarda ADR verilen kalplerde lipid peroksidasyonunun meydana geldiği gösterilmiştir. İzole sıçan papiller kası 100 μM ADR ile 60 dakika muamele edildiğinde, lipid peroksidasyon ürünlerinden biri olan malondialdehitin (MDA) arttığı gösterilmiştir (65). Hem deneysel hemde klinik araştırmalar ADR'nin, serum kreatin fosfokinaz ve kardiyak troponin T'yi (cTnT) artırdığı belirtilmektedir (83). Ayrıca serbest radikaller SR'de Ca^{+2} salınımını bozabilir. Örneğin, SR'nin ADR ve NAD/NADH dehidrojenaz ile 30 dakika pre-inkübasyonu Ca^{+2} salınımını %70 inhibe eder. Bu inhibisyon kalp dokusu katalaz, serbest radikal temizleyicileri, N-asetilsistein ve glutatyon ile inkübe edildikten sonra azalmıştır (84). Özet olarak ROS, ADR kardiyotoksisitesinde önemli etkindir ve antioksidanlar ADR'nin oluşturduğu ROS kaynaklı kardiyak hasarı azaltmaktadır.

2.2.7.2. Adriyaminin Neden Olduğu Kalp Yetmezliği, Apoptozis ve İlişkisi

Kardiyomiyositlerde apoptoz, kalp yetmezliğine neden olur (85). Endotel hücrelerde ve miyositlerde ADR, apoptotik hücre ölümlerini kaspazların aktivasyonu ve DNA hasarları ile gerçekleştirir (85). Apoptoz yolu ile kardiyomiyosit kaybı, kalp yetmezliğini başlatabilir veya şiddetini yükseltebilir (86). Adriyamin oksijen radikallerini oluşturarak miyosit ve endotel hücrelerinde apoptozu meydana getirir (85). Adriyaminin proapoptotik etkileri H_2O_2 oluşumu ile ilgilidir. Adriyaminin neden olduğu apoptoz bir yandan kanser hücrelerin yok edilmesi açısından faydalı etkilere neden olur. Diğer yandan kardiyotoksisiteden sorumludur.

Apoptoz, normal embriyonik gelişim, homeostazis, immün sistem fonksiyonlarında ve yaşlanma sürecinde organ gerilemesi gibi birçok işlevde önemli rol oynayan programlanmış hücre ölümüdür (87). Apoptozis, kontrolsüz bir şekilde aşırı aktive edildiği veya başarısız olduğu durumlarda hastalıklar ortaya çıkar. Nekroz akut hücrel hasarlar meydana getirirken, apoptozis genel olarak bir dokunun tek bir hücresinin

ölüm sürecini kontrol eder. Morfolojik olarak apoptotik hücreler, su kaybederek küçülür, büzülür. Kromatin, çekirdek membranına yakın kısımlarda yoğunlaşarak, yarım ay, hilal şeklinde çekirdek membranının iç yüzeyine yerleşir (88). Membranlar bütünlüklerini korurlar fakat apoptotik süreç ilerledikçe hücrelerde sitoplazmik çıkıntılar oluşur. Hücre daha sonra membranla çevrili küçük parçalara bölünür. Bunlara “apoptotik cisim” adı verilir (89). İçlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller bulunur. Bazılarında çekirdek parçaları da mevcuttur.

Nekrozun aksine, apoptotik cisimler çevredeki hücreler ve fagositler tarafından fagosite edilerek dokudan hemen temizlenir. Bundan dolayı dokuda inflamasyon meydana gelmez. DNA hasarları, endojen proteazları aktive ederek apoptozu başlatır (89-90). Apoptotik hücrelerde meydana gelen önemli bir değişiklik plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserinin yer değiştirerek membranın dış yüzeyine yerleşmesidir. Bu yer değişikliği kaspaz kaskadını ve poli ADP-riboz polimerazı aktivite eder (PARP) (91).

Apoptozis intrinsik ve ekstrinsik adı verilen iki ana yol ile başlatılabilir. İntrinsik yolda mitokondri önemli rol oynarken, ekstrinsik yol FAS, tümör nekroz faktör- α reseptörü (TNF- α), TNF- α ile ilişkili apoptozisi başlatıcı ligand (TRAIL) gibi ölüm reseptörleri ile uyarılır. p53 ve Bcl-2 protein ailesi intrinsik yolda önemli rol oynarken, kaspazlar her iki apoptotik sinyal yolunda rol alır. Birçok çalışmada kalpte hipoksi ve iskemi durumunda, Bax ve mitokondri aracılığıyla apoptozun başlatıldığı belirtilmektedir (88). Kalp yetmezliği bulunan hastalarda, miyosit apoptozunun Bax'ın aktivasyonu ile olabileceği gösterilmiştir. H_2O_2 oluşumu Bax, Bad gibi proapoptotik proteinlerin translokasyonu ile sitokrom-c mitokondriden ayrılmaktadır. İntrasellüler oksidan oluşumunun p53 ile ilişkili olduğuna dair kanıtlar artmaktadır. p53 de Bax'ı aktive eder. Hem $O_2^{\cdot-}$ hem de H_2O_2 , p53'ü uyarır (92). Kardiyak miyositlerdeki p53 aracılı apoptozis anjiyotensin ile de uyarılır (93). Bu çalışmalar p53, Bax ve mitokondrinin kardiyak miyosit apoptozunda önemli rol oynadıklarını desteklemektedir (93).

2.2.7.2.1. Adriyaminin Neden Olduğu Apoptoziste p53'ün, Bcl-2 Protein Ailesinin ve Kaspazların Rolü

p53, üzerinde en çok çalışılan tümör baskılayıcı proteinlerden biridir. p53 sitoplazmada bulunan ve DNA'nın ya da hücrenin ağır biçimde hasar görmesi durumunda, DNA da belli genlerin aktivasyonuna, böylece yapımlarının artmasına (Bax, Apaf-1, Fas), belli

genlerin de baskılanmasına (Bcl-2, Bcl-X) yol açarak apoptozu tetikleyen transkripsiyon faktörüdür. p53 ubikitinleyici bir protein (mdm2) tarafından belli bir hızda yok edilmektedir. Fosforile p53 ubikitinlemeyi engeller. DNA hasarı, hipoksi ya da onkogenlerin aktivasyonu, p53'ün fosforillenmesini arttırarak ortamda p53 artışına neden olur (94).

Kardiyomiyosit apopitoz sürecine p53'ün katıldığına dair kanıtlar artmaktadır (95). p53 ve Bax genlerinin ekspresyonunun miyosit apopitozunda arttığı gösterilmiştir (93). p53'ten yoksun fare kalplerinin transplante edildiği farelerin yaşam sürelerinde anlamlı bir artış olduğu belirtilmektedir. Adenovirüslerle p53'ün transfeksiyonu, mitokondri bağımlı apoptotik yolak üzerinden apopitozu başlatır (96). Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu, kardiyomiyositlerde apopitozun p53 yolunu bloke eder (97). Bu çalışmalar, patolojik koşullar altında miyosit apopitozunda p53'ün kritik rol oynadığını göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda, birçok hücre tipindeki apopitozis olayında mitokondrinin önemine dikkat çekmektedir (98). Mitokondrinin rolü ile ilişkili iki görüş belirtilmiştir. Bunlar;

1. İskemik kardiyak miyositlerde, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya geçmesi, kaspazları aktive eder (99),
2. Apopitozis boyunca, mitokondriyal permeabilite geçiş porları (mPTP) olarak da bilinen multi iletken kanalların açılması ile mitokondri iç membran potansiyeli (MMP) azalır. mPTP'lerin düzenlenme mekanizması gizemini korumakta ve birçok laboratuarda araştırılmaya devam edilmektedir. Bcl-2 protein ailesinin bu düzenlemede etkili olduğu bilinmektedir (100). p53, ubikitinleyici bir protein (mdm2) tarafından belli bir hızda yok edilmektedir. Fosforile p53 ubikitinlenmeyi engeller. DNA hasarı, hipoksi ve onkogenlerin aktivasyonu p53'ün fosforilasyonunu arttırarak ortamda p53 artışına neden olur.

Bcl-2 protein ailesi fonksiyonlarına göre anti-apopitotik ve pro-apopitotik proteinler olarak sınıflandırılır. Proapopitotik protein ailesi Bax, Bad, Bid, Bak, Bcl-x, Bik ve Bim'den oluşur ve bu ailenin üyeleri hücre ölümlerini uyarır. Anti-apopitotik protein ailesi ise, Bcl-2, Bcl-xL ve Bcl-w'den oluşur. Bu aile üyelerinin fonksiyonları ise, hücre ölümlerini inhibe etmektir (101). Bcl-2 proteinleri ya mitokondrinin dış zarında ya da sitoplazmada bulunur. Sitoplazmada bulunan proteinler de mitokondri ile

ilişkilidir. Bu protein ailesi, mPTP'leri açarak veya apoptotik proteinlerin mitokondriden sitoplazmaya geçmesini sağlayarak mitokondri patolojisine karışır. Bcl-2 protein ailesi mPTP'lerin düzenlenmesine direkt olarak katılır. Yapılan bir çalışmada, mitokondri membranından mPTP protein kompleksleri ile Bax birlikte saflaştırılmıştır. Bu bulguya dayanılarak, Bax'ın bu kompleksin oluşmasında yakından ilişkili olabileceği belirtilmektedir (102).

Ayrıca Bcl-2, sitokrom c'nin sitoplazmaya geçmesini sağlayan kanal olarak da görev yapar. Bu ailenin üç boyutlu yapısı incelendiğinde, Bcl-2 ya da Bax'ın iyon kanalı veya por çapı olarak farklı yapıda olduklarını göstermektedir. Genel olarak, Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin, kapalı küçük kanallar olabileceği belirtilmektedir. Fakat Bax gibi pro-apoptotik proteinlerin açık ise, çoğunlukla anyonlara geçirgen, büyük kanallar olabileceği belirtilmektedir. Bu iki aile birbirine zıt etkilidir (103). Pro-apoptotik Bcl-2 protein ailesi, sitokrom c'nin sitoplazmaya geçmesine neden olur ve sitoplazmada apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1)'in varlığında kaspaz aktivasyonunu başlatır. İskemi ve hipoksik stres gibi kardiyak patolojilerde miyosit apoptozuna Bcl-2 protein ailesinin katıldığı bilinmesine rağmen, ADR kardiyotoksisindeki rolleri halen araştırılmaktadır (104).

Kaspazlar (KAS), spesifik olarak pro-enzimleri aktif enzimlere dönüştürebilen bir proteolitik enzimler grubudur (105). Kaspazlar, fonksiyonlarına göre başlatıcılar ve sonlandırıcılar (efektörler) olarak sınıflandırılabilir. Başlatıcı KAS'lar (KAS-8, KAS-9 ve KAS10), sonlandırıcı KAS'ların işlenmesinden ve aktivasyonundan sorumludur. Sonlandırıcı KAS'lar (KAS-3, KAS-6 ve KAS-7), apoptozun karakteristik morfolojik değişikliklerinden ve DNA fragmentasyonundan sorumludur. KAS'ların apoptozdaki rollerinin detayları belirlenmiştir (106). İntrinsik apoptotik yolak da, mitokondriden sitokrom-c'nin ayrılması, Apaf-1'in varlığında KAS'ları aktive eder. Hücre dışı apoptotik yolak da, ölüm reseptörleriyle KAS-8'in aktivasyonu KAS-3 gibi sonlandırıcı KAS'ları aktive eder. KAS'ların hedef proteinlerinden birisi, nükleozomal DNA kırıkları oluşturan ve kaspazla aktive olan DNaz (CAD)'dır (107).

Çalışmalar, hücre kültüründe p53 aracılı apoptozda birkaç KAS'ın aktive edildiğini göstermektedir. p53'ün başlattığı apoptoz da, aktive edilen en önemli kaspazlar, KAS-3 ve KAS-9'dur (108). İnsan kolon kanser hücrelerinde, p53'e bağlı apoptozda KAS-3 ve 9 aktive edilir (109). MCF-7 kanser hücrelerinde, p53'ün aşırı ekspresyonu

KAS-1'in mRNA'sında artış yapar (110). İlginç biçimde, insan endotelial hücreleri ADR'e maruz kaldığında p53, KAS-3 ve KAS-9'un aktivasyonu aracılığıyla apoptoza neden olur (111). KAS-3'ün aktivasyonu, insan kardiyomyopatisinde meydana gelen apoptozda da gösterilmiştir (112).

2.3. RENİN ANJİYOTENSİN SİSTEMİ

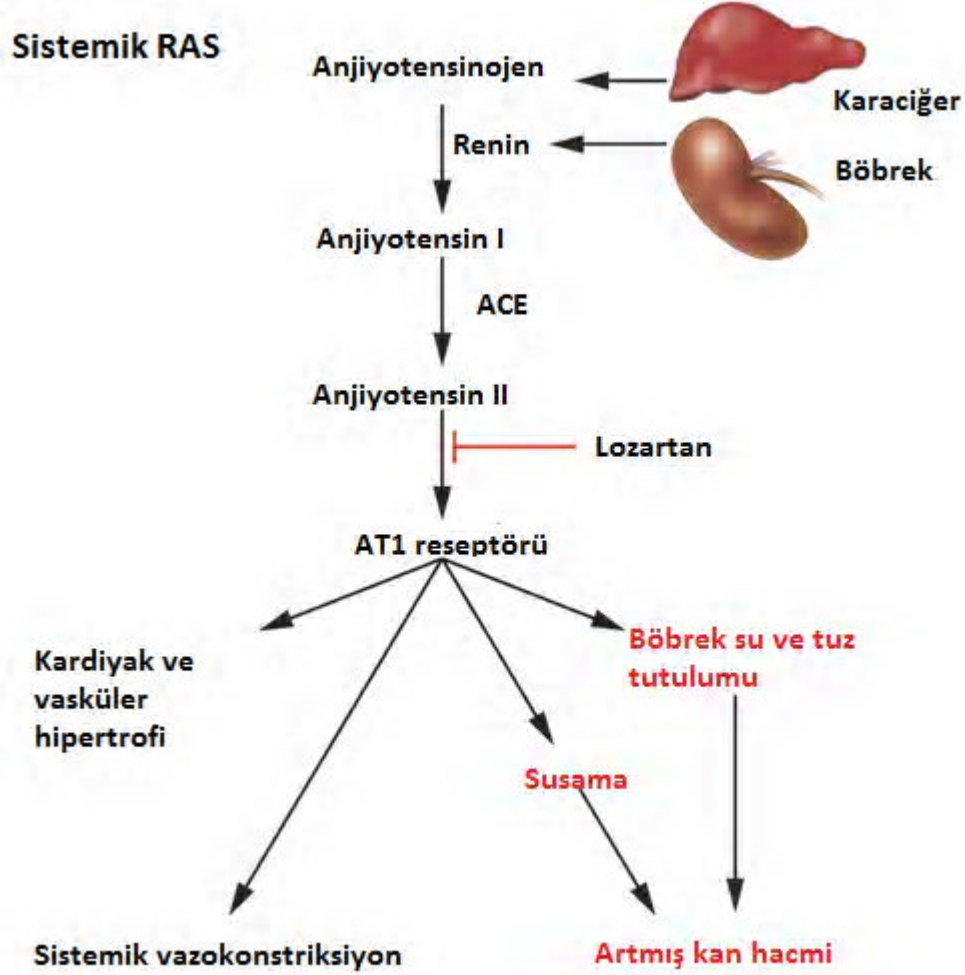
Renin anjiyotensin sistemi (RAS); homeostatik birçok olayda önemli rol oynayan bir endokrin sistemdir. Özellikle su-elektrolit dengesinin, kan hacminin ve arteriyel kan basıncının düzenlenmesi gibi renal ve kardiyovasküler fonksiyonların kontrolünde görev yapar (Şekil 2.5).

Renin, Robert Tigerstedt tarafından 1898 de keşfedilmiştir. Tigerstedt, tuz yüklediği tavşanlarda kan basıncı artışını böbrekten salınan bir endokrin madde nedeniyle geliştiği hipotezini ortaya atmış ve bu basınç arttırıcı maddenin adını da renin olarak bildirmiştir. 1934 yılında değişik yöntemlerle oluşturulan hipertansiyonlarda renin anjiyotensin sisteminin fonksiyonu net olarak ortaya konulmuştur (3). Günümüzde RAS'ın etkilerini hem endokrin sistem hem de dokularda parakrin/otokrin şekilde gerçekleştirdiği ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır (iki yönlü etkilidir) (113). Renin anjiyotensin sisteminin komponentleri olan anjiyotensinojen, renin, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) ve Anj-II reseptörleri kalp, adrenal bezler, beyin ve kan damarlarında gösterilmiştir (3).

Renin anjiyotensin sistemi, endokrin karakterli peptiderjik bir sistemdir. Bu sistemin önemli bir bileşeni olan anjiyotensinojen bir glikoproteindir ve karaciğerden salınır. Anjiyotensinojen, böbreğin jukstaglomerüler aparatından sentezlenen renin tarafından 10 aminoasitlik anjiyotensin I'e (Anj-I) dönüştürülür. Sonra Anj-I, pulmoner damar endotelial hücre yüzeylerinde, yüksek miktarlarda bulunan membrana bağlı bir metalloproteinaz ACE tarafından iki amino asiti kopartılarak aktif formu olan Anj-II'e dönüştürülür (114). Anjiyotensin II'nin RAS'ın ana efektör peptidi olduğu düşünülmektedir. Anjiyotensin II kendi spesifik reseptörlerini kullanarak, adrenal korteksten aldosteron salınmasının uyarılması, damar düz kas hücrelerindeki reseptörleri ile vazokonstriksiyon yapıcı etkilerini oluşturur (115) (Şekil 2.5).

Renin anjiyotensin sistem hakkında bilgilerimiz her geçen gün artmaktadır. Anj'nin farklı reseptörleri (AT1, AT2, AT4) ve sinyal yolları tanımlanmıştır (116). Dahası,

Anj 1-7 gibi farklı ürünler ve serin proteaz olan kimaz (chymase, Anj I'den Anj-II oluşturur) gibi Anj-II oluşturan alternatif yollar da keşfedilmiştir (117).



Şekil 2.5. Sistemik renin anjiyotensin sistemi. ACE: Anjiyotensin dönüştürücü enzim, RAS: Renin anjiyotensin sistemi.

2.3.1. Lokal Renin Anjiyotensin Sisteminin Elemanları

Uzun süreli kontrolde önemli olan lokal RAS'ın renin, anjiyotensinojen, Anj peptidleri (Anj I ve Anj-II) gibi bilinen elemanlarının dışında son zamanlarda keşfedilmiş yeni elemanları da vardır. Lokal (yerel) yada doku RAS'ının kalpte, damar yatağında, beyinde, böbrekte, akciğerlerde varlığı gösterilmiştir. Bu bölümde sadece kalpteki yerel RAS hakkında bilgi verilecektir.

2.3.1.1. Renin

Kardiyak renin ekspresyonu ile ilgili bilgiler çelişkilidir. Bazı araştırmacılar, bir çok türde yaptıkları “Northern blot” (118), hibridizasyon deneylerine (119) ve “Real-time reverse-transcriptase” (RT-PCR) (120) dayanarak kalpte renin mRNA’sının var olduğunu idda etmektedirler. Diğer bir grup araştırmacı ise kalpte lokal mRNA ekspresyonu ile ilgili literatürlerde kanıt bulunmadığını (121), ölçülen renin mRNA’nın dolaşımdan kontamine olduğunu iddia etmektedir. Kardiyomiyosit ya da fibroblast kültürlerinde reninin sentezlenmemesi bu iddiayı desteklemektedir. İnsan genomik renin yapısını taşıyan transgenik farelerle yapılan çalışmalarda, kalpte renin ekspresyonunun olmadığını göstermiştir (122). Bazı araştırmacılar ise, fizyolojik koşullar altında kalpte renin’in sentezlenmediğini, fakat patofizyolojik koşullar altında renin ekspresyonunun olabileceğini savunmaktadır (123).

Bir kısım bilim adamı, kalpdeki reninin, intertisyumdan spesifik olmayan yollarla (difüzyon) (124) ya da spesifik bağlayıcı veya prorenin renin reseptörleri (125) aracılığıyla dolaşımdan alındığı (126) konusunda hem fikirdir. Kardiyomiyositlerde, prorenin ve renin bağlanması için mannoz-6-fosfat reseptörlerinin (M6P) bulunduğu gösterilmiştir (127). Neonatal kardiyomiyositlerde hipertrofi ve artmış protein sentezi, kalp hücreleri prorenin ve anjiyotensinojen ile birlikte inkübe edildiği zamanlarda geliştiği gösterilmiştir (128).

Renin üzerinde yapılan araştırmalar sonunda S3SP cebinin keşfi ile renine yüksek seçicilik ile bağlanan aliskireni (AL) ortaya çıkarmıştır. AL bugüne kadar üretilen en güçlü insan renin inhibitörüdür (129-130). Maymun deneylerinde tek seferlik oral dozları karşılaştırıldığında (aliskiren, remikiren, zankiren) en fazla kan basıncı düşüşü ve en uzun etki süresi, AL alanlarda izlenmiştir. AL alımı sonrasında plazma renin konsantrasyonunun doza bağımlı olarak (3-10 mg/kg) artışı renin inhibisyonunun etkili bir biçimde gerçekleştiğini göstermiştir. Renin düzeyi ilk iki saatte artmaya başlamış, en az 24 saat yüksek kalmış ve plazma renin aktiviteside 24 saat süreyle baskılanmıştır (130). 2007 yılında ABD ve Avrupa’da ilk renin inhibitörü Aliskiren kullanımına onay verilmiştir.

2.3.1.2. Prorenin ve renin reseptörleri

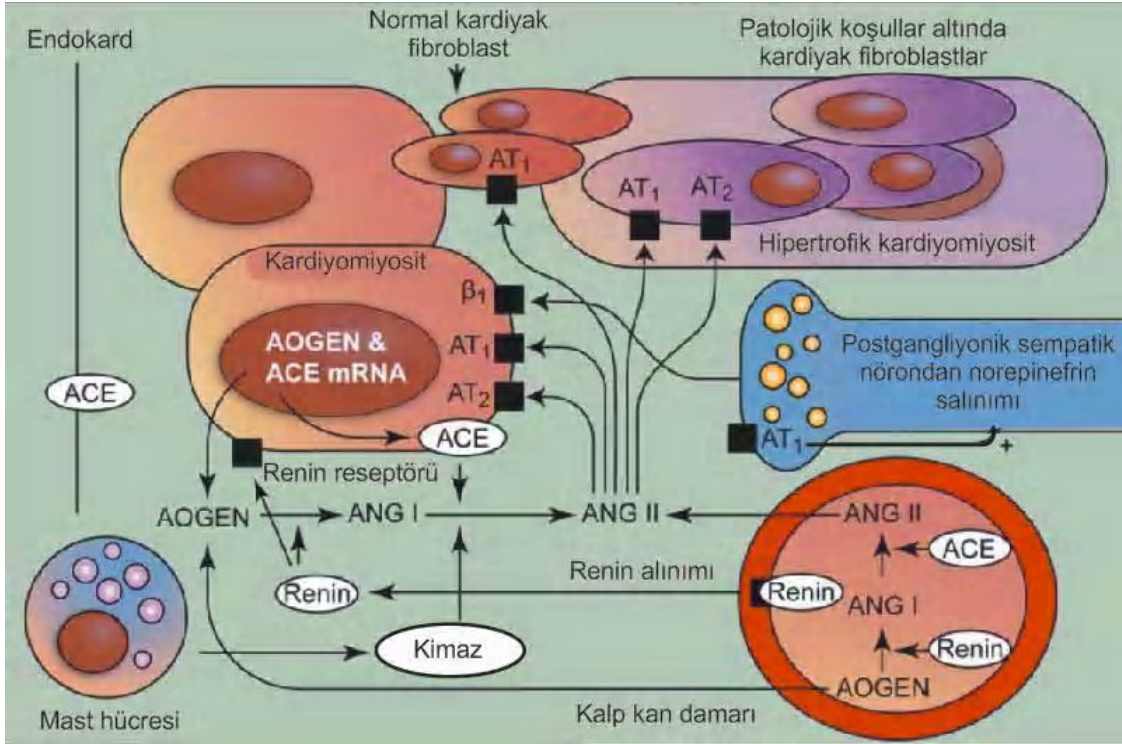
Prorenin ve reninin doku hücre yüzeyine bağlanması, doku seviyesinde lokal RAS’ın esas önemli aşamasıdır. Çünkü bu bağlanma plazmada bulunan Anj-II’den daha yüksek

konsantrasyonlarda lokal Anj-II üretilmesini sağlayan bir mekanizmayı oluşturur. Önceleri prorenin ve/veya renin'in dokulara plazmadan alındığı sanılıyordu (131). Bu mekanizma yerine, yeni renin biyosentezinin lokal RAS etkisinin oluşmasında önemli olduğu kabul edildi. Prorenin ve/veya renin bağlayıcılarının potansiyel rolleri hakkında, prorenin ve/veya renin bağlama yeteğine sahip birkaç proteinin karakterizasyonu yapılarak daha detaylı bilgilere ulaşıldı (125).

Mannoz-6-fosfat reseptörünün (M6P), hücreye renin ve prorenin'in alınmasında görev yaptığı gösterilmiştir. M6P, G proteinine eşleniktir ve sadece renin ve/veya prorenini bağlamaz aynı zamanda insülin benzeri büyüme faktörü II'nin internalizasyonunda ve inaktivasyonunda görev yapar. M6P'nin prorenin ve renini bağladığı neonatal sıçan kardiyomiyositlerinde ve insan endotelial hücrelerinde gösterilmiştir. Sadece glikolize prorenin ve renin bu reseptöre bağlanabilir. Kardiyak hücrelerde, bu bağlanmayla birlikte internalizasyonun olduğu, akabinde proteolitik bölünme ile aktive edildiği ve ardından hemen reninin bozulmasının takip ettiği gösterilmiştir (3).

Birçok araştırmacı, yerel ya da doku RAS'ının patofizyolojik rollerine odaklandılar. Bu ilgi lokal sistemlerin fizyolojik rolleri hakkında bir çok yeni görüş ortaya çıkardı. Bu konudaki bilgiler, uygun RAS genlerinin klonlanması, transgenik ya da "knockout" modeller kullanılması ile gelişmiş oldu. Lokal ve sistemik RAS, anjiyotensinojen'nin etkilerini ortaya çıkarmada birlikte çalışıyor olabilirler. Aynı zaman da, lokal RAS'ın bağımsız fonksiyonlarının olduğu da öne sürülmüştür. Bu lokal etkiler sistemik yada hücresel düzeyde olabilir. Bu bağlamda parakrin, otokrin etkiler, hücre büyümesi, proliferasyonu ve metabolizmasında özellikle önemlidir. Ayrıca bazı hücre içi ve intakrin RAS etkilerine (132), anjiyotensinojen'nin hücre çekirdeğine bağlanması aracılık eder (133).

Sistemik Anj-II etkilerinden intrakardiyak oluşturulan Anj-II'nin etkilerini ayırt etmek zor olduğu için, spesifik kardiyak RAS'ın varlığı ve fonksiyonları tartışma konusu olmuştur. Yine de, ACE inhibitörleri ya da Anj-II reseptör antagonistleri kullanılarak kardiyak "remodelling" gibi kalpde hücresel düzeyde Anj-II'nin lokal etkileri oldukça net açıklanabilmiştir. Kardiyak RAS'ın baskın fizyolojik rolü, hücre büyümesi ve proliferasyonunun uyarılması ve inhibisyonu kadar miyokardiyal strese adaptif yanıtların verilebilmesi için uygun hücresel dengenin ayarlanmasıdır (3). Kardiyak RAS'ın şematik yolları Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Kalpteki renin anjiyotensin sistem. AOGEN: Anjiyotensinojen, ANG I: Anjiyotensin I, ANG II: Anjiyotensin II, AT1: Anjiyotensin tip 1 reseptörü, AT2: Anjiyotensin tip 2 reseptörü ACE: Anjiyotensin dönüştürücü enzim (3).

2.3.1.3. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim

Reninin aksine kalpte lokal ACE'nin varlığı konusunda bilim adamları hem fikirdir. Kalpte ACE mRNA'sı, sıçan ve insan kalbinde birçok yöntemle kolay bir şekilde gösterilebilmektedir. Aynı zamanda ACE aktivitesi, otoradiyografi ya da enzimatik tayin ile hızlı bir şekilde gösterilebilmektedir (3). İmmünohistokimya ile ACE ekspresyonunun, kardiyak damarlarda ve endokardiyumda yapıldığını göstermiştir (134). Ayrıca mRNA çalışmaları ile, ACE ekspresyonunun kardiyomiyositlerde olduğu da gösterilmiştir (135). Miyokardiyal infarktüstten sonra insan kardiyomiyositlerinde ACE'nin eksprese edildiğinin görülmesi, deneysel çalışmaları desteklemektedir (136).

ACE inhibitörlerinin ilk üyesi olan Kaptopril'in (KAP) antihipertansif amaçlı kullanımı hakkında ilk çalışma 1979'da yayınlanmıştır (137). KAP absorbe edildiğinde metabolize edilmeden etkisi başlamaktadır. Absorbsiyonu %70'dir. Gıda ile alındığında emilimi gecikir ancak etkinliği değişmez. Absorbsiyon hızlıdır ve ilaç alımı sonrası kanda 15 dakika içinde tespit edilir. Böbreklerden elimine edilir (138).

2.3.1.4. Kimaz

İnsan kimazı, Anj-I'den Anj-II'i oluşturur. Kimaz, ACE inhibitörleri ile inhibe edilemez ve Anj-II oluşumundaki alternatif yollardan birinde rol alır. Tüm kalp homojenatı kullanılarak yapılan bir çalışmada, kalpteki Anj-II oluşumunun %80'inin kimaz ile, sadece %11'inin ACE aktivitesine bağlı olarak yapıldığı belirtilmektedir. Bu durum kimaz yolunun, insan kalbindeki önemini artırmaktadır (139). İnsan ve hayvan çalışmaları, intrakardiyak Anj-II oluşturma yollarında önemli tür farklılığı olduğu gösterilmiştir. İnsan kalbinde Anj-II'nin daha çok kimaz aktivitesi ile oluşturulduğu kabul edilmektedir. Köpek, tavşan, sıçan ve fare kalplerinde ise Anj-II oluşumu için ACE aktivitesi daha baskındır. İnsan kalbinde kimaz aracılı oluşan Anj-II'nin önemi henüz tam olarak ortaya konulmamıştır. Klinikte ACE inhibitörlerinin kullanımı, kalp hastalıklarında etkili bir tedavi yöntemidir (3). Deneysel çalışmalarda koronerlerde Anj-II oluşumu, ACE inhibitörleri ile bloke edilir (140). Bununla birlikte ACE'den bağımsız Anj-II oluşum yolunun, kardiyak hipertrofi (141) ve kalp yetmezliği (142) gibi özellikle patolojik koşullarda önemli olduğu belirtilmektedir.

2.3.1.5. Anjiyotensinojen, Anjiyotensin I ve Anjiyotensin II

Anjiyotensinojen mRNA'sının fare, sıçan köpek (143) ve insan kalbinde bulunduğu belirtilmektedir. Fakat izole sıçan kalp çalışmaları, kalpten endojen anjiyotensinojenin salındığı gösterilememiştir. Bu çalışmalarda, perfüzata anjiyotensinojen eklenildiğinde, proteinin hızla kardiyak intertisyuma alınması sonucu, kardiyak anjiyotensinojenin büyük çoğunluğunun plazmadan alındığı düşünülmektedir (3).

Anjiyotensinojen peptidleri kalpte plazmadan daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur (144). Bu bilgi, Anj peptidlerinin kalpte sentezinin bir göstergesi olarak görülebilir olmasına rağmen, peptidlerin kalp dokusuna alındığı ve Anj-II'nin yerel deposu olabileceği de düşünülmelidir. Alternatif olarak, dolaşımdan alınan renin ve anjiyotensinojen yerel ACE ile etkileşmiş, intrakardiyak Anj-II oluşumuna neden olmuş olabilir. van Kats ve ark tarafından radyoaktif işaretli Anj-I ve II kullanarak yapılan bir çalışmada, Anj peptidlerinin kalpte yerel olarak üretildiği ancak kardiyak RAS'ın lokal sentezlenen anjiyotensinojene ve renine bağımlı olmadığı sonucu elde edilmiştir (145).

2.3.1.6. Anjiyotensin Reseptörleri

Anj-II'nin tip 1 (AT1) ve 2 (AT2) olmak üzere iki çeşit reseptörü vardır. Kardiyomiyositlerde, Anj-II'nin hem AT1 hem de AT2 reseptörü bulunur (146). Kardiyak fibroblastlarda, reseptör popülasyonu kardiyak hastalığının bulunup bulunmadığına bağlı olarak değişir. Normal koşullarda sadece AT1 reseptörü bulunur. Fakat patolojik koşullarda AT2'de kardiyak fibroblastlarda eksprese edilir (147). Kalpte iki reseptörün bulunması farklı amaçlara hizmet etmek içindir. AT1 reseptörü kardiyak hücrelerde hipertrofiyi ve proliferasyonu uyarır. AT2 zıt etkilere aracılık etmektedir (148).

Önceki çalışmalar, erişkin sıçan kalbinde %50 oranında AT1 %50 oranında da AT2 reseptörü olduğunu ifade ederken, tek hücre çalışmaları ile erişkin sıçan kalbinde %50 oranında AT1 ve %10 oranında AT2 reseptörünün olduğu gösterilmiştir (149). Otoradyografik çalışmalar, sıçan kalbinin doğum sonrası AT1 reseptörünü 2 kat daha fazla ihtiva ettiğini göstermiştir (150). Sıçanlarda ve farelerde yapılan çalışmalar, AT2 reseptör mRNA'sının fetal dönemlerde yüksek iken, doğumdan sonra hızla düştüğünü göstermiştir (151). Yine neonatal sıçan kardiyomiyositlerinden yapılan primer kültür çalışmaları fetal yaşama göre AT2 reseptöründe %50 oranında azalma olduğu, AT1 reseptör yoğunluğunun ise değişmediği gösterilmiştir (152). Renin anjiyotensin sistem aktivasyonu; vasküler hipertrofi, vazokonstriksiyon, su ve tuz tutumu ile gelişen hipertansiyon ile sonuçlanır. Bu etkilere dominant olarak AT1 reseptörü aracılık ederken diğer hücre ölümü, vazodilatasyon, natriürezis gibi Anj-II'ye bağlı etkiler ise AT2 reseptörü aracılığıyla olur (153).

2.3.2. Kalbin Lokal Renin Anjiyotensin Sisteminin Fonksiyonları

2.3.2.1. Kalbin Lokal Renin Anjiyotensin Sisteminin İnotropik Etkisi

İlk olarak Koch-Weser suprafizyolojik konsantrasyonlarında Anj-II'nin inotropik etkilerini göstermiştir (154). Anjiyotensin II bu etkisinin en azından bir kısmını, sempatik sinir sistemi aracılığı ile oluşturur (155). Bununla birlikte, Anj-II'nin hücre içi kalsiyum girişinde ve kardiyak aksiyon potansiyelinin plato fazında yaptığı değişiklikler de inotropik etkisini oluşturabilir (direk etki) (156). Çeşitli kalp rahatsızlığı olan hastaların sağ atriyum, sağ ve sol ventrikül preparatları ile yapılan in vitro çalışmada, Anj-II'nin inotropik etkisini sadece atriyal preparatta gösterdiği belirtilmektedir. Ancak, insan AT1 reseptörünün aşırı ekspresyonun bulunduğu transgenik sıçanların kullanıldığı

başka bir çalışmada, Anj-II uyarımdan sonra intrasellüler kalsiyumun arttığı gösterilmiştir (3).

2.3.2.2. Kalbin Lokal Renin Anjiyotensin Sisteminin Hipertrofik Etkisi

Anjiyotensin II artmış myokardiyal strese karşı adaptif bir yanıt olarak, AT1 reseptörü aracılığıyla miyosit hipertrofisine neden olur. Kardiyomiyositlerde hipertrofi, kalp fonksiyonlarında kompensatuar mekanizma olarak görev yapmasına rağmen, hipertrofi, konjestif kalp yetmezliği, ani kardiyak ölümler için en önemli risk faktörüdür (157). İn vitro olarak kardiyomiyosit kültürlerinde, hipertrofinin bu etkisi gösterilmiştir (158). Ek olarak hipertrofide, endotelin-1 ve transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) gibi diğer büyüme faktörlerinin de sekonder olarak salındığı gösterilmiştir (159). Sol ventrikülde hipertrofi kalpte Anj-II üretimindeki artışa bağlıdır. Bu artış, fare renini, insan AT1 reseptörü, insan ACE'si ile hem insan renini hem de anjiyotensinojeninin aşırı eksprese edildiği (çift transgenik sıçan) transgenik hayvan modellerinde gösterilmiştir (3). Transjenik hayvan modelleri kullanılarak yapılan çalışmaların sonuçları, Anj-II'nin kan basıncı üzerine etkisinden bağımsız olarak, lokal RAS'ın hipertrofik fonksiyonel role sahip olduğunu göstermektedir. Anj-II'den kaynaklanan hipertrofik değişikliklere, MAP kinaz ve JAK/STAT yollarının aktivasyonunu içeren trozin kinaz ve RhoA kaskatlarının aktivasyonu aracılık eder (160). Sol ventrikül hipertrofisinde en önemli uyumsuzluk diyastolik fonksiyon bozukluğu ile ilişkilidir. Diyastolik disfonksiyon, bozulmuş diyastolik kalsiyum kullanımı ve/veya kardiyak fibrozis gibi yapısal değişikliklerin neden olduğu fonksiyonel bozukluktur (161). Deneysel sol ventrikül hipertrofisi olan sıçanlarla yapılan çalışmalar, lokal olarak üretilen Anj-II'nin kalbin gevşeme, yani diyastolik fonksiyonunu bozabileceğini belirtmektedir (162). Dahası diyastolik fonksiyon, kan basıncını etkilemeyen dozlarda AT1 reseptör antagonisti uygulanması ile düzelebilir. Bu ortamda sol ventrikül bozukluğunun fonksiyonel analizinde, diyastolik disfonksiyonun, bozulmuş sarkoplazmik retikulum kalsiyum pompa (SERCA2) aktivitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (163). Benzer etki, seçici bir endotelin A reseptör antagonisti uygulanan sıçan modelinde de gösterilmiştir. Sıçanlarda endotel sistemin aktivasyonu, doku RAS'ını da aktive eder (164).

Kronik olarak kalp RAS'ının aktivasyonu sadece kalp hipertrofisi veya diyastolik disfonksiyona neden olmaz. Aynı zamanda ilerleyici sistolik disfonksiyon, kalp

büyümesine ve kalp yetmezliğine de sebep olabilir. Transjenik TG1306/1R farelerde Anj-II, kan basıncını yükseltmeden kardiyak hipertrofiye neden olduğu rapor edilmiştir. Uzun vadede bu transjenik fareler takip edildiğinde, yaşlanmayla birlikte dilate kardiyomyopati meydana geldiği ve yabani tip farelere oranla mortalitede önemli artışlar olduğu görülmüştür. Transjenik farelerde kardiyak hipertrofi, SERCA2 aktivitesi ve azalmış Ca^{+2} transportu ile ilişkilidir. Ayrıca sistolik fonksiyon izole kardiyomiyositlerde bozulmuştur (165). AT2 reseptörünün kardiyak hipertrofideki rolleri hakkında belirsiz sonuçlar elde edilmiştir. AT2 reseptör, başlangıçta antihipertrofik etkiler ile ilişkili olsa da (166), AT2 eksikliği olan farelerle yapılan çalışmada Anj-II infüzyonu tarafından oluşturulan kardiyak hipertrofide AT2 reseptörünün önemli bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (167).

2.3.2.3 Kalbin Lokal Renin Anjiyotensin Sisteminin Mekaniksel Gerilime Etkisi

Anjiyotensin II yolu, kalp hipertrofisindeki aracılık rolünden dolayı mekaniksel gerilim için “hızlı yanıt sistemi” olarak tanımlanır (168). İn vivo ve in vitro çalışmalarda, gerilimin Anj-II üretimini uyarabildiği gösterilmiştir. Renin anjiyotensin sisteminin neredeyse tüm genlerinin transkripsiyonu gerim ile uyarılabilir. Sol ventriküldeki aşırı yük, kardiyak RAS’da benzer bir aktivasyona neden olur (169). Neonatal kardiyomiyosit kültür çalışmasında, p53 ve JAK/STAT yolları ile lokal Anj-II’nin üretildiği ve AT1 reseptör antagonisti uygulandığında üretimin azaldığı belirtilmektedir. Önceleri bu etkilere tamamen AT1 reseptörünün aracılık ettiği düşünülmektedir. AT2 “knockout” fare çalışmaları, AT2 reseptörünün de bu değişikliklere aracılık ettiğini ortaya çıkarmıştır (147).

2.3.2.4. Kalbin Lokal Renin Anjiyotensin Sisteminin “Remodelling”e Etkisi

Kardiyak Anj-II’nin proliferatif uyarılarına muhtemelen en uygun kardiyak hücre topluluğunun fibroblastlar olduğu Schelling ve Ganten tarafından gösterilmiştir (170). Patolojik değişikliklerin bir hücrel göstergesi olarak bildirilen fibroblast proliferasyonu kardiyak “remodelling” de gösterilmiştir. Yerel ACE oluşumu bu süreçte önemli rol oynar. Önceki çalışmalarda deneysel miyokard infarktüsü (artmış fibrosis ile devam eder) ile ratlarda kalp yetmezliği modelinde, plazma ACE aktivitesinde değişiklik olmadan kalp ACE aktivitesi ve mRNA’sında bir etkinleşme olduğunu göstermiştir (171). Sun ve Weber sıçan kalplerinde miyokard infarktüsünden sonraki 1. ve 4. haftada infarktüslü alanlarda Anj-II reseptörlerinin yoğun olarak bulunduğunu,

miyofibroblastların baskın hücre olduklarını göstermiştir (172). Fakat fibroblastlarda, makrofajlarda ve kan damarında Anj-II reseptörünün yoğunluğu düşüktür. Miyokard infarktüsü sonrası AT1 antagonisti olan losartan ile tedavi edilen sıçanlarda, infarktüsli bölgelerdeki kollajen hacmi, tedavi edilmeyen hayvanlara kıyasla anlamlı bir azalma göstermiştir (173).

Anjiyotensin II kaynaklı fibrozis mekanizmalarının en azından bir kısmı, büyüme faktörü yollarının AT1 reseptörünü aktive etmesiyle meydana gelir. Bundan en fazla sorumlu olan TGF- β 'dır. Fare Ren-2 geninin eksprese edildiği transgenik sıçanların kullanıldığı çalışmada, TGF- β 'nın inhibisyonu (tranilast ile) interstisyel kardiyak fibrozisi azalttığı ve transgenik sıçanların yaşam sürelerini uzattığı gösterilmiştir (174).

Kardiyak RAS'ın aktivasyonu sadece yapısal anormalliklere neden olmaz. Aynı zamanda, hem ventriküler hemde atriyal aritmilere neden olan elektriksel değişimler oluşturur. Kalp ameliyatı geçirmiş hastalarda, paroksizmal veya persistan atriyal fibrilasyon öyküsü olan hastalarda interstisyel fibrozisin arttığı ve sinüs ritmindeki hastalara göre doku ACE düzeyinin üç kat daha yüksek olduğu gösterilmiştir (175).

2.3.2.5 Kalbin Lokal Renin Anjiyotensin Sisteminin Apoptozise Etkisi

PC-12 hücreleri (sıçan feokromositoma hücre hattı) ile yapılan önceki çalışmalarda programlanmış hücre ölümünde (apoptozis) AT2 reseptörlerinin aracılık ettiği ileri sürmüştür. Kardiyomiyositlerde apoptoz, AT1 reseptörü üzerinden meydana geldiği kabul edilmektedir. Miyokard infarktüsü, hipertansif ve diyabetik kardiyomiyopati den sonra kardiyak "remodelling" sürecinde apoptozun etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Kalp yetmezliğinde RAS blokajının (AT1 antagonistleri tarafından bloke edilebilir) yararlı etkileri, apoptozis azalması nedeniyle olduğu düşünülmektedir (3).

2.3.3. Anjiyotensin II, Oksidatif Stres ve Mitokondri ilişkisi

Oksidatif stres böbrek hasarlarının ve kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojisinde önemli rol oynar. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, Anj-II'nin sadece sitozolik değil aynı zamanda mitokondriyal ROS oluşumunu uyardığı belirlenmiştir (176).

Reaktif oksijen ürünleri normal aerobik metabolizmanın alt ürünlerindendir. Reaktif oksijen ürünleri nükleik asitleri, lipitleri ve proteinleri okside edebilir ve bu etkisi ile biyolojik fonksiyonların modifikasyonuna ve/veya kayıplarına neden olabilir.

Patofizyolojik koşullar altında ROS oluşumu artmaktadır. Okside olan ajanlar; inflamasyona, dejeneratif hastalıklara, hipertansiyona, diyabete ve onkogeneze neden olabilir (176). Fizyolojik koşullarda düşük ROS konsantrasyonları, redoks duyarlı protein fosfatazları veya inaktive kinazları okside ederek, transkripsiyon faktörleri veya reseptörlerinin fosforilasyonunu değiştirebilir (177).

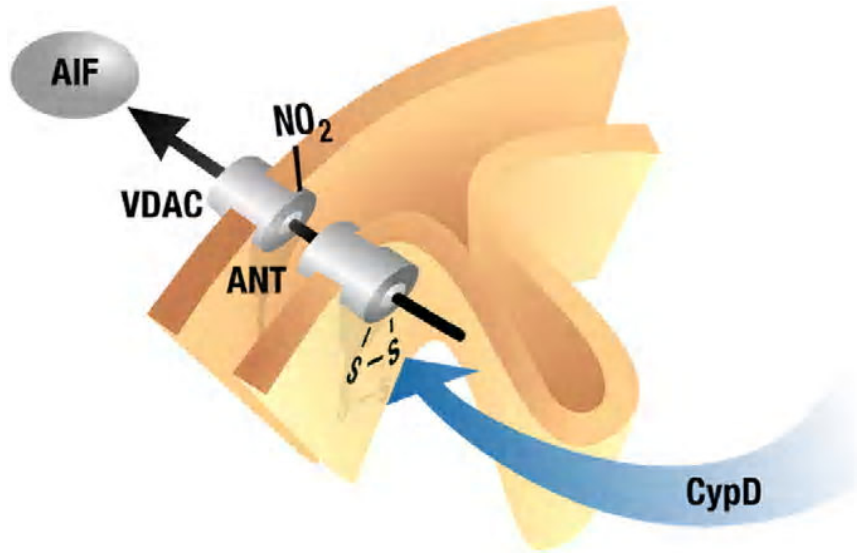
Mitokondri enerji üretim organelidir. Aynı zamanda sitozolik Ca^{+2} seviyesi ile doku oksijen gradiyetinin düzenlenmesi, H_2O_2 sinyali ile apoptozun modülasyonu gibi önemli diğer hücrel fonksiyonları da yürütür (176). Hücrel oksijenin %90'ından fazlası mitokondride kullanılır ve kompleks IV de suya dönüştürülür. Tüketilen oksijenin yaklaşık %1-2'si kompleks I ve III'den süperoksit dönüştürülür (178). Mitokondriyal ROS (mtROS), kompleks II'den kompleks I ve oksijene doğru gelişen ters yönde transporttan, matriks enzimlerinden, dış membran monoaminoksidazından (MAO) ve mitokondriyal nitrik oksit sentazdan da oluşabilir (176). Süperoksit hem mitokondri matriksine, hem de mitokondrinin iç-dış zarları arasındaki boşluğa salınabilir (179). Süperoksit (O_2^-) mitokondri iç membranında bulunan mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD) ile, dış membranda bulunan bakır çinko süperoksit dismutaz (CuZn-SOD) ile H_2O_2 'e dönüştürülür (176). H_2O_2 mitokondriyal glutatyon peroksidaz ile suya ya da katalaz tarafından su ve oksijene dönüştürülür. Mitokondriyal disfonksiyon, hem hücrenin biyoenerji kapasitesinin azalması hemde mtROS aracılı sinyal yolağının bozulması sonucu hücrelere hasar verir. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu enerji metabolizması üzerine etkisinin dışında mitokondriyal proteinleri ve metabolik ara ürünleri de etkiler (180).

Anjiyotensin II hem NO hemde NAD(P)H oksidaz aracılığıyla süperoksit oluşturur. Aynı zamanda Anj-II endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) üzerinden NO'dan süperoksit oluşumuna da neden olur. Yapılan çalışmalarda damar düz kasında ve in vivo sıçan aortasında Anj-II'nin mtROS oluşumunu uyardığı gösterilmiştir (181). Endotelial hücrelerde Anj-II mtROS'u artırır ve redoks duyarlı NF-kappaB'i aktive eder. NF-kappaB'nin aktivasyonu vasküler hücre adezyon molekülü-1'in ekspresyonuna neden olur. Bu molekül aterosklerotik lezyonun başlamasında anahtar moleküldür (181). Farelerde akut ve kronik Anj-II infüzyonu kardiyak mitokondriyal elektron taşıma sisteminin ve Krebs siklusu genlerinin ekspresyonunun azalmasına neden olur (182). Bu bilgi Anj-II'nin mitokondriyal enerji metabolizmasını baskıladığını gösteren önceki

çalışmaların sonuçlarını desteklemektedir. Son yapılan çalışmalarda, Anj-II'nin mtROS üretimini arttırması sonucu mitokondriyal membran potansiyelini azalttığı belirtilmektedir (176).

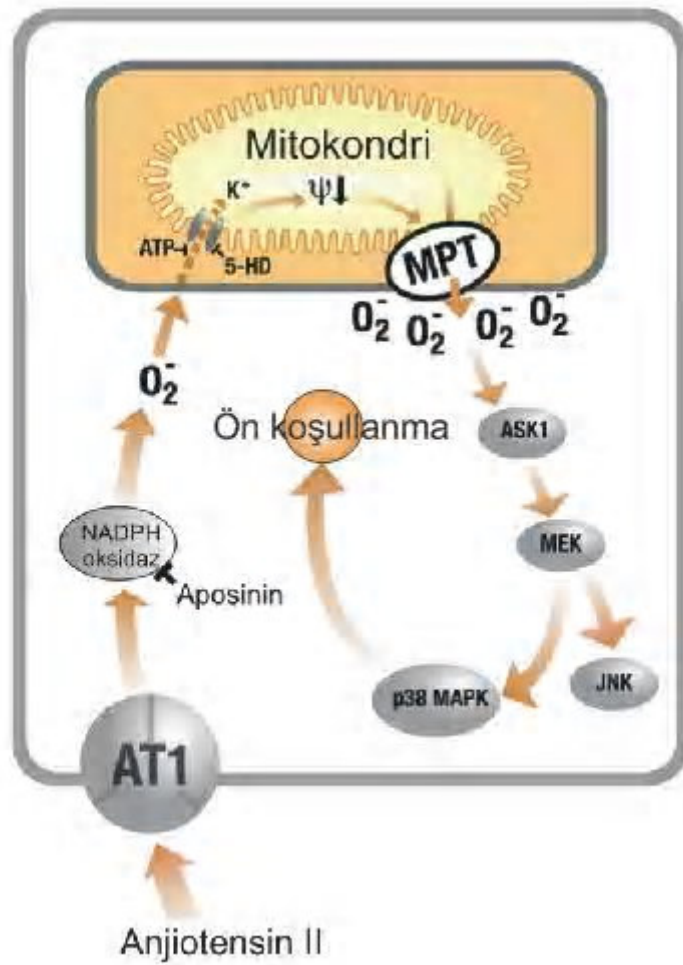
Normal fizyolojik şartlar altında, Ang-II-aracılı ROS ve NO kaynaklı oksidan üretimi ve redoks duyarlı sinyal yollarının stimülasyonu birbiriyle ilişkili olarak düzenlenmektedir. Ancak hipertansiyon, diyabet ve yaşlanma gibi RAS'ın aşırı aktive olduğu şartlarda, Ang-II-bağımlı ROS üretiminde ki artış hücre oksidasyonu ve doku hasarı için önemli bir faktörü haline gelebilir (176,181).

Mitokondri iç zarında hücre ve mitokondri için önemli olan mitokondriyal protein kompleksleri bulunur. Bunlardan birisi de mitokondriyal permeabilite geçiş porlarıdır (mPTP). mPTP, voltaja duyarlı anyon kanalı (VDAC), adenin nükleotid translokaz (ANT) ve matriksde bulunan düzenleyici alt birim olan siklofilin D (CypD)'den oluşur (Şekil 2.7). ANT, peroksinitrit dahil oksidanlardan etkilendiği bilinmektedir. ANT mitokondri dış zarında bulunan VDAC ile bağlantılıdır. ANT'nin yakınında bulunan tiyol grubunun oksidasyonu ile matrikse bulunan CypD'nin translokasyonuna neden olur. VDAC-ANT-CypD kompleksi mPTP'lerin açılmasını ve pro-apoptotik proteinlerin sitozole geçmesini sağlar. Aynı zamanda mPTP, mtROS'un sitoplazmaya geçmesinde de önemli rol oynar (4).



Şekil 2.7. Mitokondriyal geçiş porlarının oksidasyon ile açılması. VDAC: Voltaja duyarlı anyon kanalı, ANT: Adenin nükleotid translokaz, CypD: Matriksde bulunan siklofilin D düzenleyici alt birim, AIF: Apoptotiz uyarıcı faktör (4).

NADPH oksidaz kaynaklı sitozolik ROS, mitokondriyal ROS oluşumunu da tetikler. mtROS oluşumu, süperoksitin ve mitokondri membranında bulunan mitokondriyal ATP-duyarlı potasyum kanalları (mtK_{ATP}) ile etkileşmesine dayanmaktadır. mtK_{ATP} 'nin açılması potasyumun mitokondriye geçmesine ve mitokondri membran potansiyelinin azalmasına ($\Delta\psi_m \downarrow$) bununla birlikte matrikste şişme ve alkalinizasyona neden olmaktadır. Matriks alkalinizasyonun, H_2O_2 oluşumundaki artıştan kaynaklandığı ileri sürülmektedir (4)(Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Anjiyotensin II'nin NADP oksidaz kaynaklı sitozolik reaktif oksijen ürünleri ile mitokondriyal reaktif oksijen ürünlerini oluşturma mekanizması. $\Delta\psi_m$: Mitokondri membran potansiyeli, AT1: Anjiyotensin II tip-1 reseptörü, PTP: Mitokondriyal permeabilite geçiş porları, $O_2^{\cdot-}$: Süperoksit radikali (4).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma; Etik Kurul onayı (08/80 karar numaralı) alınarak Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinden (DEKAM) sağlanan ve vücut ağırlığı 355 ± 29 g olan 70 adet Wistar albino cinsi erkek sıçanlar ile gerçekleştirildi. Sıçanlar deney süresince oda sıcaklığı $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ arasında olan ortamda barındırıldı. Gece-gündüz döngüsü otomatik aygıtla 12 saat gece (6.00-20.00), 12 saat gündüz (20.00-6.00) olacak şekilde ayarlandı. Çalışma süresince hayvanlara pelet şeklinde standart sıçan yemi verildi. Deney öncesi ve deney bitiminde sıçanların ağırlıkları belirlendi.

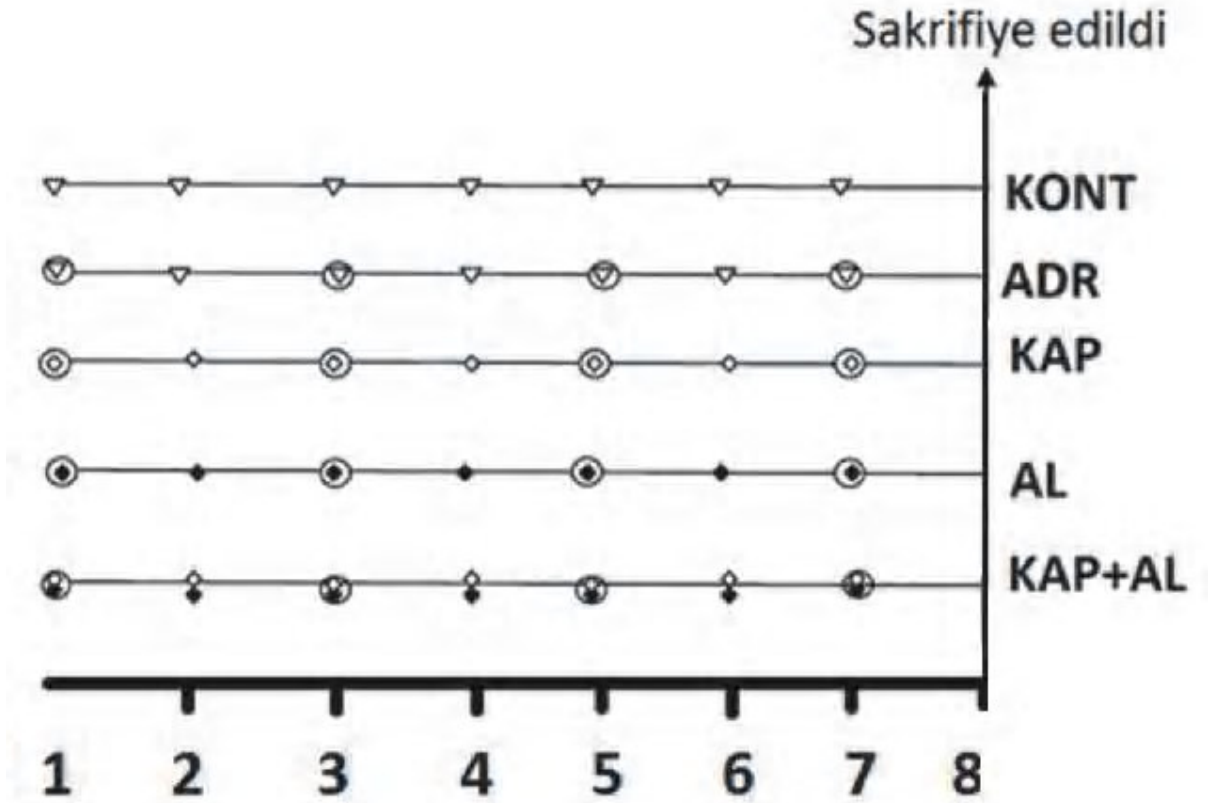
3.1. DENEY GRUPLARI

Sıçanlarda kalp yetmezliği ADR ile oluşturuldu. Her sıçana, 4mg/kg olacak şekilde iki gün arayla 4 defa ADR intraperitoniyal (ip) olarak verildi (toplam kümülatif doz 16 mg/kg). Renin anjiyotensin sistem ile ilgili gruplara maddeler, ADR verilmesi ile başlandı ve birlikte sonlandırıldı. Deney grubundaki hayvan sayısı 14 olarak belirlendi. Gruplardaki hayvanların 7 tanesi sadece hemodinamik ölçümler için kullanılırken, diğer 7 tanesinin kalpleri ve plazmaları biyokimyasal ölçümlerde kullanıldı. Son doz uygulanmasından bir gün sonra, sıçanların kan basınçları, kalp atım hızları, sol ventrikül basınçları, EKG'leri kaydedildi veya kalpleri, kanları alındı.

Ağırlıkları ölçülen hayvanlar rastgele 5 gruba ayrıldı. Gruplar şu şekilde dizayn edildi;

- 1. Kontrol Grubu (KON):** Hayvanlara 7 gün boyunca ip (0,1 ml) ve intragastrik (0,1 ml) yoldan serum fizyolojik verildi.

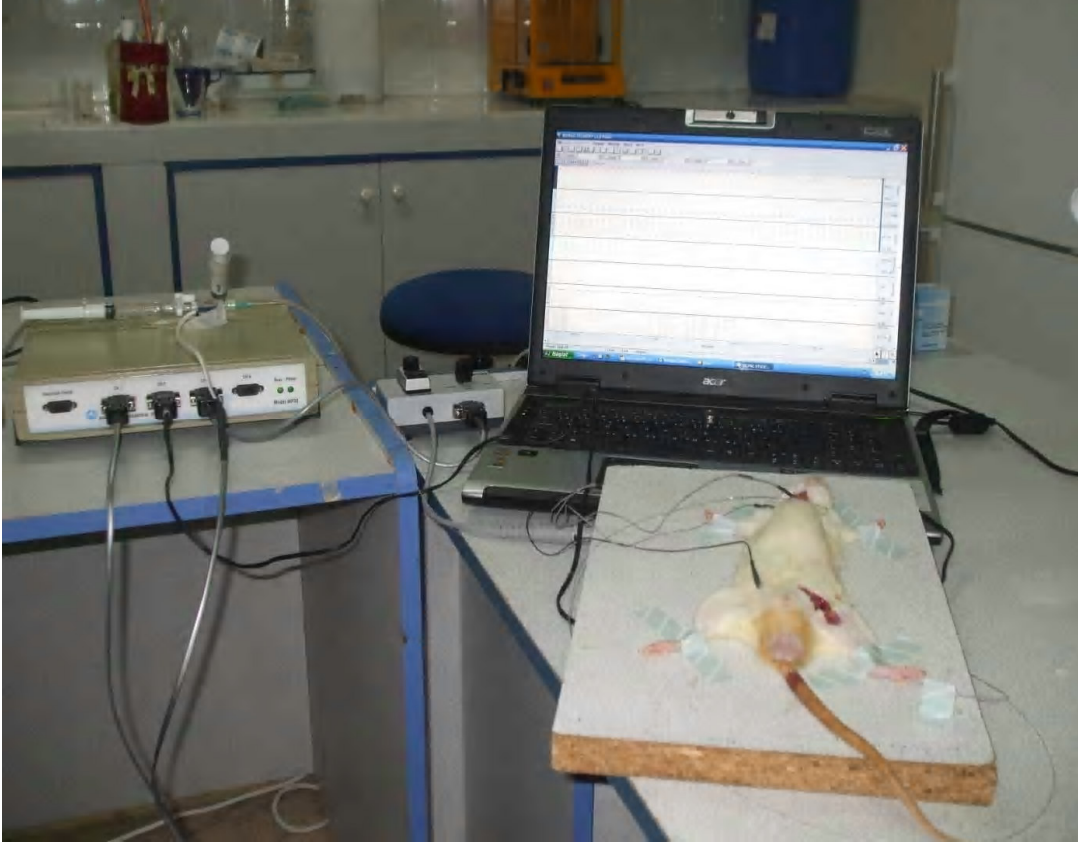
2. **Adriyamin Grubu (ADR):** Hayvanlara 4mg/kg/ip (0,1 ml SF içinde) olacak şekilde iki gün arayla dört doz ADR verildi.
3. **Kaptopril +ADR Grubu (KAP):** Hayvanlara 7 gün boyunca her gün 10mg/kg intragastrik (0,1 ml distile su içinde) Kaptopril (ACE enzim inhibitörü) ve ADR grubu ile aynı doz ve sürede ADR verildi.
4. **Aliskiren + ADR Grubu (AL):** Hayvanlara 7 gün boyunca her gün 50mg/kg intragastrik (0,1 ml distile su içinde) Aliskiren (renin enzim inhibitörü) ve ADR grubu ile aynı doz ve sürede ADR verildi.
5. **Kaptopril +Aliskiren +ADR Grubu (KAP+AL):** Diğer gruplarla aynı doz ve sürede KAP, AL ve ADR verilen grup(Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Deney protokolü. Sıçanlar 5 gruba ayrıldı; kontrol grubu [KONT, serum fizyolojik enjeksiyonu (▽), 7 gün], adriyamin grubu [ADR, adriyamin enjeksiyonu 2 gün arayla 4 doz (○) ve serum fizyolojik (▽) 7 gün], kaptopril grubu [KAP, gavajla kaptopril (◇) 7 gün ve adriyamin enjeksiyonu 2 gün arayla 4 doz (○)], Aliskiren grubu [AL, gavajla Aliskiren (◆) 7 gün ve adriyamin enjeksiyonu 2 gün arayla 4 doz (○)], kaptopril ve Aliskiren grubu [KAP+AL, gavajla kaptopril (◇) ve Aliskiren (◆) 7 gün ve adriyamin enjeksiyonu 2 gün arayla 4 doz (○)].

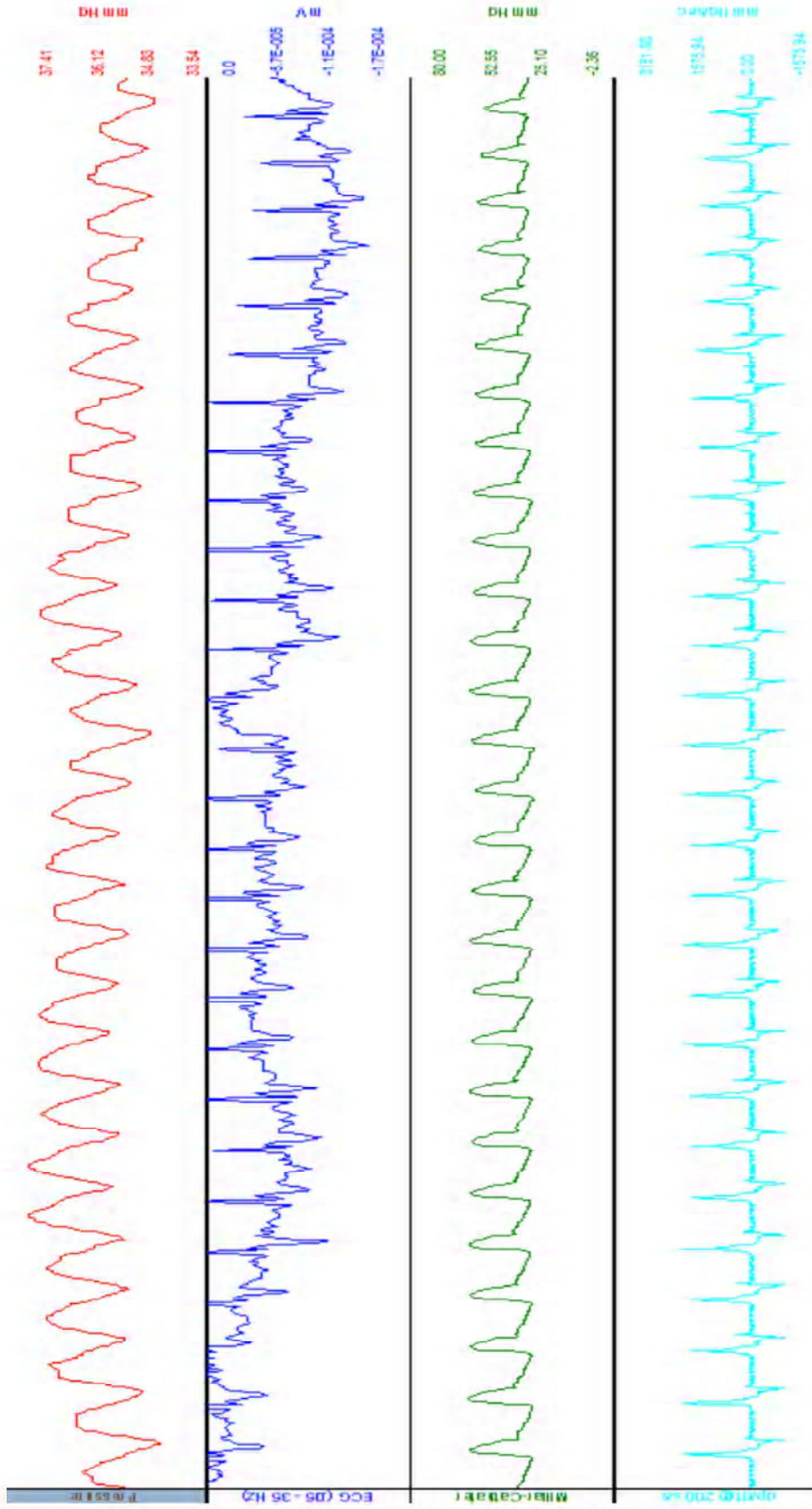
3.2. ELEKTROKARDİYOMİYOGRAM (EKG) KAYDI VE KALP FONKSİYONLARININ ÖLÇÜMÜ

Hemodinamik ölçümlere başlamadan önce, hayvanların ağırlıkları tekrar ölçüldü (A_2). Ketamin (39.35 mg/kg) ve xylazine (4.96mg/kg) karışımı ile anestezi edildi. Sol ventrikül fonksiyonlarını değerlendirmek için hayvanların boyun bölgesinde karotis artere paralel bir kesi yapıldı. Damar-sinir paketine ulaşınca kadar kaslar künt diseksiyon ile zarar verilmeden ayrıldı. Damar sinir paketine ulaşılınca *Arteria carotis communis dextra* ve *Nervus vagus* zarar görmeyecek şekilde hassas bir şekilde etraftaki dokulardan ayrıldı. Hemostatik pens aracılığıyla kan akımı kesilen damara bir enjektör ucu ile “Millar” kateterin (SPR 429, Millar Instruments Inc., Houston, Tx) geçebileceği büyüklükte delik açıldı. Kateter karotis artere girdikten sonra sol ventriküle girene kadar ilerletildi. Sol ventriküle ulaşılınca 3/0 ipek iplik ile kateter damara sabitlendi. Cerrahi işlem bittikten sonra ventrikül ve kan basınçlarının, kalp atım hızının stabilize olması için 30 dakika beklenildi, sonra kayıtlar alındı. Sol ventrikül sistolik basıncı (LVSP), sol ventrikül diyastol sonu basıncı (LVEDP), basınç gelişim hızı (kasılma, $+dP/dt$) ve basınç bozulma hızı (gevşeme, $-dP/dt$) bir analog-dijital sistem yardımı (MP 30, Biopac System) ve bir basınç çevireci ile bilgisayara kaydedildi (Resim 3.1). Sol ventrikül basınç gelişimi (LVDP); sol ventrikül sistolik basınçtan (LVSP) sol ventrikül diyastol sonu basıncı (LVEDP) çıkartılarak hesaplandı ($LVDP=LVSP-LVEDP$).



Resim 3.1. Ventrikül ve kan basıncı kaydı alma işlemleri.

Sol ventrikül basınçları kaydedilirken aynı anda kan basıncı, kalp atım hızı ve elektrokardiyogram kayıtlarında alınmaya devam edildi (Resim 3.2). Bu amaçla elektrotların pozitif ucu sol kola, negatif ucu sağ kola ve toprak elektrotu sağ bacağa bağlandı. EKG'den PR'nin, QRS'in, ST'nin ve QT'nin süreleri, R dalgasının amplitüdü değerlendirildi. PR intervali: P dalgasının başlangıcından QRS kompleksinin başlangıcına kadar geçen süredir. QRS kompleksi: Q dalgasının başlangıcından S dalgasının sonuna kadar geçen süredir. Ventriküllerin depolarizasyon sürecini kapsar. ST segmenti: QRS kompleksinin sonu ile T dalgasının başlangıcı arasındaki elektrokardiyogram bölümüdür. Ventrikül miyokardının tümünün depolarize duruma geçtiği andan başlayarak ventrikül repolarizasyonunun başladığı ana kadar sürer. QT intervali: Q dalgasının başından T dalgasının sonuna kadar geçen süredir. Ventriküllerin depolarizasyon ve repolarizasyon süreçlerini kapsar. R dalgası QRS kompleksindeki ilk pozitif defleksiyondur.

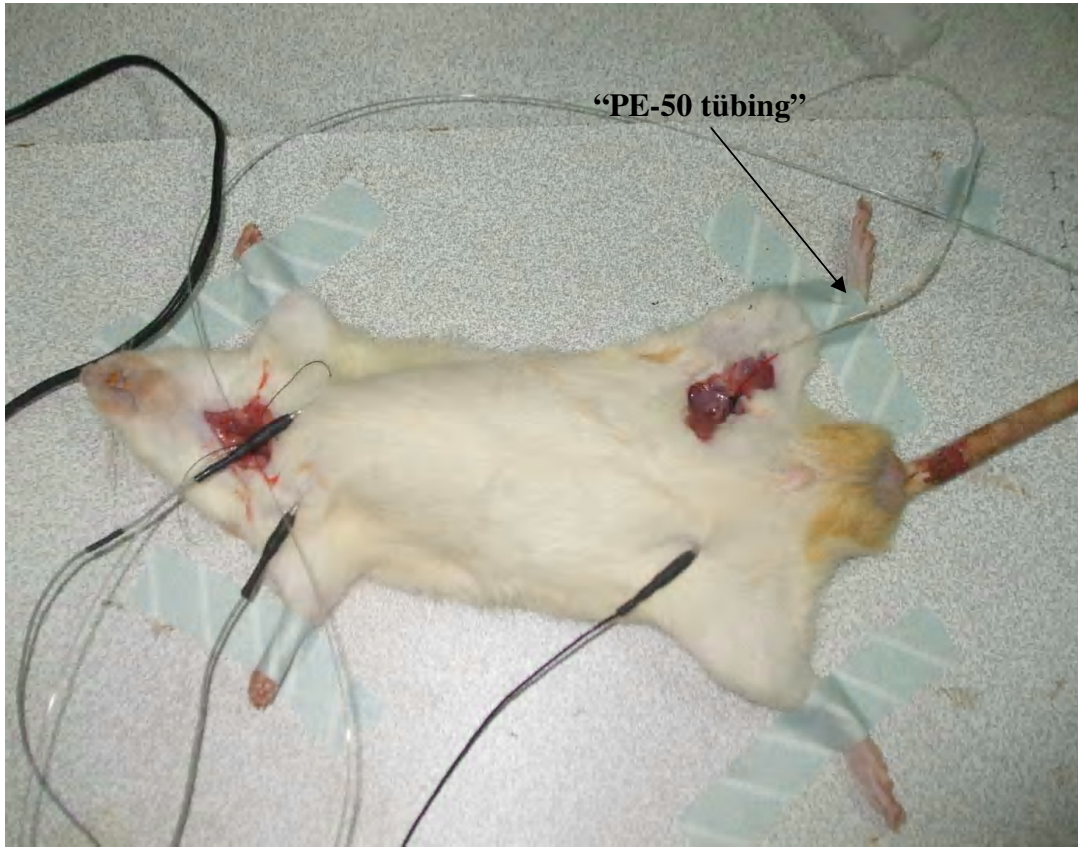


000005

Şekil 3.2. Sadece adriyamisin verilen gruba (ADR) ait bir deney kaydı.

3.3. ARTERYAL KAN BASINCININ ÖLÇÜMÜ

Kan basınçlarını ve kalp atım hızlarını ölçmek için, aseptik koşullar altında sol ingüinal bölgede *Arteria femoralis sinistra* trajesine paralel olacak şekilde deride bir kesi yapıldı. Deri altı dokusu ve fasyalar künt diseksiyon ile ayrılarak *A.femoralis*'e ulaşıldı ve *Nervus asiaticus* korunarak damarlar ayrı ayrı izole edildi. Kayıtların alınabilmesi için *A.femoralis*'e 100 U/mL oranında heparin içeren serum fizyolojik ile dolu PE-50 tübing (Intramedic, Clay Adams, MD) yerleştirildi (Resim 3.2). Basınç transdüserinin aldığı kayıtlar MP-30 sistemi (Biopac Systems, Inc., CA) bulunan “amplifier” ile büyütülüp değerlendirildi.



Resim 3.2. Kan basıncı kaydı için *A.femoralis*'e “tübing” yerleştirilmiş bir deney hayvanı.

Biyokimyasal ölçümlerde kullanılan hayvanlardan kan örneği alındı. Alınan kan örneği 4000 rpm’de 5 dakika süreyle +4⁰C’de santrifüj edildi. Elde edilen plazmalar total antioksidan seviye (TAS) ve total oksidan seviye (TOS) ölçülene kadar -80⁰C’de saklandı. Hayvanların kalpleri tartıldı ve mitokondri membran potansiyeli (MMP) ve ATP üretim miktarı ölçümü için -80 °C de saklandı.

3.4. KARDİYOMİYOSİT MİTOKONDRİLERİNİN VE SİTOZOLÜNÜN İZOLASYONU

Sol ventriküller 250 mM sukroz, 5mM Tris HCl ve 2 mM EGTA içeren 4 ml'lik medium ortamında Ultra-Turrax marka (IKA T25) homojenizatörde 18G'lik bıçakla kıyıldı. Elde edilen homojenat 2000 g'de 8 dakika santrifüj (Nüve NF 1200R) edildi. Santrifüj edildikten sonra oluşan süpernatantdan 1 mL alınarak 12000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. İkinci santrifüjden sonra hücre sitozolünden oluşan süpernatant daha sonra TAS ve TOS ölçümlerinde kullanılmak üzere -80 °C de saklandı. Geriye kalan "pellet" deki mitokondriler, 140 mM KCl ve 20 mM Tris HCl içeren 250 il'lik resüspansiyon solüsyonuyla sulandırıldı ve kullanılıncaya kadar -80 °C de saklandı.

3.5. KARDİYOMİYOSİT MİTOKONDRİ MEMBRAN POTANSİYELİNİN ÖLÇÜMÜ

Mitokondriyal spesifik katyonik floresan boya "5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl benzimidazolyl carbocyanine iodide" (JC-1) mitokondri membran potansiyeli (MMP) ölçümünde kullanıldı (Cayman Chemical, Ann Arbor Mi).

JC-1 1/10 oranında serum fizyolojik ile sulandırıldı. Her bir plate kuyucuğuna 50 µL mitokondri solüsyonlarından konuldu üzerine 10 µL sulandırılmış JC-1 eklendi ve karanlıkta 37°C de 20 dakika "plate shaker" ında (PST-60-HI plus Thermo shaker, BIOSAN) 250 rpm de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra mitokondriler "floresan plate" okuyucuda (Biotek, Synergy HT) analiz edildi.

Sağlıklı hücrelerde JC-1, 560 ve 595 nm'de sırasıyla uyarma ve emisyon ile güçlü floresan yoğunluğu görüntülenebilen J-agregatlar oluşturur. Apoptotik ya da sağlıklı hücrelerde JC-1, 485 ve 535 nm'de sırasıyla uyarma ve emisyon ile güçlü floresan yoğunluğu görüntülenebilen JC-1 monomerleri oluşturur. J-agregat floresans (kırmızı) yoğunluğunun monomerlerin floresan (yeşil) yoğunluğuna oranı mitokondri membran potansiyelinin bir göstergesi olarak kullanılır. JC-1, mitokondrilerde MMP'e bağlı olarak birikir. Normal MMP'e sahip mitokondriler kırmızı floresans yayan JC-1 agregatlar oluşturur. Depolarize olmuş mitokondriler yeşil floresans yayan JC-1 monomerleri şeklinde kalır.

3.6. KARDİYOMİYOSİT MİTOKONDRİSİNDE ATP MİKTARININ ÖLÇÜMÜ

Hücrelerin hayatta kalması ve kendi özel işlevlerini yerine getirmek için kullanılan ATP, canlı hücrelerin fonksiyonel bütünlüğünü değerlendirme amaçlı kullanılmaktadır. ATP ölçümünde kullanılan kit (Cambrex Bio Science, Rockland, USA), metabolik olarak aktif hücrelerin tamamında mevcut bulunan ATP'nin biyoluminesansı esasına dayanmaktadır. Bioluminesans yönteminde ATP'den ışık oluşumunu katalizleyen bir enzim olan, "lusiferaz" kullanılmaktadır.

100 µL'lik mitokondri örneklerine 50 µL "Cell Lysis Reagent" eklendi ve oda ısısında 12 dakika inkübe edildi. Süre bitiminde örnekler 4000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi (Nüve). Santrifüj sonrası "süpernatant" 75 µL alındı ve 50 µL Via Light eklendi. Oda ısısında 2 dakika inkübe edilen örnekler luminometre de (Biotek, Synergy HT) analiz edildi. ATP konsantrasyonu bilinen standart örneklerin değerleri kullanılarak standart eğri elde edildi. Bu eğri her bir örneğin ATP konsantrasyonunun hesaplanmasında kullanıldı.

3.7. BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

3.7.1. Total Oksidan Seviyenin Ölçümü

Total oksidan seviye (TOS) plazmada, miyosit sitozolünde ve mitokondrisinde ticari kit "Rel Assay" kullanılarak spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Örneklerde bulunan ferröz iyon-o-dianisidin kompleksi, ferrik iyonla oksidlenmektedir. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda "xylenol orange" ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örneklerde bulunan oksidanların miktarlarıyla ilişkili olan şiddet, spektrofotometrik olarak ölçülmektedir.

Kör, standart ve örneklerden 12,8 µL alındı ve üzerine 205,13 µL "reagent" 1 eklendi. 37 °C'de 5 dakika 300 rpm'e ayarlanmış "plate shakeri"nda (Thermo) iyice karıştırıldı. 660 nm dalga boyuna ayarlanmış ELISA cihazında (Biotek, Synergy HT) başlangıç absorbansı (A1) okundu. Daha sonra 32,05 µL "reagent" 2 ilave edildi. 37 °C'de 5 dakika 300 rpm'e ayarlanmış "plate shakeri"nda (Thermo) iyice karıştırıldı ve 660 nm de son absorbans (A2) okundu. Standartın konsantrasyonundan faktör hesabı yapıldı. Örneklerin A değerleri, körün A değerinden çıkartılıp faktörle çarpıldı. Sonuçlar µmol H₂O₂/L olarak ifade edildi.

3.7.2. Total Antioksidan Seviyenin Ölçümü

Total antioksidan seviye (TAS) plazmada, miyosit sitozolünde ve mitokondrisinde ticari kit (Rel Assay) kullanılarak spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. TAS güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan seviyesini ölçen bir parametredir. Bu kit, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)'nin peroksidaz (metmiyoglobin) ve H₂O₂ ile inkübe edilip 530 nm'de absorbans veren stabil mavi-yeşil renkli ABST radikali oluşumu prensibiyle çalışmaktadır. Numunelerde bulunan antioksidanlar mavi-yeşil renk oluşumu konsantrasyonları ile orantılı olarak ABST oluşumunu azaltmaktadır.

Kör, standart ve örneklerden 31,25 µL alındı ve üzerine 208,31 µL "reagent" 1 eklendi. 37 °C'de 5 dakika 300 rpm'e ayarlanmış "plate shakeri" nda (Thermo) iyice karıştırıldı. 530 nm dalga boyuna ayarlanmış ELISA cihazında (Biotek, Synergy HT) başlangıç absorbansı (A1) okundu. Daha sonra 10,41 µL "reagent" 2 ilave edildi. 37 °C'de 5 dakika 300 rpm'e ayarlanmış "plate shakeri" nda iyice karıştırıldı ve 530 nm de son absorbansı (A2) okundu. Standartın konsantrasyonundan faktör hesabı yapıldı. Örneklerin A değeri, körün A değerinden çıkartılıp faktörle çarpıldı. Sonuçlar Trolox equiv/L olarak ifade edildi.

3.7.3 Oksidatif Stres İndeksinin Hesaplanması

Oksidatif stres indeksi (OSI), oksidatif stres derecesinin bir indikatör parametresi olup, TOS ve TAS değerlerinin oranlanması ile hesaplanmaktadır (Şekil 3.3). OSI'nin formülizasyonu aşağıdadır.

$$OSI = [(TOS)/(TAS) \times 100].$$



Şekil 3.3. Oksidatif stres indeksi şekli.

3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Alınan kayıtlardan rastgele 10 adet dalga seçildi ve bu dalgaların aritmetik ortalamaları değerlendirildi. İstatistiksel hesaplamalar, Excell ve SPSS 16 programları kullanılarak yapıldı. Verilerin dağılımları Kolmogorov-Smirnov ve Levene testleri ile sınıandı. Buna göre $p>0,05$ değerleri bulunan veriler normal dağılım gösteren (parametrik) ve bunun altındaki değerlere sahip veriler ise normal dağılım göstermeyen (nonparametrik) veriler olarak kabul edildi. İkiiden çok grup arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde; normal dağılıma uygunluk saptanan koşullarda, tek yönlü ANOVA ve ardından post hoc test olarak, Tukey testi kullanıldı. Normal dağılıma uygunluğun saptanmadığı koşullarda ise ikiden fazla grubun karşılaştırılmasında Kruskal Wallis ANOVA ve ardından da Mann-Whitney U testi kullanıldı. Gruplar arasında yapılan karşılaştırma sayısına göre α değeri ayarlandı. $p<0,0125$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi. Aynı grubun tedavi öncesi ve sonrası vücut ağırlıklarının karşılaştırılmasında bağımlı örneklemelerde t testi kullanılarak yapıldı. Değerler $\text{ort.} \pm \text{SEM}$ olarak gösterildi.

4. BULGULAR

4.1. GRUPLARIN VÜCUT VE KALP AĞIRLIKLARI DEĞİŞİMİ

Çalışmanın başında hayvanlar, vücut ağırlıkları tartıldıktan (A1) sonra gruplara rastgele dağıtılmıştır. Gruplar arasında A1 yönünden istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Bu bize grupların homojen dağıldığını göstermektedir (Tablo 4.1).

Sekiz günlük ilaç uygulamasının bitiminde, hemodinamik kayıtlar veya biyokimyasal ölçümler için dokuların alındığı gün, hayvanların vücut ağırlıkları tekrar ölçülmüştür (A2). Kontrol grubunda anlamlı bir ağırlık değişimi olmamış, ADR ve AL gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlenmiştir (a: $p<0,05$). KAP+AL grubunun A2'i, sadece ADR verilen gruba göre istatistiksel olarak artmıştır (b: $p<0,05$). Kontrol grubu hariç diğer grupların A2'leri A1'lerine göre azalmıştır (*: A1'e göre). Ağırlık kazancı yönünden gruplar ile kontrol arasında anlamlı farklılık bulunmuştur (a: $p<0,05$). KAP+AL grubunun ağırlık kazancı, AL grubuna göre anlamlı düzeyde artmıştır (c: $p<0,05$; Tablo 4.1).

Adriyaminin, KAP ve AL gruplarının kalp ağırları (KA) kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gösterirken (a: $p<0,05$), KAP+AL grubunun KA arasında fark bulunmamıştır. KAP+AL grubunun sol ventrikül ağırlığı (SVA) sadece ADR verilen gruba göre anlamlı derecede artmıştır (b: $p<0,05$). KA ve SVA'da bu değişiklikler görülmesine rağmen, 100g vücut bağırlığı başına düşen KA ve SVA'ları bakımından gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Adriyaminin ile tedavi edilen sıçanların vücut ve kalp ağırlıkları üzerine renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin etkisi.

	KONT	ADR	KAP	AL	KAP + AL
A1 (g)	334 ± 9	320 ± 14	361 ± 5	366 ± 15	382 ± 12
A2 (g)	351 ± 23	257 ± 14 ^{*,a}	296 ± 11 [*]	280 ± 16 ^{*,a}	325 ± 12 ^{*,b}
Ağırlık Kazancı (g)	23 ± 11	-63 ± 3 ^a	-66 ± 6 ^a	-84 ± 8 ^a	-37 ± 12 ^{a,c}
KA (mg)	954 ± 51	737 ± 8 ^a	821 ± 59 ^a	849 ± 55 ^a	858 ± 37
SVA (mg)	586 ± 37	450 ± 30	579 ± 62	543 ± 64	653 ± 33 ^b
%KA (mg)	289 ± 12	278 ± 10	277 ± 16	307 ± 12	257 ± 6
%SVA (mg)	165 ± 10	175 ± 8	190 ± 16	195 ± 16	193 ± 7

Ağırlık kazancı: Son vücut ağırlığı ile ilk vücut ağırlığı arasındaki fark, KA: Kalp ağırlığı, SVA: Sol ventrikül ağırlığı, A1: İlaç uygulamasının birinci gününde ölçülen vücut ağırlığı, A2: Hemodinamik kayıtların veya biyokimyasal ölçümler için dokuların alındığı gün ölçülen vücut ağırlığı (son doz uygulandıktan 24 saat sonraki vücut ağırlıkları). KONT: Kontrol grubu, ADR: Adriyaminin grubu, KAP: Kaptopril grubu, AL: Aliskiren grubu, KAP+AL: Kaptopril + Aliskiren grubu. *: p<0.01 VA1'e göre, a: p<0.05 KONT grubuna göre, b: p<0.05 ADR grubuna göre, c: p<0.05 AL grubuna göre. Değerler ortalama ±SEM olarak verilmiştir.

4.2. GRUPLARIN ELEKTROKARDİYOĞRAFİSİNİN VE KALP FONKSİYONLARININ DEĞİŞİMİ

Sadece ADR verilen grupta ST segmentinin, PR aralığının, QRS ve QT aralığının süresi KONT grubuna göre artma gösterirken, bu değerlerden sadece ST intervalinin uzaması istatistiksel olarak anlamlıdır (a: p<0,01). Renin ve ACE inhibitörlerinin verildiği gruplarda (KAP, AL ve KAP+AL) ST segmentinin süresi ADR grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (p<0,01). Diğer bir EKG parametresi olan PR aralığının süresi AL ve KAP+AL grubunda, ADR grubuna göre azalırken (p<0,01), KAP grubunda ise süre KONT grubuna yakın bir süre elde edilmiştir. Tüm grupların QT ve R amplitüd değerleri birbirine yakın bulunmuştur (Tablo 4.2).

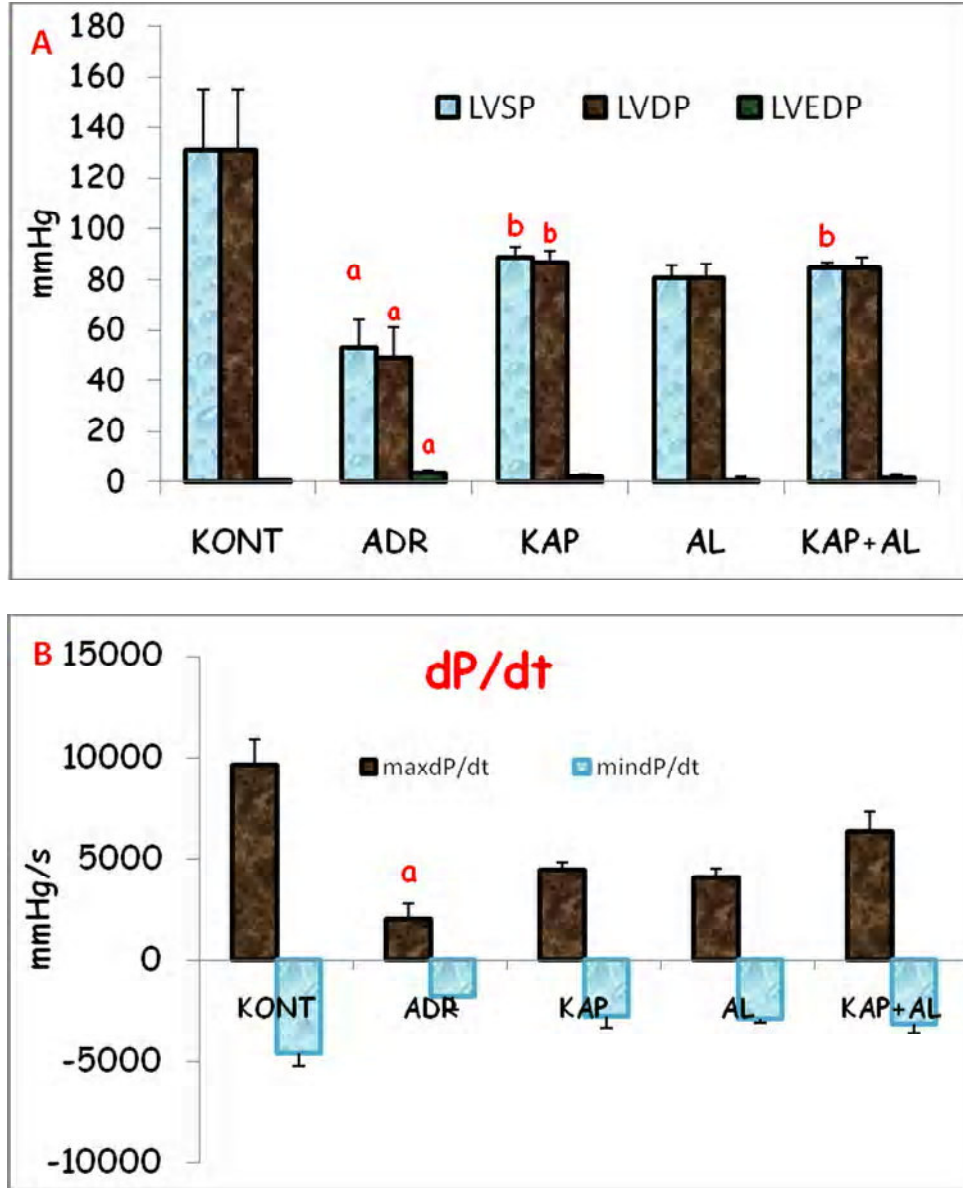
Tablo 4.2. Adriyaminin ile tedavi edilen sıçanların EKG parametreleri üzerine renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin etkisi

	PR (ms)	QRS (ms)	ST (ms)	QT (ms)	R (mV)
KONT	69 ± 2,7	35 ± 1,1	6,5 ± 0,7	99 ± 0,8	1,5 ± 1,3
ADR	82 ± 3	41 ± 2,3	11 ± 1 ^a	110 ± 10	0,18 ± 0,17
KAP	63 ± 4,3	42 ± 1,4	6 ± 0,5 ^b	109 ± 4,5	0,17 ± 0,08
AL	53 ± 3,1 ^b	41 ± 2,4	5 ± 0,1 ^b	105 ± 3,9	0,09 ± 0,02
KAP+AL	56 ± 0,6 ^b	39 ± 1,1	5 ± 0,1 ^b	109 ± 1,4	0,32 ± 0,07

KONT: Kontrol grubu, ADR: Adriyaminin grubu, KAP: Kaptopril grubu, AL: Aliskiren grubu, KAP+AL: Kaptopril + Aliskiren grubu. a: p<0.01 KONT grubuna göre, b: p<0.01 ADR grubuna göre. Değerler ortalama ±SEM olarak verilmiştir.

Adriyaminin grubunda LVSP ve LVDP değerleri KONT grubuna göre önemli derecede azalmış (p<0,01) ve LVEDP değeri ise önemli derecede artmıştır (p<0,01). Kaptopril (ACE inhibitörü) ve kaptopril ile birlikte Aliskiren (renin enzim inhibitörü) verilen grupların (KAP ve KAP+AL) LVDP değerleri sadece ADR verilen grubun değerinden daha yüksek bulunmuştur (p<0,01). Ayrıca KAP grubunun LVDP değeri sadece ADR verilen grubun LVDP değerinden yüksektir (p<0,01). Renin enzim inhibitörü verilen grubun (AL) sol ventrikül fonksiyonlarını gösteren, LVSP, LVDP ve LVEDP değerleri, sadece adriyaminin verilen grubun değerlerinden yüksek bulunmuştur. Fakat bu yükselme istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.1)

±dP/dt değerleri kontrole göre diğer gruplarda azalmış istatistiksel anlamda azalma sadece ADR grubu +dP/dt değerindedir (p<0,01). Buna karşılık renin ve ACE inhibitörleri verilen grupların max ve min dP/dt değerleri KONT grubuna yakın değerlerdedir (Şekil 4.1).

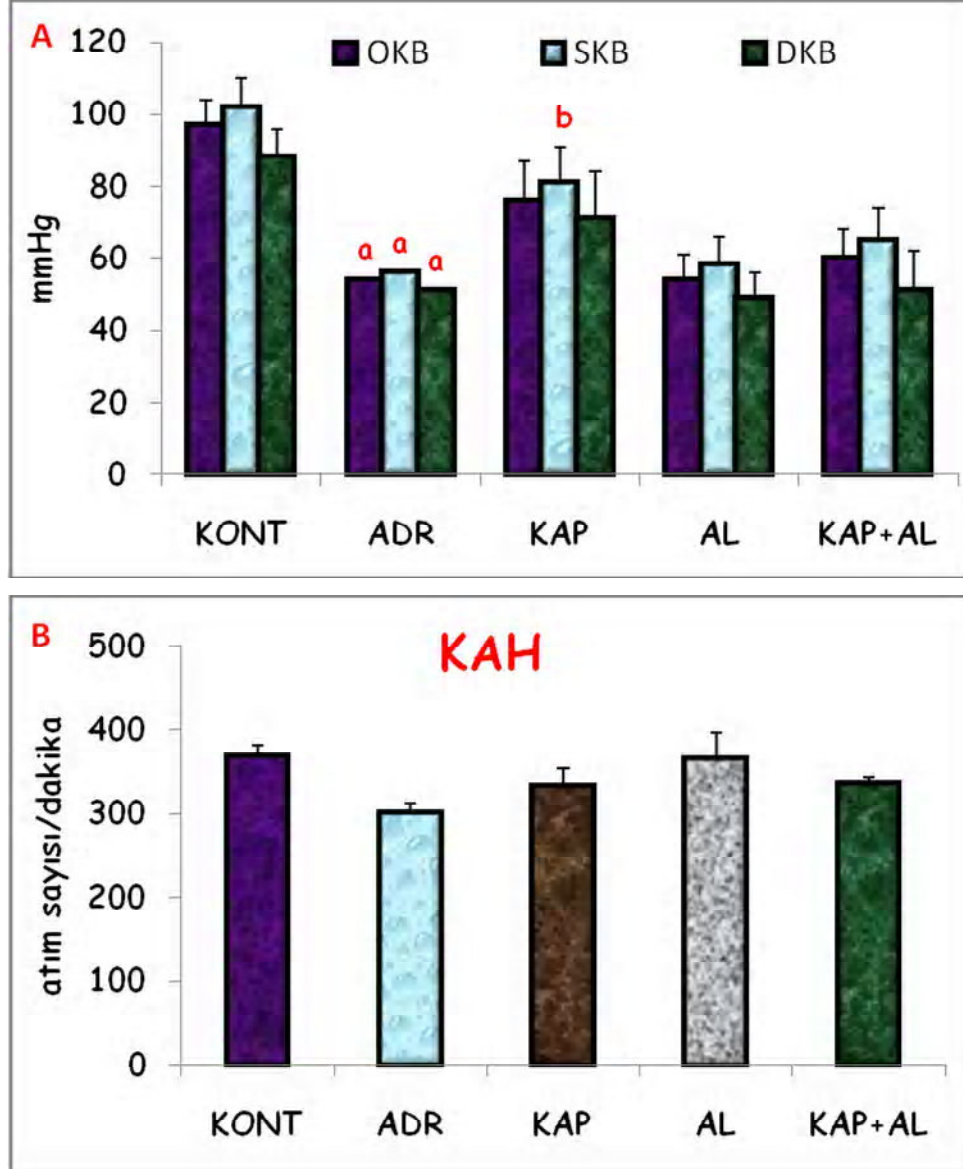


Şekil 4.1. Adriyamisin ile tedavi edilen sıçanların sol ventrikül basınçları (A) ve hızları (B) üzerine renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin etkisi. LVSP: Sol ventrikül sistolik basıncı; LVDP: Sol ventrikül basınç gelişimi, LVEDP: Sol ventrikül diyastol sonu basıncı, maxdP/dt: Sol ventriküler basınç gelişim hızı, mindP/dt: Sol ventrikül basınç düşüş hızı; KONT: Kontrol grubu, ADR: Adriyamisin grubu, KAP: Kaptopril grubu, AL: Aliskiren grubu, KAP+AL: Kaptopril + Aliskiren grubu. a: $p<0.01$ KONT grubuna göre, b: $p<0.01$ ADR grubuna göre. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

4.3. GRUPLARIN ARTERYAL KAN BASINCINDAKİ VE KALP ATIM HIZINDAKİ DEĞİŞİM

Adriyamisin verilen grubun ortalama, sistolik ve diyastolik basınçları KONT grubunun değerine göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,01$). Adriyamisin ile birlikte renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin verildiği gruplarda kan basınçları ADR grubuna göre yükselmiştir. Sadece kaptopril grubunun sistolik kan basıncı değerindeki

artma istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,01$). Kalp atım hızında gruplar arasında anlamlı fark yoktur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Adriyamisin ile tedavi edilen sıçanların kan basınçları (A) ve kalp atım hızları (B) üzerine renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin etkisi. OKB: Ortalama kan basıncı, SKB: Sistolik kan basıncı, DKB: Diyastolik kan basıncı, KAH: Kalp atım hızı; KONT: Kontrol grubu, ADR: Adriyamisin grubu, KAP: Kaptopril grubu, AL: Aliskiren grubu, KAP+AL: Kaptopril + Aliskiren grubu. a: $p<0,01$ KONT grubuna göre, b: $p<0,01$ ADR grubuna göre. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

4.4. BİYOKİMYASAL ÖLÇÜM DEĞİŞİMLERİ

4.4.1. Grupların Total Oksidan Seviyesindeki Değişim

Total oksidan seviye miyosit mitokondrisinde, sitozolünde ve plazmada ölçülmüştür. Sadece ADR verilen grubun mitokondriyal TOS'u artma eğilimi gösterirken, ADR ile

birlikte renin anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin verildiği gruplarda mitokondriyal TOS azalma eğilimindedir. Özellikle AL grubundaki azalma eğilimi, KAP ve KAP+AL gruplarına oranla daha belirgindir, bu farklılık istatistiksel anlamda değildir.

Adriyaminin grubun sitozolik TOS'u, KONT'a göre istatistiksel anlamda yüksektir (a: $p<0,001$). Adriyaminin ile birlikte KAP ve AL verilen grupların sitozolik TOS'ları sadece ADR verilen grubun değerine göre anlamlı oranda azalmıştır (b: $p<0,05$). KAP+AL grubunun sitozolik TOS'unda gözlenen azalma anlamlı değildir.

Adriyaminin grubunun plazma TOS'unda artma, ADR ile birlikte renin-anjiyotensin II inhibitörlerinin verildiği gruplarda azalma eğiliminde idi. Özellikle yine sitozolik TOS'da olduğu gibi, AL grubundaki azalma eğilimi, KAP ve KAP+AL gruplarına oranla daha belirgindir (Şekil 4.3).

4.4.2. Grupların Total Antioksidan Seviyesindeki Değişim

Total antioksidan seviye (TAS) de miyosit mitokondrisinde, sitozolünde ve plazmada ölçülmüştür. Sadece ADR verilen grubun mitokondriyal TAS'ı KONT'a göre azalma eğilimi gösterirken, ADR ile birlikte KAP'ın verildiği grupta ise mitokondriyal TAS artmıştır (b: $p<0,05$). AL ve KAP+AL gruplarının mitokondriyal TAS'ları yüksek plmasına rağmen istatistiksel anlamda farklılık yoktur.

Sadece ADR verilen grubun sitozolik TAS'ı azalmış, ADR ile birlikte renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin verildiği gruplarda sitozolik TAS'lar artma göstermiştir. Fakat gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur.

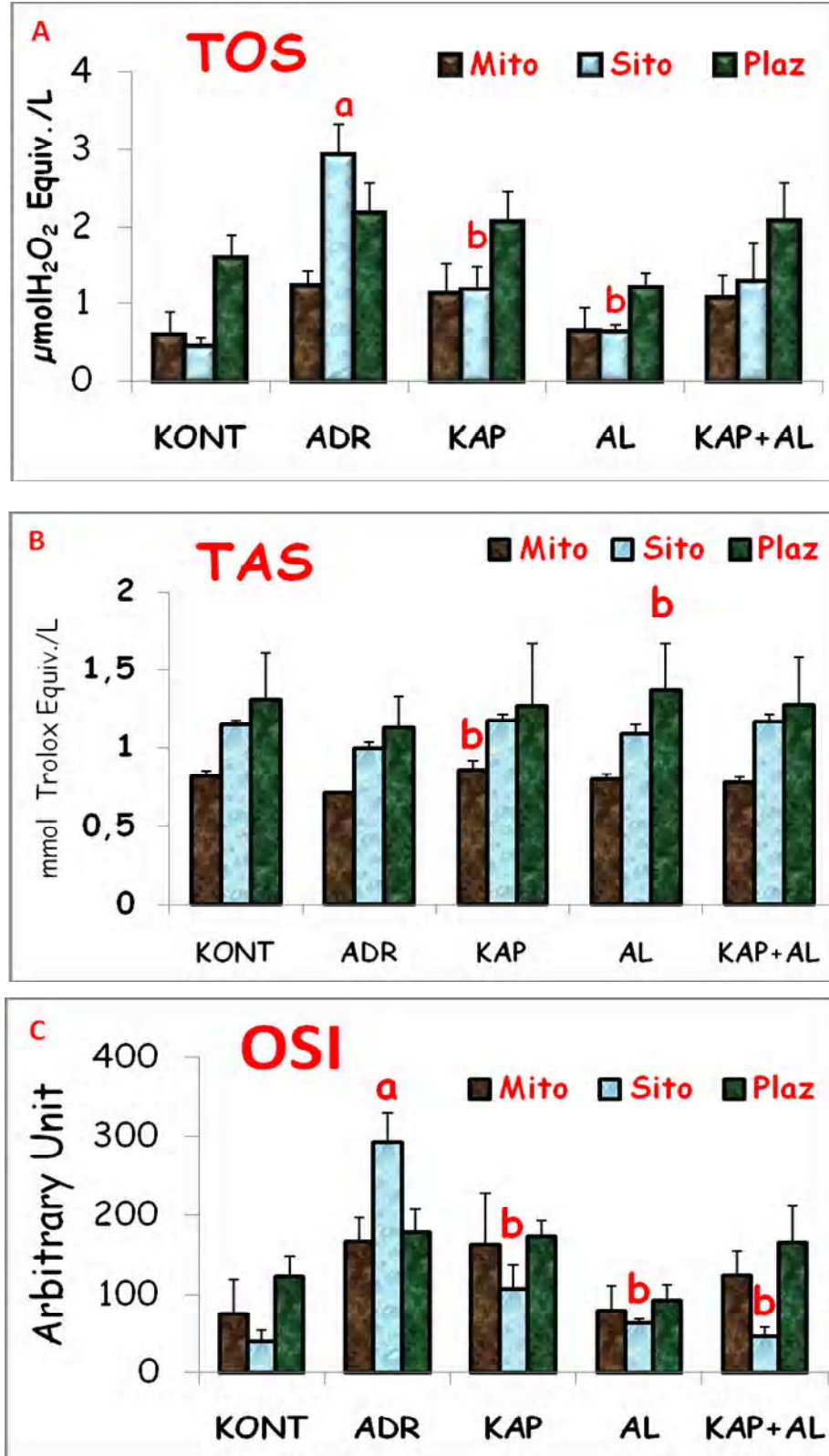
Adriyaminin grubunun plazma TAS'ında azalma, ADR ile birlikte renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin verildiği gruplarda artma eğiliminde idi. Adriyaminin ile birlikte aliskiren verilen grubun (AL) plazma TAS'ı, sadece adriyaminin verilen grubun (ADR) değerinden anlamlı derecede yüksekti (Şekil 4.3).

4.4.3. Grupların Oksidatif Stres İndeksindeki Değişim

Oksidatif stres indeksi (OSI) de TAS ve TOS'da olduğu gibi miyosit mitokondrisinde, sitozolünde ve plazmada hesaplanmıştır. Sadece ADR verilen grubun mitokondriyal OSI'i KONT'a göre artmış, ADR ile birlikte renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin verildiği gruplarda azalma göstermiş olup özellikle AL grubundaki azalma daha belirgindir.

Sadece ADR verilen grubun sitozolik OSI'si, KONT grubuna göre artmıştır (a: $p<0,001$). Adriyamin ile birlikte renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin verildiği grupların sitozolik OSI'leri ADR grubuna göre istatistiksel anlamda bulunmuştur (b: $p<0,05$).

Adriyamin grubunun plazma OSI'inde artma, ADR ile birlikte birlikte renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin verildiği gruplarda ise azalma göstermiş olup özellikle adriyamin ile birlikte aliskiren verilen gruptaki (AL) azalma daha belirgindir (Şekil 4.3).

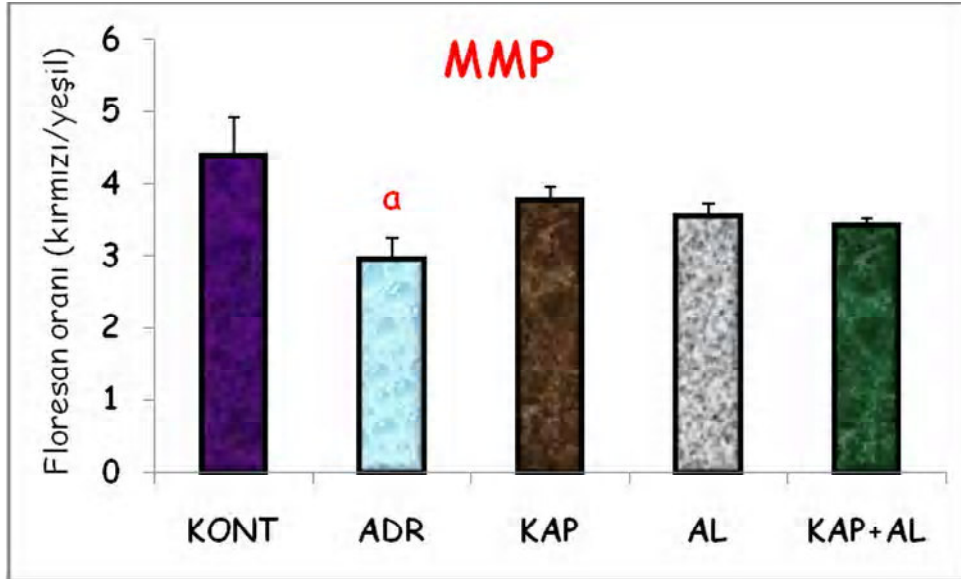


Şekil 4.3. Adriyaminin ile tedavi edilen sıçanların total oksidan (A), antioksidan seviyeleri (B) ve oksidatif stres indeksleri (C) üzerine renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin etkisi. Mito: Mitokondriyal, Sito: Sitozolik, Plaz: Plazma; KONT: Kontrol grubu, ADR: Adriyaminin grubu, KAP: Kaptopril grubu, AL: Aliskiren grubu, KAP+AL: Kaptopril+Aliskiren grubu. a: $p<0.001$ KONT grubuna göre, b: $p<0.05$ ADR grubuna göre. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

4.5. GRUPLARIN MİTOKONDİRİ MEMBRAN POTANSİYELİNDEKİ DEĞİŞİM

Mitokondri membran potansiyeli (MMP) mitokondri iç zarını özellikle duyarlı bir boyan olan JC-1 kullanılarak yapılmıştır. Normal ya da yüksek potansiyele sahip sağlıklı mitokondrilerde bu boya, J agregatlar oluşturarak kırmızı floresan yaymaktadır. Apoptotik ya da sağlıklı hücreler düşük MMP'e sahipler ve JC-1 monomer oluşturup yeşil floresan verir. Kırmızı florsanın yeşil floresana oranlanması MMP olarak değerlendirilmektedir.

Sadece adriyamisin verilen grubun MMP'si kontrol grubunun MMP'sinden daha düşüktür (a: $p<0,01$). Adriyamisin ile birlikte renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin verildiği gruplarda ise sadece ADR verilen grubun MMP'sine oranla artma göstermiştir. Bu artış KAP grubunda daha belirgindir. Gruplar arasında istatistiksel anlamda fark yoktur (Şekil 4.4).

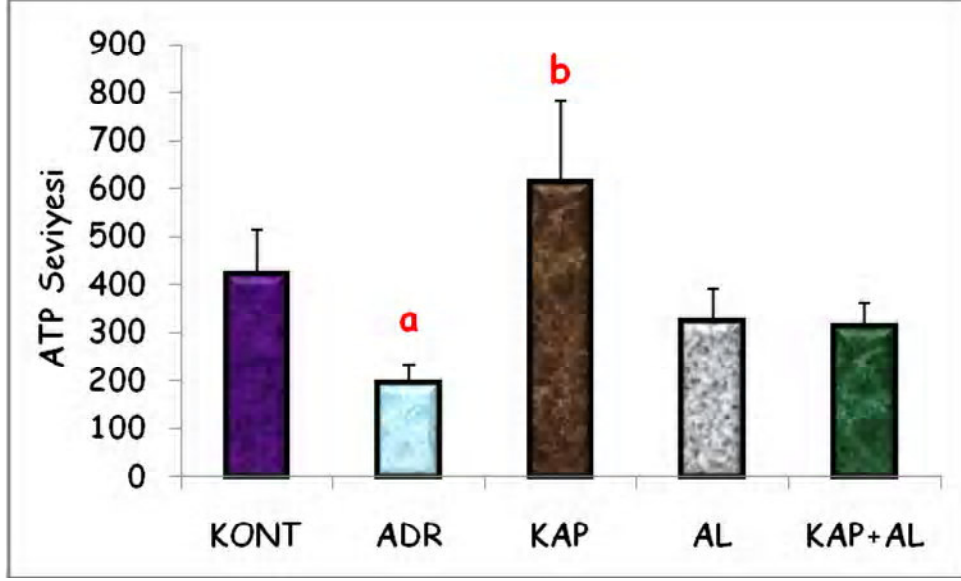


Şekil 4.4. Adriyamisin ile tedavi edilen sıçanların miyosit mitokondri membran potansiyeli üzerine renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin etkisi. MMP: Mitokondri membrane potansiyeli; KONT: Kontrol grubu, ADR: Adriyamisin grubu, KAP: Kaptopril grubu, AL: Aliskiren grubu, KAP+AL: Kaptopril + Aliskiren grubu. a: $p<0.01$ KONT grubuna göre. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

4.6. GRUPLARIN MİTOKONDRİLERİNDE ATP MİKTARININ DEĞİŞİMİ

MMP de meydana gelecek değişiklik mitokondride üretilen ATP'i direk olarak etkiler. Miyosit mitokondrisinde oluşturulan ATP miktarı, MMP'i destekler niteliktedir. Sadece

adriyaminin verilen grubun mitokondrisinde üretilen ATP miktarı kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır. Adriyaminin ile birlikte renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin verildiği gruplarda ise sadece ADR verilen grubun ATP üretim miktarına oranla artma göstermiştir. Bu artış sadece KAP verilen grubun ATP üretim miktarına oranla istatistiksel anlamda farklıdır (a: $p<0,01$; Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Adriyaminin ile tedavi edilen sıçanların miyosit ATP üretimi üzerine renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin etkisi. KONT: Kontrol grubu, ADR: Adriyaminin grubu, KAP: Kaptopril grubu, AL: Aliskiren grubu, KAP+AL: Kaptopril + Aliskiren grubu. a: $p<0.01$ KONT grubuna göre, b: $p<0.01$ ADR grubuna göre. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kalp yetmezliği birçok kalp hastalıklarından kaynaklanan klinik sendromdur. Değişik etyoloji ve presipite edici faktörlere rağmen kalp yetmezliğinde primer defekt sol ventrikülün yeterli strok volümü devam ettirememesidir. Kardiyak outputta azalma sonucu Frank-Starling mekanizması, miyokardiyal hipertrofinin gelişmesi, nörohormonal aktivasyon, sempatik sinir sistemi, renin-anjiyotensin sistemi gibi birçok kompensatuar mekanizmalar vital organlara kan perfüzyonunu devam ettirir. Kardiyak output azaldıkça kompensatuar mekanizmalara cevap olarak hemodinamik değişiklikler gelişir. Bu değişiklikler aşırı vazokonstrüksiyon sonucu gelişen ard yük artışı, sıvı retansiyonu, periferik ödem, pulmoner konjesyon, kalp hipertrofisi ve dilatasyondur (5).

Kalp yetmezliği, ADR'nin istenmeyen ciddi bir yan etkisidir ve ilk olarak 1960'larda kanserli çocuklarda fark edilmiştir (1). Kardiyak fonksiyon bozukluğunun mekanizması akut ve kronik toksisitede farklı olabilir (183). Akut dönemde EKG değişiklikleri (ST-T anormallikleri, supraventriküler taşikardi gibi) görülebilir. Ama asıl kalp yetmezliği şeklindeki yan etkisi kronik verilmesi ile ortaya çıkmaktadır. Adriyamisin miyokard dokusunda oksidatif strese ve bunun sonucunda serbest radikallerin açığa çıkmasına neden olur. Serbest radikaller hücre dejenerasyonunu ve apoptozisi indükler (4). Sonuçta, miyosit nekrozu ve kaybı ile gelişen, genellikle tedaviye dirençli kalp yetmezliği meydana gelir (15). Uygulanan kümülatif doz 550 mg/m²'yi geçtiğinde kardiyomiyopati insidansı %20'dur (13). Akut ADR etkileri geçicidir, fakat sonraki aşamalarda meydana gelen kalp yetmezliğinde anahtar role sahip olabilir. Bu

çalışmanın sonuçları da ADR uygulamasının (kümülatif doz 16 mg/kg) sıçanlarda akut kardiyotoksisiteye neden olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda sekiz günlük enjeksiyon periyodu sonunda, sadece ADR verilen hayvanlarda sol ventrikül disfonksiyon (sistolik ve diyastolik) gelişti ve anormal EKG (ST ve PR uzaması) kayıtları alındı. Önceki çalışmalarda ADR'nin hemodinamik ve EKG parametreleri üzerine etkileri gösterilmiştir. Adriyamin kaynaklı kardiyomyopatide reversibl aritmiler, en çok da sinüs taşikardisinin meydana geldiği, ST ve QRS süresinin uzadığı belirtilmiştir (184,185). Fisher ve ark.'ları ST intervalinin süresi ile ADR kardiyotoksitesi arasında güçlü bir ilişkinin olduğunu bildirmiştir (186). Vanketesan, ADR verilmesinden 48 saat sonra ST segmentinde yükselme, kalp atım hızında artma, T dalgasında düzleşme, QT intervalinde uzama ve R dalga amplitüdünde azalmanın olduğunu göstermiştir (187). Çalışmamızda da ADR, ST segmentinde uzama yapmıştır. ST'nin uzaması ADR'nin kardiyomiyositlerde aksiyon potansiyeli süresi uzattığını düşündürmüştür. Bu öngörümüz ADR verilen sıçanların kalp atım hızının azalması ile güçlenmektedir. ACE ve renin inhibitörü verdiğimiz gruplarda (KAP, AL ve KAP+AL) ST'deki uzama iyileşmiş ve kalp atım hızı normal değere yaklaşmıştır. Haftada 1,5 mg/kg (5 hafta, kümülatif doz 7,5 mg/kg) ADR uygulanan çalışmada, ventriküler repolarizasyonun uzadığı, diğer elektrokardiyografik parametrelerde (kalp atım hızı, QRS voltajı ve süresi) anlamlı bir değişikliğin olmadığı belirtilmiştir. Adriyamin ile birlikte 10 mg/kg/gün ACE inhibitörleri (zofenopril ve lisinopril) uygulandığında QT intervalindeki uzamanın düzeldiği, kan basıncı ve ventrikül basıncının da düştüğü belirtilmiştir (2). QT intervalindeki progresif uzama, kronik ADR uygulanan sıçanlarda miyokardiyal hasar belirleyicisidir (188-189). Miyokardiyal repolarizasyon fazının uzun vadeli bozulmasıyla kardiyak histopatolojik lezyonların sayısı ve şiddeti ile pozitif kolerasyon gösterdiği belirtilmiştir (188,190). Çalışmamızda adriyamin, KAP, AL ve KAP+AL gruplarının QT interval süresinde anlamlı bir değişim olmamıştır. Bu hayvanlarda akut ADR toksisitesi geliştiğini düşündürür.

Çalışmamızda sadece ADR verilen hayvanlarda patolojik EKG kayıtları alınırken, ADR ile birlikte renin ve ACE'nin inhibe edildiği hayvanlarda ise bu patolojiler görülmemiştir. EKG'deki bu değişimler Anj-II'nin rolünü göstermektedir. Anjiyotensin II, aritmojenik etki gösterebilir (191,192). Anj-II, geç-rektifiye olan K⁺ kanallarının

(IKs) yavaş komponenti üzerinden atriyal aksiyon potansiyel süresini etkiler. Deneysel çalışmada, Anj-II uygulamasıyla, IKs amplitüdü artmış ve aksiyon potansiyel süresi kısalmıştır. Bu olumsuz etkiler, valsartan (AT1 reseptör antagonisti) tedavisiyle önlenmiştir (191). Anj-II, atriyum ve ventrikül miyositlerinde kalsiyum konsantrasyonunu artırabilir. Hücre-içi, kalsiyum artışı hem atriyal elektriksel “remodelling”e, hem de ventriküler repolarizasyon aritmilerine neden olabilir (192).

EKG de meydana gelen değişimler kalbin mekanik fonksiyonlarında da farklılıklar oluşmasına neden olur. İnotropinin veya kontraktilitenin azalması kalp yetmezliğinin klasik özelliğidir. Gevşeme fonksiyonu da en az sistolik fonksiyonlar kadar önemli olup, sıklıkla sistolik fonksiyonlardan önce bozulabildiği bildirilmektedir (26). Anormal gevşeme nedeni, kasın gevşeme mekanizmasındaki bozulma veya kompliyansın azalmasıdır. Kalp yetmezliğinde sarkomer uzunluğu maksimumdur, sol ventrikül diyastol sonu basıncındaki artış endokardiyal duvar gerginliğini artırır ve oksijen sunum/tüketim oranını bozar. Miyokard, Starling eğrisinin sınırında fonksiyon gördüğünden sol ventrikül, diyastol sonu basıncın daha fazla artışına miyokardiyal performans artışıyla yanıt veremez. Aksine subendokardiyal duvar gerginliği ve ard yük artışı, sol ventrikül performansını düşürür ve sol ventrikül diyastol basıncı artar. Bu bulgular sistolik disfonksiyonun yanında, diyastolik disfonksiyonun da önemli olduğunu göstermektedir (5).

Sol ventrikül basınçlarındaki değişim kalbin kas gücü hakkında bilgi verir (LVSP, LVDP, LVEDP gibi). Sistol ya da diyastol esnasında ventrikül basınçlarının zamana karşı değişimi hakkında bilgi $\pm dP/dt$ ’den elde edilir. Çalışmamızda in vivo kalp fonksiyon değerlendirmelerinde, sadece ADR verilen grupta LVSP, LVDP, $+dP/dt$ ve kan basıncının azaldığı, LVEDP’nin arttığı; renin ve ACE inhibitörlerinin verildiği gruplarda ADR’nin neden olduğu kalbin mekanik aktivitesindeki bu değişimlerin normal değerlerine yaklaştığı belirlenmiştir. Adriyaminin kalbin hemodinamik fonksiyonunda yaptığı bu etki hem prelinik hem de klinik çalışmalarda da araştırılmıştır. Sıçanlara ADR enjeksiyonundan sonraki birkaç saat içerisinde, kardiyak debide %42’lik, sol ventrikül pik sistolik basıncında (LVSP) %36’lık bir azalma görülmüştür (24). Başka bir çalışmada ise, çoklu ADR enjeksiyonundan sonra (ilk 8 hafta 1mg/kg/hafta, sonra 2 haftada bir 1mg/kg/8 hafta) sistolik ve diyastolik sol ventrikül fonksiyonların ilerleyici şekilde azaldığı belirtilmiştir. Aynı çalışma, 16

haftalık ADR tedavisinin, sistolik dP/dt de %25'lik, kardiyak indeksde %40'lık azalmaya, sol ventrikül diyastol sonu basınçda %250'lik artışa neden olduğunu ifade etmektedir (25). Adriyaminin kaynaklı kardiyotoksisite belirtileri ilk önce diyastolik fonksiyonlarda görülmesine rağmen; yüksek doz ADR, hem sistolik hem de diyastolik fonksiyon bozukluğuna neden olur (26). Çalışmamızda da benzer bulgular elde edilmiştir. Sadece ADR verilen grupta LVEDP'nin artması diyastolik fonksiyon bozukluğunu, LVSP'nin azalması ise sistolik fonksiyon bozukluğunu işaret etmektedir. Emanuelov ve ark.'ları çalışmalarında, iki gün arayla 2,5 mg/kg ip, 6 doz ADR verilmesinin LVSP'de değişim yapmadığı, fakat LVEDP'de artma, sol ventrikülde ilerleyici dilatasyon, fraksiyonel kısalmada azalma ve sol ventrikül duvarında incelmenin olduğunu bildirmiştir (193). Adriyaminin kısa sürede yüksek dozda verilmesi hem sistolik hemde diyastolik fonksiyonları bozmuştur. Yapılan klinik bir araştırmada, ADR tedavisinden sonra uzun süre hayatta kalanlarda, ard yük artışına bağlı sol ventrikül duvar kalınlığında azalma ve bunun sonucunda sol ventrikül performansında azalma saptanmıştır (194). Ard yükteki bu azalma ilerleyicidir. Bozulmuş kontraktilete, geç konjestif kalp yetmezliği, yüksek dereceli ektopi veya ani ölümler uzun vadede ortaya çıkan sorunlardır (195). Çocukluk çağı kanserinden sonra uzun süre sağ kalanlarla yapılan başka bir çalışmada, 25 yıl sonra bile kardiyovasküler mortalite oranlarının arttığı bulunmuştur (196). Tedavi ile geç dönem mortalite de hiçbir azalma olmadığı ve adriyaminin tedavisinin geç mortalite için bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir (197).

Kalp yetmezliğinin klinik tablosu, bir seri miyokardiyal metabolik ve nörohormonal anormallik (renin-anjiyotensin-aldosteron aktivasyonu) gelişmesine bağlıdır. Bu anormallikler, miyokardiyal mekanik bozulmaya, sodyum ve sıvı retansiyonuna bağlı volüm artışına, periferik vasküler direnci arttırmasına bağlı olarak ard yük artışına neden olarak kalp yetmezliğini şiddetlendirir (5). Toko ve ark.'ları tarafından ADR'nin sol ventrikül geometrisinde ve fonksiyonunda meydana gelen değişimlerde, anjiyotensinin etkisi elektrokardiyografik analizle (EKO) araştırılmıştır. Hem akut hem de kronik ADR uygulamasında, sol ventrikülün iç çapı artmış (sol ventrikül sistolik ve diyastolik çaplarda), fraksiyonel kısalmanın yüzdesi (%FS) de azalmıştır. Fakat AT1 reseptörleri olmayan ve AT1 reseptör antagonistlerinden RNH-6270'in verildiği farelere ADR uygulaması, sol ventrikül iç çapını ve kardiyak fonksiyonları değiştirmemiştir

(183). Bu sonuçlar, AT1 aracılı sinyallerin engellenmesinin ADR kaynaklı kardiyotoksisteyi önleyebileceğini düşündürür.

“Hamster” ile yapılan bir çalışmada ise ADR, $\pm dP/dt$ 'i azaltmış ve kardiyak hipertrofiye neden olmuştur. Adriyaminin uygulanan aynı hayvanlarda kontrol grubuna göre kardiyak ACE aktivitesinin 2,3 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (198). Aynı araştırmacılar, ADR'nin miyositlerde makrofaj sayısını yükselttiğini, ACE'nin de bu makrofajlardan eksprese edildiğini buna bağlı olarak Anj-II'nin artabileceğini bildirmişlerdir. Fakat aynı kalplerde kardiyak kimaz aktivisinde bir değişim gözlenmemiştir. Kimaz Anj-I'den Anj-II'yi oluşturan, alternatif yolda görev yapan bir enzimdir. Bu bilgiler ADR kaynaklı kalp yetmezliğinin gelişmesinde kardiyak ACE'nin, kimazdan daha önemli rol oynadığını göstermektedir (198). Venkatesan ve ark.'ları tarafından da, ADR'nin kardiyak ACE aktivitesini yükselttiği gösterilmiştir (199). Anj-II'nin, kardiyak hipertrofi, fibroblast proliferasyonu ve kollajen sentezine neden olduğu bildirilmiştir. Kardiyak ACE tarafından oluşturulan lokal Anj-II dokunun patolojik “remodelling” olayında parakrin yada otokrin etkilere sahip olabilir (200-201). ACE inhibitörleri ön ve ard yükü azaltarak kardiyak fonksiyonlarda düzelme yapar (202). Çalışmamızda, ADR'nin neden olduğu azalmış sol ventrikül fonksiyonları KAP, AL ve KAP+AL gruplarında artmıştır. Renin ve ACE inhibitörlerinin faydalı bu etkilerinin, sistemik kan basıncını azaltıcı etkisinden bağımsız olarak meydana geldiğini düşünmekteyiz. Çünkü renin ve ACE inhibitörleri verilen gruplarımız (KAP, AL ve KAP+AL) ile kontrol grubu arasında kan basınçları bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Sadece KAP grubunun sistolik kan basıncı, ADR verilen gruba göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu bulgular, renin ve ACE inhibitörlerinin ADR'nin kardiyotoksitesine karşı olumlu etkisinin, kardiyak Anj-II'yi inhibe etmesinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Kalp fonksiyonlarında meydana gelen iyileşme de azalmış kan basınçlarının düzelmesine aracılık eder.

Anjiyotensin dönüştürücü enzim, renin-anjiyotensin sisteminde anahtar rol oynayan bir çinko dipeptidil karboksipeptidazdır. Anjiyotensin I'i, kendisinin aktif bir peptidi ve güçlü vazokonstriktör olan anjiyotensin II'ye çevirir, ayrıca vazodilatör olan bradikinin de inaktive eder. Kalp yetmezliğinde ACE'nin inhibisyonu, birkaç yoldan kardiyoprotektif etkilidir. Birincisi direkt etkileridir; plazma ve dokularda anjiyotensin II düzeyinin azalması sonucu vazodilatasyona sebep olarak, total periferik damar

direncini azaltıp, kan basıncını düşürürler. Miyokard kontraktilitesini değiştirmeden ard yükü azaltarak atım hacmini yükseltirler. Böylece ejeksiyon fraksiyonu artar, bunu da sistol sonu hacmi, diyastol sonu hacimden daha çok azaltarak yaparlar (203,204). İkincisi indirekt olarak, bradikinin yıkımının azalmasına, NO sentezi artışına ve/veya sarkoplazmik retikulum Ca^{+2} homeostazinin korunmasına neden olur. Bu indirekt etkisi miyokardiyumun kontraktilitesini yükseltir (205,206). ACE inhibitörleri aynı zamanda LVEDP'de (207), diyastol sonu hacimde, total kan hacminde (208), ortalama dolaşım doluş basıncında (207) azalma ve venöz kompliansta artmaya neden olur. İn vitro çalışmalarda ACE inhibitörlerinin serbest radikal temizleyici (209), miyokardiyal oksijen tüketimini azaltıcı (210) etkisi gösterilmiştir. Adriyaminin tarafından oluşturulan serbest radikaller, ACE inhibitörleri ile detoksifiye edilir. ACE inhibitörleri glutatyona bağlı antioksidan savunmayı da arttırır (211). Hem aldosteron hem de Anj-II kardiyak intersisyumda progresif kollajen birikimine neden olur. Aynı zamanda ACE inhibitörlerinin antifibrotik etkileri, ADR uygulamasından sonra gelişen yapısal hasarı ve miyosit ölümünü engeller (202).

Kalp dokusunda renin yapımı ile ilgili çalışmalar çelişkilidir (118). Bazı çalışmalar, renin mRNA ekspresyonunun kalpte fazla olduğunu bazıları ise reninin kalpte sentezlenmediğini bildirmektedir. Bazıları ise reninin kalpte normal fizyolojik şartlarda sentezlenmediğini, patolojik şartlarda renin gen ekspresyonunun yükselttiğini bildirmektedir (123). Plazma renin aktivitesi miyokard enfarktüsünde, kalp yetmezliğinde ve sol ventrikül hipertrofisinde önemli kardiyovasküler risk faktörüdür ve bozulmuş renal fonksiyon ile ilişkilidir. Plazma renin aktivitesinin önlenmesi bu riskleri ve hasarları önlemeye yardımcı olmaktadır (118,212). Aliskiren, insan reninini oral alımdan sonra inhibe eden, yarılanma ömrü 40 saat olan potent bir moleküldür. Aliskiren ile hem Anj-I hemde Anj-II oluşumunu azalmaktadır (213). Çalışmamızda AL, kalbin hem elektriksel aktivitesini hem de fonksiyonlarını düzeltmiştir.

Feldman ve ark. streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş olan TG (mRen-2)27 sıçan modelinde, aliskiren tedavisinin doza bağımlı bir şekilde kan basıncını düşürdüğünü ve proteinüriyi azalttığını göstermiştir. Bu çalışmada aliskiren tedavisi glomerüllerde, tübüllerde ve kortikal damarlarda (pro)renin reseptör ekspresyonunu azaltmıştır. Ayrıca, böbrekteki TGF- β ve kollajen 1 ekspresyonları da azalmıştır (214). Pilz ve ark., insan renin ve anjiyotensinojen genleri taşıyan çift transgenik sıçanlarda (dTGR) valsartan

(AT1 reseptör antagonisti) ve aliskiren tedavilerinin etkilerini karşılaştırmışlardır. Bu modelde, düşük ve yüksek dozlardaki aliskiren ve yüksek dozdaki valsartan tedavileri kan basıncını düşürmüş, albüminüriyi azaltmış, sol ventrikül hipertrofisini geriletmiş ve sağkalım süresini uzatmıştır (215). İlerlemiş diyabetik nefropati modeli olan diyabetik transgenik (mRen-2)²⁷ sıçanlarda aliskiren ile ACE inhibitörü olan perindoprilin etkileri karşılaştıran bir başka deneysel araştırmada, her iki ilaç da kan basıncını ve albüminüriyi azaltmıştır. Aliskiren ve perindopril albüminüriyi ve glomeruloskleroza azaltmada benzer derecede etkili bulunurken, interstisyel fibrozisin aliskiren ile daha fazla önlendiği dikkat çekmiştir (216). Fisher ve ark. direkt renin inhibitörlerinin renin-anjiyotensin-aldosteron sistemini baskılamadaki gücünü araştırmak amacı ile sağlıklı normotansif kişilerde aliskiren tedavisi ile ACE inhibitörü olan kaptopril tedavisinin, intrarenal renin aktivitesinin göstergesi olan renal plazma akımına etkisini karşılaştırmıştır. Düşük sodyumlu diyet verilen ve böylece renin anjiyotensin-aldosteron sistemi uyarılan sağlıklı gönüllülere aliskiren tedavisi, renal plazma akımını kaptopril verilenlere göre daha belirgin bir şekilde arttırmıştır. Araştırmacılar, direkt renin inhibitörlerinin, renin-anjiyotensin-aldosteron sistemini diğer RAS blokerlerine göre daha belirgin bir şekilde baskıladığını, bu nedenle de organ koruyucu potansiyelinin daha fazla olduğu sonucuna varmışlardır (217).

Akut ADR çalışmalarında 5. güne kadar (81,218-219), kronik çalışmalarda ise 8. haftaya kadar (220) kalpte morfolojik değişiklik gözlenmez diye belirtilmektedir. Çalışmamızda ADR'nin kalp üzerine etkileri, histopatolojik açıdan değerlendirilmedi. Fakat yapılan çalışmalarda, miyositlerde nekroz, miyofibril kayıpları, sitoplazmik vakuolizasyon, sarkoplazmik retikulumda dilatasyonun olduğu gösterilmiştir (29). Akut ADR kardiyotoksitesinde karnozinin protektif etkisini araştıran çalışmamızda, ADR uygulamasından 24 saat sonra bile kalpte morfolojik değişimlerin olduğu gösterilmiştir (221).

Mevcut kanıtlar, ADR kaynaklı kalp yetmezliği nedeninin multifaktoriyel olduğuna işaret eder. Kalsiyum geri alımı ve salınımını düzenleyen proteinlerin mRNA düzeylerinin, kalp yetmezliğinde azaldığı bildirilmiştir (222). Uzun süre adriyamisin uygulanan tavşanlarda görülen kalp yetmezliğinde plazma membran proteinlerindeki mRNA düzeyi değişmezken, sarkoplazmik retikulum proteinlerinin mRNA düzeyinin azaldığı saptanmıştır. Spesifik olarak, ryanodin reseptörleri, fosfolamban ve

sarkoplazmik retikulumun Ca^{+2} -ATPaz proteinleri mRNA düzeyleri düşüktür. Bu durumun kardiyak fonksiyonlardaki azalmayı açıklayabileceği düşünülmektedir (223). Arai'ye göre, sarkoplazmik retikuluma kalsiyum alınması ya da salınımı ile ilgili genler basınç hipertrofisinin derecesine göre artar ya da azalır. Bu genlerin hafif kardiyak hipertrofide arttığı, şiddetli hipertrofide ise azaldığı düşünülmektedir (224,225). Adriyaminin toksik etkilerine aracılık eden önemli bir faktör, özellikle mitokondrilerde kardiyolipine ADR'nin yüksek affinitede bağlanmasıdır. Kardiyolipin ökaryotik enerji metabolizmasında elzemdir ve iç mitokondriyal membranda bulunan bir anyonik fosfolipittir (226). Kardiyolipine ADR'nin bağlanması, stokrom c ve mitokondriyal kreatin kinaz gibi kardiyolipinle ilişkili periferik proteinlerin mitokondri iç membranından ayrılmasına neden olur. Mitokondri iç membranından ayrılan bu proteinler elektron taşıma zincirini ve enerji yollarını etkilediği gibi programlı hücre ölümlerini de (apoptozis) başlatabilir (19). Çoğunlukla kardiyolipine ADR'nin bağlanması ile oluşan mitokondriyal toksisite oksidatif stresten kaynaklanır. Bu etki mitokondride hücrel enerji metabolizmasını önemli derecede olumsuz etkiler ve ADR'nin kardiyotoksik etkisinin oluşmasında son derece önemli bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Adriyaminin, iki farklı mekanizma ile serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır. Bunlar:

1. NADPH'a bağlı redüktazlar, ADR'den bir elektron kopararak ADR'nin semikuinon formunu oluşturmaya neden olur. Ortamda oksijen varsa, ADR kaynaklı kuinin-semikuinon döngüsünden süperoksit radikalleri oluşur.
2. Adriyaminin, demir ile reaksiyona girerek enzimatik olmayan yoldan da serbest radikalleri oluşturabilir. Demir-ADR kompleksi, oksijeni H_2O_2 ve diğer aktif oksijen formlarına indirger (227-229).

Oluşan serbest radikaller son derece kararsız moleküllerdir. Bu kararsız moleküller hızlı bir şekilde zincir reaksiyonları ile daha fazla serbest radikal oluşturmak üzere diğer bileşiklerle reaksiyona girer. Yüksek konsantrasyondaki reaktif radikallerin lipid peroksidasyonu, protein modifikasyonu ve DNA kırıklarına neden olarak biyolojik molekülleri yıktığı bilinmektedir (229,230). Serbest radikaller, oksidatif stresten sorumludur (230). Adriyaminine bağlı olarak oluşan oksijen radikalleri eğer

temizlenmezse plazma membranı ve mitokondri gibi hücrel organellerde farklı oksidatif hasarlar ortaya çıkabilir (54).

Adriyaminin tarafından oluşturulan süperoksit anyonu, süperoksit dismutaz (SOD) tarafından H_2O_2 'e dönüştürülür ve daha sonra katalaz ya da glutatyon peroksidaz ile detoksifiye edilir. Ayrıca süperoksit ile nitrik oksit (NO) reaksiyona girerek peroksinitrite de ($ONOO^-$) dönüştürülür. NO, anjiyotensin ve reaktif oksijen ürünlerinin etkileşimi karmaşıktır. Bu etkileşim hipertansiyon, kalp yetmezliği gibi çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda önemli rol oynar (231-233). Bu anlamda, sıçan kardiyomiyositlerinde Anj-II'nin sitokin ile uyarılmış nitrik oksit sentezini arttırdığı bildirilmiştir (233). Anjiyotensin IINO'i peroksinitrite dönüştüren reaksiyon ile süperoksit radikallerinin oluşumunu uyarabilir. Bu etkisiyle ADR ile ilişkili hücrel hasarın oluşmasında çok önemli rol oynar (234). Son zamanlarda yapılan araştırmada, Anj-II sinyalinin zayıflatılması ile endotelial nitrik oksit sentazın (eNOS) ürettiği süperoksit radikalleri etkisiyle oluşan hasarı azalttığı belirtilmektedir (235). H_2O_2 ise, hidroksil radikallerinin ($OH^\cdot$) oluşmasına neden olur. $OH^\cdot$, NADH'a bağımlı mikrozomal lipid peroksidasyonunu artırır ve hücre membranında oksidatif hasara neden olan lipid radikal zincir reaksiyonunu başlatır. Çalışmamızda, kümülatif adriyaminin uygulamasına bağlı gelişen kardiyotoksisite ve bu toksisitenin oluşumunda etkin rol oynayan serbest oksijen radikallerinin türüne bakılmaksızın toplam oksidan seviye (TOS) ölçülmüştür. Adriyaminin, mitokondride, sitozolde ve plazmada TOS'u artırmıştır. Fakat sadece sitozolik TOS, istatistiksel anlamda artmıştır. Adriyaminin ile birlikte renin ve ACE inhibitörleri verilen gruplarda TOS azalmıştır. Bu azalma yine sitozolde daha belirgindir.

Singal ve ark.'ları da, ADR kaynaklı kardiyomiyopati patogeneğinde hem oksidan artışını hemde antioksidan azalmasının önemini vurgulamaktadır (236). Miyositlerde katalaz (237) ve hızlı inaktive olan glutatyon peroksidaz-1 (GPx-1) (238) gibi antioksidan enzimlerin miktarının ya da aktivitesinin az olması ile ADR'nin kalpte yaptığı toksik etki arasında önemli ilişki olduğu önceki çalışmalarda belirtilmiştir. Kalpte ADR'nin istenmeyen bu yan etkisinin oluşmasında diğer bir neden ise, miyokardiyumda fazla mitokondri bulunmasıdır. Adriyaminin zamanla mitokondride birirmektedir. Yapılan kültür çalışmaları da mitokondri içi ADR konsantrasyonunun ekstrasellüler konsantrasyondan 2 kat daha yüksek olduğu, plazma ADR

konsantrasyonu 0,5-1 mM iken, mitokondri iç konsantrasyonun yaklaşık 50-100 mM olduğu gösterilmiştir (237).

Çalışmamızda, ADR serbest oksijen radikallerini (TOS) oluşturarak ve antioksidanları (TAS) azaltarak oksidatif hasara neden olmuştur. Kalpte ADR'nin oksidatif hasar göstergelerinden biri de mitokondri membran potansiyelinde ve mitokondriyal enerji üretiminde azalma yapmasıdır. Adriyaminin mitokondriyal elektron transport zincirini ve oksidatif fosforilasyonu inhibe etme mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır. Mitokondriyal biyoenerji ve Ca^{+2} düzenlenmesinin ROS ile bozulduğu hipotezi bu etkilerin ortaya çıkmasında en çok kabul gören görüştür. Mitokondriyal permeabilite transport porları (mPTP), protein tiyol gruplarının oksidasyonu ya da sitozolik Ca^{+2} artışı ile açılmaktadır. mPTP'deki açılma ile H^{+} gradiyenti ve MMP azalır (pozitifte yaklaşır), matriks volümü artar, mitokondriyal dış membran yapısı bozulur ve neticede sitokrom c mitokondri membranından ayrılıp sitoplazmaya geçer. Mitokondride oluşan oksidatif hasar, lipid peroksidasyonu, solunumu ve oksidatif fosforilasyonu inhibisyonu, mitokondriyal ATPaz aktivitesinde ve solunum zinciri redoks aktivitesinde azalmaya neden olur (239).

Çalışmamızda renin ve ACE inhibitörleri ile birlikte ADR verilen gruplarımızda, oksidanların azalması, antioksidanların artması ile oksidatif stres azalmıştır. Bu sonuçlarımız, Anj-II'nin ADR kaynaklı kalp yetmezliğinin şiddetini arttırdığını düşündürmektedir. Anj-II'nin inhibisyonu, kalbin mekaniksel ve elektriksel aktivitesinde iyileşme yapmıştır. Günümüzde Anj-II'nin klasik kan basıncı ve hacim düzenlenmesindeki rolünün dışında, güçlü bir proinflatuvar ve reaktif oksijen ürünlerinin üretimi için bir uyarıcı olduğu kabul edilmektedir. Aynı zamanda Anj-II, düz kas hücresi ve fibroblastların gelişimini, göçünü ve endotel hücrelerindeki apoptozu, monositlerin makrofajlara dönüşümünü ayarlamaktadır. Anj-II'ye karşı ortaya çıkan hücresel yanıtların karmaşıklığı, birden fazla yolla üretildiğinin anlaşılmasıyla daha da kompleks bir hal almıştır. Klasik olarak temel kaynak, dolaşımdaki plazma kökenli Anj-II'dir. Bununla birlikte yakın zamandaki araştırmalar, belki de esas önemli kaynağın kalp ve vasküler hücrelerdeki lokal ve doku düzeyindeki Anj-II'nin olabileceğini işaret etmektedir. İnsan aterosklerotik lezyonlarında ACE, Anj-II ve reseptörlerinin bulunduğu gösterilmiştir. Dahası vasküler duvarın tüm hücresel komponentleri (makrofaj, düz kas hücresi, fibroblast ve endotel hücresi), RAS'ın bu

komponentlerini üretebilirler (240). Çalışmamızda Anj-II inhibisyonu, ROS oluşumunu azaltıp, apoptozisi inhibe ederek kalbin mekaniksel ve elektriksel aktivitesinde düzelme yapmış olabilir. Kaptoprilin antioksidan özelliği de bu iyileşmede önemlidir.

Yaptığımız çalışmada antioksidan türüne bakılmaksızın toplam antioksidan seviye (TAS) ölçülmüştür. Oysa birçok çalışmada glutatyon (GSH) düzeyi ölçülmüştür (40,241). Çünkü GSH intrasellüler antioksidan sistemin en önemlilerinden biridir ve hücrelerde yüksek konsantrasyon da bulunur. Bu sistemin en önemli fonksiyonu toksik peroksitleri indirgemesidir. GSH'ın indirgeyici özelliğinden dolayı hücrenin bütünlüğünün korunmasında önemlidir. GSH da meydana gelebilecek azalma, makromoleküller veya membran lipidlerinde hasara neden olur. Çalışmalar, ADR'nin kardiyak GSH'da azalmanın olduğunu göstermiştir (40,241). Bu da serbest oksijen radikallerinin sürekli oluştuklarını yansıtır (40). Iqbal ve ark.'larına göre, biyomembranlardaki hasar ya da peroksidasyon etkisi ile ADR kardiyak GSH'da azalma yapar. Yapılan bu çalışmada AT1 reseptör antagonisti olan telmisartanın tedavi öncesi olarak verildiği grupta, ADR'nin neden olduğu GSH'da ki azalmanın normale döndüğü gösterilmiştir. Fakat tedavi sonrası olarak telmisartanın verildiği grupta ADR'nin neden olduğu GSH'daki azalma değişmemiştir (242). Bu sonuçlar, ADR'nin ROS oluşturma etkisinde anjiyotensinin tip 1 reseptörü (AT1) üzerinden önemli role sahip olduğunu göstermektedir. AT1 reseptör antagonistlerinden biri olan valsartan'ın akut kardiyotoksiteyi düzeltici etkisinin indirekt yoldan hemodinamik etkisiyle değil, direkt Anj-II'i inhibe etmesinden kaynaklandığı belirtilmektedir (243). Bu çalışmalarda ADR kaynaklı kardiyotoksitede, kalbin kendi yerel anjiyotensin sisteminin önemi vurgulanmaktadır (244-245). Anj-II, kimaz adı verilen bir enzimle üretilmektedir (3). Adriyamin kaynaklı kalp yetmezliğinde ACE ve kimaz enzimlerinin aktivitesi ölçülmüştür. Çalışmada, kardiyak ACE'nin ADR kaynaklı kalp yetmezliği gelişmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (198). ACE inhibitörleri ve anjiyotensin reseptör blokörlerinin ADR kaynaklı kardiyotoksiteye karşı protektif olabileceği belirtilmiştir (242,244,246-247).

İbrahim ve ark.'larına göre, ADR ile birlikte telmisartan veya kaptopril uygulandığında ADR'nin neden olduğu oksidatif stres anlamlı düzeyde azalır (248). Oksidatif streste ki bu azalma ACE ve Anj reseptör inhibitörlerinin güçlü antioksidan etkilerinden dolayıdır (242,249). Kaptopril tiyol içeren ACE inhibitörlerinden biridir. Kaptoprilin, çeşitli

reaktif oksijen ürünlerini temizlediği belirtilmektedir. Kaptoprilin antioksidan özelliği yapısında ihtiva ettiği sülfüdril (SH) grubundan kaynaklanmaktadır. SH bileşikleri bir hidrojen donörü gibi elektron transfer mekanizması ile oksijen radikallerini nötralize eder (232). Serebral, kardiyovasküler ya da böbrek hasarlarına karşı ACE inhibitörlerinin faydalı etkileri doku ve sistemik Anj-II'i azaltılması ve bradikinin etkisinin artırılması ile oluşmaktadır (250).

Mitokondri hücrede ROS oluşumunun hem kaynağı, hemde ROS hasarının hedefi konumundadır. Kalp enerjisini uzun zincirli serbest yağ asitlerinin β -oksidasyonu ile üretmektedir. Üretilen enerjinin büyük bir kısmı kontraktıl fonksiyonlarda kullanılır. Bundan dolayı kardiyomiyositler büyük miktarlarda mitokondri ihtiva ederler. Geri dönüşümsüz hücre ölümünün mekanizması karışık ve mültifaktoriyeldir. ATP düzeyleri ölçülerek gösterilmeye çalışılan enerji kaybı, kalsiyum homeostazisinin bozulmasına ve bu da fosfolipazları aktive ederek sarkolemma hasarına neden olmaktadır. Membran değişikliklerine açıl KoA, açıl karnitin gibi metabolize olmamış lipid ara ürünleri ve serbest radikaller de neden olur. Bu olaylar sarkolemmal hasarı artırır ve intraselüler ödem gelişir. Membran hasarı, kalsiyum iyonlarının hücreye girmesine neden olur, hücre içi kalsiyumun bu şekilde aşırı artışı irreversibl hasarı artırır, fazla miktarda enzim açığa çıkar (77). Bu çalışmada ADR, renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri ile birlikte verilmiştir. ADR, 2'er gün arayla 4 doz, renin ve ACE inhibitörleri 7 günlük enjeksiyon peryodunda gūnaşırı uygulanmıştır. Enjeksiyon süresinin sonunda kalpler homojenize edilmiştir. Homojenize işlemi sonunda kardiyomiyositlerin mitokondrisi ve sitozolü izole edilmiştir. Kardiyomiyositlerin mitokondri membran potansiyeli ve ATP düzeyleri ölçülmüştür. Adriyamisin mitokondri membran potansiyelini azaltarak miyositlerde enerji oluşumunu azaltmıştır. Bu da kardiyomiyosit kayıplarına ve kalbin kontraktilitesinin azalmasına neden olmuş olabilir. Sonuçlarımız önceki çalışmaları desteklemektedir. 1mg/L konsantrasyonunda ADR ile 24 saat muamele edilen neonatal sıçan hücre kültüründe, kardiyomiyosit MMP'sinin azaldığı belirtilmiştir (251). H9c2 hücreler 0,5 μ g/ml ADR ile 4 saat muamele edildiğinde MMP azalmıştır (252). H9c2 hücreler 1 μ M ADR ile 30 dakika muamele edilmesi durumunda, zamana bağılı olarak MMP'nin ve canlı hücre sayısının azaldığı, fakat kaspaz 3/7 aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (253). Fakat in vivo yapılan bir çalışmada, sıçanlara tek doz (20 mg/kg) ADR verildikten 5 gün sonra MMP ve ATP düzeyinde anlamlı bir azalmanın olmadığı belirtilmektedir (254). Adriyamisin ile

birlikte renin ve ACE inhibitörü verilen gruplarımızda MMP ve ATP düzeyi artmıştır. Anj-II'nin inhibe edilmesiyle birlikte miyositlerde gözlenen bu iyileşme, kalbin elektriksel ve mekaniksel aktivitesinde de düzelme yapmıştır. 100 nM Anj-II ile muamele edilen kardiyomiyositlerde MMP'nin azaldığı belirtilmiştir (255). Adriyaminin mitokondri membran potansiyeli ve ATP üretimine yaptığı olumsuz etkide Anj-II'nin rolünü gösteren çalışmaya rastlanılmamıştır.

Elektron taşıma sisteminin mitokondride yer alması ve mRNA sentezi esnasında RNA polimerazın hatayı okuma mekanizmasına sahip olmaması nedeniyle, oksidatif hasar, mitokondride kromozomal DNA'ya göre daha sıklıkla meydana gelmektedir. Mitokondriyal solunum sonucu oluşan serbest radikaller (süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil), tek zincir kırıklarına ve 8-oksoguanin ve timin glikol gibi hasarlı bazların oluşmasına sebep olur. Oluşan bu ürünler apoptozisi uyarmaktadır (256).

Hücre ölümünün 2 tipi tanımlanmıştır. Nekroz ve apoptozis. Nekroz pasif bir olaydır. Hücre gruplarını kapsar, genellikle hasarı takip eder. Apoptosis programlı hücre ölümüdür. Aktif bir olaydır ve genetik olarak regüledir. Enerjiye bağımlı moleküler ve biyokimyasal olaylarla karakterizedir. Apoptosis saatler içinde kısa sürede oluşur. Kromozomal DNA fragmentasyonu apoptozisin ana işaretidir (257). Apoptozisin başlamasında ya da baskılanmasında mitokondri önemli bir organeldir. Apoptozisde mitokondri membran potansiyeli azalmakta ve mitokondri zarlarının geçirgenliği artmaktadır. Membranda meydana gelen bu değişiklikler neticesinde stokrom-c mitokondri membranından ayrılır, sitoplazmaya geçer ve apoptoz kaskatı aktive edilir.

Olivetti ve arkadaşları tarafından kalp yetmezliğinde apoptozisin meydana geldiği gösterilmiştir (258). Kalp yetmezliğinde apoptozis sıklığı normalden 230 kat daha fazla bulunmuştur. Konjestif kalp yetmezliği ile sonuçlanan birçok kardiyovasküler hastalık, kalpte volüm yüklenmesi, basınç yüklenmesi, ya da kontraktıl miyokardiyal kitlenin kaybıyla karakterizedir. Hastalarda hemodinamik kompensasyon, miyokardiyal hipertrofi, dilatasyona götüren nörohormonal ve sitokin aktivasyonu ile sağlanır (259). Hastalığın ilerlemesiyle miyositler içinde fetal gen program aktivasyonu olur ve apoptozise götürebilir (258). Adriyamin, miyositlerde apoptoza neden olur (260). Diğer taraftan, Anj-II'nin ventriküler miyositlerde apoptozisi uyardığı bilinmektedir (4). Akut ADR uygulamasının, TUNEL-pozitif hücre, anti-aktif kaspaz-3 antibadi-pozitif hücre sayısını arttırdığı gösterilmiştir (183). H9c2 hücreleri, 1 μ M ADR ile muamele

edildiğinde kaspaz 3, 8 ve 9'un aktivitelerinde zamana bağlı artışın olduğu ve 8 saat sonra FasL proteinlerinin 2 kat arttığı bildirilmiştir. (261). Elde edilen bu sonuçlar da, akut ADR uygulamasının kardiyak miyositlerin apoptotik ölümlerine neden olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda kullandığımız JC-1 dolaylı yoldan apoptotik hücre yoğunluğu hakkında bilgi vermektedir. Bu boya oldukça negatif mitokondri membran potansiyeline sahip sağlıklı hücrelerde kolayca mitokondri içine geçmekte ve J-agregatlar oluşturmaktadır. Sağlıksız ya da apoptotik hücrelerde mitokondriler depolarize oldukları için membran potansiyelleri azalır ve JC-1 boya, mitokondriye geçemediği için J-monomerleri oluşturur. Adriyaminin verilen grubun MMP'si kontrol grubuna göre düşük olması, kardiyomiyositlerde apoptozisin arttığını göstermektedir. Adriyaminin ile birlikte renin ve ACE inhibitörleri verilen grupların MMP'lerinin, ADR verilen gruba göre daha negatifleşmesi, apoptozisin uyarılması süreçlerinde Anj-II'nin önemli bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Toko ve ark.'larına göre hem akut hem de kronik ADR, kalp yetmezliğine ve yapısal değişimlere neden olur. Fakat sadece akut ADR verilen gruplarda, gen ekspresyonu ve apoptotik hücre sayısı artmıştır. AT1 "knockout"lı veya ADR ile birlikte AT1 reseptör antagonisti olan RNH-6270 verilen farelerde apoptotik hücre sayısı azalmıştır. Bu sonuçlar, AT1 aracılı Anj-II sinyallerinin en azından kısmi olarak ADR kaynaklı kardiyak hasarda rol alabileceğini göstermiştir. Ayrıca ADR'nin neden olduğu sol ventrikül "remodelling" olayında AT1 "knockout"lı veya RNH-6270 verilen farelerde görülmediği de belirtilmiştir (183). Kardiyovasküler sistemin şekillenmesinde AT2 reseptörünün programlı hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozisi artırdığı gösterilmiştir. Yine Anj-II'nin kaspaz kaskadını aktive ederek apoptozis üzerine olan uyarıcı etkisinin AT2 reseptör blokajı ile ortadan kalkmasının gösterilmesi de bu reseptörün apoptozisteki rolünü kanıtlamıştır (262).

Yaptığımız çalışmada, sadece ADR verilen grubun 100 g vücut ağırlığı başına düşen sol ventrikül ağırlığı, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır. Bu azalmanın ADR'nin, α -aktin, troponin, myozin hafif zincir-2 ve keatin kinaz M izoformu gibi kalp kasına spesifik genlerin ekspresyonunu inhibe etmesi (220) ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Kalp kası ağırlığındaki azalmanın diğer bir nedeni, ADR'nin apoptozisi uyarması sonucu kas miyofil kaybıyla da olabilir. p53 inhibitörü olan pifitrin molekülünün profilaktik kullanılmasıyla, adriyaminin neden olduğu miyokard

nekrozunun önlenmesi, bu düşüncemizi desteklemektedir (263). ACE ve renin inhibitörü verilen grupların da vücut ağırlığı başına düşen ventrikül ağırlığı artmıştır. İnhibitörlerin kalp ağırlığına olumlu etkisi, oksidatif stresi azaltması neticesinde olabilir. Reaktif oksijen ürünlerinin azalması, MMP'nin pozitif yaklaşmasını önlemiş, hücrel enerji üretimini korumuş olabilir. Reaktif oksijen ürünlerinin azalması, MMP'nin negatifliğinin artması aynı zamanda apoptozisin uyarılmasını da engellemiş olabilir. Bu etkiler sonucunda ADR kaynaklı miyofibril kayıpları azalabilir. Yapılan çalışmalarda, kısa veya uzun süreli ADR ile birlikte ACE inhibitörleri uygulanan sıçanlarda, ADR'nin neden olduğu sol ventrikül ağırlığı artışının yanı sıra kardiyak fonksiyondaki azalma neredeyse tamamiyle düzelmiştir (244,246,247).

Sonuç olarak; ADR kaynaklı kardiyotoksisitenin oluşumunun primer sorumlusu ROS'taki artmadır. Reaktif oksijen ürünleri, mitokondriyal fonksiyon ile enerji metabolizmasındaki bozulmayı arttırmıştır. Buna ek olarak TAS'daki azalma, ADR kaynaklı TOS'un artışı sonucu antioksidan maddelerin azaldığını yansıtmaktadır. Anjiyotensin II, bilinen klasik etkilerinin dışında, dokularda yerel olarak üretilmektedir. Yerel Anj-II özellikle patolojik durumlarda daha etkilidir. ACE ve renin inhibitörleri ile anjiyotensin II'nin inhibe edilmesi oksidatif stresi azaltmıştır. Reaktif oksijen ürünlerinin azalması mitokondri membran potansiyelinin korunmasına ve apoptozisin önlenmesine neden olmuştur. Bu olumlu etkiler neticesinde, adriyaminin neden olduğu kalp yetmezliğinde anjiyotensinin önemli rolü gösterilmiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Simunek T, Sterba M, Popelova O, et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep* 2009;61:154-71.
2. Sacco G, Mario B, Lopez G, et al. ACE inhibition and protection from doxorubicin-induced cardiotoxicity in the rat. *Vascul Pharmacol* 2009;50:166-70.
3. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006;86:747-803.
4. Daiber A. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 2010;1797:897-906.
5. Colucci WS. Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure. *Am J Cardiol* 1997;80:15L-25L.
6. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006;56:106-30.
7. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004;56:185-229.
8. Ryberg M, Nielsen D, Skovsgaard T, et al. Epirubicin cardiotoxicity: an analysis of 469 patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:3502-8.

9. Bristow MR, Thompson PD, Martin RP, et al. Early anthracycline cardiotoxicity. *Am J Med* 1978;65:823-32.
10. Bleyer WA. The impact of childhood cancer on the United States and the world. *CA Cancer J Clin* 1990;40:355-67.
11. Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, et al. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med* 1979;91:710-7.
12. Von Hoff DD, Rozencweig M, Layard M, Slavik M, Muggia FM. Daunomycin-induced cardiotoxicity in children and adults. A review of 110 cases. *Am J Med* 1977;62:200-8.
13. Wallace KB. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacol Toxicol* 2003;93:105-15.
14. Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb JA. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer* 1973;32:302-14.
15. Ludke AR, Al-Shudiefat AA, Dhingra S, Jassal DS, Singal PK. A concise description of cardioprotective strategies in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol* 2009;87:756-63.
16. Aversano RC, Boor PJ. Histochemical alterations of acute and chronic doxorubicin cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol* 1983;15:543-53.
17. Robert J, Vrignaud P, Nguyen-Ngoc T, et al. Comparative pharmacokinetics and metabolism of doxorubicin and epirubicin in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rep* 1985;69:633-40.
18. van Asperen J, van Tellingen O, Tijssen F, Schinkel AH, Beijnen JH. Increased accumulation of doxorubicin and doxorubicinol in cardiac tissue of mice lacking *mdr1a* P-glycoprotein. *Br J Cancer* 1999;79:108-13.
19. Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, da Silva R, et al. Acute toxicity of doxorubicin on isolated perfused heart: response of kinases regulating energy supply. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H37-47.
20. Ferrans VJ, Clark JR, Zhang J, Yu ZX, Herman EH. Pathogenesis and prevention of doxorubicin cardiomyopathy. *Tsitologiia* 1997;39:928-37.
21. Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer* 2003;97:2869-79.

22. Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, et al. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med* 2006;355:1572-82.
23. Rosenoff SH, Olson HM, Young DM, Bostick F, Young RC. Adriamycin-induced cardiac damage in the mouse: a small-animal model of cardiotoxicity. *J Natl Cancer Inst* 1975;55:191-4.
24. Luo X, Evrovsky Y, Cole D, et al. Doxorubicin-induced acute changes in cytotoxic aldehydes, antioxidant status and cardiac function in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1997;1360:45-52.
25. Unverferth DV, Leier CV, Balcerzak SP, Hamlin RL. Usefulness of a free radical scavenger in preventing doxorubicin-induced heart failure in dogs. *Am J Cardiol* 1985;56:157-61.
26. Kehoe R, Singer DH, Trapani A, et al. Adriamycin-induced cardiac dysrhythmias in an experimental dog model. *Cancer Treat Rep* 1978;62:963-78.
27. Jaenke RS. An anthracycline antibiotic-induced cardiomyopathy in rabbits. *Lab Invest* 1974;30:292-304.
28. Unverferth DV, Magorien RD, Unverferth BP, et al. Human myocardial morphologic and functional changes in the first 24 hours after doxorubicin administration. *Cancer Treat Rep* 1981;65:1093-7.
29. Doroshow JH, Tallent C, Schechter JE. Ultrastructural features of Adriamycin-induced skeletal and cardiac muscle toxicity. *Am J Pathol* 1985;118:288-97.
30. Billingham ME, Mason JW, Bristow MR, Daniels JR. Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep* 1978;62:865-72.
31. Van Vleet JF, Ferrans VJ, Weirich WE. Cardiac disease induced by chronic adriamycin administration in dogs and an evaluation of vitamin E and selenium as cardioprotectants. *Am J Pathol* 1980;99:13-42.
32. Merski JA, Daskal I, Busch H. Effects of adriamycin on ultrastructure of nucleoli in the heart and liver cells of the rat. *Cancer Res* 1976;36:1580-4.
33. Bellini O, Solcia E. Early and late sarcoplasmic reticulum changes in doxorubicin cardiomyopathy. An ultrastructural investigation with the zinc iodide-osmium tetroxide (ZIO) technique. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1985;49:137-52.

34. Isner JM, Ferrans VJ, Cohen SR, et al. Clinical and morphologic cardiac findings after anthracycline chemotherapy. Analysis of 64 patients studied at necropsy. *Am J Cardiol* 1983;51:1167-74.
35. Singal PK, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Thomas TP, Li T. Combination therapy with probucol prevents adriamycin-induced cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:1055-63.
36. Della Torre P, Podesta A, Pinciroli G, Iatropoulos MJ, Mazue G. Long-lasting effect of dexrazoxane against anthracycline cardiotoxicity in rats. *Toxicol Pathol* 1996;24:398-402.
37. Kang YJ, Chen Y, Epstein PN. Suppression of doxorubicin cardiotoxicity by overexpression of catalase in the heart of transgenic mice. *J Biol Chem* 1996;271:12610-6.
38. Yen HC, Oberley TD, Vichitbandha S, Ho YS, St Clair DK. The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *J Clin Invest* 1996;98:1253-60.
39. Sun X, Zhou Z, Kang YJ. Attenuation of doxorubicin chronic toxicity in metallothionein-overexpressing transgenic mouse heart. *Cancer Res* 2001;61:3382-7.
40. Zhou S, Palmeira CM, Wallace KB. Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes. *Toxicol Lett* 2001;121:151-7.
41. Gosalvez M, Blanco M, Hunter J, Miko M, Chance B. Effects of anticancer agents on the respiration of isolated mitochondria and tumor cells. *Eur J Cancer* 1974;10:567-74.
42. Jeyaseelan R, Poizat C, Wu HY, Kedes L. Molecular mechanisms of doxorubicin-induced cardiomyopathy. Selective suppression of Reiske iron-sulfur protein, ADP/ATP translocase, and phosphofructokinase genes is associated with ATP depletion in rat cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1997;272:5828-32.
43. Ellis CN, Ellis MB, Blakemore WS. Effect of adriamycin on heart mitochondrial DNA. *Biochem J* 1987;245:309-12.
44. Serrano J, Palmeira CM, Kuehl DW, Wallace KB. Cardiosensitive and cumulative oxidation of mitochondrial DNA following subchronic doxorubicin administration. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:201-5.

45. Palmeira CM, Serrano J, Kuehl DW, Wallace KB. Preferential oxidation of cardiac mitochondrial DNA following acute intoxication with doxorubicin. *Biochim Biophys Acta* 1997;1321:101-6.
46. De Martinis BS, de Lourdes Pires Bianchi M. Methodology for urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine analysis by HPLC with electrochemical detection. *Pharmacol Res* 2002;46:129-31.
47. McDorman KS, Pachkowski BF, Nakamura J, Wolf DC, Swenberg JA. Oxidative DNA damage from potassium bromate exposure in Long-Evans rats is not enhanced by a mixture of drinking water disinfection by-products. *Chem Biol Interact* 2005;152:107-17.
48. Boucek RJ, Jr., Olson RD, Brenner DE, et al. The major metabolite of doxorubicin is a potent inhibitor of membrane-associated ion pumps. A correlative study of cardiac muscle with isolated membrane fractions. *J Biol Chem* 1987;262:15851-6.
49. Dodd DA, Atkinson JB, Olson RD, et al. Doxorubicin cardiomyopathy is associated with a decrease in calcium release channel of the sarcoplasmic reticulum in a chronic rabbit model. *J Clin Invest* 1993;91:1697-705.
50. Arai M, Yoguchi A, Takizawa T, et al. Mechanism of doxorubicin-induced inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase gene transcription. *Circ Res* 2000;86:8-14.
51. Zorzato F, Salviati G, Facchinetti T, Volpe P. Doxorubicin induces calcium release from terminal cisternae of skeletal muscle. A study on isolated sarcoplasmic reticulum and chemically skinned fibers. *J Biol Chem* 1985;260:7349-55.
52. Singal PK, Pierce GN. Adriamycin stimulates low-affinity Ca²⁺ binding and lipid peroxidation but depresses myocardial function. *Am J Physiol* 1986;250:H419-25.
53. Takano H, Ozawa H, Kobayashi I, et al. Myocardial sympathetic dysinnervation in doxorubicin cardiomyopathy. *J Cardiol* 1996;27:49-55.
54. Meinardi MT, van der Graaf WT, van Veldhuisen DJ, et al. Detection of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cancer Treat Rev* 1999;25:237-47.

55. Sato S, Iwaizumi M, Handa K, Tamura Y. Electron spin resonance study on the mode of generation of free radicals of daunomycin, adriamycin, and carboquone in NAD(P)H-microsome system. *Gann* 1977;68:603-8.
56. Myers CE, McGuire W, Young R. Adriamycin: amelioration of toxicity by alpha-tocopherol. *Cancer Treat Rep* 1976;60:961-2.
57. Myers CE, McGuire WP, Liss RH, et al. Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science* 1977;197:165-7.
58. Wiseman LR, Spencer CM. Dexrazoxane. A review of its use as a cardioprotective agent in patients receiving anthracycline-based chemotherapy. *Drugs* 1998;56:385-403.
59. Berthiaume JM, Wallace KB. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Cell Biol Toxicol* 2007;23:15-25.
60. Chen Y, Daosukho C, Opii WO, et al. Redox proteomic identification of oxidized cardiac proteins in adriamycin-treated mice. *Free Radic Biol Med* 2006;41:1470-7.
61. Sarvazyan N. Visualization of doxorubicin-induced oxidative stress in isolated cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1996;271:H2079-85.
62. Shioji K, Kishimoto C, Nakamura H, et al. Overexpression of thioredoxin-1 in transgenic mice attenuates adriamycin-induced cardiotoxicity. *Circulation* 2002;106:1403-9.
63. Gao J, Xiong Y, Ho YS, et al. Glutathione peroxidase 1-deficient mice are more susceptible to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783:2020-9.
64. Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, Joenje H. Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther* 1990;47:219-31.
65. Lee V, Randhawa AK, Singal PK. Adriamycin-induced myocardial dysfunction in vitro is mediated by free radicals. *Am J Physiol* 1991;261:H989-95.
66. Doroshow JH. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res* 1983;43:460-72.
67. Doroshow JH, Davies KJ. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *J Biol Chem* 1986;261:3068-74.

68. Zweier JL. Iron-mediated formation of an oxidized adriamycin free radical. *Biochim Biophys Acta* 1985;839:209-13.
69. Fogli S, Nieri P, Breschi MC. The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage. *FASEB J* 2004;18:664-75.
70. Liu B, Li H, Qu H, Sun B. Nitric oxide synthase expressions in ADR-induced cardiomyopathy in rats. *J Biochem Mol Biol* 2006;39:759-65.
71. Neilan TG, Blake SL, Ichinose F, et al. Disruption of nitric oxide synthase 3 protects against the cardiac injury, dysfunction, and mortality induced by doxorubicin. *Circulation* 2007;116:506-14.
72. Cole MP, Chaiswing L, Oberley TD, et al. The protective roles of nitric oxide and superoxide dismutase in adriamycin-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Res* 2006;69:186-97.
73. Kalivendi SV, Kotamraju S, Zhao H, Joseph J, Kalyanaraman B. Doxorubicin-induced apoptosis is associated with increased transcription of endothelial nitric-oxide synthase. Effect of antiapoptotic antioxidants and calcium. *J Biol Chem* 2001;276:47266-76.
74. Johnson BA, Cheang MS, Goldenberg GJ. Comparison of adriamycin uptake in chick embryo heart and liver cells an murine L5178Y lymphoblasts in vitro: role of drug uptake in cardiotoxicity. *Cancer Res* 1986;46:218-23.
75. Huber SA. Doxorubicin-induced alterations in cultured myocardial cells stimulate cytolytic T lymphocyte responses. *Am J Pathol* 1990;137:449-56.
76. Doroshov JH, Locker GY, Myers CE. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. *J Clin Invest* 1980;65:128-35.
77. Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, Zuppinger C, Wallimann T, Schlattner U. New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: the critical role of cellular energetics. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:389-405.
78. Nohl H, Gille L, Staniek K. The exogenous NADH dehydrogenase of heart mitochondria is the key enzyme responsible for selective cardiotoxicity of anthracyclines. *Z Naturforsch C* 1998;53:279-85.

79. Goormaghtigh E, Huart P, Praet M, Brasseur R, Ruyschaert JM. Structure of the adriamycin-cardiolipin complex. Role in mitochondrial toxicity. *Biophys Chem* 1990;35:247-57.
80. Gille L, Nohl H. Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity. *Free Radic Biol Med* 1997;23:775-82.
81. Weinstein DM, Mihm MJ, Bauer JA. Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;294:396-401.
82. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271:C1424-37.
83. DeAtley SM, Aksenov MY, Aksenova MV, et al. Adriamycin-induced changes of creatine kinase activity in vivo and in cardiomyocyte culture. *Toxicology* 1999;134:51-62.
84. Harris RN, Doroshov JH. Effect of doxorubicin-enhanced hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation on calcium sequestration by cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;130:739-45.
85. Moudgil R, Menon V, Xu Y, et al. Postischemic apoptosis and functional recovery after angiotensin II type 1 receptor blockade in isolated working rat hearts. *J Hypertens* 2001;19:1121-9.
86. Wu ML, Tsai KL, Wang SM, et al. Mechanism of hydrogen peroxide and hydroxyl free radical-induced intracellular acidification in cultured rat cardiac myoblasts. *Circ Res* 1996;78:564-72.
87. van den Hoff MJ, van den Eijnde SM, Viragh S, Moorman AF. Programmed cell death in the developing heart. *Cardiovasc Res* 2000;45:603-20.
88. Zhang YW, Shi J, Li YJ, Wei L. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2009;57:435-45.
89. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-6.
90. Anversa P. Myocyte death in the pathological heart. *Circ Res* 2000;86:121-4.
91. Wieder T, Essmann F, Prokop A, et al. Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood* 2001;97:1378-87.

92. Sugden PH, Clerk A. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res* 1998;83:345-52.
93. Leri A, Liu Y, Malhotra A, et al. Pacing-induced heart failure in dogs enhances the expression of p53 and p53-dependent genes in ventricular myocytes. *Circulation* 1998;97:194-203.
94. Kumar D, Jugdutt BI. Apoptosis and oxidants in the heart. *J Lab Clin Med* 2003;142:288-97.
95. Ikeda S, Hamada M, Hiwada K. Cardiomyocyte apoptosis with enhanced expression of P53 and Bax in right ventricle after pulmonary arterial banding. *Life Sci* 1999;65:925-33.
96. Regula KM, Kirshenbaum LA. p53 activates the mitochondrial death pathway and apoptosis of ventricular myocytes independent of de novo gene transcription. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1435-45.
97. Kirshenbaum LA, de Moissac D. The bcl-2 gene product prevents programmed cell death of ventricular myocytes. *Circulation* 1997;96:1580-5.
98. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-12.
99. Borutaite V, Budriunaite A, Morkuniene R, Brown GC. Release of mitochondrial cytochrome c and activation of cytosolic caspases induced by myocardial ischaemia. *Biochim Biophys Acta* 2001;1537:101-9.
100. Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366:151-65.
101. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-6.
102. Zamzami N, Metivier D, Kroemer G. Quantitation of mitochondrial transmembrane potential in cells and in isolated mitochondria. *Methods Enzymol* 2000;322:208-13.
103. Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 1999;59:1693s-1700s.
104. Kubasiak LA, Hernandez OM, Bishopric NH, Webster KA. Hypoxia and acidosis activate cardiac myocyte death through the Bcl-2 family protein BNIP3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12825-30.

105. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-6.
106. Communal C, Sumandea M, de Tombe P, et al. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:6252-6.
107. Sheikh MS, Fornace AJ, Jr. Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol* 2000;182:171-81.
108. Alves da Costa C, Paitel E, Mattson MP, et al. Wild-type and mutated presenilins 2 trigger p53-dependent apoptosis and down-regulate presenilin 1 expression in HEK293 human cells and in murine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:4043-8.
109. Bartke T, Siegmund D, Peters N, et al. p53 upregulates cFLIP, inhibits transcription of NF-kappaB-regulated genes and induces caspase-8-independent cell death in DLD-1 cells. *Oncogene* 2001;20:571-80.
110. Gupta S, Radha V, Furukawa Y, Swarup G. Direct transcriptional activation of human caspase-1 by tumor suppressor p53. *J Biol Chem* 2001;276:10585-8.
111. Lorenzo E, Ruiz-Ruiz C, Quesada AJ, et al. Doxorubicin induces apoptosis and CD95 gene expression in human primary endothelial cells through a p53-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2002;277:10883-92.
112. Narula J, Pandey P, Arbustini E, et al. Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8144-9.
113. Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest* 1987;79:1-6.
114. Hall JE. Historical perspective of the renin-angiotensin system. *Mol Biotechnol* 2003;24:27-39.
115. Hollenberg NK, Williams GH. Angiotensin as a renal, adrenal, and cardiovascular hormone: responses to saralasin in normal man and in essential and secondary hypertension. *Kidney Int Suppl* 1979:S29-35.
116. Nouet S, Nahmias C. Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:1-6.

117. Arakawa K, Urata H. Hypothesis regarding the pathophysiological role of alternative pathways of angiotensin II formation in atherosclerosis. *Hypertension* 2000;36:638-41.
118. Dzau VJ, Ellison KE, Brody T, Ingelfinger J, Pratt RE. A comparative study of the distributions of renin and angiotensinogen messenger ribonucleic acids in rat and mouse tissues. *Endocrinology* 1987;120:2334-8.
119. Paul M, Wagner D, Metzger R, et al. Quantification of renin mRNA in various mouse tissues by a novel solution hybridization assay. *J Hypertens* 1988;6:247-52.
120. Paul M, Wagner J, Dzau VJ. Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. Quantitative analysis by the polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 1993;91:2058-64.
121. von Lutterotti N, Catanzaro DF, Sealey JE, Laragh JH. Renin is not synthesized by cardiac and extrarenal vascular tissues. A review of experimental evidence. *Circulation* 1994;89:458-70.
122. Yan Y, Chen R, Pitarresi T, et al. Kidney is the only source of human plasma renin in 45-kb human renin transgenic mice. *Circ Res* 1998;83:1279-88.
123. De Mello WC, Danser AH. Angiotensin II and the heart : on the intracrine renin-angiotensin system. *Hypertension* 2000;35:1183-8.
124. Peters J, Farrenkopf R, Clausmeyer S, et al. Functional significance of prorenin internalization in the rat heart. *Circ Res* 2002;90:1135-41.
125. Catanzaro DF. Physiological relevance of renin/prorenin binding and uptake. *Hypertens Res* 2005;28:97-105.
126. Danser AH, van Kesteren CA, Bax WA, et al. Prorenin, renin, angiotensinogen, and angiotensin-converting enzyme in normal and failing human hearts. Evidence for renin binding. *Circulation* 1997;96:220-6.
127. Saris JJ, Derkx FH, De Bruin RJ, et al. High-affinity prorenin binding to cardiac man-6-P/IGF-II receptors precedes proteolytic activation to renin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H1706-15.
128. Saris JJ, van den Eijnden MM, Lamers JM, et al. Prorenin-induced myocyte proliferation: no role for intracellular angiotensin II. *Hypertension* 2002;39:573-7.

129. Ichihara A, Sakoda M, Kurauchi-Mito A, et al. New approaches to blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system: characteristics and usefulness of the direct renin inhibitor aliskiren. *J Pharmacol Sci* 2010;113:296-300.
130. Wood JM, Maibaum J, Rahuel J, et al. Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:698-705.
131. Admiraal PJ, van Kesteren CA, Danser AH, et al. Uptake and proteolytic activation of prorenin by cultured human endothelial cells. *J Hypertens* 1999;17:621-9.
132. Dzau VJ, Gibbons GH. Autocrine-paracrine mechanisms of vascular myocytes in systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1987;60:99I-103I.
133. Tang SS, Rogg H, Schumacher R, Dzau VJ. Characterization of nuclear angiotensin-II-binding sites in rat liver and comparison with plasma membrane receptors. *Endocrinology* 1992;131:374-80.
134. Falkenhahn M, Franke F, Bohle RM, et al. Cellular distribution of angiotensin-converting enzyme after myocardial infarction. *Hypertension* 1995;25:219-26.
135. Paul M, Stoll M, Kreutz R, Fernandez-Alfonso MS. The cellular basis of angiotensin converting enzyme mRNA expression in rat heart. *Basic Res Cardiol* 1996;91 Suppl 2:57-63.
136. Hokimoto S, Yasue H, Fujimoto K, et al. Expression of angiotensin-converting enzyme in remaining viable myocytes of human ventricles after myocardial infarction. *Circulation* 1996;94:1513-8.
137. Yamagishi M, Kaneko M, Chiba K, Ohji T, Kohri T. Refractory hypertension in childhood--efficacy of captopril therapy. *J UOEH* 1987;9:401-10.
138. Gupta A, Prajapati SK, Singh M, Balamurugan M. Proniosomal powder of captopril: formulation and evaluation. *Mol Pharm* 2007;4:596-9.
139. Urata H, Healy B, Stewart RW, Bumpus FM, Husain A. Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. *Circ Res* 1990;66:883-90.
140. Urata H, Nishimura H, Ganten D. Chymase-dependent angiotensin II forming systems in humans. *Am J Hypertens* 1996;9:277-84.
141. Li P, Chen PM, Wang SW, Chen LY. Time-dependent expression of chymase and angiotensin converting enzyme in the hamster heart under pressure overload. *Hypertens Res* 2002;25:757-62.

142. Wolny A, Clozel JP, Rein J, et al. Functional and biochemical analysis of angiotensin II-forming pathways in the human heart. *Circ Res* 1997;80:219-27.
143. Lee YA, Liang CS, Lee MA, Lindpaintner K. Local stress, not systemic factors, regulate gene expression of the cardiac renin-angiotensin system in vivo: a comprehensive study of all its components in the dog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:11035-40.
144. Danser AH, van Kats JP, Admiraal PJ, et al. Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension* 1994;24:37-48.
145. van Kats JP, Danser AH, van Meegen JR, et al. Angiotensin production by the heart: a quantitative study in pigs with the use of radiolabeled angiotensin infusions. *Circulation* 1998;98:73-81.
146. Bader M, Peters J, Baltatu O, et al. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med* 2001;79:76-102.
147. Senbonmatsu T, Ichihara S, Price E, Jr., Gaffney FA, Inagami T. Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. *J Clin Invest* 2000;106:R25-9.
148. Widdop RE, Jones ES, Hannan RE, Gaspari TA. Angiotensin AT₂ receptors: cardiovascular hope or hype? *Br J Pharmacol* 2003;140:809-24.
149. Busche S, Gallinat S, Bohle RM, et al. Expression of angiotensin AT₁ and AT₂ receptors in adult rat cardiomyocytes after myocardial infarction. A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction study. *Am J Pathol* 2000;157:605-11.
150. Sechi LA, Grady EF, Griffin CA, Kalinyak JE, Schambelan M. Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat and human kidney. *Am J Physiol* 1992;262:F236-40.
151. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* 1999;33:613-21.
152. Matsubara H, Kanasaki M, Murasawa S, et al. Differential gene expression and regulation of angiotensin II receptor subtypes in rat cardiac fibroblasts and cardiomyocytes in culture. *J Clin Invest* 1994;93:1592-601.

153. Berry C, Touyz R, Dominiczak AF, Webb RC, Johns DG. Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H2337-65.
154. Koch-Weser J. Myocardial Actions of Angiotensin. *Circ Res* 1964;14:337-44.
155. Koch-Weser J. Nature of the Inotropic Action of Angiotensin on Ventricular Myocardium. *Circ Res* 1965;16:230-7.
156. Dempsey PJ, McCallum ZT, Kent KM, Cooper T. Direct myocardial effects of angiotensin II. *Am J Physiol* 1971;220:477-81.
157. Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, et al. The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data. *Am J Cardiol* 2001;88:1L-20L.
158. van Kesteren CA, van Heugten HA, Lamers JM, et al. Angiotensin II-mediated growth and antigrowth effects in cultured neonatal rat cardiac myocytes and fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:2147-57.
159. Gray MO, Long CS, Kalinyak JE, Li HT, Karliner JS. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1998;40:352-63.
160. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000;52:415-72.
161. Cingolani OH, Yang XP, Liu YH, et al. Reduction of cardiac fibrosis decreases systolic performance without affecting diastolic function in hypertensive rats. *Hypertension* 2004;43:1067-73.
162. Schunkert H, Jackson B, Tang SS, et al. Distribution and functional significance of cardiac angiotensin converting enzyme in hypertrophied rat hearts. *Circulation* 1993;87:1328-39.
163. Rothermund L, Pinto YM, Vetter R, et al. Effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade on cardiac fibrosis and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling in hypertensive transgenic rats overexpressing the Ren2 gene. *J Hypertens* 2001;19:1465-72.
164. Rothermund L, Pinto YM, Hofer B, et al. Cardiac endothelin system impairs left ventricular function in renin-dependent hypertension via decreased sarcoplasmic reticulum Ca(2+) uptake. *Circulation* 2000;102:1582-8.

165. Domenighetti AA, Wang Q, Egger M, et al. Angiotensin II-mediated phenotypic cardiomyocyte remodeling leads to age-dependent cardiac dysfunction and failure. *Hypertension* 2005;46:426-32.
166. Levy BI. Can angiotensin II type 2 receptors have deleterious effects in cardiovascular disease? Implications for therapeutic blockade of the renin-angiotensin system. *Circulation* 2004;109:8-13.
167. Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E, Jr., et al. Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. *Circulation* 2001;104:346-51.
168. Cingolani HE, Perez NG, Aiello EA, de Hurtado MC. Intracellular signaling following myocardial stretch: an autocrine/paracrine loop. *Regul Pept* 2005;128:211-20.
169. Baker KM, Chernin MI, Wixson SK, Aceto JF. Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol* 1990;259:H324-32.
170. Schelling P, Fischer H, Ganten D. Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? *J Hypertens* 1991;9:3-15.
171. Hirsch AT, Talsness CE, Schunkert H, Paul M, Dzau VJ. Tissue-specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure. *Circ Res* 1991;69:475-82.
172. Sun Y, Weber KT. Angiotensin-converting enzyme and wound healing in diverse tissues of the rat. *J Lab Clin Med* 1996;127:94-101.
173. De Carvalho Frimm C, Sun Y, Weber KT. Angiotensin II receptor blockade and myocardial fibrosis of the infarcted rat heart. *J Lab Clin Med* 1997;129:439-46.
174. Pinto YM, Pinto-Sietsma SJ, Philipp T, et al. Reduction in left ventricular messenger RNA for transforming growth factor beta(1) attenuates left ventricular fibrosis and improves survival without lowering blood pressure in the hypertensive TGR(mRen2)27 Rat. *Hypertension* 2000;36:747-54.
175. Healey JS, Baranchuk A, Crystal E, et al. Prevention of atrial fibrillation with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1832-9.
176. de Cavanagh EM, Inserra F, Ferder M, Ferder L. From mitochondria to disease: role of the renin-angiotensin system. *Am J Nephrol* 2007;27:545-53.

177. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000;899:136-47.
178. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003;552:335-44.
179. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 2004;279:49064-73.
180. Ardehali H, Chen Z, Ko Y, Mejia-Alvarez R, Marban E. Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:11880-5.
181. Zhang GX, Lu XM, Kimura S, Nishiyama A. Role of mitochondria in angiotensin II-induced reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase activation. *Cardiovasc Res* 2007;76:204-12.
182. Larkin JE, Frank BC, Gaspard RM, et al. Cardiac transcriptional response to acute and chronic angiotensin II treatments. *Physiol Genomics* 2004;18:152-66.
183. Toko H, Oka T, Zou Y, et al. Angiotensin II type 1a receptor mediates doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Hypertens Res* 2002;25:597-603.
184. Praga C, Beretta G, Vigo PL, et al. Adriamycin cardiotoxicity: a survey of 1273 patients. *Cancer Treat Rep* 1979;63:827-34.
185. Gilladoga AC, Manuel C, Tan CT, et al. The cardiotoxicity of adriamycin and daunomycin in children. *Cancer* 1976;37:1070-8.
186. Fisher 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;111:1601-10.
187. Venkatesan N. Curcumin attenuation of acute adriamycin myocardial toxicity in rats. *Br J Pharmacol* 1998;124:425-7.
188. Jensen RA, Acton EM, Peters JH. Doxorubicin cardiotoxicity in the rat: comparison of electrocardiogram, transmembrane potential, and structural effects. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984;6:186-200.
189. Villani F, Monti E, Piccinini F, et al. Relationship between doxorubicin-induced ECG changes and myocardial alterations in rats. *Tumori* 1986;72:323-9.

190. Cirillo R, Sacco G, Venturella S, et al. Comparison of doxorubicin- and MEN 10755-induced long-term progressive cardiotoxicity in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;35:100-8.
191. Zankov DP, Omatsu-Kanbe M, Isono T, et al. Angiotensin II potentiates the slow component of delayed rectifier K⁺ current via the AT1 receptor in guinea pig atrial myocytes. *Circulation* 2006;113:1278-86.
192. Touyz RM, Sventek P, Lariviere R, et al. Cytosolic calcium changes induced by angiotensin II in neonatal rat atrial and ventricular cardiomyocytes are mediated via angiotensin II subtype 1 receptors. *Hypertension* 1996;27:1090-6.
193. Emanuelov AK, Shainberg A, Chepurko Y, et al. Adenosine A3 receptor-mediated cardioprotection against doxorubicin-induced mitochondrial damage. *Biochem Pharmacol* 2010;79:180-7.
194. Giantris A, Abdurrahman L, Hinkle A, Asselin B, Lipshultz SE. Anthracycline-induced cardiotoxicity in children and young adults. *Crit Rev Oncol Hematol* 1998;27:53-68.
195. Lipshultz SE. Ventricular dysfunction clinical research in infants, children and adolescents. *Prog Pediatr Cardiol* 2000;12:1-28.
196. 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;19:3163-72.
197. Green DM, Hyland A, Chung CS, Zevon MA, Hall BC. Cancer and cardiac mortality among 15-year survivors of cancer diagnosed during childhood or adolescence. *J Clin Oncol* 1999;17:3207-15.
198. Okumura K, Jin D, Takai S, Miyazaki M. Beneficial effects of angiotensin-converting enzyme inhibition in adriamycin-induced cardiomyopathy in hamsters. *Jpn J Pharmacol* 2002;88:183-8.
199. Venkatesan N, Ramesh CV, Jayakumar R, Chandrakasan G. Angiotensin I converting enzyme activity in adriamycin induced nephrosis in rats. *Toxicology* 1993;85:137-48.
200. Schnee JM, Hsueh WA. Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res* 2000;46:264-8.

201. MacKenna D, Summerour SR, Villarreal FJ. Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc Res* 2000;46:257-63.
202. Vaynblat M, Shah HR, Bhaskaran D, et al. Simultaneous angiotensin converting enzyme inhibition moderates ventricular dysfunction caused by doxorubicin. *Eur J Heart Fail* 2002;4:583-6.
203. Kimball TR, Daniels SR, Meyer RA, et al. Effect of digoxin on contractility and symptoms in infants with a large ventricular septal defect. *Am J Cardiol* 1991;68:1377-82.
204. Moncloa F, Sromovsky JA, Walker JF, Davies RO. Enalapril in hypertension and congestive heart failure. Overall review of efficacy and safety. *Drugs* 1985;30 Suppl 1:82-9.
205. Node K, Kitakaze M, Kosaka H, et al. Role of Ca^{2+} -activated K^{+} channels in the protective effect of ACE inhibition against ischemic myocardial injury. *Hypertension* 1998;31:1290-8.
206. Ferrari R, Cargnoni A, Curello S, et al. Protection of the ischemic myocardium by the converting-enzyme inhibitor zofenopril: insight into its mechanism of action. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;20:694-704.
207. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res* 1985;57:84-95.
208. Raya TE, Gay RG, Aguirre M, Goldman S. Importance of venodilatation in prevention of left ventricular dilatation after chronic large myocardial infarction in rats: a comparison of captopril and hydralazine. *Circ Res* 1989;64:330-7.
209. Lindpaintner K, Ganten D. The cardiac renin-angiotensin system. An appraisal of present experimental and clinical evidence. *Circ Res* 1991;68:905-21.
210. Daly P, Rouleau JL, Cousineau D, Burgess JH. Acute effects of captopril on the coronary circulation of patients with hypertension and angina. *Am J Med* 1984;76:111-5.
211. Abd El-Aziz MA, Othman AI, Amer M, El-Missiry MA. Potential protective role of angiotensin-converting enzyme inhibitors captopril and enalapril against adriamycin-induced acute cardiac and hepatic toxicity in rats. *J Appl Toxicol* 2001;21:469-73.

212. Soga Y, Takai S, Koyama T, et al. Attenuation of adhesion formation after cardiac surgery with a chymase inhibitor in a hamster model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;127:72-8.
213. Azizi M. Direct renin inhibition: clinical pharmacology. *J Mol Med* 2008;86:647-54.
214. Feldman DL, Jin L, Xuan H, et al. Effects of aliskiren on blood pressure, albuminuria, and (pro)renin receptor expression in diabetic TG(mRen-2)27 rats. *Hypertension* 2008;52:130-6.
215. Pilz B, Shagdarsuren E, Wellner M, et al. Aliskiren, a human renin inhibitor, ameliorates cardiac and renal damage in double-transgenic rats. *Hypertension* 2005;46:569-76.
216. Kelly DJ, Zhang Y, Moe G, Naik G, Gilbert RE. Aliskiren, a novel renin inhibitor, is renoprotective in a model of advanced diabetic nephropathy in rats. *Diabetologia* 2007;50:2398-404.
217. Fisher ND, Jan Danser AH, Nussberger J, Dole WP, Hollenberg NK. Renal and hormonal responses to direct renin inhibition with aliskiren in healthy humans. *Circulation* 2008;117:3199-205.
218. Boucek RJ, Jr., Miracle A, Anderson M, et al. Persistent effects of doxorubicin on cardiac gene expression. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1435-46.
219. Ito H, Miller SC, Billingham ME, et al. Doxorubicin selectively inhibits muscle gene expression in cardiac muscle cells in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:4275-9.
220. Nakamura T, Ueda Y, Juan Y, et al. Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: In vivo study. *Circulation* 2000;102:572-8.
221. Dursun N, Taskin E, Ozturk F. Protection Against Adriamycin-Induced Cardiomyopathy by Carnosine in Rats: Role of Endogenous Antioxidants. *Biol Trace Elem Res* 2010.
222. Arai M, Matsui H, Periasamy M. Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 1994;74:555-64.
223. Arai M, Tomaru K, Takizawa T, et al. Sarcoplasmic reticulum genes are selectively down-regulated in cardiomyopathy produced by doxorubicin in rabbits. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:243-54.

224. Arai M, Suzuki T, Nagai R. Sarcoplasmic reticulum genes are upregulated in mild cardiac hypertrophy but downregulated in severe cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:1583-90.
225. Arai M, Alpert NR, MacLennan DH, Barton P, Periasamy M. Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure. A possible mechanism for alterations in systolic and diastolic properties of the failing myocardium. *Circ Res* 1993;72:463-9.
226. Goormaghtigh E, Huart P, Brasseur R, Ruyschaert JM. Mechanism of inhibition of mitochondrial enzymatic complex I-III by adriamycin derivatives. *Biochim Biophys Acta* 1986;861:83-94.
227. Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Mol Cell Biochem* 2000;207:77-86.
228. De Beer EL, Bottone AE, Voest EE. Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review. *Eur J Pharmacol* 2001;415:1-11.
229. Suresh A, Guedez L, Moreb J, Zucali J. Overexpression of manganese superoxide dismutase promotes survival in cell lines after doxorubicin treatment. *Br J Haematol* 2003;120:457-63.
230. Green PS, Leeuwenburgh C. Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002;1588:94-101.
231. Scribner AW, Loscalzo J, Napoli C. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial function and oxidant stress. *Eur J Pharmacol* 2003;482:95-9.
232. Liu YH, You Y, Song T, Wu SJ, Liu LY. Impairment of endothelium-dependent relaxation of rat aortas by homocysteine thiolactone and attenuation by captopril. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;50:155-61.
233. Ikeda U, Maeda Y, Kawahara Y, Yokoyama M, Shimada K. Angiotensin II augments cytokine-stimulated nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes. *Circulation* 1995;92:2683-9.
234. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999;43:562-71.

235. Oak JH, Cai H. Attenuation of angiotensin II signaling recouples eNOS and inhibits nonendothelial NOX activity in diabetic mice. *Diabetes* 2007;56:118-26.
236. Singal PK, Iliskovic N, Li T, Kumar D. Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *FASEB J* 1997;11:931-6.
237. Chandran K, Aggarwal D, Migrino RQ, et al. Doxorubicin inactivates myocardial cytochrome c oxidase in rats: cardioprotection by Mito-Q. *Biophys J* 2009;96:1388-98.
238. Simmons TW, Jamall IS. Relative importance of intracellular glutathione peroxidase and catalase in vivo for prevention of peroxidation to the heart. *Cardiovasc Res* 1989;23:774-9.
239. Xin H, Liu XH, Zhu YZ. Herba leonurine attenuates doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells. *Eur J Pharmacol* 2009;612:75-9.
240. Weiss D, Sorescu D, Taylor WR. Angiotensin II and atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2001;87:25C-32C.
241. Dorr RT, Lagel K, McLean S. Cardioprotection of rat heart myocytes with amifostine (Ethyol) and its free thiol, WR-1065, in vitro. *Eur J Cancer* 1996;32A Suppl 4:S21-5.
242. Iqbal M, Dubey K, Anwer T, Ashish A, Pillai KK. Protective effects of telmisartan against acute doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Pharmacol Rep* 2008;60:382-90.
243. 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;104:2492-8.
244. Sacco G, Bigioni M, Evangelista S, et al. Cardioprotective effects of zofenopril, a new angiotensin-converting enzyme inhibitor, on doxorubicin-induced cardiotoxicity in the rat. *Eur J Pharmacol* 2001;414:71-8.
245. Baker KM, Booz GW, Dostal DE. Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol* 1992;54:227-41.
246. al-Shabanah O, Mansour M, el-Kashef H, al-Bekairi A. Captopril ameliorates myocardial and hematological toxicities induced by adriamycin. *Biochem Mol Biol Int* 1998;45:419-27.

247. Tokudome T, Mizushige K, Noma T, et al. Prevention of doxorubicin (adriamycin)-induced cardiomyopathy by simultaneous administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor assessed by acoustic densitometry. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36:361-8.
248. Ibrahim MA, Ashour OM, Ibrahim YF, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin AT(1)-receptor antagonism equally improve doxorubicin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Pharmacol Res* 2009;60:373-81.
249. Yilmaz S, Atessahin A, Sahna E, Karahan I, Ozer S. Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicology* 2006;218:164-71.
250. Grossman E, Messerli FH, Neutel JM. Angiotensin II receptor blockers: equal or preferred substitutes for ACE inhibitors? *Arch Intern Med* 2000;160:1905-11.
251. Lu L, Wu W, Yan J, et al. Adriamycin-induced autophagic cardiomyocyte death plays a pathogenic role in a rat model of heart failure. *Int J Cardiol* 2009;134:82-90.
252. L'Ecuyer T, Sanjeev S, Thomas R, et al. DNA damage is an early event in doxorubicin-induced cardiac myocyte death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H1273-80.
253. Liu Y, Huo Z, Yan B, et al. Prolyl hydroxylase 3 interacts with Bcl-2 to regulate doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;401:231-7.
254. Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, Leeuwenburgh C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Res* 2002;62:4592-8.
255. Choudhary R, Baker KM, Pan J. All-trans retinoic acid prevents angiotensin II- and mechanical stretch-induced reactive oxygen species generation and cardiomyocyte apoptosis. *J Cell Physiol* 2008;215:172-81.
256. Croteau DL, Bohr VA. Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J Biol Chem* 1997;272:25409-12.
257. Colucci WS. Apoptosis in the heart. *N Engl J Med* 1996;335:1224-6.

- 258. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997;336:1131-41.
- 259. Katz AM. The cardiomyopathy of overload: an unnatural growth response. *Eur Heart J* 1995;16 Suppl O:110-4.
- 260. Miyazaki M, Takai S. Local angiotensin II-generating system in vascular tissues: the roles of chymase. *Hypertens Res* 2001;24:189-93.
- 261. Kalivendi SV, Konorev EA, Cunningham S, et al. Doxorubicin activates nuclear factor of activated T-lymphocytes and Fas ligand transcription: role of mitochondrial reactive oxygen species and calcium. *Biochem J* 2005;389:527-39.
- 262. Yamada T, Akishita M, Pollman MJ, et al. Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life Sci* 1998;63:PL289-95.
- 263. Liu X, Chua CC, Gao J, et al. Pifithrin-alpha protects against doxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H933-9.

**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ DENEY HAYVANLARI
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE**

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

ETİK KURULUN ADRESİ : Erciyes Üniversitesi

Tarih: 17.12.2008

Toplantı Sayısı: 11

Karar No: 08/80

Etik kurul toplantısı

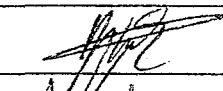
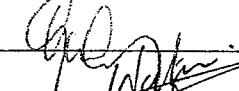
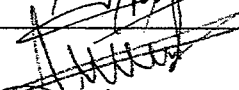
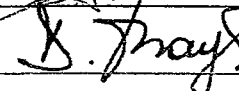
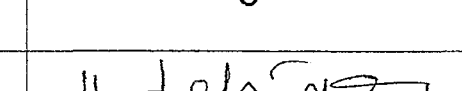
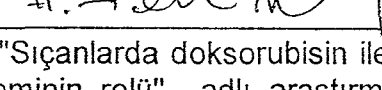
17.12.2008

tarihinde Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik

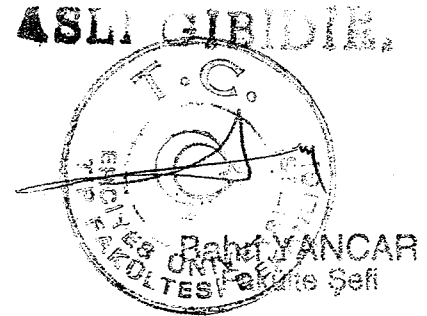
Kurul Başkanlığı'nda

Prof.Dr. Zübeyde Gündüz

başkanlığında gerçekleştirilmiştir.

Üye Adı/Soyadı	Akademik Ünvanı	Fakültesi	
Zübeyde Gündüz	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Harun Ülger	Doç.Dr	Tıp Fakültesi	
Özlem Canöz	Doç.Dr.	Tıp Fakültesi	
Hatice Özbilge	Doç.Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Servet Kesim	Yard.Doç.Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Davut Bayram	Öğrt.Gör.Dr.	Veteriner Fakültesi	
Halit Erkiletlioğlu	Diş Hekimi		
Halil Tekiner	Eczacı		

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Prof.Dr. Nurcan Dursun'un "Sıçanlarda doksorubisin ile in vitro oluşturulan kalp fonksiyon bozukluğunda renin-anjiyotensin sisteminin rolü" adlı araştırması incelenerek, çalışmasının yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına oy birliğiyle karar verildi.



Dosyada sunulan dökümanlar;

Tarih : 17.12.2008

Etik Kurul Başkanı : Prof.Dr. Zübeyde Gündüz

Etik Kurul Başkanı İmzası



ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Adana'nın Ceyhan ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Ceyhan'da tamamladı. Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden 2002 yılında mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Fizyoloji Anabilim dalında yüksek lisansa başladı ve 2005 yılında tamamladı. Doktora eğitimine Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Fizyoloji Anabilim dalında 2006 yılında başladı. Halen aynı anabilim dalında doktora eğitimine devam etmektedir.