

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ATP DUYARLI K⁺ KANALLARININ DOKSORUBİSİN İLE
OLUŞTURULAN KARDİYOTOKSİTEDEKİ ROLÜ**

**Tezi Hazırlayan
Elvan KUNDUZ**

**Danışman
Prof.Dr.Nurcan DURSUN**

Yüksek Lisans Tezi

**Haziran 2012
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ATP DUYARLI K⁺ KANALLARININ DOKSORUBİSİN
İLE OLUŞTURULAN KARDİYOTOKSİTEDEKİ ROLÜ**

Tezi Hazırlayan

Elvan KUNDUZ

Danışman

Prof.Dr.Nurcan DURSUN

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TSY-11-3500 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Haziran 2012

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Elvan KUNDUZ

İmza : 

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“ATP-Duyarlı K⁺ Kanallarının, Doksorubisin İle Oluşturulan Kardiyotoksitedeki Rolü” adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Elvan KUNDUZ



Danışman

Prof.Dr.Nurcan DURSUN

Anabilim Dalı Başkanı

Prof.Dr.Cem SÜER



Prof. Dr. Nurcan DURSUN danışmanlığında **Elvan KUNDUZ** tarafından hazırlanan “**ATP-Duyarlı K⁺ Kanallarının, Doksorubisin İle Oluşturulan Kardiyotoksitedeki Rolü**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Fizyoloji Anabilim Dalı**’nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

18 /06/ 2012

JÜRİ**İmza**

Danışman : Prof.Dr.Nurcan DURSUN (Fizyoloji AD)

Üye : Prof.Dr.Cem SÜER (Fizyoloji AD)

Üye : Prof.Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ (Tıbbi Biyoloji AD)

ONAY

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

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

Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, büyük bir sabır ve ilgiyle benden hiçbir emeğini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Nurcan DURSUN' a, deneylerin yapılması ve sonuçların değerlendirilmesinde çok fazla emeği geçen, araştırma görevlisi Kalender ÖZDOĞAN'a çalışmanın her aşamasında değerli fikirlerinden yararlandığımız ve sistemlerde oluşan sorunları hızlı bir şekilde düzeltmede yardımcı olan Prof. Dr. Cem SÜER'e, yüksek lisansım süresince bana gerekli bilgi ve becerileri yükleyen değerli hocalarım sayın, Prof. Dr. Sami AYDOĞAN, Prof. Dr. Nazan DOLU, Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU ve Prof. Dr. Asuman GÖLGELİ'ye, deney hayvanları bakımındaki ve uygulamalardaki yardımları için DEKAM personellerinden Biyolog A. Celil ÜNVER, değerli yüksek lisans arkadaşlarım Dilek SİVRİ, Songül BİLTEKİN, Arzu Dilek GÜLER, Sinan HAMARAT, Nesrin KAYAR ve bütün bilgi, becerisini benimle paylaşıp bana öğreten çok kıymetli ablam Dr. Eylem TAŞKIN'a, değerli abim Ali Aytaç SEYMEN'e, sorumlu hemşirem sayın Hatice UZUN'a bütün hayatım boyunca bana sonuna kadar destek ve her daim yanımda olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

ATP DUYARLI K⁺ KANALLARININ DOKSORUBİSİN İLE OLUŞTURULAN KARDİYOTOKSİTEDEKİ ROLÜ

Elvan KUNDUZ
Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Fizyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2012
Danışman: Prof. Dr. Nurcan DURSUN

ÖZET

Doksorubisin, onkolojik tedavide kullanılan bir ilaç olup doz-bağımlı yan etkisi nedeni ile kullanımı sınırlıdır. Antrasiklinlerin oluşturduğu kardiyak hücre stresi mitokondriyal bir yolla apoptozu ve nekrozisi aktive eder. Doksorubisinin indüklediği oksidatif stres mitokondriyal membran transportunu indükler, bunu da matriks şişmesi, eşleşmemiş solunum zinciri ve matriksde kalsiyum artışı takip eder. Doksorubisin ile muamele edilmiş mitokondriler, Siklosporin A (CsA) ile in-vitro şartlarda inkübe edildiğinde, CsA matriksdeki siklofilin D'ye bağlanarak mitokondriyal membran transportunu engeller, bu durum mitokondrilerde kalsiyum birikimini azaltır. Glibenklamid özellikle mitokondriyal hücre içi membranlarda bulunan bir K_{ATP} kanal blokörü olup dinlenme ve patolojik durumlarda mitokondriyal enerji üretimini azaltır. Bir Na⁺/H⁺ değiş-tokuşu yapan kanal proteinin inhibitörü olan “Cariporid” in çeşitli iskemi-reperfüzyon hayvan modellerinde kardiyoprotektif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Son çalışmalar “cariporid”in mitokondriyal membran transportu ve mitokondriyal kalsiyum yüklenmesini azalttığı ama mekanizmasının açık olmadığını ileri sürmektedir. Bu çalışmanın amacı, doksorubisinin neden olduğu myokardiyal ve mitokondriyal fonksiyon bozukluklarını engellemede mitokondriyal membran transportu, Na⁺/H⁺ değiş-tokuşu ve K_{ATP} kanal inhibisyonlarının etkili olup olmadığını karşılaştırmalı olarak test etmektir. 40 rat her bir grupta 8 olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. İntraperitoneal bolus olarak (10mg/kg vücut ağırlığı) doksorubisin verilerek akut kalp hasarı oluşturuldu. Diğer üç gruptan birisine CsA (1mg/kg vücut ağırlığı) ikincisine, Cariporide(10mg/kg vücut ağırlığı) ve üçüncüsüne Glibenklamid (10mg/kg vücut ağırlığı) verildi. Dış görünüşleri, ölüm yüzdeleri, elektrokardiyografik değişiklikler (EKG, PR, QT, R-R, ve QRS intervalleri ile P-seg), kan basıncı, aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) değerleri enjeksiyondan bir gün sonra değerlendirildi.

Akut model doksorubisin uygulama EKG parametrelerini, kan basıncı değerlerini etkilemedi fakat AST ve ALT enzim aktivitelerinde artış oldu. Doksorubisin ile birlikte Siklosporin A, Cariporide yada Glibenklamid vermek kalp fonksiyonlarını sadece doksorubisin verilenlere göre daha kötüleştirdi. Bu kötüleşme özellikle biyokimyasal parametreler olan aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz enzim aktivitelerinde daha belirgindi. Gruplar arasında istatistiksel anlamda fark bulunmadı. Bu bulgular, doksorubisinin CsA, Carp and Gli gibi kimyasallar ile birlikte koruyucu amaçla verilmesinin doksorubisinin yaptıklarını düzeltmediğinin delilidir. Doksorubisinin CsA, Carp and Gli gibi kimyasallar ile birlikte verilmesi doksorubisinin insanlarda oluşturduğu kardiyotoksik etkiden koruma için uygun değildir.

Anahtar kelimeler : Kariporid, Glibenklamid, Siklosporin, Doksorubisin, Sıçan, Kalp

**THE ROLE OF ATP-SENSITIVE K⁺ CHANNELS IN DOXORUBICIN INDUCED
CARDIOTOXICITY**

Elvan KUNDUZ

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Physiology

Master Thesis, July 2012

Supervisor: Prof. Dr. Nurcan DURSUN

ABSTRACT

The use of doxorubicin (DOX), an antibiotic used in oncological treatments, is limited by a dose-related cardiotoxicity. Cardiac cell stress by anthracyclines activates apoptosis and necrosis via a mitochondrial pathway. Doxorubicin induced oxidative stress may induce mitochondrial permeability transition (mPT), resulting in matrix swelling, uncoupling of the respiratory chain and in matrix increased calcium concentration. In- vitro pre-incubation of mitochondria with cyclosporin A (CsA), which limits mitochondrial permeability transition by binding to matrix cyclophilin D, reverses the diminished calcium loading capacity of mitochondrial isolated from doxorubicine-treated rats. Glibenclamide, which blocks K(ATP) channels on the myocardial myocytes as well as on the inner mitochondrial membrane, results in a decrease of myocardial oxygen consumption both at rest and pathological conditions. The Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) inhibitor cariporide has a cardioprotective effect in various animal models of myocardial ischemia-reperfusion. Recent studies have suggested that cariporide interacts with mitochondrial Ca²⁺ overload and the mitochondrial permeability transition (MPT); however, the precise mechanisms remain unclear. We aim to test comparatively whether inhibitions of the mitochondrial permeability transition, the KATP channel and the Na⁺/H⁺ exchanger would prevent doxorubicin-induced myocardial and mitochondrial dysfunction. Forty rats were divided into 5 groups. Acute model of DOX exposition were performed in rats with a single intraperitoneal bolus (10mg/kg body weight). Rats of the other three groups were received either CsA (1mg/kg of body weight), Cariporide(10mg/kg), or Glibenclamide (10mg/kg) with doxorubicine. The general observations, mortality, electrocardiographic (ECG) changes (PR, QT, R-R, and QRS intervals, PRseg), blood pressure, biochemical parameters such as aspartate aminotransferase (AST) alanine aminotransferase (ALT) were monitored after one day. The acute model, doxorubicin not changed EKG parameters, blood pressures but AST and ALT enzyme activities were increased by doxorubicin. Administration cyclosporine A, Cariporide and Glibenclamide with doxorubicin more disrupted heart function especially biochemical parameters such as aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase enzyme activities. We did not find any significant differences between groups. These findings suggest that co-administration of CsA, Cariporide and Gli with doxorubicin did not improve heart tolerance to doxorubicin manifested in vivo. Co-administering of CsA, Cariporide or Gli may not be useful in protecting heart from doxorubicin-induced cardiotoxicity in humans.

Key words. Cariporide, Glibenclamide, Cyclosporine, Doxorubicine, Rat, Heart

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	ix
TABLO RESİM VE ŞEKİL LİSTESİ	xii
 1.GİRİŞ VE AMAÇ	 1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. ATP DUYARLI POTASYUM KANALLARI	4
2.1.1 Yapısı	6
2.1.1.a Kir6 Alt Ünitelerinin Yapısı	8
2.1.1.b SUR Alt Ünitelerinin Yapısı	8
2.1.2.Fizyolojik Fonksiyonları	12
2.1.2.1 ATP'ye Duyarlı K ⁺ Kanallarını Regüle Eden Hücrel Mekanizmalar	14
2.1.3. Farmakolojisi	14
2.1.3.1 Kanal İnhibitörleri (5)	15
2.1.3.1.a Sülfonilüreler (5)	15
2.1.3.1.b.Diğer İnhibitörler (5)	17
2.1.3.2.Kanal Aktivatörleri (15,5)	17
2.1.4. Damar Dışı Düz Kaslardaki K _{ATP} Kanalları (5)	18
2.1.5. Patolojik Durumlarda K _{ATP} Kanallarının Rolü (5, 9)	18
2.2. KEMOTERAPİK BİR AJAN OLAN DOKSORUBİSİN VE DOKSORUBİSİNE BAĞLI GELİŞEN KARDİYOTOKSİSİTE	19
2.2.1. Tanımı, Klinik Kullanımı ve Yapısı	19
2.2.2. Antitümör etki (dna'ya bağlanma)	20
2.2.3. Yan Etkileri	22
2.2.4. Antrasiklin Kardiyotoksitesine Genel Bakış	23

	<u>Sayfa no</u>
2.2.5. Patofizyolojisi.....	22
2.3. SİKLOSİPORİN A	23
3. GERE. YÖNTEM.....	27
3.1. DENEY HAYVANLARI.....	27
3.2. DENEY GRUPLARI	28
3.3. DEĞERLENDİRMEYE ALINAN PARAMETRELER.....	28
3.3.1 Arteryal Kan Basıncı Ölçümü	28
3.3.2. EKG Kaydı.....	29
3.3.3. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü	30
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	30
4. BULGULAR	31
4.1. BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	31
4.2. EKG VERİLERİNİN DEĞERLENDİRMESİ	32
4.3. KAN BASINCININ VERİLERİNİN DEĞERLENDİRMESİ.....	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	35
6.KAYNAKLAR	40
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

ADP:Adenozin difosfat

ALT:Alanin aminotransferaz

AST:Aspartat aminotransferaz

ATP:Adenozin trifosfat

Ca⁺²:Kalsium

Carp:Cariporide

CsA:Siklosporin A

CoA:Koenzim A

CYC-D: Siklofilin D

DAG:Diaçil gliserol

DOX:Doksorubisin

EKG: Elektrokardiyografi

GLİ:Glibenklamid

H⁺: Hidrojen

IP₃:İnositol üç fosfat

İL-2:İnterlökin 2

K⁺:Potasyum

K_{ATP}:Potasyuma duyarlı ATP kanalı

K_{ca}:Kalsiyuma duyarlı potasyum kanalı

LV:Sol ventrikül

Mg⁺:Magnezyum

MPTP:Mitokondriyal membran potansiyeli transport poru

Na⁺:Sodyum

NBC: Sodyum-bikarbonat kotranspart sistemi

NFAT:Aktive T hücrelerinin nükleer faktörü

NHE1: Sodyum-hidrojen zıt transport proteini

PKA:Protein kinaz A

PKC:Protein kinaz C

PIP₂:Fosfotidil inozitol 4-5 bifosfat

ROS:Reaktif oksijen türleri

TABLO RESİM ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1:	ATP duyarlı potasyum kanallarında Kir2'lerin ve Sur'ların yapısı. ABC süper ailesi transmembran proteinleri 6 transmembran helikalden oluşmuştur ve bunlar transmembran transporter fonksiyonu yaparlar. SUR TMD1 ile, TMD1 TMD0 ile TMD0 ise Kir6 alt ünitesi ile bağlantılıdır ve aktivasyon bu şekilde sağlanır.....	10
Şekil 2:	KATP kanalında bulunan SUR ve Kir alt niteleri için önerilen membran topolojisi. (A) Gri (SUR) ve siyah (Kir) silkindirler transmmbran domainleri,beyaz silişndirler Walker B (WA ve WB)motiflerini simgelemektedir(L:Link (bağlanma) bölgesi). (B)SUR ve Kir alt ünitelerinin 4:4 stokiometrisi(3).....	12
Şekil 3:	Doksorubisin'in etki mekanizması.....	20
Şekil 4:	Doksorubisin- DNA Kompleksi.....	21
Şekil 5:	Siklosporin A'nın kimyasal yapısı	25
Şekil 6:	Siklosporin-A İmmünosüpresif ve ikincil nöronal hasarı önleyici etkisini Ca^{+2} a bağımlı bir enzim olan kalsinörini selektif bir şekilde inhibe ederek gösterir. Bunun için siklosporin'in önce, sitoplazmik bir reseptör olan siklofiline bağlanması gerekir.....	25
Resim 3.1.	Kan basıncı ve EKG kayıt alma işlemleri.....	29
Resim 3.2.	Sıçanların EKG ve Kan basıncı kaydı. QRS, PR, QT, Prseg, ve R-R parametrelerinin EKG dalgası üzerinde gösterilmesi.	30
Tablo 4.1.	Sıçanların plazma AST ve ALT enzim aktiviteleri (n=8).....	32
Tablo 4.2	.Sıçanların EKG parametre değerleri (n=8)	33
Tablo 4.3.	Sıçanların kan basıncı değerleri (n=8).....	34

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde kişilerin ölüm oranını artıran önemli nedenlerden biriside kardiovasküler hastalıklardır. Kardiovasküler hastalık oluşumunda etkin neden ise kardiyak ve endotelial oksidatif hasarlardır.

Adriyamin (ADR) yada doksorubisin (DOX) medikal onkolojide kullanılan kuvvetli antikanserojen etkisi olan antrasiklin antibiyotiklerdir. Baş ve boyun tümörleri, göğüs kanseri, kan kanseri, idrar kesesi ve testiküler kanser tedavisinde kullanılmaktadır. 450 – 500 mg/m² gibi kümülatif dozlarda yan etkisi olarak, doz bağımlı kardiyomiyopati oluşturmaktadır.

Kemoterapiye bağlı kardiyotoksisite, kemoterapötik ajanların kullanımlarının kısıtlanmasına neden olan en önemli yan etkilerden olup ilk kez 1960'lı yıllarda adriyamin tedavisi alan çocuklarda kalp yetmezliği geliştiğinin fark edilmesiyle dikkat çekmiştir. Adriyaminin kardiyotoksik yan etkisi antitümör ajan olarak kullanımını engellememiş, kardiyotoksik etkilerin azaltılma çalışmaları ön plana çıkmıştır. Adriyamine bağlı kardiyotoksisitenin engellenmesi düşüncesi deneysel çalışmaları gündeme getirmiş, deneysel çalışmalar sayesinde patofizyoloji, tanı ve önlenmesi ile ilgili olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Oluşturduğu yan etkisi nedeni ile insanlarda tedavi amaçlı kullanımı sınırlı kalmaktadır. Ama kalpte oluşturduğu iskemi ve buna bağlı geliştirdiği kardiyomiyopati özelliği hayvan ile yapılan oksidatif stres çalışmalarında metod olarak kullanılmaktadır.

Normal fizyolojik şartlarda voltaj kapılı potasyum kanalları ve içe rektifiye edici potasyum kanalları kalp kası dinlenim potansiyelini stabilize etmede ve majör repolarize edici akım sağlamada önemli rol oynarlar. K_{ATP} kanalları elektriksel aktiviteyi değiştirerek ya da durdurarak kalp yetmezliğine sebep olabilir.

Yapılan son çalışmalar, genetiği değiştirilmiş fareler kullanılarak K_{ATP} kanallarının kalbin koruyucu mekanizması ile ilgili yeni görüşler ortaya koymuştur. K_{ATP} kanal aktivitesinin kalbi korumada etkilerinin olduğu gösterilmiştir.

Myositlerdeki K_{ATP} kanalları SUR2A ve Kir6.2 alt ünitelerine sahiptir. Aslında myositlerde hem SUR1 hem de SUR 2 bulunur. Fakat SUR2 alt üniteleri daha fazladır. Kalp hem Kir6.2 SUR2A hem de Kir6.2 SUR2B rekombinasyonlarını içermesine rağmen SUR2A kanalları daha çok bulunur. Ventriküler myosit K_{ATP} kanalları pinasidil ve kromakalime duyarlıdır. Fakat diazoksida duyarlı değildir.

K_{ATP} kanalları diazoksit, sülfanilüre gibi kuvvetli ve tolbutamid gibi zayıf etkili açıcılar ile açılırlar. K_{ATP} kanal açıcıları norepinefrin salınımını inhibe etmekte, K_{ATP} kanal blokörleri ise norepinefrin salınımını arttırmaktadır.

Kir6.2 ve SUR2A fiziksel olarak etkileşim içinde fonksiyonel kanalları oluşturmak için bir arada bulunurlar. Kir6.2 ya da SUR2 olmayan farelerde K_{ATP} kanal aktivitesinin olmadığı görülmüştür. Öyleyse Kir6.2 ve SUR2A ventriküler sarkolemmadaki bu kanalların esansiyel komponentleridir.

SUR1 ve SUR2 alt ünitelerinin kanal kompleksleri benzer özellik gösterir. SUR1 mRNA'sı ve proteini pek çok canlı türünün kalbinde de belirlenmiştir. Çalışmalar SUR1'leri olmayan farelerin ventriküler myositlerinde K_{ATP} kanal aktivitesinin olmadığını göstermiştir. Ayrıca rat kalp hücresinde hipoksinin SUR2A'yı arttırdığını, İnfarkt kalp bölgelerinde SUR1 ekspresyonu ve diazoksida duyarlı akımların her ikisinin de arttığını göstermiştir. Miyokardiyal iskemide Kir6.1 mRNA ekspresyonu fazla miktarda artar. Stres durumlarında myosit hücrelerinde Kir6.1 proteinlerinin miktarı artar. Kir6.1'deki bu artış miyokardiyak iskemide ve hipoksida de görülür.

K_{ATP} kanalları birçok vazoaktif faktörün hedefidir ve aktivasyon dereceleri bu aktivatör ve inhibitörlerin net etkileri ile düzenlenir. K_{ATP} kanalları kan akımının metabolik regülasyonunda rol oynayabilirler. Hipoksi gibi kan ihtiyacının arttığı durumlarda komşu dokulardan vazodilatörlerin saliverilmesi ile ya da hipoksinin direkt etkisi ile

K_{ATP} kanalları aktive olurlar. Bazı durumlarda, oksijen seviyesi normal, ortamda vazodilatörler yok iken koroner arterlerde olduğu gibi K_{ATP} kanalları arter düz kasının membran potansiyelini düzenlenmede katkıda bulunur. K_{ATP} kanalları depolarizasyon ve kasılmaya yol açan vazokonstriktörler tarafından inhibe edilebilirler.

Sodyum- hidrojen zıt transport proteini (NHE1) kalp iskemisinde, hücre içi artan hidrojen iyonunu azaltmak için en iyi çalışan tampon sistemlerinden birisidir. Diğer bir tampon sistemi ise sodyum-bikarbonat kotransport (NBC) sistemidir. Kalp iskemisinde kardiyak hücre içinde artan hidrojen protonu, bu iki pompanın çalışması ile azaltılmaya çalışılırken, aynı anda hücre içi sodyum iyon artışına, buna bağlı kalsiyum iyon artışına neden olmakta, iskemik kalp hücrelerinin daha fazla kasılması hasarın artmasına neden olmaktadır.

Siklosporin, mitokondri membranında yer alan membran potansiyeli transport poru (MPTP)'nu inhibe ederek hücre içine Ca^{++} girişini engeller. Siklosporin-A, MPTP'nu inhibe ederek hücre içi Ca^{++} düzeyini düşürür ve hücre ölümünü engeller.

Çalışmamızın amacı, doksorubisin ile oluşturulan kalp hasarında, farklı özellikleri olan, patolojik durumlarda myosit sitoplazma ya da mitokondrisi içerisinde kalsiyum iyonunun artışını engelleyen kimyasalların tedavi edici etkilerini karşılaştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ATP DUYARLI POTASYUM KANALLARI

Kardiovasküler sistemde çok çeşitli iyon kanalları bulunmaktadır. ATP' ye duyarlı potasyum kanalları (K_{ATP}) intraselüler enerji metabolizması ile elektriksel uyarı arasında bağlantı sağlayan en önemli iyon kanallarındandır. Çeşitli doku ve hücrelerde farklı tipte K_{ATP} kanalları vardır (1). Bilinen 4 farklı K^+ kanalı bulunmaktadır:

- Yüksek-kondüktanslı kalsiyuma duyarlı K^+ (K_{Ca}) kanalı,
- Voltaja duyarlı K^+ (K_v) kanalı,
- İçer yönelik doğrultucu K^+ (K_{IR}) kanalı ve
- ATP'ye duyarlı K^+ (K_{ATP}) kanalı (2).

Kardiyak myositlerde K_{ATP} kanalları ilk olarak Akinor Noma tarafından 1983 yılında keşfedilmiştir. K_{ATP} kanallarının çeşitli organ hücreleri arasında özellikle hücresel enerji metabolizması ve elektriksel uyarılabilirlik ilişkisini sağlamada önemli bir kanal olarak belirtilmiştir. Bu kanalların ATP duyarlılığı kobay ve tavşan kalbinden izole edilen ventriküler ve atrial hücrelere 'patch klempe' tekniği uygulanarak doğrulanmıştır. İntraselüler ATP metabolik inhibisyon yaratılarak azaltıldığında hücrelerdeki K_{ATP} kanallarının açıldığı gözlenmiştir. Aynı hücrelere mikroyenjeksiyon ile ATP

verildiğinde, aksiyon potansiyeli (AP) süresi kısaltıldığında ya da K_{ATP} kanal blokeri olan glibenklamid ile hücreler muamele edildiğinde ise K_{ATP} kanallarının kısmen eski haline döndüğü gözlenmektedir (1). Eğer kalp kasında AP süresi kısalsın kalp kas hücresine girecek olan Ca^{+} miktarı az olacak, kas hücresi erken gevşeyecek, kullanılan ATP azalacak, bu da kalp kas hücresi ATP'sinin tüketimini azaltacaktır.

K_{ATP} kanallarının 1983 yılında ilk kez kalpte bulunduklarının belirlenmesinden sonra benzer K^{+} kanallarının pankreatik beta hücreleri, iskelet kası, damar ve diğer düz kas hücreleri, nöronal hücreler, endotelial hücreler ve renal epitel hücreler gibi farklı birçok dokuda bulundukları gösterilmiştir (3). Normal kalpte K_{ATP} kanalları yüksek konsantrasyondaki intrasellüler ATP nedeniyle kapalıdır. İskemi söz konusu olduğunda bu kanallar açılarak, iskemik kalp hücrelerini korumak üzere işlev görürler. Kalpteki bu protektif etkisine ilaveten pankreatik beta hücrelerden insülin salgılanmasının kontrolünde, beyin damarlarının iskemiden korunmasında, beyin sinapslarında transmitter salınımının modülasyonunda ve damar düz kas tonusunun regülasyonunda önemli rol oynamaktadırlar (4).

Özellikleri (5);

Çeşitli damarlardaki K_{ATP} kanallarının iletkenlikleri çok fazla değişkenlik gösterir, yine de kanallar iletkenliklerine göre iki gruba ayrılabilirler:

- Düşük /orta iletkenlik gösteren kanallar ve
- Yüksek iletkenlik gösteren kanallar.

Diğer dokulardaki K_{ATP} kanallarının iletkenlikleri genellikle bu iki grubun ortasına denk düşmektedir. Sıçan aortasında da yüksek kondüktanslı K_{ATP} kanalları bulunmaktadır.

Şu an için düz kasta K_{ATP} kanallarının hücre kinetiklerine ait detaylı bilgi olmamasına rağmen iskelet kası ve kalpte yapılan çalışmalarda bu kanalların kinetik davranışlarının kompleks olduğu gözlemlenmiştir.

K_{ATP} kanalları intrasellüler ATP tarafından inhibe edilmelerine bağlı olarak ATP'ye duyarlı K^{+} kanalı olarak isimlendirilseler de sitoplazmadaki ATP düzeyleri genellikle çok iyi ayarlanır ve miktarı milimolar düzeylerde sabit tutulur; ancak şiddetli metabolik bozukluklarda bu kanal aktivitesi azalabilir. Bu bilgiler K_{ATP} kanallarının ATP'ye ilave olarak başka faktörler tarafından birlikte regülasyonu fikrini gündeme getirmiştir. K_{ATP} kanal aktivitesini değiştiren intrasellüler metabolitler arasında adenosin difosfat (ADP)

ve diğer nükleotid difosfatlar bulunmaktadır. ADP ve guanin nükleotidleri K_{ATP} kanalı üzerinde yüksek konsantrasyonlarda bloke edici, düşük konsantrasyonlarda ise aktive edici etkiye sahiptirler. Guanin nükleotidlerinin kanal üzerindeki aktivatör etkisinin SUR alt ünitesi üzerinden, blokör etkisinin ise Kir alt ünitesi üzerinden geliştiği düşünülmektedir (6).

K_{ATP} kanalı intraselüler ATP miktarı düşük iken açık, ATP miktarı fazla iken kapalıdır. K_{ATP} kanalının kapanması hücreyi depolarize eder ya da pankreasın beta hücrelerinde olduğu gibi hücre içerisine Ca^{+} girişini arttırarak insülin hormonunun ekzositozunu arttırır. Pankreasın beta hücrelerinde kandaki artan glikoz hücrelere Glut2 ile girer ve beta hücrelerine giren glikoz burada ATP üretiminde kullanılır. Artan ATP miktarı membranda bulunan K_{ATP} kanallarını kapatır, hücreyi depolarize eder. Depolarize olan pankreatik beta hücrelerine dışarıdan Ca^{+} girişi artar ve içeriye giren Ca^{+} da insülinin ekzositozunu kolaylaştırır. Diyabet hastalarına sülfanilüre ilacı verilerek insülin salgısının arttırılması bu şekildedir. Genelde hipoglisemik dediğimiz kandaki glikoz seviyesinin azaldığı durumlarda ya da oksijenin hücrelere az taşındığı durumlarda hücrelerdeki ATP miktarı çok düşmektedir. Buna bağlı olarak K_{ATP} kanalları açılır, pankreasda insulin salgısı azalırken, diğer hücrelerde sikemi sonrası hücresel hasar oluşturur.

Damar düz kaslarında oksijen azlığı olduğunda anaerobik solunum ve buna bağlı laktik asit birikimi olur. Yani ATP azlığı ya da eksikliği K_{ATP} kanalını açar, düz kas hiperpolarize olur ve sonuçta vazodilatasyon gelişir. Damardaki bu olay beyin ya da kalp iskemisi gibi patolojik durumlarda dokuya gelen kan akımını vazodilatasyon ile arttırıp hasarı azaltır.

Normal şartlarda kalp kas membranında K_{ATP} kanalları koruyucu rodedir. Metabolik stres periyotları esnasında K_{ATP} kanalları aktive olur. İskemi, anoksi, metabolik inhibisyon K_{ATP} kanallarını açar ve AP süresini kısaltır. Dolayısıyla kalp kasında Ca^{+} birikimi azalır ve kalp kası kontraksiyonu zayıflar.

2.1.1 Yapısı

K_{ATP} kanalları heteroktemerik komplekslerdir. ATP'yi bağlayan ve poru oluşturan bir Kir alt ünitesi bulunur. Kir ; Kir 6.1 ve Kir 6.2 olarak iki farklı yapıda bulunur. Bunları kodlayan iki gen vardır ki KCNJ8 (Kir6.1) ve KCNJ 11 (Kir6.2) 'yi ifade eder (Şekil.1).

SUR genlerine baktığımız zaman ise ABCC8 (SUR1)'i, ABCC9 ise (SUR2) alt ünitelerini kodlamaktadır. Dolayısıyla iki tane SUR2 alt ünitesi bulunur ki bunlar genel olarak düzenleyici alt ünitelerdir. Biyokimya çalışmaları SUR2A ve SUR2B alt varyantlarının olduğunu göstermiştir.

Fonksiyonel bir K_{ATP} kanalı oluşumu için her iki alt ünitenin(SUR ve Kir) varlığına da ihtiyaç duyulmaktadır. Diğer içe yönelik doğrultucu kanalların aksine Kir6.2 tek başına kanal oluşturmaz. Bunun nedeni tam olarak bilinmese de SUR ünitesinin, Kir6.2'nin hücre içi transport ve dağılımı için gerekli olduğu düşünülmektedir.

Dokulara göre K_{ATP} kanallarını oluşturan alt üniteler farklılık göstermektedir. Düz kasta K_{ATP} kanallarını oluşturan alt üniteler muhtemelen **Kir6.2 ve SUR2B'dir** (7).

Kalpde en fazla **Kir 6.2 ve SUR 2A** formu bulunmasına karşı yapılan çalışmalar Kir 6.1 'in insan, tavuk, sıçan ve farede bulunduğunu göstermektedir. Kir 6.1 atrium, ventrikül ve damar endotelinde bulunduğu bildirilmekte o nedenle K_{ATP} kanalları kalp dokusunda farklı fonksiyon ve farmakolojik özellikler içermektedir. SUR1 ADP'ye SUR2 'den daha duyarlıdır. Bu yüzden kanda glikoz azalması SUR1'i daha çok etkiler. Pankreatik beta hücreleri ATP'ye duyarlı iken ventriküller ise iskemik hipoksiye daha duyarlıdır. SUR1, nörotransmitter salınımını da regüle etmektedir. İskemide SUR1 bağlantılı K_{ATP} kanalları, norepinefrin, asetilkolin gibi kalpten lokal nörotransmitter salınımını etkilemektedir. Kir6.1 ve SUR2 olmayan farelerde hipertansiyon ve koroner vazospazm belirlenmiş sadece SUR1 olmayan farelerde (Kir mevcut) koroner arter bağlanması ile oluşturulan iskemi reperfüzyonda, daha az infarkt alan daha az fibrozis ve daha az diğer iskemi reperfüzyon bulguları elde edilmiş. SUR1'in bu etkisinin nasıl geliştiği bilinmemekle birlikte sadece Kir6.2 alt ünitesinin genetik delesyonunun bu etkileri göstermediği görülmüştür (1).

Çalışmalar K_{ATP} kanalındaki por oluşturuvcu ünitenin Kir6.2 olduğunu göstermektedir. Sulfonilüre reseptörü farmakolojik ajanlar için hedeftir (12,13). SUR1 ve SUR2 reseptörleri süfonilürelere değişik affinite gösterirler. K_{ATP} kanalları sadece sarkolemmada değil mitokondri membranında da bulunmakta ama moleküler yapısı henüz tam olarak açıklanamamıştır.

2.1.1.a Kir6 Alt Ünitelerinin Yapısı

Kir'lerin 2 alt ünitesi de (Kir6.1 ve Kir6.2) içe doğru rektifiye edici kanal proteinlerinden oluşur. Kir'ler membranda 2 tane helikal domainlere sahiptir (TM1 ve TM2). Sitoplazmik kısmında NH_2 ucu ve karboksil (COOH) ucu bulunur. Membran boyunca boydan boya uzanan heliksler Kir6.1 ve Kir6.2'nin porlarını oluştururlar.

K_{ATP} kanallarının S5, S6 membran segmentlerine benzer bir şekilde Kir6.1 ve Kir6.2 de (transmembran heliksleri) poru oluştururlar. Kir6.1 ve Kir6.2'nin her ikisi de genel olarak çok benzer bir por yapısına sahip olmakla beraber bu iki alt ünite kanal iletkenliği açısından birbirinden farklılık gösterir.

Kir6 alt ünitesine ATP bağlanması (intraselüler kısmına) K_{ATP} kanallarının inhibisyonuna neden olur. K_{ATP} kanalları (özellikle Kir6.2 ve SUR1 ya da SUR2A iktiva edenler) genelde ATP varlığında kapalıdır.

Başlangıçta Kir6.1'lerin ATP'ye duyarlı olmadığı belirtilse de aslında Kir6.2'lerle kıyaslandığında bunlarında ATP inhibisyonlarına sahip olduğu gösterilmiştir. Hem Kir6.2'ler hem de Kir6.1'ler ATP varlığında inhibe olurlar. Aynı zamanda Mg^{+} ve ADP yokluğu da K_{ATP} kanallarının aktivasyonunu inhibe eder (14).

2.1.1.b SUR Alt Ünitelerinin Yapısı

SUR alt ünitelerinin NBF1 ve NBF2 dediğimiz kısımları bulunmaktadır. SUR proteinleri ABC genleri tarafından kodlanırlar. Bu nedenle ABC proteinleri olarak da adlandırılabilirler. ABC proteinlerinin sitoplazmik kısmında NBF domainleri vardır. Bu domainler de Mg^{+} ve adenosin nükleotidleri için bağlanma alanlarına sahiptir ve bu bölgelere bağlandığı zaman K_{ATP} kanallarının fonksiyonlarını uyarırlar.

ABC süper ailesi TMD1 ve TMD2 olarak 2 adet transmembran domaine sahiptir. Domainlerin her biri 6 tane transmembrandan oluşur ve bunlar transmembran transport görevi yapan tipik taşıyıcılardır. Fakat SUR1 ve SUR2 dediğimiz yapılar çok farklıdır. Transport fonksiyonu yapmazlar. Bu alt üniteler daha çok; K_{ATP} fonksiyonlarını uyarıcıdır ve NH_2 terminallarına sahiptir. NH_2 terminali de TMD0'a bağlıdır. Bu aynı zamanda TMD1'e bir stoplazmik bağlantı ile bağlıdır. NH_2 ucu transmembran domaine sahip ve özellikle TMD1 ve TMD0'a bağlıdır bunlar NH_2 ve Kir 6.2'nin arasında bağlantı sağlarlar.

ABC süper ailesi transmembran proteinleri 6 transmembran helikalden oluşmuştur ve bunlar transmembran transporter fonksiyonu yaparlar. SUR 'lar K_{ATP} kanallarının aktivitelerini düzenlerler. SUR 'un aktive olması Kir6' yı aktive eder ki bu da TMD1 ile bağlantılıdır. SUR TMD1 ile, TMD1 TMD0 ile TMD0 ise Kir6 alt ünitesi ile bağlantılıdır ve aktivasyon bu şekilde sağlanır.

Asıl porun olduğu ve potasyumun geçtiği yer Kir 6 alt üniteleridir. Kir'in aktivasyonunu düzenleyen ise SUR alt üniteleridir. SUR'unda transmembran kısımları birbiri ile bağlayıcılarla bağlıdır. Bu bağlayıcıların birine L0 birine L1 gibi isimler verilmiştir.

SUR'un en son L0 bağlayıcı bölgesi TMD0 domaininde olup özellikle Kir 6.2'nin NH_2 ucu ile de bağlantıdadır. Böylelikle SUR tarafından Kir 6.2 dediğimiz kısımların regülasyonu sağlanmış olur. Yapılan çalışmalar regülasyonda SUR'un önemli olduğunu göstermiştir.

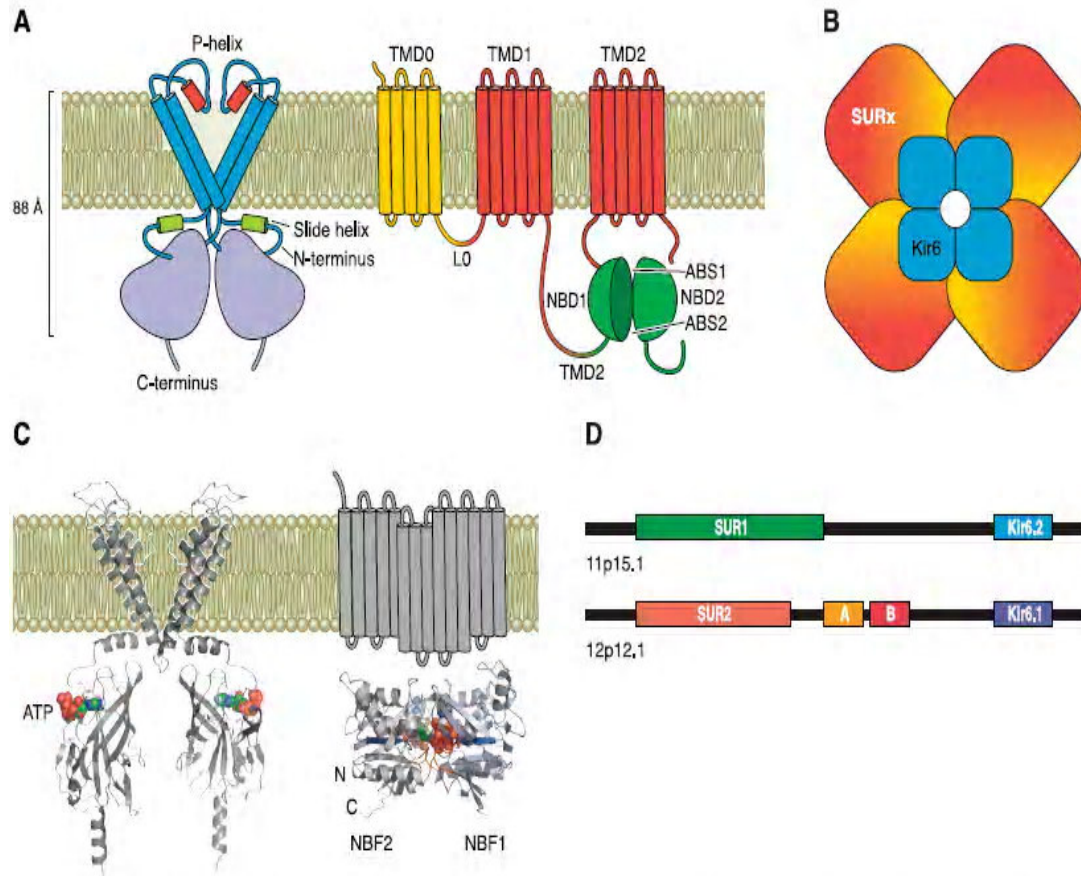
Mg^{+} yokluğu ve nükleotidler K_{ATP} kanal aktivitesinde inhibisyona sahip olurlar ki bunu genelde SUR2 alt üniteleriyle etkileşerek yaparlar. SUR alt ünitelerini oluşturan proteinler ABC protein genleridir. SUR diye bahsettiğimiz bu NBF1 ve NBF2 denilen proteinler birer sitoplazmik nükleotid bağlanma katlanmalarıdır.

NBF1 ve NBF2 (Walker A ve Walker B) nükleotid bağlayıcı motiflerden oluşmuşlardır (Şekil 1). İntraselüler kısımdaki NBF1 ve NBF2 aynı zamanda Mg^{+} ve Adenozin nükleotidleri de bağlar. K_{ATP} kanallarının uyarılmasında görevlidir.

K_{ATP} kanalının spesifik özelliği vardır ki bu sadece ATP varlığında açılmasıdır. Spesifik özellik, nükleotidlerin regülasyonu ile saptanır. Nükleotid regülasyonu, diğer regülatör ligandlarla (örneğin Kir 6 alt ünitesi ya da SUR alt ünitesi ya da her ikisinde de) direkt olarak etkileşime girerek K_{ATP} kanallarının aktivitesini modüle edebilirler. Örneğin membran fosfolipidleri, fosfoinozitidler kısmen fosfotidil inozitol 4-5 bifosfat, Kir6 alt ünitelerine kuvvetli bir şekilde bağlanarak, ATP kanal aktivitesini uyarabilirler.

Yapılan çalışmalarda görülmektedir ki fosfotidil inozitol 4-5 bifosfatın (PIP_2) 'patch' dediğimiz yöntemle membrandan hücrenin içine verilmesi ile K_{ATP} kanal aktivitesini artırdığı gözlenmiştir. Eğer kanal çalışmaz hale getirilirse yani bloklanırsa yine 'patch tekniği' ile PIP_2 verildiğinde ise tekrar çalışır hale gelmesini sağlar.

Yukarıdaki çalışmaya zıt olarak ‘patch tekniği’ ile fosfolipaz-c enjekte edilirse PIP_2 ‘yi hidrolize ettiği için kanal aktivitesi azalır. Fosfolipaz-c; fosfotidil inozitol 4-5 bifosfatı parçalayan ve miktarını azaltan bir enzimdir. PIP_2 ‘yi azaltan herhangi bir şey kanal aktivitesini de azaltmaktadır. Fosfolipaz-c ‘nin reseptör aracılı aktivasyonu yine K_{ATP} ‘nin kanal aktivitesini modüle eder. Yalnız bir PIP_2 aktivasyonu ile ATP’ye duyarlı K^+ kanalları arasında negatif bir eşleşme vardır. PIP_2 arttığında kanalın açılması artarken K_{ATP} kanalının ATP duyarlılığı azalır. Fizyolojik olarak bu demektir ki ATP duyarlılığı parametre değildir. Yani kanalın aktivitesini sadece ATP düzenler demek değildir. Membran kombinasyonundaki değişiklikler de dinamik olarak K_{ATP} kanalları üzerinde değişiklik oluşturabilir anlamına gelmektedir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir: Kir6.2 üzerindeki ATP bağlanma alanı ile bunların aktivasyonları çakışıyor olabilir yani PIP_2 bağlandığı zaman ATP bağlanamıyor olabilir. Bu yüzden ikisi arasında bir yarışma olduğu düşünülmektedir.



Şekil 1: ATP duyarlı potasyum kanallarında Kir2’lerin ve Sur’ların yapısı. ABC süper ailesi transmembran proteinleri 6 transmembran helikalden oluşmuştur ve bunlar transmembran transporter fonksiyonu yaparlar. SUR TMD1 ile, TMD1 TMD0 ile TMD0 ise Kir6 alt ünitesi ile bağlantılıdır ve aktivasyon bu şekilde sağlanır.

PIP₂ ile bu kanalların aktivasyonunda fosfolipidin baş ve kuyruğunun her ikisinin de olması gerekir. PIP₂ hidrolize olursa IP₃ ve DAG oluşur ki bunlar kanalın aktivasyonunda etkili olmazlar. Başın negatif yüklü olması asıl kritik noktadır çünkü fosfotidilserin (bu negatif yükü sağlar) asıl K_{ATP} kanalını aktive eden kısımdır.

Uzun zincirli açıl CoA molekülleri yağ asitlerinin beta oksidasyonunda, K_{ATP} kanal aktivitesini modüle etmede ve PIP₂ aktivasyonunda görevlidirler. Mesela PIP₂ aktivasyonuna aracılık eden Kir6.2 üzerindeki rezidüeler uzun zincirli açıl CoA'nın ilave etkisi için majör alandır. Özellikle ventriküler myositlerde açıl CoA'nın ATP sentezlerine etkisi pankreatik beta hücrelerine kıyasla çok daha büyüktür. Asetil CoA'nın aktivasyon derecesi kardiyak ventriküler kanallardaki zincir uzunluğu ile artar. Halbuki pankreatik beta hücrelerinde durum böyle değildir.

K_{ATP} kanallarının aktivitesi için özellikle patolojik şartlarda lipid modülasyonu ve PIP₂ önemlidir. Patolojik şartlarda bu lipidlerdeki değişiklikler önemli regülatör olabilir. Kardiyak ventriküllerdeki K_{ATP} kanal predominantı SUR2A bağlantılı iken pankreatik K_{ATP} kanal predominantları ise SUR1 ile bağlantılıdır. Farklı etki oluşturmalarının nedeni farklı SUR bağlantılarının olmasıdır.

Hüce içi asidifikasyon (ki bu aneorobik metabolizmanın neden olduğu durumdur) K_{ATP} kanal aktivitesini arttıran diğer bir durumdur.

SUR2 alt ünitelerinde recombinant fotogenezis çalışmaları; pH' a duyarlı olan kısımların özellikle Kir6.2 alt ünitesindeki 2 aminoasit olduğunu göstermiştir (Thr-71 ve His-175). Ancak pH'ın ATP bağımlı kapıları nasıl düzenlediği henüz tam olarak açıklanamamıştır.

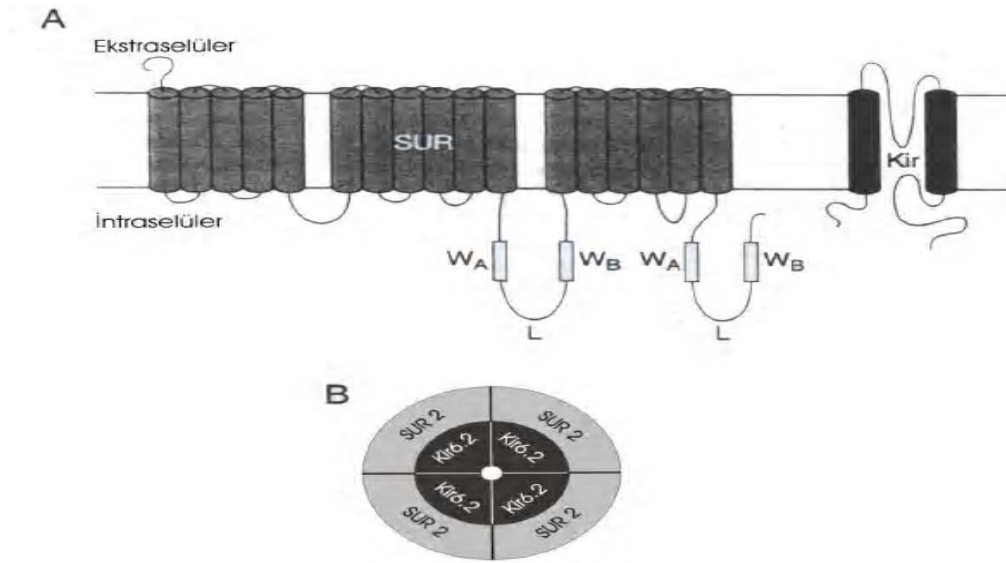
Düz kaslarda aynı zamanda PKA da önemli bir regülatördür. Düz kas ve pankreatik hücrelerde PKA' lar kanal fosforilasyonunda önemli rol oynarlar fakat iskelet kasında bu durum tam olarak açık değildir. Kir6 alt üniteleri PKA fosforilasyon alanına sahiptir. Bu alanlar kanalın fosforilasyonunu artırarak onları açarlar. Mesela insandaki SUR1, PKA tarafından fosforile edilir. SUR2 fosforile edildiği zaman ise K_{ATP} kanal sayısı artırılarak ya da azaltılarak kanal aktivitesi düzenlenir. Yalnız ratlardaki SUR1' ler ile PKA etkileşiminin nasıl olduğu belli değildir. İskelet kasında PKA' nın Kir6.2 ve SUR2A üzerine etkisi çalışılmış bir konu değildir. Bu yüzden iskelet kasında SUR2A 'yı PKA' nın fosforile edip etmediği henüz bilinmemektedir.

PKC ventriküler K_{ATP} kanalları üzerine etkilidir. PKC' ler ventriküler K_{ATP} kanallarında karmaşık bir etkiye sahiptir. Kir6.2 alt ünitelerinde T180 rezidüsü hayli fazladır. Düşük ATP konsantrasyonlarında PKC' ler Kir6.2 alt ünitelerindeki T180 rezidüelerinin fosforilasyonunu inhibe ederler. Bu şekilde K_{ATP} kanal inhibisyonu oluşturulur.

Ventriküler ATP'nin iki tür etkisi vardır:

- 1)Düşük molar ATP konsantrasyonlarında K_{ATP} kanal aktivitesini inhibe edici
- 2)Yüksek molar ATP konsantrasyonların da ise K_{ATP} kanalını aktive edici etkisi vardır.

Yüksek konsantrasyonlardaki aktive edici etkisini özellikle Kir6.2 alt ünitelerindeki T180 rezidüelerini fosforile ederek yaparlar. Kronik PKC aktivasyonunun dinamik bğımlı bir mekanizma ile membran yüzeyindeki Kir6.2'nin geri alımına duyarlıdır.Özellikle KIR6.1 ve SUR2B' yi içeren kanallar akut PKC muamelesi ile inhibe edilmişlerdir. Kir6.1 rezüdieleri PKC ile fosforile olurken, Kir6.2 ve SUR2B kanal aktivitelerinin PKC' den etkilenmediği bildirilmiştir.



Şekil 2: KATP kanalında bulunan SUR ve Kir alt niteleri için önerilen membran topolojisi. (A) Gri (SUR) ve siyah (Kir) silindirler transmembran domainleri, beyaz silindirler Walker A (WA ve WB) motiflerini simgelemektedir (L: Link (bağlanma) bölgesi). (B) SUR ve Kir alt ünitelerinin 4:4 stokiometrisi(3)

2.1.2. Fizyolojik Fonksiyonları

Normal fizyolojik şartlarda voltaj kapılı potasyum kanalları ve içe rektifiye edici potasyum kanalları kalp kası dinlenim potansiyelini stabilize etmede ve majör

repolarize edici akım sağlamada önemli rol oynarlar. K_{ATP} kanalları elektriksel aktiviteyi değiştirerek ya da durdurarak kalp yetmezliğine sebep olabilir.

Yapılan son çalışmalar, genetiği değiştirilmiş fareler kullanılarak K_{ATP} kanallarının kalbin koruyucu mekanizması ile ilgili yeni görüşler ortaya koymuştur. K_{ATP} kanal aktivitesinin kalbi korumada etkilerinin olduğu gösterilmiştir.

Myositlerdeki K_{ATP} kanalları SUR2A ve Kir6.2 alt ünitelerine sahiptir. Aslında myositlerde hem SUR1 hem de SUR 2 bulunur. Fakat SUR2 alt üniteleri daha fazladır. Kalp hem Kir6.2 SUR2A hem de Kir6.2 SUR2B rekombinasyonlarını içermesine rağmen SUR2A içeren kanallar daha çok bulunur. Ventriküler myosit K_{ATP} kanalları pinasidil ve kromakalime duyarlıdır. Fakat diazoksida duyarlı değildir.

K_{ATP} kanalları diazoksit, sülfanilüre gibi kuvvetli ve tolbutamid gibi zayıf etkili açıcılar ile açılırlar. K_{ATP} kanal açıcıları norepinefrin salınımını inhibe etmekte, K_{ATP} kanal blokörleri ise norepinefrin salınımını arttırmaktadır (1).

Kir6.2 ve SUR2A fiziksel olarak etkileşim içinde fonksiyonel kanalları oluşturmak için bir arada bulunurlar. Kir6.2 ya da SUR2 olmayan farelerde K_{ATP} kanal aktivitesinin olmadığı görülmüştür. Öyleyse Kir6.2 ve SUR2A ventriküler sarkolemmadaki bu kanalların esansiyel komponentleridir.

SUR1 ve SUR2 alt ünitelerinin kanal kompleksleri benzer özellik gösterir. SUR1 mRNA'sı ve proteini pek çok canlı türünün kalbinde de belirlenmiştir. Çalışmalar SUR1'leri olmayan farelerin ventriküler myositlerinde K_{ATP} kanal aktivitesinin olmadığını göstermiştir. Ayrıca rat kalp hücresinde hipoksinin; SUR2A'yı arttırdığını, İnfarkt kalp bölgelerinde SUR1 ekspresyonu ve diazoksida duyarlı akımların her ikisinin de arttığını göstermiştir. Miyokardiyal iskemide Kir6.1 mRNA ekspresyonu fazla miktarda artar. Stres durumlarında myosit hücrelerinde Kir6.1 proteinlerinin miktarı artar. Kir6.1'deki bu artış miyokardiyal iskemide ve hipoksida de görülür.

K_{ATP} kanalları birçok vazoaktif faktörün hedefidir ve aktivasyon dereceleri bu aktivatör ve inhibitörlerin net etkileri ile düzenlenir. K_{ATP} kanalları kan akımının metabolik regülasyonunda rol oynayabilirler. Hipoksi gibi kan ihtiyacının arttığı durumlarda komşu dokulardan vazodilatörlerin salınması ile ya da hipoksinin direkt etkisi ile K_{ATP} kanalları aktive olurlar. Bazı durumlarda, oksijen seviyesi normal, ortamda vazodilatörler yok iken koroner arterlerde olduğu gibi K_{ATP} kanalları arter düz kasının

membran potansiyelini düzenlenmede katkıda bulunur. K_{ATP} kanalları depolarizasyon ve kasılmaya yol açan vazokonstriktörler tarafından inhibe edilebilirler (5).

2.1.2.1 ATP'ye Duyarlı K^+ Kanallarını Regüle Eden Hücresel Mekanizmalar

Hücrenin metabolik faaliyetleri sonucunda, ATP'nin azalması, ADP ve diğer nükleotid difosfatların konsantrasyonunun artması gibi intraselüler metabolit miktarında meydana gelen değişiklikler K_{ATP} kanal aktivitesini arttırmaktadır. Hücre metabolizmasının metabolik zehirlerle inhibisyonu, substrat azalması veya hipoksi K_{ATP} kanal akımlarını arttırır.

Norepinefrin, histamin, serotonin, nöropeptidler, endotelin, vazopressin ve anjiotensin gibi PKC'yi aktive eden vazokonstriktörler, K_{ATP} kanal akımlarını inhibe ederler (5).

Membran fosfolipidleri olan PIP_2 , uzun zincirli açıl CoA'lar, protein kinazlar (PKA,PKC), pH, İntraselüler nükleotidler; K_{ATP} kanallarının metabolik duyarlılık gösterdiği komponentlerdir.

Çeşitli çalışmalar göstermiştir ki; metabolik inhibisyonda yani ATP yokluğunda kanallar açılır ya da sitozol içine ATP enjeksiyonu kanalı kapatır. Sonuç olarak ATP'deki düşme kanalı açmak için bir kontrüktör gibi düzenleyici görev yapar. Ancak ATP hiçbir zaman düşmez çünkü ATP yaşayan bir hücrede milimolar seviyede de olsa muhakkak vardır.

Fizyolojik olarak Mg^{++} 'a bağlı nükleotid difosfatın aktive edici etkisi önemlidir. Çünkü ATP'deki düşme ve bununla beraber ADP'deki artışın her ikisi de birlikte major regülatör parametrelerdir. Sadece ATP' nin düşmesi değil ADP 'nin artması ya da Mg^{++} un nükleotid difosfata bağlanması da K_{ATP} kanal regülasyonunda rol oynar.

2.1.3. Farmakolojisi

SUR izoformları sülfanilüre, glibenklamid tarafından inhibe edilirler. Bu durum, sülfanilürenin nükleotid konsantrasyonları üzerine olan inhibisyon etkisi ile gerçekleşir. Metabolik denge üzerine SUR1' ler SUR2' lere göre sülfanilürelere daha duyarlıdırlar. SUR1' in TMD2 yapısında tolbutamid için de bağlanma alanı vardır.

Diazoksit, hem SUR1 in hemde SUR2' nin efektif bir aktivatörüdür. Pek çok K_{ATP} kanal açıcısı vardır (Pinasidil, kromakalim ve diğerleri). Örneğin pinasidil de

kromakalim de SUR2A ve SUR2B'nin efektif aktivatörleridir ama SUR1'in aktivatörü değildir.

K_{ATP} kanalları terapötik bir hedeftirler ve hem aktivatör hem de inhibitörleri klinikte kullanılmaktadır. Pankreas beta hücrelerindeki K_{ATP} kanallarının sülfonilüreler tarafından inhibisyonu insülin salgısının artışı ile sonuçlanır. Bu etkileri sülfonilürelerin insüline bağlı olmayan diyabetteki kullanımlarının altında yatan mekanizmadır (5). Sülfonilüre alan diyabet hastalarında kalbin somatik uyarıya cevabında aritmi gibi istenmeyen cevaplar gelişebilmektedir (1). Sentetik K_{ATP} kanal açıcıları membran hiperpolarizasyonu oluşturarak düz kası gevşetirler. Bu ilaçların astım, hipertansiyon, angina ve mesanenin motilite bozukluklarında önemli değere sahip olabilecekleri düşünülmektedir. Kalpteki K_{ATP} kanallarının aktivasyonu iskemik ön koşullamada rol oynar (5). Kardiyak doku kısa iskemik periyodlara maruz kaldığında oluşacak iskemik hasara karşı daha dirençli olmaktadır. Bu etkiyi taklit eden kalp K_{ATP} kanal aktivatörlerinin geliştirilmesi terapötik kullanıma olanak sağlayabilecektir (8). Çeşitli K_{ATP} kanal aktivatör ve blokörlerinin terapötik indikasyonları Tablo 2.1'de verilmektedir (9). Sonuç olarak sülfonilüre kardiyoprotektif olabilir, K_{ATP} kanalları ; proeksite, güçlü proaritmik olabilir.(1)

2.1.3.1 Kanal İnhibitörleri (5)

2.1.3.1.a Sülfonilüreler (5)

Sülfonilüreler klinikte insüline bağımlı olmayan diyabetin tedavisinde kullanılırlar. Bu bileşikler artmış ekstraselüler glukozun pankreas beta hücresindeki etkisini taklit ederler.

Membran depolarizasyonuna neden olup aksiyon potansiyelini tetiklerler ve hücreye Ca^{+2} girişi sonucunda insülin sekresyonuna neden olurlar. Beta hücrelerindeki K_{ATP} kanalları ile SUR arasında bir bağlantı olduğu bilinmektedir ve sülfonilürelerin hipoglisemik etkilerinin altında yatan neden bu kanalın inhibisyonudur.

SUR ile K_{ATP} kanalları arasındaki ilişki

Sülfonilüre grubu ilaçlar ile K_{ATP} kanalları arasındaki ilişkiyi gösteren ilk gözlem tolbutamidin pankreas beta hücrelerindeki K_{ATP} kanallarını inhibe etmesidir (10).

Tolbutamid üretilen birinci jenerasyon sülfonilüre bileşikler arasındadır ve glibenklamid gibi ikinci jenerasyon sülfonilüreler ile karşılaştırıldığında daha az etkili bir hipoglisemik ajandır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Çeşitli K_{ATP} Kanallarının aktivatör ve blokörlerinin kullanıldıkları indikasyonlar

	Terapötik indikasyon(lar)	Bileşikler
K_{ATP} kanal aktivatörleri	Hipertansiyon, iskemik kalp hastalığı, kalp hastalığı	Pinasidil, Diazoksit, Nikorandil
	Astım	Aprikalim, Bimakalim, Kromakalim, Celikalim, Emakalim, NIP 121, RO 316930, RWJ 29009, SDZ PCO 400, Rimakalim, Simakalim, YM-099, YM-934
	Myokard iskemisi	BMS 180448, U 89232
	Alopesi	P1075, minoksidil
	Üriner inkontinens	ZM244085, ZD6169, WAY151616, ZD0947
	Erektile disfonksiyon	PNU83757
K_{ATP} kanal blokörleri	Ventriküler aritmi, kalp hastalığı, kardiyak arrest	HMR1098, HMR1883
	Tip II diyabet	Tolbutamid, Klorpropamid, Glibenklamid, Glipizid, Nategliniid, Repagliniid

Kas hücrelerindeki sülfonilüre reseptörleri ve K_{ATP} kanalları

Sülfonilüreler, beta hücrelerindeki gibi daha yüksek konsantrasyonlarda kalp, iskelet ve düz kastaki K_{ATP} kanallarını da inhibe ederler. Sülfonilürelerin kalp ve damardaki K_{ATP} kanallarını inhibe etmesi klinik açıdan önemlidir, çünkü bazı çalışmalarda diyabetik hastaların sülfonilürelerle tedavileri artmış kardiyovasküler mortalite ile ilişkilendirilmiştir.

Glibenklamid düz kasta, K^+ kanal açıcıları, vazodilatörler, hipoksi, nükleotid difosfatlar ve ATP azalmasına bağlı K_{ATP} akımlarını inhibe eder. Kanalin sülfonilürelere karşı duyarlılığını nükleotid difosfatların arttırdığı, kromakalimin ise azalttığı düşünülmektedir. Nükleotid difosfatlar gibi çeşitli hücrel kofaktörler sülfonilürelerin

bağlanma ve elektrofizyolojik etkilerini modifiye edebilir. ADP'nin tolbutamidin inhibisyon etkisini potansiyalize edici yöndeki etkisi magnezyuma bağımlıdır. Magnezyum iyonuna ilaç ile reseptör arasındaki ilişkiden çok, SUR ile K_{ATP} kanalı arasındaki ilişki için ihtiyaç duyulmakta olduğu söylenilebilir. Kalp hücrelerindeki metabolik inhibisyon süresince K_{ATP} kanalları, sülfonilürelelere karşı duyarlılıklarını yitirirler. Bu nedenle, hipoksi ve kardiyak iskemi gibi K_{ATP} kanallarının aktivasyonu sonucu ortaya çıkan durumlarda sülfonilüreler hücresel K^+ efluksunu parsiyel olarak inhibe ederler. Glibenklamidin metabolik inhibisyon esnasında kalpteki K_{ATP} kanallarını inhibe edememesinin nedeni intraselüler ADP miktarındaki artıştır.

2.1.3.1.b.Diğer İnhibitörler (5)

Ekstraselüler baryum damar dışı düz kaslardaki K_{ATP} kanallarını bloke eder. Tetraetilamonyumklorid (TEA) iyonları düz kas ve iskelet kasında K_{ATP} kanallarının zayıf bir inhibitörüdür. 5-hidroksidekanoat düz kasta denenmemiş olmasına rağmen K_{ATP} kanallarının selektif bir inhibitörü olabilir. Fentolamin gibi imidazolaminler beta hücreleri ve düz kasta K_{ATP} kanal akımlarını inhibe ederler. Rubidiyum, 4-aminopiridin, penisiklidin ve kinin de inhibitörler arasındadır.

2.1.3.2.Kanal Aktivatörleri (15,5)

Sentetik K^+ kanal açıcıları vasküler K^+ kanallarını aktive ederek membran hiperpolarizasyonuna neden olurlar. Meydana gelen membran hiperpolarizasyonu voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarının kapanmasına ve dolayısıyla gevşemeye neden olur. Çeşitli değişik yapısal sınıfa dahil bir dizi sentetik K^+ kanal açıcısı geliştirilmiştir. Kromakalim, kromakalimin aktif enantiyomeri (eşdeğer özellikli) levkromakalim, nikorandil, pinasidil, minoksidil ve diazoksid bu kanal açıcılarına dahil ajanlardır. Kanal açıcıları oldukça farklı yapıya sahip olmalarına rağmen, ortak bir etki bölgesine sahip olduklarını düşündüren benzer farmakolojiye sahiptirler ve K_{ATP} kanalını aktive ederek etkilerini gösterirler. K_{ATP} kanalları endotel hücrelerinde de bulunmaktadır. Endotel kaynaklı K_{ATP} kanal akımlarının aktive olması endotel kaynaklı gevşetici faktörlerin salınmasına ve buna bağlı gevşemesine neden olur.

2.1.4. Damar Dışı Düz Kaslardaki K_{ATP} Kanalları (5)

K_{ATP} kanalları solunum yolu, mide, özefagus, barsak, mesane, safra kesesi, üreter ve uterusu da içeren birçok damar dışı düz kasta bulunur. K_{ATP} kanalları damar dışı düz kasta da kasılmaya yol açan transmitterler tarafından inhibe edilip gevşemeye yol açan transmitterler ile aktive olur. Kanal açıcıları damar dışı düz kasta da gevşemeye, membran hiperpolarizasyonuna ve K^+ , rubidyum efluksuna neden olur. Buna ek olarak, dokular K^+ 'un yüksek konsantrasyonlarına maruz kaldıklarında membran hiperpolarizasyonu kaybolur ve gevşeme yanıtında azalma gözlenir.

2.1.5. Patolojik Durumlarda K_{ATP} Kanallarının Rolü (5, 9)

Potasyum kanalları çeşitli patofizyolojik durumlar için moleküler hedeftirler. Sinirsel İleti, damar ve damar dışı kasların kasılması, hormon sekresyonu, immun fonksiyonlar ve hücre çoğalmasını da içeren çeşitli fizyolojik süreçlerde K_{ATP} kanallarının önemli rolleri bulunmaktadır. Bu süreçlerin patolojik bozuklukları ile K_{ATP} kanallarının yapısal ve kalıtsal bozuklukları arasında ilişki bulunmaktadır. K_{ATP} kanalları kalpte, aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazında ve dolayısıyla kalbin uyarılmasında kritik rol oynadıklarından, çeşitli EKG bozuklukları ile karakterize kalp hastalıklarına neden olur. K_{ATP} kanalları nötrotransmisyonunda rol aldıklarından bu kanalların fonksiyonlarındaki değişiklikler, membran uyarılabilirliği ve sinirsel işlevlerin yerine getirilmesinde büyük değişikliklere yol açar. Farklı K_{ATP} kanal alt tiplerinin bozuklukları, episodik ataksi, benign familiyal neonatal konvülsiyonlar, nörodejenerasyon ve şizofreni gibi sinirsel bozukluklarla sonuçlanır. Alzheimer hastalığında kalsiyuma duyarlı K_{ATP} kanallarının bozuk olduğu gözlenmiştir (16). İşitme ve vestibüler hastalıklar, Bartter sendromu gibi renal ve ailesel hiperinsülinemik hipoglisemi gibi metabolik bozukluklar bu kanalların fonksiyon bozukluğunun neden olduğu diğer hastalıklar arasında yer alır. Damar düz kas hücresindeki artmış K^+ akımının hipertansiyon ile bağlantısı vardır. Hem intraselüler sinyallerle hem de mekanik uyarılarla açılabilen K_{Ca} kanallarının hipertansiyonda rollerinin olduğu düşünülmektedir. Kasılma esnasında bu kanalların açılması negatif feedback kontrol mekanizması sağlar (11).

2.2. KEMOTERAPİK BİR AJAN OLAN DOKSORUBİSİN VE DOKSORUBİSİNE BAĞLI GELİŞEN KARDİYOTOKSİSİTE

Antitümör antibiyotiklerden olan Doksorubisin (DOX) ve diğer antrasiklinler 1960' larda *Streptomyces peucetius* var. *caesieus* kültürlerinden izole edilmiş olan bir grup glikozidik antibiyotiklerdir (17).

Ancak, antrasiklin antibiyotiklerin kullanımının artmasıyla doksorubisin kemoterapisinin birkaç şiddetli komplikasyonu olarak bilinen akut ve kümülatif doz bağımlı kardiyotoksisite fark edilmiştir (18). Kemoterapötiklerin en önemli yan etkilerinden biri olan kardiyotoksisite ilk kez doksorubisin tedavisi alan çocuklarda kalp yetmezliği geliştiğinin fark edilmesiyle dikkati çekmiş, kullanımları arttıkça diğer antrasiklinlerin ve 5-fluorourasilin de kardiyotoksik etkilerinin olduğu belirlenmiştir (19).

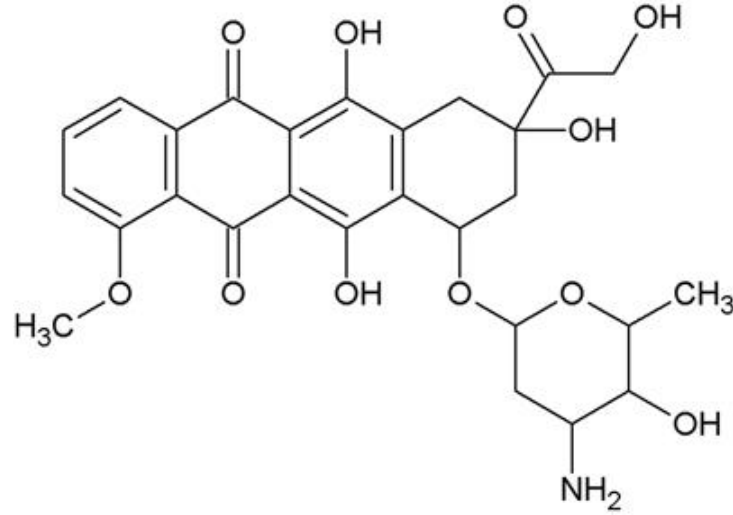
Kardiyotoksisite genellikle terapötik moleküllerin kalp fonksiyonu üzerine olan olumsuz etkilerini geniş bir yelpazede tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Kanser tedavisi için kullanılan çeşitli kemoterapötikler kardiyovasküler komplikasyon riskiyle ilişkilidir. Kardiyak fonksiyon defektleri semptomatik veya asemptomatik olabilmektedir(20). Bu sorunun klasik örneği doksorubisin gibi antrasiklinlerin, hematolojik maligniteler ve solid tümörlerin tedavisinde kullanımıdır.(21,22)

Antikanser ilaçlara bağlı potansiyel kardiyovasküler toksisite, QT süresinin uzaması, aritmiler, myokard iskemisi, hipertansiyon, tromboembolitik komplikasyonlar (antionjiojerik ajanlar) (22) ve myokardiyal fonksiyon bozukluğunu içine alır (23). İkinci olarak bu değişiklikler geri dönüşümlü veya dönüşümsüz olabilir, tedavi esnasında yada sonrasında gelişebilir. Örneğin doksorubisin gibi antrasiklinlerin klinik kullanımı, genellikle doza bağımlı ve kümülatif olarak kardiyomyopati ve konjestif kalp yetmezliğinin gelişiminden dolayı sınırlandırılmıştır (24). Akut kardiyotoksisite görülmekle birlikte en sıkıntılı formu geç meydana gelen ve kalbin yapısal bozukluklarıyla karakterize olandır (25). Sol ventrikül duvar kalınlığına,myokard kütlesi yanı sıra, sol ventrikül uyum azalmasına neden olur.(22,26,27)

2.2.1. Tanımı, Klinik Kullanımı ve Yapısı

Doksorubisin, *Streptomyces peucetius* kültürlerinden elde edilen, antibiyotik niteliğinde, antrasiklin grubu bir kemoterapötik ajandır (28). Doksorubisin, geniş

spekturumlu bir ajan olmasından dolayı, gastrointestinal tümör, sarkomlar, lenfomalar, göğüs ve yumurtalık kanseri gibi katı tümörler ve lösemi gibi kan kanserleride halen ilk olarak kullanılan bir ilaçtır (29). Antrasiklinlerin kimyasal yapıları karmaşıktır, bir aglikon ve bir amino şeker gurubundan oluşmuş quinon formdaki doksorubisin aşağıda gösterilmiştir (17).



Şekil 3: Doksorubisin'in etki mekanizması

2.2.2. Antitümör etki (dna'ya bağlanma)

Antrasiklin bileşikleri DNA ile etkileşerek RNA sentezi dahil olmak üzere DNA'nın birçok fonksiyonunu bozar. Tek ve çift zincir kırılmaları oluşur. Bundan dolayı antrasiklinler mutajenik ve teratojenik etki gösterirler (30). Doksorubisin, kanser kemoterapisinde kullanılan ilk antrasiklin antibiyotiktir. Doksorubisinin sitotoksik ve sitostatik etki mekanizmaları arasında topoizomerez II inhibisyonu, doksorubisin-demir kompleksinin DNA 'ya bağlanması ve DNA baz çiftlerinin ilaçla etkileşmesi gibi radikale bağlı olmayan mekanizmalar ve serbest radikal üretimi ile DNA hasarı yer almaktadır (31, 32).

Antrasiklinlerin apoptotik hücre ölümünü indükledikleri gösterilmiştir (32). Doksorubisin, DNA çift zincirini, bu zincir içinde komsu guanozin-sitozin bazçiftleri arasına enine yerleşerek etkiler (33). Bu tür yerleşim antineoplastik ilaçların (alkilleyici olanlar hariç) DNA molekülünü etkilemesinin, çapraz-bağlanmayı andıran, fakat farklı olan bir şeklidir. Bu nitelikteki moleküller, DNA çift zinciri içindeki birbirine bitişik iki baz çiftinin arasına girerek onlara reversibl şekilde bağlanırlar. Ancak reversibl

bağlanma, zamanla irreversibl bağlanmaya dönüşebilir. Aynı DNA çift-zincirinde birçok noktada olan bu yerleşim ve bağlanma komşu baz çiftlerinin birbirinden uzaklaşmasına, zincirin uzamasına ve sarmallığın azalmasına yol açar. Sonuçta DNA'nın replikasyonu (DNA sentezi) ve transkripsiyonu (mRNA sentezi) inhibe edilir (33).



Şekil 4: Doksorubisin- DNA Kompleksi

2.2.3. Yan Etkileri

Teratojenik, mutajenik ve karsinojeniktir (33) Doksorubisin verilen hastaların çoğunda en sık görülen yan etkiler kemik iliği aktivitesinde azalma, ağız mukoza iltihabı, sindirim bozukluğu, ve saç dökülmesidir. Ağır lökosit ve trombosit kaybı olabileceğinden dozu sınırlandırılmıştır (34)

Kardiyak yan etki olarak ise; Doksorubisinin neden olduğu üç çeşit kardiyotoksisite belirlenmiştir (35). Birincisi, tedavinin hemen sonrasında görülen akut ya da subakut hasar. İkinci olarak, kardiyomiyopatiyle sonuçlanan Doksorubisinin neden olduğu kronik kardiyotoksitedir. Son olarak, doksorubisin tedavisinin tamamlanmasından yıllar sonra oluşan doksorubisin kardiyotoksitesinin neden olduğu ventriküler bozukluklar ve aritmidir (36,37).

Doksorubisin vezikan bir ilaçtır. Ekstravazasyonu doku nekrozuna neden olur(33). Doksorubisin idrarı geçici olarak kırmızıya boyar; bunun klinik bir önemi yoktur.

2.2.4. Antrasiklin Kardiyotoksisitesine Genel Bakış

Antrasiklinlerin indüklediği kardiyotoksisite akut, kronik, ilerleyici ve geç başlayan kronik ilerleyici olarak sınıflandırılmıştır(38). Akut kardiyotoksisite devamlı ya da kısa süreli ilaç infüzyonu sonrası oluşur ve nonspesifik EKG değişiklikleri ve aritmileri içerir ki bazı hastalarda perikardit, miyokardit gibi kalp hastalıkları eşliğinde olabilir(25). Bu komplikasyonlar tipik olarak geri dönüşümlüdür, doza bağımlı değildir ve daha fazla antrasiklin kullanımını önlemez. Akut kardiyak ölüm ve ani ölümlerde rapor edilmiş tek sebeptir (25,39). Klinik miyokardit ile benzerdir. Ödem ve sol ventrikül (LV) duvarında kalınlaşmayla birlikte % 60 mortaliteye sahiptir. Akut kardiyotoksisite, hastaların % 1 inde oluşurken, subakut formu hastaların % 1.4-2 sinde oluşur(9). Klinikte en belirgin etkisi; kronik kardiyotoksisite, konjestif kalp yetmezliği ve LV disfonksiyonuna sebep olur(40,41). Geç başlangıç kronik ilerleyici toksisite genellikle ilk bir yıldan sonra terapi tamamlama ve nükslerden sonra görülür(41). Geç başlangıç kronik ilerleyici toksisite kanser tedavisinin ilk dozundan 10-20 yıla kadar belli olmamaktadır. Antrasiklinle ilgili tedavi edilmeyen kalp hastalıklarında LV disfonksiyonunun ilk 2 yıllık mortalitesi % 50' dir(41,42). Geç kardiyotoksisitede en önemli risk faktörü kümülatif tedavidir(42).

Antrasiklinin her bir dozunun kalpte yapısal değişikliklere sebep olduğuna inanılır ki eninde sonunda kardiyak ölümlere sebep olur. Bu defektler mekanizma tarafından, belli eşik değerlere kadar kompanse edilir ama ventriküler remodeling sıklıkla çoklu formlarda kardiyak yaralanmaları tetikler(43) .

2.2.5. Patofizyolojisi

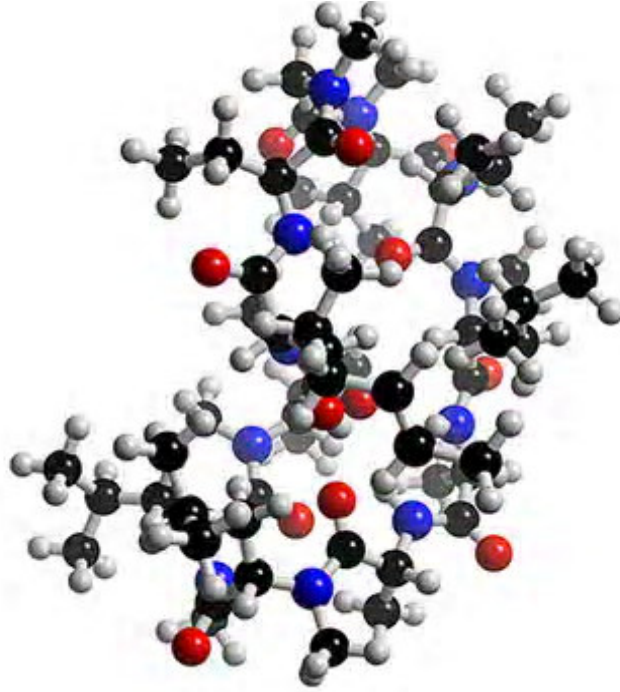
Kardiyotoksisitenin literatürde dikkat çekici birçok yönü olmasına rağmen antrasiklinlerin kalp üzerindeki zararlı etkileri için öne sürülen teoriler yeterli değildir. Antrasiklinin indüklediği myokardiyal hasarların oluşmasında birinci sırayı serbest oksijen radikallerinin üretimi almıştır (44). Bir çok çalışma oksitadif stres modeli ROS oluşumunda, özellikle intrasellüler demir seviyesindeki artışın, antrasiklin tedavisinin yanıtını desteklediğini gösteriyor. son çalışmalar antrasiklin kardiyotoksisitesinin özelliklerinin açıklanmasında ROS modelinin yetersiz kaldığını göstermektedir(44,45).

Serbest ROS mekanizmasının kardiyomiyosit apoptosizi veya nekrozu gibi, normal sarkomer yapısını ve yeterli kontraksiyonu üretmek için kalp hücresinin yeteneğini bozan, bu durumların değişik enerjetiklerden kaynaklandığına dair güçlü kanıtlar

vardır(44). Son çalışmalarda vurgulanan komponsatuar sağkalım mekanizmaları üzerindeki antrasiklinin yan etkileri, neuregulin/heregulin-Erb/HER2 ve hücre salvage kinaz yolu kalp hasarının gelişmesinde hafifletici etkiye sahiptir.(46,47)

2.3. SİKLOSİPORİN A

CsA, *Tolypocladium inflatum* Gams. adlı mantardan elde edilen 11 aminoasitli (undekapeptit), siklik bir polipeptittir (40). Bu mantarın 24 C sıcaklıkta maya-malt agarda üretilmesi ve bir dizi kültür işleminden sonra CsA elde edilir. CsA suda çözünmez, fakat bir çok organik çözücünde ve lipitlerde oldukça fazla çözünme özelliği vardır (45). Açık kimyasal formülü aşağıdaki gibidir (46) (Şekil 3).

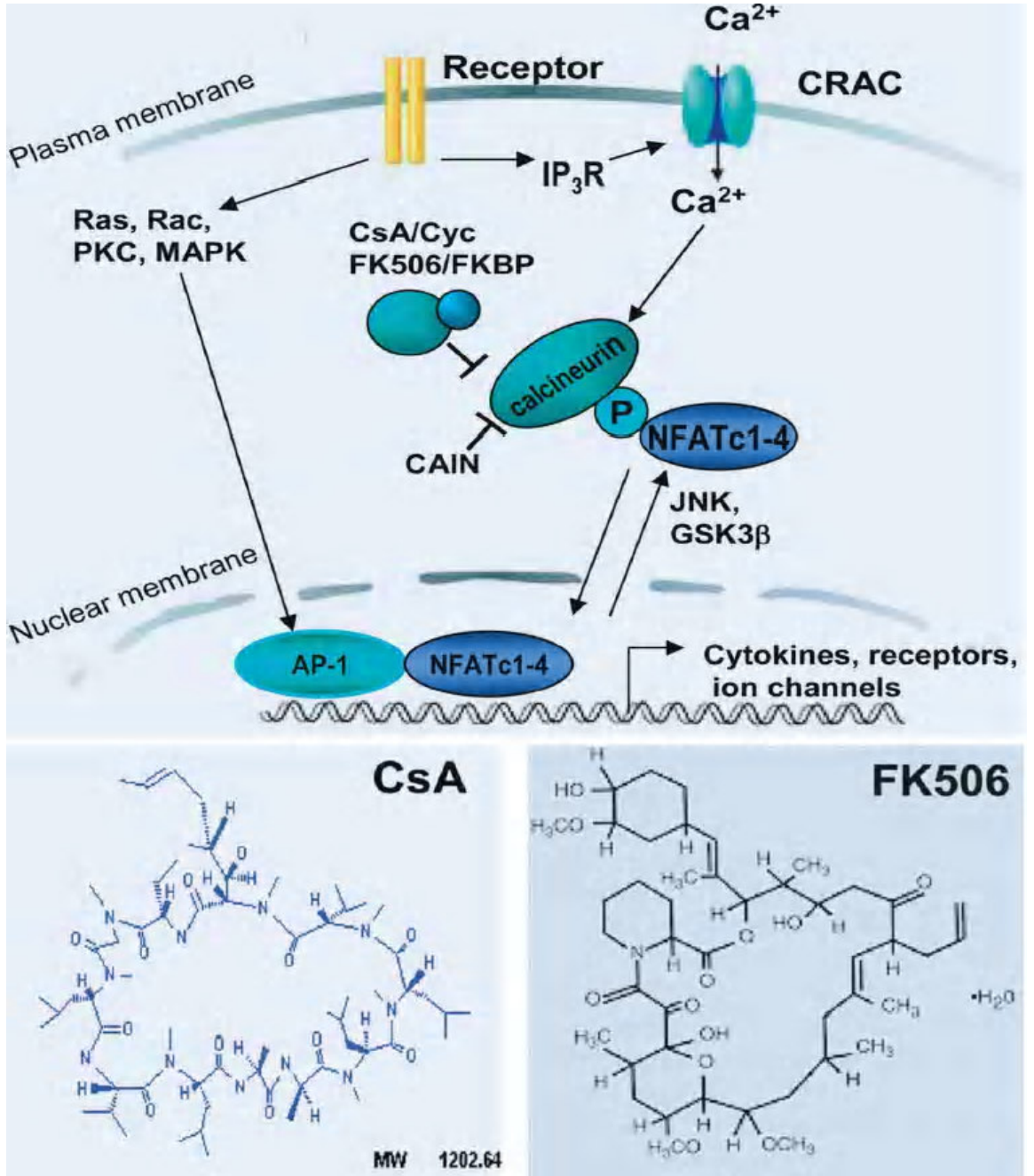


Şekil 5. :Siklosporin A'nın kimyasal yapısı

Tolypocladium inflatum Gams adlı fungustan elde edilen, 11 amino asitli, siklik bir polipeptiddir. Kimyasal formülü $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ 'dir. CsA, mide-barsak kanalından kısmen absorbe edilir. Bu nedenle ağızdan alınabilir. Fakat biyoyararlanımı az ve fazla değişkendir (43). CsA büyük oranda ince bağırsaktan emilir, emilim oranı %4-26 arasında değişir. Kana geçen CsA, %70 oranında hücrelere (bunun %80'ini eritrositler oluşturur), %30 oranında plazma proteinlerine bağlanır (45).). Plazma proteinleri içinde, albümin'e düşük oranda bağlanırken özellikle YDL (yüksek dansiteli

lipoprotein) ve DDL (düşük dansiteli lipoprotein)'den oluşan lipoproteine yüksek oranlarda bağlanır (45). CsA halen kullanılan bağışıklık sistemini baskılayıcı ilaçların etkinliği (efikasitesi) en yüksek olanıdır. Antijenin tanınmasını izleyen otoimmün cevabın erken basamaklarını önleyerek bağışıklık sistemini baskılar (43).

İmmünoşüpresif ve ikincil nöronal hasarı önleyici etkisini CD4 tipi T lenfositlerinde, T lenfosit reseptörünün antijenle uyarılması ile başlatılan sinyalleme kaskadı basamaklarından birini oluşturan ve Ca^{+2} 'a bağımlı bir enzim olan kalsinörini selektif bir şekilde inhibe ederek gösterir. Bunun için siklosporin'in önce, sitoplazmik bir reseptör olan siklofiline bağlanması gerekir. Siklofilinler, "peptidil prolil sis-transizomeraz" (rotamaz) etkinliği gösteren ve hücre çoğalmasına katkıda bulunan, prolinliproteinlerin uygun bir üçüncül yapı kazanmalarını sağlayan enzimlerdir (48). Siklofilin ile birleşip siklosporin-siklofilin kompleksi oluşturan siklosporin A, kalsinörin yada protein fosfataz 2B denilen fosfatazı inhibe eder. Kalsinörin bir defosfataz enzimi olup NFAT (aktive T hücrelerinin nükleer faktörü) adlı ve inaktif durumda sitoplazmada bulunan faktörden fosfat gruplarını koparır ve etki yeri olan hücre çekirdeğine girmesini sağlar. NFAT, çekirdekte interleukin-2 geninin körükleyici bölgesindeki bağlanma yerine bağlanarak gen transkripsiyonunu ve böylece İL-2 üretimini artırır. Bu olay zincirinde siklosporin, mitokondri membranında yer alan mPTP'nu inhibe ederek hücre içine Ca^{+2} girişini engeller. Böylece Ca^{+2} bağımlı kalsinörin inhibisyonu, İL-2 üretimini engelleyerek antijenik uyarının İL-2 aracılığı ile T lenfositlerinde etkinlik artması ve proliferolmasını önler. İntraselüler Ca^{+2} düzeyinin artması hücre hasarına neden olmaktadır (49,50). Siklosporin-A, MPTP'nu inhibe ederek hücre içi Ca^{+2} düzeyini düşürür ve hücre ölümünü engeller (48). Eldeki tüm veriler, siklosporin'in spesifik olarak ve reversible bir biçimde lenfositler üzerinde etkin olduğunu göstermektedir. Sitostatik ajanların aksine hemopoezisi deprese etmemekte ve fagositik hücrelerin işlevleri üzerinde de etkisi bulunmamaktadır (51).



Şekil 6: Siklosporin-A İmmünosüpresif ve ikincil nöronal hasarı önleyici etkisini Ca^{2+} 'a bağımlı bir enzim olan kalsinörini selektif bir şekilde inhibe ederek gösterir. Bunun için siklosporin'in önce, sitoplazmik bir reseptör olan siklofiline bağlanması gerekir.

Siklosporin ortalama yarılanma ömrü 6.4- 8.7 saat olup, metabolizma aracılığıyla elimine edilmektedir. Metabolitlerin eliminasyonu %90 oranında safrada olur. Verilen dozun %6' sı idrarla atılır. İdrar ekskresyonu düşük olduğu için, böbrek bozuklukları siklosporin eliminasyonunu değiştirmez. Çocuklarda atılma oranları %40 daha fazla olduğu için, kısa aralıklarda daha yüksek dozlara ihtiyaç duyulmaktadır. Yaşlı

hastalarda, karaciğer bozukluğu olan lipoprotein, kolesterol ve trigliserid serum seviyeleri düşük olan hastalarda atılma oranları düşüktür (27,36,52,53,54).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı ve Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Proje, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu ve Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Başkanlığının 11/04 nolu kararı ile onaylanmıştır.

3.1. DENEY HAYVANLARI

Çalışma; etik kurul onayı alınarak Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinden (DEKAM) sağlanan ve vücut ağırlığı 370 ± 50 g olan 40 adet Spraque Dawley cinsi erkek sıçanlar ile gerçekleştirildi. Sıçanlar deney süresince sıcaklığı $24 \pm 1^\circ\text{C}$ arasında olan ortamda barındırıldı. Gece gündüz döngüsü otomatik aygıt ile 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 ve çeşme suyu verildi. Deney öncesi ve deney bitiminde sıçanların ağırlıkları tartıldı.

3.2. DENEY GRUPLARI

1. **Kontrol grubu (KONT, n=8):** Bir gün önce tek doz serum fizyolojik (SF) solüsyonunun [0,1 m l/kg/hayvan başına intraperitoneal (i.p.)] verildiği grup.
2. **Doxorubisin grubu (DOX, n=8) :** Bir gün önce tek doz doksorubisin [10 mg/kg/hayvan başına 1ml (i.p.)] verilen grup.
3. **Doxorubisin+Glibenklamid grubu (DOX+GLİ, n=8):** Bir gün önce tek doz glibenklamid[10mg/kg/hayvan başına 1ml (p.o)] ve doksorubicin (10mg/kg/hayvan başına 1ml i.p) verilen grup.
4. **Doxorubisin+Siklosiporin grubu(DOX+CsA, n=8):** Bir gün önce tek doz siklosiporin [1mg/kg/hayvan başına 0,1ml (i.p)] ve doksorubicin [10mg/kg/hayvan başına 1ml(i.p)] verilen grup.
5. **Doxorubisin+Cariporide grubu(DOX+CARP, n=8) :** Bir gün önce tek doz cariporid [10mg/kg/ hayvan başına 0,1 ml (iv)] ve doksorubicin [10mg/kg/hayvan başına 1ml (i.p)] verilen grup.

3.3. DEĞERLENDİRMEYE ALINAN PARAMETRELER

3.3.1 Arteryal Kan Basıncı Ölçümü

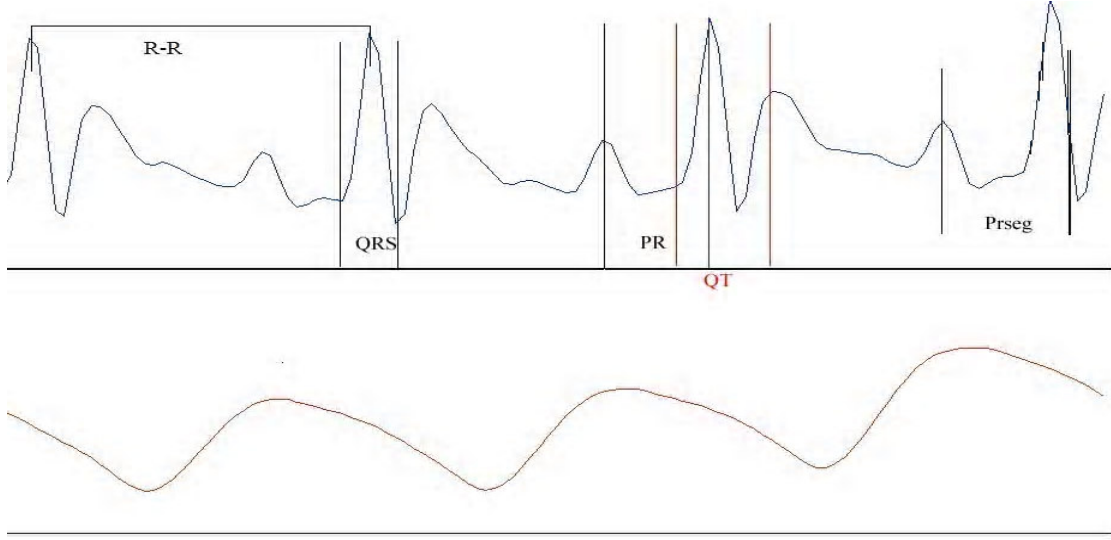
Arteryal kan basıncı direkt yöntemle femoral arterden kaydedildi. Kayıt öncesi, 8 gün intraperitoneal ilaç enjeksiyonu yapılan sıçanlara anestezi uygulandı. Ketamin (39,35 mg/kg) ve xylazine (4.96 mg/kg karışımı i.p). Anestezi altındaki sıçanın sol kasık bölgesindeki femoral artere paralel olacak şekilde deride bir kesi yapıldı. Deri altı dokusu ve fasyalar künt disseksiyon ile ayrılarak Arteria femoralise ulaşıldı ve siyatik sinir korunarak damar izole edildi. Kayıtların alınabilmesi için femoral artere 100 U/mL oranında heparin içeren serum fizyolojik ile dolu PE-50 tubing yerleştirildi. Basınç çevirici-yükseltici sistemi ve yükselticiye bağlı MP-30 sistemi (Biopac Systems, Inc., CA) ile 15 dk boyunca kan basınç değerleri kaydedildi. Hayvanlar uyanmadan önceki beş dakika boyunca alınan kayıtlar bilgisayarda işaretlendi. Sonrasında hayvanlardan biyokimyasal ölçümler için 1,5 ml kan örneği alındı. Alınan kan örneği 4000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilen plazmalar ependorf tüplerne alınarak -20°C'de saklandı.



Resim 3.1. Kan basıncı ve EKG kayıt alma işlemleri.

3.3.2. EKG Kaydı

EKG elektrotlarının pozitif ucu sol kola negatif ucu sağ kola ve toprak elektrodu sağ ayağa bağlandı. EKG'den PR'nin , QT'nin, QRS'in süreleri R dalgasının amplitüdü , R_R intervali, P-Rsegmenti değerlendirildi. R-R intervali R dalgasının başlangıcından QRS kompleksinin başlangıcına kadar geçen süredir. QRS kompleksi Q dalgasının başlangıcından S dalgasının sonuna kadar geçen süredir. Ventriküllerin depolarizasyon sürecini kapsar. QT intervali Q dalgasının başından T dalgasının sonuna kadar geçen süredir. Ventriküllerin depolarizasyon ve repolarizasyon süreçlerini kapsar R dalgası QRS kompleksindeki ilk pozitif defleksiyondur.



Resim 3.2. Sıçanların EKG ve Kan basıncı kaydı. QRS, PR, QT, Prseg, ve R-R parametrelerinin EKG dalgası üzerinde gösterilmesi.

3.3.3. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

Aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) Aktivite Tayinleri: Doxurabisinin oluşturduğu kalp hasarını belirlemede; AST ve ALT gibi enzim aktivite tayinleri, klinik biyokimya laboratuvarında, rutinde kullanılan alet ve kitler ile yapıldı (Beckman Coulter LX-2000, Beckman kids). AST ve ALT nin ölçüm değerlerinin birimi U/l'dir.

3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel hesaplamalar, Excell ve SPSS 16.0 programları kullanılarak yapıldı. İki den çok grup arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde; normal dağılıma uygunluk saptanan koşullarda, tek yönlü ANOVA uygulandı ve ardından post hoc test olarak, Tukey testi kullanıldı. Bağımlı grupların ortalamalarını karşılaştırmak için önce Kruskal Wallis ANOVA ardından ikili karşılaştırma için bağımlı gruplarda t-testi kullanıldı. Değerler $\text{ort.} \pm \text{SD}$ olarak gösterildi. $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Beş grubun hayvanlarının plazma örneklerinde AST ve ALT enzim aktiviteleri değerlendirilmiştir. Dox alan, Dox ile birlikte glibenklamid, siklosporin A ve cariporide alan grupların AST enzim aktiviteleri kontrol grubunun değerleri ile karşılaştırıldığında AST aktivitesinde istatistiksel anlamda önemli bir artış bulunmuştur ($p<0,01$ ve $p<0,001$). Dox+CsA ve Dox+Carp gruplarının AST değeri ile sadece Dox verilen grubunki arasında da istatistiksel anlamda bir artış vardır ($p<0,01$ ve $p<0,001$).

ALT enzim aktivitesi sadece Dox+Carp alan gruplarda kontrolden farklı bulunmuştur ($p<0,001$). Dox+Carp , Dox+CsA ve Dox+Gli gruplarında ALT enzim aktiviteleri sadece Dox alan gruptan istatistiksel anlamda yüksek bulunmuştur ($p<0,001$ ve $p<0,05$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Sıçanların plazma AST ve ALT enzim aktiviteleri (n=8)

Gruplar	AST (U/L)	ALT (U/L)
Kontrol	78 ± 17	61±05
Dox	146±50 ^a	60±05
Dox+Gli	103±20	70±16 ^e
Dox+CsA	287±34 ^{b,c,d}	70±05 ^e
Dox+Carp	172±11 ^{b,c}	93±12 ^{b,d}

AST : Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz.

a: p<0,01 KONT grubuna göre, b: p<0,001 KONT grubuna göre.

c: p<0,01 DOX grubuna göre, d: p<0,001 DOX grubuna göre. e: p<0,05 DOX grubuna göre. Değerler ortalama ±SD olarak verildi.

4.2. EKG VERİLERİNİN DEĞERLENDİRMESİ

Kontrol grubu ile diğer grupların ve Dox alan grupla diğer grupların PR süresi, QT intervalı, PRsegmenti, RR aralığı ve QRS kompleksi istatistiksel olarak değerlendirildi. Buna göre; PR aralığı, kontrole göre diğer gruplarla karşılaştırıldığında, Dox+Carp, Dox+CsA gruplarındaki PR aralığının istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu bulunmuştur (p<0,001 ve p<0,05). Aynı parametreyi Dox verilen gruba göre diğer gruplarla karşılaştırdığımızda Dox+Carp verilen grup istatistiksel anlamda farklı bulunmuştur. (p<0,05) (Tablo 4.2).

Kontrolün QT intervalını diğer grupları ile karşılaştırdığımızda, yada Dox alan grupla diğer grupların QT intervalını istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Kontrolün PR segmentini diğer grupları ile karşılaştırdığımızda, istatistiksel anlamda önemli bir değişim bulunmaz iken, sadece Dox verilen grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da anlamlı değişim görülmüştür (p<0,05)

Kontrolün R-R intervalını diğer grupları ile karşılaştırdığımızda, Dox+CsA ve Dox verilen gruplardan istatistiksel anlamda farklı olduğu bulunmuştur (p<0,05). Dox verilen grubun RR intervalı diğer grupların RR intervalleri ile karşılaştırdığımızda ise; Dox+Gli verilen grubun değeri istatistiksel yönden anlamlı olarak artış göstermiştir (p<0,01).

Kontrolün R amplitüdünü diğer grupları ile karşılaştırdığımızda, yada Dox alan grupla diğer grupların R amplitüdünü istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda anlamlı bir farklılık sadece Dox+Gli verilen grupta görülmüştür ($p<0,05$).

Kontrolün QRS intervalini diğer grupları ile karşılaştırdığımızda, yada Dox alan grupla diğer grupların QRS intervalini istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Tablo 4.2. Sıçanların EKG parametre değerleri (n=8)

Gruplar	PR (ms)	QT (ms)	Prseg (ms)	R_R (sn)	Rampl	QRS (ms)
Kontrol	0,027±0,001	0,046±0,003	0,005±0,002	0,188±0,014	0,350±0,044	0,031±0,001
Dox	0,027 ±0,001	0,045±0,001	0,008±0,001	0,166±0,007 ^c	0,305±0,044	0,030±0,001
Dox+Gli	0,026±0,002	0,045±0,001	0,012±0,003 ^d	0,181±0,016 ^d	0,419±0,044 ^{c,d}	0,030±0,001
Dox+CsA	0,028±0,001 ^c	0,046±0,002	0,008±0,001	0,173±0,01 ^c	0,265±0,044	0,030±0,001
Dox+Carp	0,029±0,001 ^{b,d}	0,045±0,001	0,007±0,001	0,176±0,011	0,280±0,044	0,030±0,001

PR: P R aralığı arasındaki süre. QT: Q T arasındaki süre. Prseg: PR segment süresi
R-R: İki R dalgası arasındaki mesafe. Ramp: R dalgasının amplitüdü QRS: QRS kompleksi

b: $p<0,001$ KONT grubuna göre, c: $p<0,05$ KONT grubuna göre.

d: $p<0,05$ DOX grubuna göre, Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verildi.

4.3. KAN BASINCININ VERİLERİNİN DEĞERLENDİRMESİ

Gruplarda değerlendirilen diğer bir fizyolojik parametre de arterial kan basınçlarıdır. Grupların kan basınçları sistolik, diyastolik ve ortalama kan basıncı olarak değerlendirildi. Sistolik, ,diyastolik ve ortalama kan basınçları açısından kontrol grubuyla diğer gruplar ve sadece Dox alan grupla diğer gruplar arasında istatistiksel karşılaştırmalar yapılmıştır.

Sistolik kan basıncı açısından kontrol grubuyla diğer grupları karşılaştırdığımızda Dox+Carp ve Dox grubunun değerleri istatistiksel olarak kontrol grubundan yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

Aynı parametre açısından Dox verilen grupla diğer grupları karşılaştırdığımızda Dox+CsA ve Dox+Gli gruplarının sistolik basınçlarının sadece Dox verilen grubunkinden istatistiksel anlamda önemli derecede düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$).

Diastolik kan basıncı ise; Kontrol grubu diğer dört grupla karşılaştırıldığında Dox+CsA, Dox, Dox+Gli grupları arasında istatistiksel anlamda farklılık bulunmuştur ($p<0,001$ ve $p<0,02$).

Diastolik kan basıncı açısından Dox alan grupla diğer grupları karşılaştırdığımızda Dox+CsA ve Dox+Gli verilen grupların değerleri istatistiksel olarak daha düşük değerde bulunmuştur. ($p<0,001$ ve $p<0,03$).

Ortalama kan basınçları açısından kontrol grubu, diğer dört grupla karşılaştırıldığında Dox+CsA, Dox, Dox+Gli ve Dox+Carip grupları arasında ki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$, $p<0,02$, $p<0,05$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3.Sıçanların kan basıncı değerleri (n=8)

Gruplar	SKB (mmHg)	DKB (mmHg)	OKB(mmHg)
Kontrol	129±8	89±8	112± 13
Dox	130±4 ^a	99 ±6 ^b	112 ±6
Dox+Gli	114±3 ^d	87±2 ^{a,e}	100±1 ^{c,e}
Dox+CsA	115±1 ^d	83±8 ^{a,d}	98 ±9 ^{a,d}
Dox+Carp	134±6 ^a	104±5	118±6

OKB: Ortalama kan basıncı, SKB: Sistolik kan basıncı, DKB: Diyastolik kan basıncı

a: $p<0,001$ KONT grubuna göre, b: $p<0,02$ KONT grubuna göre, c: $p<0,005$ KONT grubuna göre,

d: $p<0,001$ DOX grubuna göre, e: $p<0,003$ DOX grubuna göre. Değerler ortalama ±SD olarak verildi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Doksorubisin, *Streptomyces peucetius* kültürlerinden elde edilen, antibiyotik niteliğinde, antrasiklin grubu bir kemoterapötik ajandır (3). Doksorubisin, geniş spektrumlu bir ajan olmasından dolayı, gastrointestinal tümör, sarkomlar, lenfomalar, göğüs ve yumurtalık kanseri gibi katı tümörler ve lösemi gibi kan kanserlerinde halen ilk olarak kullanılan bir ilaçtır (5). Doksorubisin verilen hastaların çoğunda en sık görülen yan etkiler kardiyotoksisite, kemik iliği aktivitesinde azalma, ağız mukoza iltihabı, sindirim bozukluğu ve saç dökülmesidir. Ağır lökosit ve trombosit kaybı olabileceğinden dozu sınırlandırılmıştır (34)

Antikanser ilaçlara bağlı potansiyel kardiyovasküler toksisite, QT süresinin uzaması, aritmiler, myokard iskemisi, hipertansiyon, tromboembolitik komplikasyonlar (antionjiojerik ajanlar) (22) ve myokardiyal fonksiyon bozukluğunu içine alır (23). İkinci olarak bu değişiklikler geri dönüşümlü veya dönüşümsüz olabilir, tedavi esnasında yada sonrasında gelişebilir. Örneğin doksorubisin gibi antrasiklinlerin klinik kullanımı, genellikle doza bağımlı ve kümülatif olarak kardiyomyopati ve konjestif kalp yetmezliğinin gelişiminden dolayı sınırlandırılmıştır (24). Akut kardiyotoksisite görülmekle birlikte en sıkıntılı formu geç meydana gelen ve kalbin yapısal bozukluklarıyla karakterize olandır (25). Sol ventrikül duvar kalınlığına, myokard kütlesi yanı sıra, sol ventrikülün uyumunda azalmaya neden olur.(22, 26, 27)

Kardiovasküler sistemde çok çeşitli iyon kanalları bulunmaktadır. ATP' ye duyarlı potasyum kanalları (K_{ATP}) intraselüler enerji metabolizması ile elektriksel uyarı arasında bağlantı sağlayan en önemli iyon kanallarındandır. K_{ATP} kanalları heteroktemerik komplekslerdir. ATP'yi bağlayan ve poru oluşturan bir Kir alt ünitesi bulunur. Kir; Kir 6.1 ve Kir 6.2 olarak iki farklı yapıda bulunur. Bu kanallarda SUR ismi verilen ayrı alt üniteler bulunmaktadır. Myositlerdeki K_{ATP} kanalları SUR2A ve Kir6.2 alt ünitelerine sahiptir. Aslında myositlerde hem SUR1 hem de SUR 2 bulunur. Fakat SUR2 alt üniteleri daha fazladır. Kalp hem Kir6.2 SUR2A hem de Kir6.2 SUR2B rekombinasyonlarını içermesine rağmen SUR2A içeren kanallar daha çok bulunur. Ventriküler myosit K_{ATP} kanalları pinasidil ve kromakalime duyarlıdır. Fakat diazoksilde duyarlı değildir. Bu nedenle, hipoksi ve kardiyak iskemi gibi K_{ATP} kanallarının aktivasyonu sonucu ortaya çıkan durumlarda sülfonilüreler hücrel K^+ efluksunu parsiyel olarak inhibe ederler. Glibenklamidin metabolik inhibisyon esnasında kalpteki K_{ATP} kanallarını inhibe edememesinin nedeni intraselüler ADP miktarındaki artıştır.

K_{ATP} kanalları intraselüler ATP tarafından inhibe edilmelerine bağlı olarak ATP'ye duyarlı K^+ kanalı olarak isimlendirilseler de sitoplazmadaki ATP düzeyleri genellikle çok iyi ayarlanır ve miktarı milimolar düzeylerde sabit tutulur; ancak şiddetli metabolik bozukluklarda bu kanal aktivitesi azalabilir. Bu bilgiler K_{ATP} kanallarının ATP'ye ilave olarak başka faktörler tarafından birlikte regülasyonu fikrini gündeme getirmiştir. K_{ATP} kanal aktivitesini değiştiren intraselüler metabolitler arasında adenosin difosfat (ADP) ve diğer nükleotid difosfatlar bulunmaktadır. ADP ve guanin nükleotidleri K_{ATP} kanalı üzerinde yüksek konsantrasyonlarda bloke edici, düşük konsantrasyonlarda ise aktive edici etkiye sahiptirler.

Normal kalpte K_{ATP} kanalları yüksek konsantrasyondaki intraselüler ATP nedeniyle kapalıdır. İskemi söz konusu olduğunda bu kanallar açılarak, iskemik kalp hücrelerini korumak üzere işlev görürler. Kalpteki bu protektif etkisine ilaveten pankreatik beta hücrelerden insülin salgılanmasının kontrolünde, beyin damarlarının iskemiden korunmasında, beyin sinapslarında transmitter salınımının modülasyonunda ve damar düz kas tonusunun regülasyonunda önemli rol oynamaktadırlar (4).

Sülfonilüreler , beta hücrelerindeki kadar yüksek konsantrasyonlarda kalp, iskelet ve düz kastaki K_{ATP} kanallarını da inhibe ederler. Sülfonilürelerin kalp ve damardaki K_{ATP} kanallarını inhibe etmesi klinik açıdan önemlidir, çünkü bazı çalışmalarda diyabetik

hastaların sülfonilürelerle tedavileri artmış kardiyovasküler mortalite ile ilişkilendirilmiştir. Hipoksi ve kardiyak iskemi gibi K_{ATP} kanallarının aktivasyonu sonucu ortaya çıkan durumlarda sülfonilüreler, hücrel K^+ efluksunu parsiyel olarak inhibe ederler. Glibenklamidin metabolik inhibisyon esnasında kalpteki K_{ATP} kanallarını inhibe edememesinin nedeni intraselüler ADP miktarındaki artıştır.

K_{ATP} kanalları birçok vazoaaktif faktörün hedefidir ve aktivasyon dereceleri bu aktivatör ve inhibitörlerin net etkileri ile düzenlenir. K_{ATP} kanalları kan akımının metabolik regülasyonunda rol oynayabilirler. Hipoksi gibi kan ihtiyacının arttığı durumlarda komşu dokulardan vazodilatörlerin saliverilmesi ile ya da hipoksinin direkt etkisi ile K_{ATP} kanalları aktive olurlar. Bazı durumlarda, oksijen seviyesi normal, ortamda vazodilatörler yok iken koroner arterlerde olduğu gibi K_{ATP} kanalları arter düz kasının membran potansiyelini düzenlenmede katkıda bulunur. K_{ATP} kanalları depolarizasyon ve kasılmaya yol açan vazokonstriktörler tarafından inhibe edilebilirler.

Sodyum- hidrojen zıt transport proteini (NHE1) kalp iskemisinde, hücre içi artan hidrojen iyonunu azaltmak için en iyi çalışan tampon sistemlerinden birisidir. Diğer bir tampon sistemi ise sodyum-bikarbonat kotransport (NBC) sistemidir. Kalp iskemisinde kardiyak hücre içinde artan hidrojen protonu, bu iki pompanın çalışması ile azaltılmaya çalışılırken, aynı anda hücre içi sodyum iyon artışına, buna bağlı kalsiyum iyon artışına neden olmakta, iskemik kalp hücresinin daha fazla kasılması hasarın artmasına neden olmaktadır.

Siklosporin, mitokondri membranında yer alan membran potansiyeli transport poru (MPTP)'nu inhibe ederek hücre içine Ca^{++} girişini engeller. siklosporin-A, MPTP'nu inhibe ederek hücre içi Ca^{++} düzeyini düşürür ve hücre ölümünü engeller.

Çalışmamızda 5 grup oluşturulmuş, her birine rastgele 8 hayvan ayrılmıştır. Hayvanlara kontrol grubu hariç doksorubisin verilmiş, doksorubisin verilen bir grup hariç diğerlerine doksorubisin ile aynı zamanda farklı ilaçlar ilaveten verilmiştir. glibenklamid verilerek K_{ATP} kanallarının inaktif hale getirilmesi planlanmıştır.

Diğer gruba doksorubisin ile birlikte siklosporin A verilmiştir. Bilindiği gibi siklosporin hem kalsinörini inhibe ederek immunosupresif etki oluştururken aynı zamanda patolojik durumlarda açılabilen mitokondri membranındaki porları kapatabilmekte böylece mitokondriyal hasarı engellemektedir.

Diğer bir gruba ise doksorubisin ile birlikte cariporide verilmiştir. Cariporide $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ değiş-tokuşunu yapan transport sistemi inhibe edicidir. Düşündük ki doksorubisin akut olarak radikalleri artıracak pH'yı değiştirecek, hücre içi Na^+ artışı ve buna bağlı Ca^{++} artışına neden olacaktır. Artan Ca^{++} iyonu da her zaman özellikle mitokondrilerde hem yapısal hem de fonksiyonel bozukluk oluşturan önemli sebeplerden birisidir.

Çalışmamızın amacı, hayvanlara doksorubisin vermek suretiyle radikal oluşumunu artırmak bu radikallerin ortamdan kaldırılmasında siklosporin A, glibenklamid yada cariporide'in etkili olup olmadığını belirlemek, grupları karşılaştırarak en etkili olanı bulmaktır.

Hipotezimizi test etmek için maddelerin verilmesinden 24 saat sonrasında, özellikle karaciğer dokusunun ama kalp kası hasarının da belirteci olan AST ve ALT enzim aktiviteleri Biyokimya laboratuvarlarında yaptırılmıştır. Fizyoloji laboratuvarında ise EKG parametreleri ile birlikte kan basınçları direkt kayıtlanmıştır. Dox verilen grupların AST enzim aktiviteleri kontrole göre yüksek bulunmuştur ve bu yükselme istatistiksel anlamda da önemlidir. Dox ile birlikte verilen kimyasalların hiçbirisinin AST enzim aktivitesini kontrole yaklaştırmadığı gibi sadece doksorubisin verilen grubunkinden de daha yüksek olduğu tesbit edilmiştir. Benzer durum ALT enzim aktivitelerinde de görülmektedir. Bu sonuçlar doksorubisinin verildikten 24 saat sonrasında bile hasar oluşturmaya başladığını, ancak verilen glibenklamid, siklosporin A yada cariporitin bu hasarı engellemede yetersiz olduğunu göstermektedir.

EKG verilerine baktığımızda doksorubisinin verilmesinden sonraki 24 saatte, doksorubisinin yaptığı patolojilerin henüz EKG parametrelerine yansımadığını söyleyebiliriz. Dolayısı ile sadece doksorubisin verilenlerde bile hemen hemen tüm değerler kontrole benzemektedir. Doksorubisin ile cariporide birlikte verilen grubun PR değeri, hem kontrolden hem de sadece doksorubisin verilen gruplar ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme göstermiştir. Bu tür yükselmeler glibenklamid verilenlerde PR segmenti, R amplitüdünde ve QRS kompleksinde de görülmüştür. Bu iki kimyasal madde muhtemelen hücre içi-dışı iyon dengesinde değişiklik yaratmış olabilir.

Kan basıncı değerlendirmeleri incelendiğinde doksorubisinin verilmesi sonrası 24. saatte kan basınçlarının fazla değişmediği, fakat doksorubisin ile birlikte glibenklamid, siklosporinA verilmesinin kan basıncında azalma oluşturduğunu söyleyebiliriz.

cariporide ise hem sistolik hemde diyastolik basınçlarda artışa neden olmuştur. Bu etki muhtemelen glibenklamidin, siklosporin A'nın yada cariporitin damar üzerindeki etkilerine bağlı geliştiğini göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile doksorubisinin 24 saat içerisinde bile dokularda hasar oluşturduğu, verilen glibenklamid, siklosporin A yada cariporidin bu hasarı düzeltmede yetersiz olduğu, en azından ilk 24 saat içerisinde düzeltmede yetersiz olduğu düşüncesindeyiz. İleriki çalışmalar mitokondri etkilenimini gösterecek şekilde planlanırsa, verilen bu maddelerin bu hasarı önleme yada tetikleme konusunda daha kesin sonuçlar ortaya konulabilecektir.

6. KAYNAKLAR

1. Beck FW, Kaplan J, Fine N, Prasad AS. Decreased expression of CD-73 in the CD-8+ subset is associated with zinc deficiency in human patients. J Lab Clin Med 1997; 130: 147-56.49
2. Beck FW, Kaplan J, Fine N, Prasad AS. Decreased expression of CD-73 in the CD-8+ subset is associated with zinc deficiency in human patients. J Lab Clin Med 1997; 130: 147-56.49
3. Tomat L,Arranz C,Costa M.Zinc resriction during different periods of life:Influence in renal and cardiovascular diseases.Nutrition 2010; 27;392-398
4. Roth HP, Kirchengener M. Zur Biochemie Des Zincs. In: Holtmeimer HJ, Krusejarres JD. Editors. Zinc: biochemie, physiologie, pathophysiologie und Klinik Des Zinstoffwechseis Des menschen. Stuttgart (DE): Wissensschaftliche Verlagsgesellschaft; 1991: 67-77.
5. Bhagavan NV. Medical Biochemistry. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1992: pp. 880-2.
6. .Merten K,JiangY, Kang J.Zinc nibits Doxorubicin-Activated Calcineurin Signal Transduction Pathays in H9c2 Embriyonic Rat Cardiac Cells, 2007; 232:682-689.

7. Hambidge KM, Krebs NF, Miller L. Evaluation of zinc metabolism with use of stable-isotope techniques: Implications for the assesment of zinc status. *Am J.Clin Nutr* 1998; 68: 410-3.
8. Miller LV, Krebs NF, Hambidge KM. Human zinc metabolism: Advances in the modelling of stable isotope data. *Adv Exp Med Biol*, 1998; 445: 253-69.
9. Whitney, EN, Hamilton EMN, Rolfes SR. *Understanding Nutrition*. Fifth Edition. New York: West Publishing Company, 1990: 326-31.
10. Prasad AS. Zinc and enzymes. _n: Prasad AS. (Ed.). *Biochemistry of zinc*. NewYork: Plenum; 1993: pp. 17-53.
11. Sanstead HH. *Understanding Zinc: Recent observations and interpretations*. JLab Clin Med 1994; 124: 322-7.
12. Aguilar-Bryan, L., Clement IV, J.P., Gonzalez, G., et al, "Toward understanding the assembly and structure of KATP channels", *Physiological Reviews*, 78, 1, 1998; 227-245.
13. Ashcroft, F.M., Gribble, F.M., "Correlating structure and function in ATPsensitive K+ channels", *Trends Neurosci.*, 1998: 21; 288-294.
14. Muscle K_{ATP} Channels: Recent Insights to Energy Sensing and Myoprotection *Physiol Rev.* July 2010; 90: 799–829.
15. Vallee BL, Auld RS. Zinc methallochemistry in biochemistry. *EXS* 1995; 73:259-77.
16. Timson DJ, Wigley DB. Functional domains of an NAD+ dependent DNA ligase. *J Mol Biol* 1999; 285: 73-83.
17. Peter j.LittlePh.D,et al.Zinc and kardiovasküler disease.Nutrition 2010: 26;1050-1057
18. Tuncay E,Bilginoğlu A,Sozmen N,et al İntracellular free zinc during cardiac excitation conraction cycle:calcium and redox dependencies 2011; 89 634-64
19. İspir M, Emek K. Cerrahi travmanın serum çinko düzeyine etkisi. *Türk Tıp ve Eczacılık Dergisi*. 1998; 12: 251-3.
20. Kayakırılmaz K, Oral SN. Okul öncesi çocuklarda diyet, saç ve serum çinko düzeyleri. *Doğa Türk Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1989; 13: 225-33.
21. Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology.*Physiological Reviews*. 1993; 73: 79-118.
22. Ageet PJ. Zinc. *Annales Nestle* 1994; 52: 91.

23. Hempe JM, Cousins RJ. Cystine-rich intestinal protein binds zinc during transmucosal zinc transport. *Proc Natl Acad Sci*, 1991; 88: 9671-4.
24. O'Dell BL. Cystin-rich intestinal protein (crip): a new intestinal zinc transport protein. *Nutr Rev* 1992; 50: 232-3.
25. Miller LV, et al. Size of the zinc pool that exchange rapidly with plasma zinc in humans: Alternative techniques for measuring and relation to dietary intake. *J.Nutr* 1994; 124: 268-76.
26. Miller LV, Krebs NF, Hambidge KM. Human zinc metabolism: Advances in the modelling of stable isotope data. *Adv Exp Med Biol*, 1998; 445: 253-69.
27. Hambidge KM, Krebs NF, Miller L. Evaluation of zinc metabolism with use of stable-isotope techniques: Implications for the assesment of zinc status. *Am J.Clin Nutr* 1998; 68: 410-3.
28. Tomat L,Arranz C,Costa M.Zinc resriktion during different periods of life:Influence in renal and cardiovascular diseases.*Nutrition* 2010; 27: 392-398
29. Bhagavan NV. *Medical Biochemistry*. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1992: pp. 880-2.
30. Whitney, EN, Hamilton EMN, Rolfes SR. *Understanding Nutrition*. Fifth Edition. New York: West Publishing Company, 1990: 326-31.
31. .Merten K,JiangY, Kang J.Zinc inibits Doxorubicin-Activated Calcineurin Signal Transduction Pathays in H9c2 Embriyonic Rat Cardiac Cells 2007; 232:682-689.
32. Roth HP, Kirchengener M. Zur Biochemie Des Zincs. In: Holtmeimer HJ, Krusejarres JD. Editors. *Zinc: biochemie, physiologie, pathophysiologie und Klinik Des Zinstoffwechsels Des menschen*. Stuttgart (DE): Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 1991: 67-77.
33. Berg JM, Shi Y. The galvanization of Biology: A Growing Appreciation for the roles of zinc. *Science* 1996; 271:1081-5.
34. Decker P, et al. Zinc is an essential cofactor for recognition of DNA binding domain of poly (ADP-ribose) polymerase by antibody in otoimmune rheumatic and bowel disease. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 918-26.
35. Beck FW, Kaplan J, Fine N, Prasad AS. Decreased expression of CD-73 in the CD-8+ subset is associated with zinc deficiency in human patients. *J Lab Clin Med* 1997; 130: 147-56.49

36. Falschuk KH. The molecular basis for the role of zinc in developmental biology. *Mol Cell Biochem* 1998; 188: 41-8.
37. Fraker PJ, Telford WG. A reappraisal of the role of zinc in life and death decision of cell. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 215: 229-36.
38. Ploysangnam A, Falciglia GA, Brehm Bj. Effect of marginal zinc deficiency on human growth and development. *J Trop Pediatr* 1997; 43:192.
39. Goyer RA. Toxic and essential metal interactions. *Annu Rev Nutr.* 1997; 17:37-50.
40. Elgohari WG, Sidhu S, Krezoski SO, Petering DH, Byrnes RW. Protection of DNA HL-60 cells from damage generated by hydroxyl radicals produced by reaction of hydrogen peroxide with cell iron by zinc methallothionein. *Chem Biol Interact* 1998; 115: 85-107.
41. Bhutta ZA, et al. Zinc investigators collaborative group: Prevention of diarrhea and pneumonia by zinc supplementation in children in developing countries: pool analysis of randomized controlled trials. *J Pediatr* 1990;135: 689-90.
42. Coleman JE. Zinc enzymes. *Curr Opin Chem Biol* 1998;2: 222-34.
43. Uyanık F. Hayvanlarda çinko metabolizması. *Erciyes Üniv. Sağlık Bilim. Dergisi.* 1998; 7(1-2): 58-66
44. Bennett WM, Porter GA. Nephrotoxicity of common drugs used by urologists. *Urologic Clinics of North America*, 17:145-156,1990
45. Halestrap A P, Pasdois P The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease . *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 1787 : 1402–1415
46. Halestrap A P, What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2009; 46; 821–831
47. Wang CH, Salahudeen AK, McClain M, Whitehead J. Lipid peroxidation accompanies cyclosporin nephrotoxicity: Effects of vitamin E. *Kidney International*, 1995;47:927-34,
48. Pascoe GA, Reed DJ: Cell calcium, vitamin E and the thiol redox system in cytotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, 1989; 6:209-24,
49. Kayaalp O. T.bbi Farmakoloji. Immün sistem bozukluklar. ve immünomodülatör ilaçlar. Cilt 2, 9. Bask., Hacettepe TasKitabevi, 2000: 372-416,
50. Mihatsch Mj, Thiel G, Ryffel B. Morphologic diagnosis of cyclosporine nephrotoxicity. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 1988; 5:1,104-121,

51. Vickers AEM, Fischer V, Connors S, et al. Cyclosporin A metabolism in human liver, kidney, and intestine slices. *Drug Metabolism and Disposition*, 1992; 20:6:802-809.
52. Düzgüner, V.: Deneysel Olarak Diyabet Oluşturulan Tavşanlarda Çinkonun Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, M.K.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji (VET) Anabilim Dalı, Hatay 2005
53. Petering, D.H., Loftsgaarden, J., Schneider, J., Fowler, B.: Metabolism of Cadmium, Zinc and Copper in the Rat Kidney: The Role of Metallothionein and Other Binding Sites, *Environmental Health Perspectives*, Vol 54, pp. 1984: 73-81.
54. Vasak M. Advances in metallothionein structure and functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2005; 19: 13-17.

**ERCİYES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE**

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı
ETİK KURULUN ADRESİ : Erciyes Üniversitesi

Tarih: 12.01.2011

Toplantı Sayısı: 01

Karar No: 11/04

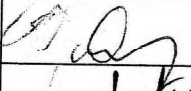
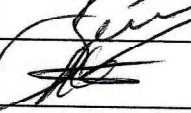
Etik kurul toplantısı

12.01.2011

tarihinde Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel

Etik Kurul

Prof.Dr. Zübeyde GÜNDÜZ Başkanlığı'nda başkanlığında gerçekleştirilmiştir

Üye Adı/Soyadı	Akademik Ünvanı	Fakültesi	
Zübeyde Gündüz	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Harun Ülger	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	
Özlem Canöz	Prof.Dr.	Tıp Fakültesi	
Hatice Özbilge	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Servet Kesim	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Davut Bayram	Öğrt.Gör.Dr.	Veteriner Fakültesi	
Coşkun Tez	Doç. Dr.	Fen Fakültesi	
M. Betül Aycan	Yrd. Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi(Farmakoloji)	
Ahmet Öztürk	Öğrt.Gör.Dr		
Serap Altuntaş Eroğlu	Avukat		
Halil Tekiner	Eczacı		

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr.Nurcan DURSUN tarafından yapılan "ATP- Duyarlı Potasyum Kanal Akımlarının İskemik ve Noniskemik Sıçan Kalp Kası Hücrelerinde İncelenmesi "adlı araştırması incelenerek çalışmasının yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına oy birliğiyle karar verildi.

ASLINA KAYITLI

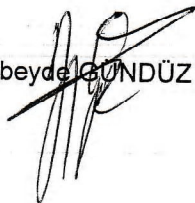
Okam Sekreteni

Bingül Kocaman

Tarih : 12.01.2011

Etik Kurul Başkanı İmzası

Etik Kurul Başkanı : Prof.Dr. Zübeyde GÜNDÜZ



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Elvan Kunduz
Doğum yeri ve tarihi : Çine, 01.10.1985
Adres : Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji ABD 38039 Kayseri.
Tel : 05367623266
E-mail : elvan.kunduz@gmail.com

EĞİTİM

Lisans : Süleyman Demirel Üniversitesi, Hemşirelik, 2007
Yüksek Lisans : Erciyes Üniversitesi, Fizyoloji, devam ediyor
Aldığı Sertifikalar : Patch-Clamp Kursu, 28 Haziran 2010, Isparta Araştırmacılar İçin Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Mart 2011, Kayseri
Yabancı Dil Bilgisi : İngilizce, orta derecede

İLGİ ALANLARI

Kardiyovasküler Fizyoloji, İzole Kalp Hücrelerinde Patch Clamp Yöntemi İle İyon Akım Kayıtları

Araştırma Deneyimi

1. **Kunduz E**, Taşkın E, Dursun N, Özdoğan K, Yerer Aycan B: Adriamisin'in neden olduğu nefrotoksisite üzerine anjiyotensin II'nin rolü. 36. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2010
2. Özdoğan K, **Kunduz E**, Taşkın E, Dursun N: The Effect of Carnosine on Adriamycin-induced Oxidative Heart Damage in Rats. International Symposium on New Approaches in Cardiovascular Disorders, 2011
3. Şahin L, Kavraal Ş, **Kunduz E**, Aşcıoğlu M, Süer C, Alel G, Deneme F, Dursun N: Effect of Carnosine on Thoracic Aortic Segments in Aged Rats, 2011