

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

**DOKSORUBİSİNİN KALP MYOSİTLERİNDE
OLUŞTURDUĞU MİTOKONDRIYAL HASARI AZALTMADA
“MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION
PORE (MPTP)” LARIN ROLÜ**

**Tezi Hazırlayan
Dilek SİVRİ**

**Danışman
Prof.Dr.Nurcan DURSUN**

Yüksek Lisans Tezi

**Haziran 2012
KAYSERİ**

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

**DOKSORUBİSİNİN KALP MYOSİTLERİNDE
OLUŞTURDUĞU MİTOKONDRIYAL HASARI AZALTMADA
“MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION
PORE (MPTP)” LARIN ROLÜ**

**Tezi Hazırlayan
Dilek SİVRİ**

**Danışman
Prof.Dr.Nurcan DURSUN**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TSY-11-3757 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.

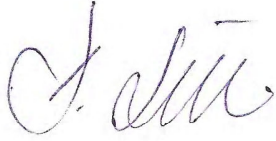
Adı-Soyadı: Dilek SİVRİ

İmza :

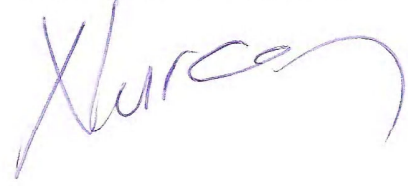
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Doktorubisinin Kalp Myositlerinde Oluşturduğu Mitokondriyal Hasarı Azaltmada “Mitochondrial Permeability Transition Pore (MPTP)”ların Rolü” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Dilek SİVRİ



Danışman
Prof.Dr.Nurcan DURSUN



Anabilim Dalı Başkanı
Prof.Dr.Cem SÜER



Prof. Dr. Nurcan DURSUN danışmanlığında **Dilek SİVRİ** tarafından hazırlanan “Doksorubisinin Kalp Myositlerinde Oluşturduğu Mitokondriyal Hasarı Azaltmada”**Mitochondrial Permeability Transition Pore (MPTP)“ların 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 Elvan KUNDUZ, Songül BİLTEKİN, Arzu Dilek GÜLER ,Sinan HAMARAT, Nesrin YILDIZ ve bütün hayatım boyunca bana sonuna kadar destek ve her daim yanımda olan sevgili babam Ahmet SİVRİ' ye sonsuz teşekkür ederim.

DOKSORUBİSİNİN KALP MYOSİTLERİNDE OLUŞTURDUĞU MİTOKONDRIYAL HASARI AZALTMADA “MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE (MPTP) ”LARIN ROLÜ

Dilek SİVRİ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Fizyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2012

Danışman: Prof. Dr. Nurcan DURSUN

ÖZET

Dokсорubisin, kanseri tedavi etmekte oldukça etkili bir antibiyotiktir. Kullanımı, doza bağlı kardiyotoksisite ve yaşamı tehdit eden kardiyomyopatiye neden olabileceği için sınırlıdır. Kalp hücreleri mitokondri membranında bulunan mitochondrial permeability transition pore (mPTP) 'ların aktivasyonunu artırır, porlar açılır, bu da mitokondri içinde Ca^{+2} artışına neden olur . Mitokondri şişer, ATP sentezi aksar, apoptotik maddeler mitokondri dışına çıkar, myokard hücresinde nekroz oluşumunu artırır. Siklosporin A (CsA) ve Takrolimus (FK506), kalsinörine bağlanır ve onu inhibe eder. Siklosporin A, aynı zamanda mPTP 'nin kapanmasına neden olarak koruyucu etki gösterir.

Bu çalışmada, sıçanlarda dokсорubisin tarafından oluşturulan mitokondriyal hasarda, mPTP' nin rolü ve CsA ile FK506'nın koruyucu etkisinin araştırılması amaçlandı.

Deney planında 4 grup oluşturuldu. Kontrol (KONT . serum fizyolojik), Dokсорubisin (DOX, 10 mg /kg/gün tek doz intraperitoneal), dokсорubisin ve siklosporin (DOX +CsA, 10 mg/kg/gün tek doz intraperitoneal DOX ve 8 gün boyunca 1mg/kg/gün intraperitoneal CsA), dokсорubisin ve tacrolimus (DOX+TAC), 10 mg/kg/gün tek doz intraperitoneal DOX ve 8 gün boyunca 0,1 mg/kg/gün intraperitoneal tacrolimus) . 8 gün boyunca ilaç verilen hayvanlara, 8. gün anestezi yapılarak ekokardiyografisi (EKO) çekildi. Elektrokardiyografi (EKG) ve femoral arterden arteriyel kan basıncı kayıtları alındı. . Kardiyak hasarı gösteren; Kreatin kinaz MB (CK-MB), Laktat dehidrogenaz (LDH), Aspartat aminotransferaz (AST), Alanin aminotransferaz (ALT) enzimlerinin ölçümü için kan örnekleri alındı.

Dokсорubisin ile kardiyak iskemi oluşturulan sıçanlarda, CK-MB, LDH, AST enzimleri ve CO, IVSd, LVIDd artmış, QT, Prseg, QRS süreleri uzamıştır. Dokсорubisin ile birlikte CsA ve FK506 verilen sıçanlarda, bu parametreler kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda artış göstermiştir. Dokсорubisin ile bozulan kalp fonksiyonları ve enzim aktivitelerinde, CsA veya FK506 ile düzelme olmadı.

Anahtar Kelimeler: Dokсорubisin, Siklosporin A, Takrolimus, Sıçan, Kardiyomiyosit

**THE ROLE OF “MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE (MPTP)”
AGAINST DOXORUBICIN-INDUCED MITOCHONDRIAL
INJURY ON RAT HEART MYOCYTE**

Dilek SIVRI

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 antracyclines 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 membrane potential collapse. 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. We tested whether inhibition of mitochondrial permeability transition by cyclosporin A would prevent doxorubicin-induced myocardial and mitochondrial dysfunction.

Twenty rats were divided into 4 groups. Acute model of DOX exposition were performed in rats with a single intraperitoneal bolus (10mg/kg body weight). Follow-up was 8 days. Rats received either CsA (1mg/kg of body weight) or tacrolimus (0.1 mg/kg of body weight FK506, a cyclosporin derivative with no inhibitory effect on the mitochondrial transition pore, or saline until follow-up. The general observations, mortality, electrocardiographic (ECG) changes (PR, QT, R-R, and QRS intervals, Prseg), echocardiographic (ECHO) changes (CO, IVSd, LVIDd, EF%, FS%), blood pressure, biomarker enzymes' activities like lactate dehydrogenase (LDH) and creatine phosphokinase-MB (CPK-MB), biochemical parameters such as aspartate aminotransferase (AST) alanine aminotransferase (ALT) were monitored after last dose.

The acut model, doxorubicine increased left ventricular IVSd, LVIDd. Administration CsA with Doxorubicin more distruped heard function especially CO, IVSd, and LVIDd than only doxorubicin treated group. CsA elongated the QT, Prseg, and QRS. Distruped heart function and enzyme activities by doxorubicin were not improved by tacrolimus or by CsA.

These findings suggest that co-administration of CsA with doxorubicin did not improved heart tolerance to doxorubicin manifested in vivo. Co-administering of CsA or the less toxic FK506 with doxorubicin may not be useful in protecting heart from doxorubicin-induced-cardiotoxicity in humans.

Keywords; Doxorubicin, Cyclosporin A, Tacrolimus(FK506), Rat, heart mitochondria

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 ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ	x
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. DOKSORUBİSİN	3
2.1.1. Doksorubisin'in Tanımı, Klinik Kullanımı ve Yapısı	3
2.1.2. Doksorubisin'in Etki Mekanizması	4
2.1.3. Yan Etkileri	5
2.1.4. Kemoterapik Bir Ajan Olan Doksorubisin Ve Doksorubisine Bağlı Gelişen Kardiyotoksisite	5
2.2. MİTOKONDİRİ	10
2.2.1. Mitokondrinin Tarihçesi	10
2.2.2. Mitokondri Yapısı	11
2. 3. 'MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE'	18
2.3.1. mPTP' nin Moleküler Yapısı	18
2.3.2. Siklofilin-D' nin Rolü	19
2.3.3. Adenin Nükleotit Translokaz' ın Rolü	20
2.3.4. İskemi	21
2.4. SİKLOSİPORİN A	23
2.5. TAKROLİMUS (FK506)	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.	27
4.BULGULAR	31
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	37
6.KAYNAKLAR	42
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

ADP	: Adenozin difosfat
ANT	: Adenin Nükleotit Translokaz
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
ATP	: Adenozin trifosfat
BKA	: Bong kreik acid
Ca ⁺²	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
CYC-D	: Siklofilin D
CK-MB	: Kreatin kinaz MB
CsA	: Siklosiporin A
DOX	: Doksorubisin
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
EKG	: Elektrokardiyografi
EKO	: Ekokardiyografi
FADH ₂	: Flavın adenin dinükleotid
FK506	: Takrolimus
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LVDP	: Ventrikül basınç gelişimi
MDA	: Malondialdehit
NO	: Nitrik Oksit
O ₂ ⁻	: Süperoksit radikali
Pi	: Fosfat
Ramp	: R dalgasının amplitüdü
RCC	: Reaktif karbon bileşikleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
TİM	: Transporter inner membrane
TOM	: Transporter outer membrane

TABLO ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

Tablo 4.1.	Deney öncesi, sonrası sıçanların vücut ağırlık ortalamaları.....	31
Tablo 4.2.	Sıçanların plazma CK-MB, LDH AST ve ALT Enzim aktiviteleri.	32
Tablo 4.3.	Sıçanların EKG parametre değerleri	33
Tablo 4.4:	Sıçanların EKO parametre değerleri	33
Tablo 4.5.	Sıçanların kan basıncı değerleri.	36
Şekil 2.1.	Doksozobisin'in Yapısı.....	3
Şekil 2.2.	Doksozobisin- DNA Kompleksi.....	4
Şekil 2.3.	Mitokondrinin ultrastructurel görüntüsü.....	12
Şekil 2.4.	Piruvat, aminoasit ve yağ asitlerinin metabolizasyonu sonucu asetil CoA oluşumu ve Krebs döngüsüne girişi	13
Şekil 2.5.	Respiratuar enzim zinciri	14
Şekil 2.6.	Respiratuvar enzim zinciri	16
Şekil 2.7.	mPTP' nin yapısı.....	19
Şekil 2.8.	İskemi	22
Şekil 2.9.	Siklosporin A' nın kimyasal yapısı	23
Sekil 2.10.	Tacrolimus (FK506)'un yapısal şekli.....	26
Şekil 4.1.	Eko değerleri.....	35
Resim 3.1.	Kan basıncı ve EKG kayıt alma işlemleri.....	28
Resim 3.2.	Sıçanların EKG ve Kan basıncı kaydı. QRS, PR, QT, Prseg, ve R-R parametrelerinin EKG dalgası üzerinde gösterilmesi.	29
Resim.3.3.	M-mode ekokardiyografi cihazı.....	30

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde kişilerin ölüm oranını artıran önemli nedenlerden birisi de kardiyovasküler hastalıklardır. Kardiyovasküler hastalıklar, gelişmiş toplumlarda majör hastalık ve ölüm sebebidirler. Oluşumunda etkin neden ise kardiyak ve endotelyal oksidatif hasarlardır (1).

Doksorubisin (DOX) medikal onkolojide kullanılan kuvvetli antikansorejen etkisi olan antrasiklin antibiyotığıdır. Baş ve boyun tümörleri, göğüs kanseri, kan kanseri, idrar kesesi ve testiküler kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Yüksek kümülatif dozlarda yan etkisi olarak, doz bağımlı kardiyomiyopati oluşturmaktadır (2).

Kemoterapiye bağlı kardiyotoksisite, kemoterapötik ajanların kullanımlarının kısıtlanmasına neden olan en önemli yan etkilerden olup ilk kez 1960'lı yıllarda doksorubisin tedavisi alan çocuklarda kalp yetmezliği geliştiğinin fark edilmesiyle dikkat çekmiştir. Doksorubisinin kardiyotoksik yan etkisi antitümör ajan olarak kullanımını engellememiş, kardiyotoksik etkilerin azaltılma çalışmaları ön plana çıkmıştır.

Doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin engellenmesi düşüncesi deneysel çalışmaları gündeme getirmiş, deneysel çalışmalar sayesinde patofizyoloji, tanı ve önlenmesi ile ilgili olumlu sonuçlar elde edilmiştir (3).

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.

Doksorubisin, mitokondride bulunan ‘mitochondrial permeability transition pore (mPTP)’lerin açılımına ve hücre nekrozuna neden olmaktadır. Siklosiporin A (CsA) ise, mPTP’yi inhibe edici olarak bilinmektedir. İskemi reperfüzyon hasarında oluşan, özellikle kalp ve beyin nekrozlarının oluşumu, CsA kullanılarak azaltılabileceği gösterilmiştir(4).

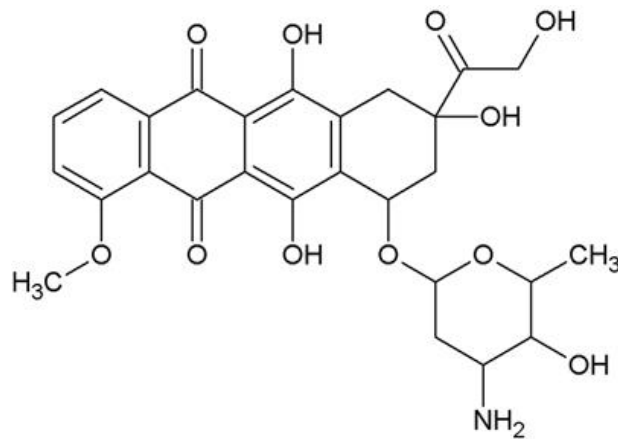
Bu çalışmada, siklosiporin A’nın, doksorubisinin oluşturduğu, kalbin hasarlı hücrelerinde yapacağı iyileştirici etkiyi, fizyolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler ile belirleyerek, önemli bir hastalık grubu olan kalp yetmezliği iyileşmesinde siklosiporin A’nın öneminin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DOKSORUBİSİN

2.1.1. Doksorubisin'in Tanımı, Klinik Kullanımı ve Yapısı

Doksorubisin, *Streptomyces peucetius* kültürlerinden elde edilen, antibiyotik niteliğinde, antrasiklin grubu bir kemoterapötik ajandır. Doksorubisin, geniş spektrumlu bir ajan olmasından dolayı, gastrointestinal tümör, sarkomlar, lenfomalar, göğüs ve yumurtalık kanseri gibi katı tümörler ve lösemi gibi kan kanserlerinde halen kullanılan bir ilaçtır (2). Antrasiklinlerin kimyasal yapıları karmaşıktır, bir aglycone ve bir amino şeker grubundan oluşmuş quinon formundaki doksorubisin Şekil 2.1'de gösterilmiştir (1).



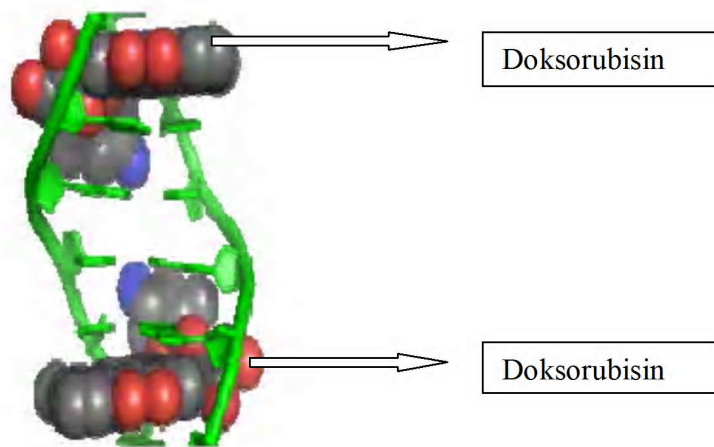
Şekil 2.1.Doksorubisinin Yapısı (1).

2.1.2. Doksorubisin'in Etki Mekanizması

Antitümör Etki (DNA'ya Bağlanma)

Antrasiklin bileşikler 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 (4). 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 (5, 6).

Antrasiklinlerin, apoptotik hücre ölümünü indükledikleri gösterilmiştir (6). Doksorubisin, DNA çift zincirini, bu zincir içinde komşu guanozin-sitozin baz çiftleri arasına enine yerleşerek etkiler (7). 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 irreversible 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 (7).



Şekil 2.2. Doksorubisin- DNA Kompleksi

2.1.3. Yan Etkileri

Teratojenik, mutajenik ve karsinojeniktir (7). 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 (8).

Kardiyak yan etki olarak ise; doksorubisinin neden olduğu üç çeşit kardiyotoksisite belirlenmiştir. 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 (9-11).

Doksorubisin vezikan bir ilaçtır. Ekstravazasyonu doku nekrozuna neden olur (7). Doksorubisin idrarı geçici olarak kırmızıya boyar; bunun klinik bir önemi yoktur.

2.1.4. Kemoterapik Bir Ajan Olan Doksorubisin Ve Doksorubisine Bağlı Gelişen Kardiyotoksisite

Antitümör antibiyotiklerden olan doksorubisin ve diğer antrasiklinler 1960' larda *Streptomyces peucetius* var. *caesius* kültürlerinden izole edilmiş olan bir grup glikozidik antibiyotiklerdir (1).

Antrasiklin antibiyotiklerin kullanımının artmasıyla, doksorubisin kemoterapisinin birkaç şiddetli komplikasyonu olarak bilinen akut ve kümülatif doz bağımlı kardiyotoksisite fark edilmiştir (7). Kemoterapötiklerin en önemli yan etkilerinden biri olan kardiyotoksisite ilk kez doksorubisin tedavisi alan çocuklarda kalp yetmezliği geliştiğinin fark edilmesiyle dikkat çekmiş, kullanımları arttıkça diğer antrasiklinlerin ve 5-fluorourasilin de kardiyotoksik etkilerinin olduğu belirlenmiştir (3).

Kardiyotoksisite, genellikle terapötik moleküllerin kalp fonksiyonu üzerine olan olumsuz etkilerini geniş bir yelpazede tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Kanseri tedavisi için kullanılan çeşitli kemoterapötikler kardiyovasküler komplikasyon riskiyle ilişkilidir. Kardiyak fonksiyon defektleri semptomatik veya asemptomatik olabilmektedir (4). Bu sorunun klasik örneği doksorubisin gibi antrasiklinler, hematolojik maligniteler ve solid tümörlerin tedavisinde kullanımıdır (7, 8).

Antikanser ilaçlara bağlı potansiyel kardiyovasküler toksisite, QT süresinin uzaması, aritmiler, myokard iskemisi, hipertansiyon, tromboembolik komplikasyonlar (antionjiojerik ajanlar) (6) ve myokardiyal fonksiyon bozukluğunu içine alır (7). 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 (8). Akut kardiyotoksisite görülmekle birlikte en sıkıntılı formu geç meydana gelen ve kalbin yapısal bozukluklarıyla karakterize olandır (9). Sol ventrikül duvar kalınlığında, myokard kütleğinde ve sol ventrikül kompliyansında azalmaya neden olur (6, 10, 11).

Antrasiklinlerin indüklediği kardiyotoksisite akut, kronik ilerleyici ve geç başlayan kronik ilerleyici olarak sınıflandırılmıştır (12). 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 (9). 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 (9, 13). Klinik miyokarditle 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 kardiyak toksisite, konjestif kalp yetmezliği ve LV disfonksiyonudur (14, 15). Geç başlangıç kronik ilerleyici toksisite, genellikle ilk bir yıldan sonra terapi tamamlama ve nükslerden sonra görülür (15). 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 (15, 16). Geç kardiyak toksisitede en önemli risk faktörü kümülatif tedavidir (16).

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 (17).

Patafizyolojisi

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 (18). Antrasiklin tedavisinin, özellikle hücre içi demir seviyesini artırarak, ROS oluşumunda etkili olduğu pek çok çalışma ile desteklenmiştir. Son çalışmalar, antrasiklinlerin sadece ROS yapımını artırarak kardiyotoksisite oluşturmadığını göstermiştir (18, 19).

ROS'un dışında antrasiklinlerin, kardiyomiyosit apoptozisi ve nekrozisi, normal sarkomer yapısında bozukluk, yeterli kasılma için gereken enerji eldesindeki bozukluklar gibi etkileri olduğuna dair kuvvetli deliller vardır (18). Son yıllarda antrasiklinlerin, kalp yetmezliğini modüle eden, neuregulin/herregulin-Erb/HER2 ve 'cell salvage kinase' yolları gibi kompensatör ve prosurvival mekanizmalar üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar yoğunlaşmıştır (20, 21).

Oksidatif Stres ve Demir Hipotezi

Antrasiklinlerin kimyasal yapısı karmaşıktır. Bu ilaçlar bir aglycone ve bir şekerden oluşan yapıdadır. Aglycone ; bir tetrasiklin halkasıyla birlikte quinon ve hidroquinon yarımlarından oluşmaktadır. Kinon yarımları toksikolojik öneme sahiptir (18, 22). Antrasiklinin, tetrasiklin halkasındaki bir elektronun azalması semiquinon serbest radikalinin oluşmasına sebep olur. Bu radikal anoksik ortama nispeten yerleşmiştir ama normoksik durumlar altında oksijene verilen eşleştirilmemiş elektron, süperoksit radikallerin şekillendirilmiş halidir. Uygun flavoproteinler, kompleks I katalizi azaltılmış semiquinon radikaller NADH yada NADPH'dan elektron alan ve veren antrasiklinlerdir. Reaksiyonun bu dizisi redoks döngüsü olarak bilinir (18). Son derece zarar verici ve nispeten içinde bir miktar süperoksit radikallerin sayısız oluşumu için yeterli değildir. Antrasiklinin redoks döngüsü sitoplazma, mitokondri ve sarkoplazmik retikulumda olur. Antrasiklin aracılı serbest radikal zararlarının ilk hedefleri peroksidasyona meyilli, yağdan zengin çeşitli duvar membranlarıdır. Bu radikal zararın sonuçları, makromoleküler hedefli daha fazla saldırı için bir çok kararlı ve yüksek toksik etkili aldehit üretimidir. ROS oluşumu ile indüklenen antrasiklinlerin quinon kısmı, nitrik oksit, nitrik oksit sentaz, peroksinitrit ve süperoksit anyonunun oluşumuna yol açan oksidatif stresi indükler (18, 23).

ROS üretimi, kardiyotoksisite oluştururken birçok mekanizma içerir. Bu mekanizmalar kardiyak proteinlerin ekspresyonunda bozulma, hücrel ve mitokondriyal kalsiyum homeostazisinde bozulma, mitokondrideki DNA lenzyonlarının indüklenmesidir. ROS oluşumu, mitokondrideki enerji oluşumunu, ATP' nin elektrotansportunu bozar. Bunun yanında miyoflamentleri ve sitoskeleton proteinlerin yapısının bozulmasına neden olabilir (18, 23).

Mitokondriyal Apoptozis ve Nekrozis Yolu

Antrasiklinlerin kardiyak yan etkileri iki mekanizma içerir. Bunlar birbirleri ile etkileşim halinde olan oksidatif stres ve apoptozisdir. Bu hücrel olayların pek çoğu ROS tarafından oluşturulur. ROS kardiyomiyosit ölümüne sebep olur (18, 23). Antrasiklinlerin indüklediği kardiyomiyopati için primer mekanizmanın ROS oluşumu olduğu gösterilmiştir. ROS'un yaptığı hasarlar, apoptotik ve nekrotik yolların aktivasyonunu takiben kalp hücrelerinin ölümü, antrasiklinlerin indüklediği kardiyotoksisite için bize etkin bir açıklama sağlar (23, 24). Antrasiklinlerin in vivo olarak hayvanlara verilmesi, apoptotik hücre ölümünün geliştiğini göstermiştir. Hayvan kültür çalışmalarında da bu apoptotik ve nekrotik hücre ölümünün, antrasiklinler tarafından indüklendiği belirtilmiştir. Antrasiklinle muamele edilen hastaların endomiyokardiyal biyopsilerinde, apoptozis ve mitokondriyal hasar belirtileri gösterilmiştir (23, 25). Antrasiklin verilmesi esnasında kardiyomiyosit ölümü apoptozisin biyokimyasal özelliklerini içerir ve aynı zamanda hücre nekrozunun morfolojik görüntülerini gösterir. Antrasiklinin indüklediği kalpteki apoptozis, mitokondriyal yolla oluşmaktadır. Bu mitokondride bulunan Bax, sitokrom c ve caspase-3 gibi maddeleri gerektirir (23, 24). Antrasiklin muamelesi mitokondrilerde oksidatif stresi artırır ve intrasellüler kalsiyum seviyesini bozar. Artmış intrasellüler kalsiyum, mitokondriyal kalsiyum seviyesini de artırır. İşte bu kalsiyum seviyesinin artması da muhtemelen 'mitochondrial permeability transition pore (mPTP)'ların geçirgenliğini artırır. Böylelikle membran potansiyeli değişir, dış membranının geçirgenliğini artırır, mitokondrilerde şişmeye neden olur, mitokondriler içindeki, sitokrom c gibi apoptotik faktörlerin dışarıya geçişini artırır. Sitozoldeki sitokrom c, adaptör proteini apoptozis proteaz aktivatör protein -1 (Apaf-1), dATP ve caspase-9 ile kompleks oluşturur (24).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, mitokondriyal permabilitedeki bir artışın, mPTP' nin açılmasına ve apoptotik hücre ölümü başlatıcısı olduğu gösterilmiştir. Nekrozis, erişkin insan kalp hasarlarının pek çok formunda oluşur ve bunlardan biride antikanserojen ilaçların kardiyotoksik etkisidir. Yeni çalışmalar göstermiştir ki, mPTP apoptozisi başlatmaz, bu kompleks nekroziste önemli bir role sahiptir (26, 27). Siklosporin A (CsA), mPTP' yi inhibe edici olarak bilinir. İskemi reperfüzyon hasarında oluşan, özellikle kalp ve beyin nekrozislerinin oluşumu, CsA kullanılarak azaltılabileceği gösterilmiştir. Cyc-D' si olmayan fareleri kullanan çalışmacılar, mPTP' nin hücre nekrozisinde önemli rol oynadığını göstermiştir. Cyc-D'si olmayan fareler, kalsiyum artışı ile indüklenmede olduğu gibi, nekrotik uyarımlara direnç göstermiş, ama klasik apoptotik artırıcıları ile muamele edilince ölmüşlerdir (28, 29).

Alternatif Hücre Ölümleri

Son yıllarda, hücre ölümünün onkozis ve otofaji olarak alternatif iki tipi daha belirlenmiştir. Hücre onkozisinin özelliği ki bu genellikle sitoplazmanın şişmesiyle ve sarkomerin plazma membranının erken parçalanmasıyla ilişkilidir (30). Son çalışmalar, antrasiklinlerin indüklediği hücre ölümünün, mPTP bağımlı mekanizmalarla çok iyi programlanabildiğini göstermiştir (31). Mitokondriyal kalsiyum birikmesi nedeniyle artan ROS, mPTP' yi açarak, mitokondriyal şişmeye ve ATP eksikliğine neden olur. Tüm bunlarda nekrotik hücre ölümünü başlatır (24). Otofaji ise, genelde sitoplazmik bileşenlerin, organellerin yada uzun ömürlü proteinlerin, toplu yıkımını ve geri dönüşümünü sağlayarak, koruyucu bir görev üstlenir. Kalpteki otofaji önemlidir. Özellikle normal şartlar altında, düşük bazal seviyelerde, yaşlı organelleri temizleyerek, hücrenin canlı kalmasını sağlar. İskemi-reperfüzyon hasarı ve kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklara cevap olarak daha fazla çalışır. Otofajik hücrelerin miyokardiyal fonksiyon bozukluklarında önemli olduğu, doksorubisinin indüklediği miyokardiyal hasarda, otofajik hücrelerin ölümüyle açıklanır. Antrasiklinler, mitokondri üzerinde apoptozis, nekrozis ve özellikle ROS yapımının artması, hücrede aşırı kalsiyumun birikmesi, DNA lezyonlarını artırması, yollarıyla hücre ölümüne neden olur (32).

2.2. MİTOKONDİRİ

Sağlıklı bir kalpte, mitokondriyal Ca^{+2} konsantrasyonundaki değişiklikler, oksidatif fosforilasyonun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. ATP varlığı bu rolün etkinliğini artırır. Kalp hücresinin iş yükü arttığında ATP kullanımı artar. Bu da spesifik Ca^{+2} taşıyıcı yollarının aktivasyonunu sağlar, ki bunlar mitokondriyal matrikste sitozolik Ca^{+2} geçişini artırır. Kalp çok çalıştığında Ca^{+2} sitozolden mitokondriye geçer. Böylece mitokondriyal dehidrogenaz aktivasyonu artar. Bu aktivasyon NADH'ı artırır . NADH ise ATP yapımını artırır. Buna Ca^{+2} bağımlı mitokondriyal etki diyoruz. Ca^{+2} mitokondriye geçince proton transloke edici ATPaz enzimini stimule eder. Bu mekanizmaların hepsi ATP' nin nasıl yapıldığını açıklamayı sağlar. Ca^{+2} kalp hücresinde, sitozolde ve mitokondrilerde belirli bir konsantrasyonda bulunur. Aralarında bir denge vardır. Patolojik şartlarda sitozoldeki Ca^{+2} yükselir. Bu durum mitokondride aşırı Ca^{+2} yüklenmesine neden olur. Sonuçta mitokondriyal hasar artar ve mitochondrial permeability transition pore (mPTP)' lar açılır . Porların açılması hasarı daha da artırır (33).

2.2.1. Mitokondrinin Tarihçesi

Mitokondriyi temsil eden yapılara ait ilk yayınlar 1841 yılına, hücre nükleusunun tanımlanmasının birkaç yıl sonrasına kadar uzanmaktadır. Mitokondriler ilk olarak 1857'de Kollicker tarafından çizgili kas hücrelerinden izole edilmistir. 1850'den itibaren yapılan çalışmalarla beraber bu organelin ilk tanımlanmasını 1890'da Altman yapmıştır ve bioblast olarak adlandırdığı bu yapıların her hücrede olduğunu, hücre için hayati önem taşıyan fonksiyonları olduğunu açıklamıştır. 1898 yılında Benda, bu organellere Yunanca iplik şeklinde granül anlamına gelen mitokondri terimini ilk kez kullanmıştır. 1913'de Warburg solunum enzimlerinin mitokondride olduğunu, 1925'de Keilin sitokrom sistemini ve 4 yıl sonrasında da Warburg ve Negelein oksidasyon ve redüksiyon olaylarını tanımlamışlardır. Krebs döngüsünün 1937'de tanımlanmasından sonra, 1957'de Krebs ve Kornberg adenosin difosfat (ADP) fosforilasyonu sonrasında ATP oluşumunu ve fosforilasyonun oksijen tüketimine bağımlı olduğunu, 1961'de ise Mitchell ATP oluşmasını sağlayan kemiozmotik teoriyi ortaya koymuştur .

1963'de Nass ve arkadaşları tarafından mitokondri içerisinde DNA karakteristiğinde ipliksi yapıların varlığı tanımlanmış, yine 1963'de Engel ve Cunningham tarafından iskelet kasında ilk kez anormal mitokondrilerle karakterize ragged-red lifler (ragged-red

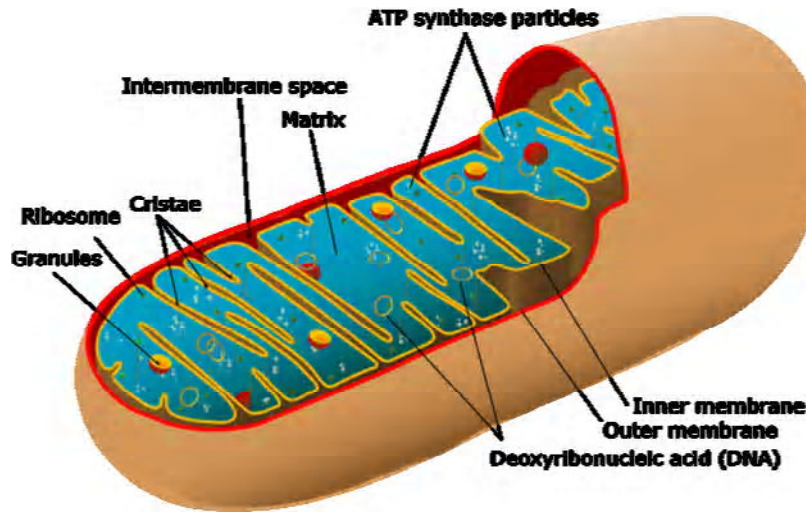
fiber, RRF) gösterilmiştir. 1981’de Anderson ve arkadaşları tarafından mitokondriyal genomun dizisi tam olarak gösterilmiştir . 1988’de ise ilk patojenik mtDNA mutasyonu bildirilmiştir. İlk kez 1962’de Luft ve arkadaşlarının tiroidden bağımsız hipermetabolizması olan myopatili bir vakayı bildirmesinden sonra mitokondriyal hastalıklarla ilgili incelemeler başlamış ve sayıları gün geçtikçe artmıştır. Luft hastalığı olarak adlandırılan bu hastalık çok nadir görülmesine rağmen klinik tanımı ve biyokimyasal çalışmaları ile mitokondriyal hastalıktan şüphelenilen hastaların klinik ve patolojik araştırmaları için yol göstermiştir.

1990’lar mitokondriyal genom için önemli bir dönem olmuştur. Genetik ve biyokimyasal çalışmalarla mitokondriyal hastalığın etiyopatogenezinin aydınlatılmasında önemli gelişmeler kaydedilmiştir (33).

2.2.2. Mitokondri Yapısı

Mitokondriler, ökaryotik hücrelerin sitoplazmik hacminin önemli bir kısmını işgal ederler. Mitokondriler hücrenin enerji santralleri olup, atasal bir ökaryotik hücreye entegre olan bir prokaryottan köken aldığı düşünülmektedir. Bu düşüncenin en önemli kanıtı da bakterilerinkine benzer halkasal DNA taşımaları ve otonom çoğalma kapasitesine sahip olmalarıdır (34). Mitokondri karaciğer serbest yağ asidi oksidasyonunda, ATP ve bazal reaktif oksijen metabolitleri oluşumunda temel rol oynar (35). Mitokondriler olmasaydı, hayvan hücreleri tüm ATP’ leri için anaerobik glikolize bağımlı kalacaklardı. Glikoz metabolizması mitokondrilerde tamamlanmaktadır. Mitokondri içine pirüvat alınmakta ve burada oksijen ile CO₂ ve H₂O’ya okside edilmektedir. Bu işlem tek başına glikolizden elde edilenden 15 kat daha fazla ATP yapılmasına yol açar. İnsanda matur eritrositler dışında tüm ökaryotik hücrelerde bulunurlar. 1-7 mikrometre uzunluğunda, çubuk şeklinde veya 2-3 mikrometre çapında küresel yapılardır. Dış membran, iç membran, krista, matriks ve membranlar arası boşluktan oluşmaktadır (Şekil 2.3). Mitokondriler ve hücre sitozölü arasında sürekli madde alışverişi olmaktadır. Mitokondriler apoptoziste ve hücrel homeostazda görev alır. Hücrelerin enerji üretim merkezleridir. Oksidatif fosforilasyon veya respiratuar zincir, yağ asidi β-oksidasyonu, trikarboksilik asit (TCA) döngüsü (Krebs döngüsü) gibi temel metabolik olaylar mitokondride gerçekleşir. Üre siklusunda, aminoasit, kolesterol, yağ, steroid ve nükleotidlerin metabolizmasında da görev alırlar. Ca⁺² ve Mg⁺² depolayarak, gerektiğinde hücreye verir. Mitokondri, çift zarla çevrili olan ve kendi

DNA'sını taşıyan bir organeldir. Bu sayede, enerji ihtiyacının daha fazla olduğu hücrelerde, hücre bölünmesinden bağımsız olarak sayılarını artırabilirler. Mitokondrinin bol olduğu kahverengi yağ dokusunda mitokondriyal iç membranda Termogenin adlı bir protein kanalı vardır. Bu kanal proteini, proton gradiyentinin oluşumuna olanak vermez ve oksidatif reaksiyonlardan sağlanan enerjiden ATP üretimi yerine ısı oluşumu gerçekleşir (33, 35).



Şekil 2.3. Mitokondrinin ultrastructurel görüntüsü.

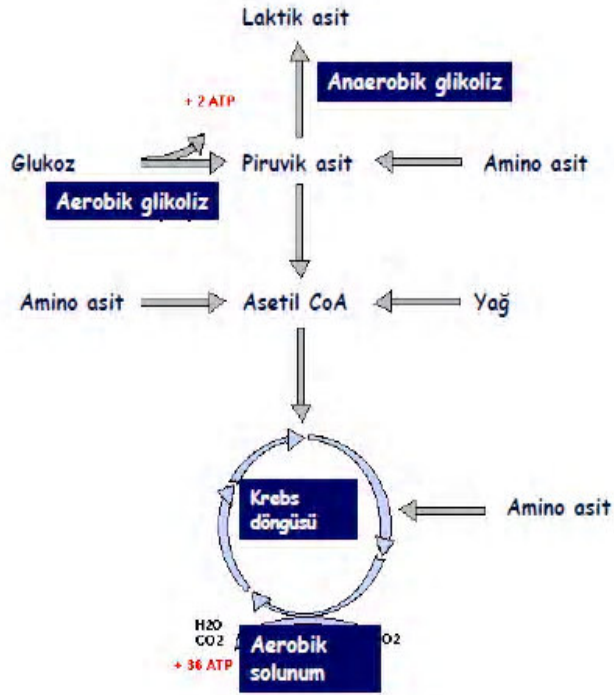
a) Dış membran : Lipid tabaka, içinde büyük sulu kanallar oluşturan ve *porin* diye adlandırılan bir transport proteininin çok sayıda kopyalarını içerir. Bu nedenle bu zar küçük proteinleri de içine alan 5000 dalton veya daha az molekül ağırlığına sahip tüm moleküllere geçirgen olan bir eleği andırır. Bu tip moleküller, intermembran aralığa geçebilir; fakat bunların çoğu geçirgen olmayan (impermeabil) iç zarı geçemezler. Bu nedenle, içerdiği küçük moleküllerle intermembran aralık, kimyasal olarak sitozolle aynı olmasına rağmen, matriks kısmı bu moleküllerin içinden ileri derecede seçilmiş olanlarını içermektedir. Mitokondriyal proteinlerin çoğu sitoplazmik ribozomlarda sentezlenir. Nükleer genom tarafından kodlanan proteinler, mitokondriye, dış membrandan TOM protein kompleksi, iç membrandan ise TIM protein kompleksi yardımıyla geçerler (36).

b) İç membran : Krista adı verilen katlanmalar ile yüzeyini artırır. İç membranın selektif geçirgen olması nedeniyle protein ve metabolitlerin matrikse taşınması için spesifik mekanizmalar mevcuttur. İç membranda bulunan taşıyıcı proteinler membrana geçirgenlik özelliğini kazandırır. İç membranın lipid içeriğinde bir fosfolipid olan kardiolipin yoğun olarak bulunur. Yoğun fonksiyonel özelliğinden dolayı iç membranın protein oranı diğer membranlara göre daha yüksektir. %70 protein, %30 lipid ve çok az kolesterol içerir. İç zar 5 ayrı enzim kompleksinden oluşur: I, II, III, IV ve V. I ve IV arasındaki kompleksler elektron transportunda, V. kompleks ise ATP sentezinde rol alır. Bu komplekslerin, mitokondri içerisindeki rolleri ve motilite ile ilişkisi detaylı olarak araştırılmıştır (37, 38).

c) Membranlar arası alan

40-80 ° genişliğindedir . Bazı enzimler bulunur . Sitozole eşdeğer içeriktedir (33, 39)

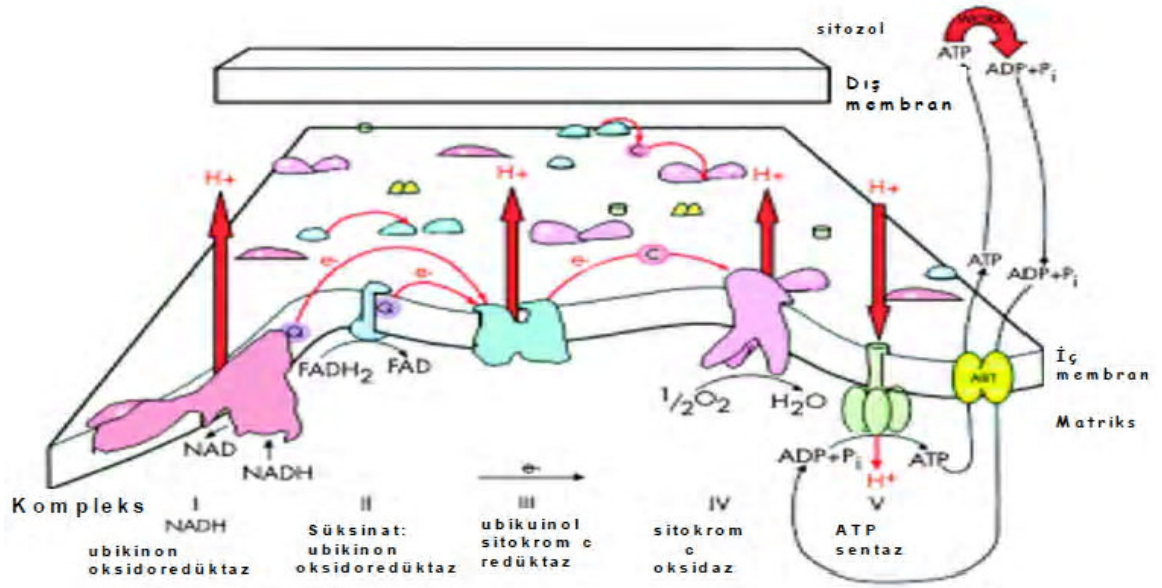
d) Matriks: İç membranın çevrelediği alandır. Bol miktarda protein molekülü, çeşitli reaksiyon enzimleri, mtDNA, ribozomlar ve tRNA bulunur. Matrikste granül sayısı azdır. Hücre içindeki kalsiyum ve magnezyum fazlası mitokondriye geçerek granüllere bağlanır. Depolanan bu katyonlar tekrar sitozole verilir. Trikarboksilik asit (TCA veya Krebs döngüsü) matrikste gerçekleşir. Piruvat, aminoasit ve yağ asitlerinin metabolizması sonucu oluşan asetil koenzim A (asetil CoA) Krebs döngüsüne girerek okside olur (33).



Şekil 2.4. Piruvat, aminoasit ve yağ asitlerinin metabolizasyonu sonucu asetil CoA oluşumu ve Krebs döngüsüne girişi (33).

Respiratuar Enzim Zinciri

Bir hücrede çok sayıda mitokondri bulunmaktadır. Mitokondri ve krista sayısı hücrenin metabolik aktivitesi ile doğru orantılıdır. Mitokondriler hücrede, mikrotübüllere bağlı olarak hareket ederler ve enerji ihtiyacı olan bölgeye yerleşirler. Mitokondri iç membranında 5 ayrı enzim kompleksi vardır. Kompleks I, II, III ve IV ETZ' nin bir bölümüdür, kompleks V ise ATP sentezini yapar. Sistemin tam olarak çalışabilmesi için mitokondri iç zarında bulunan taşıyıcılara gereksinim vardır. ETZ' de elektronların son alıcısı oksijendir. Vücudun oksijen tüketiminin çoğu burada gerçekleşir (40).

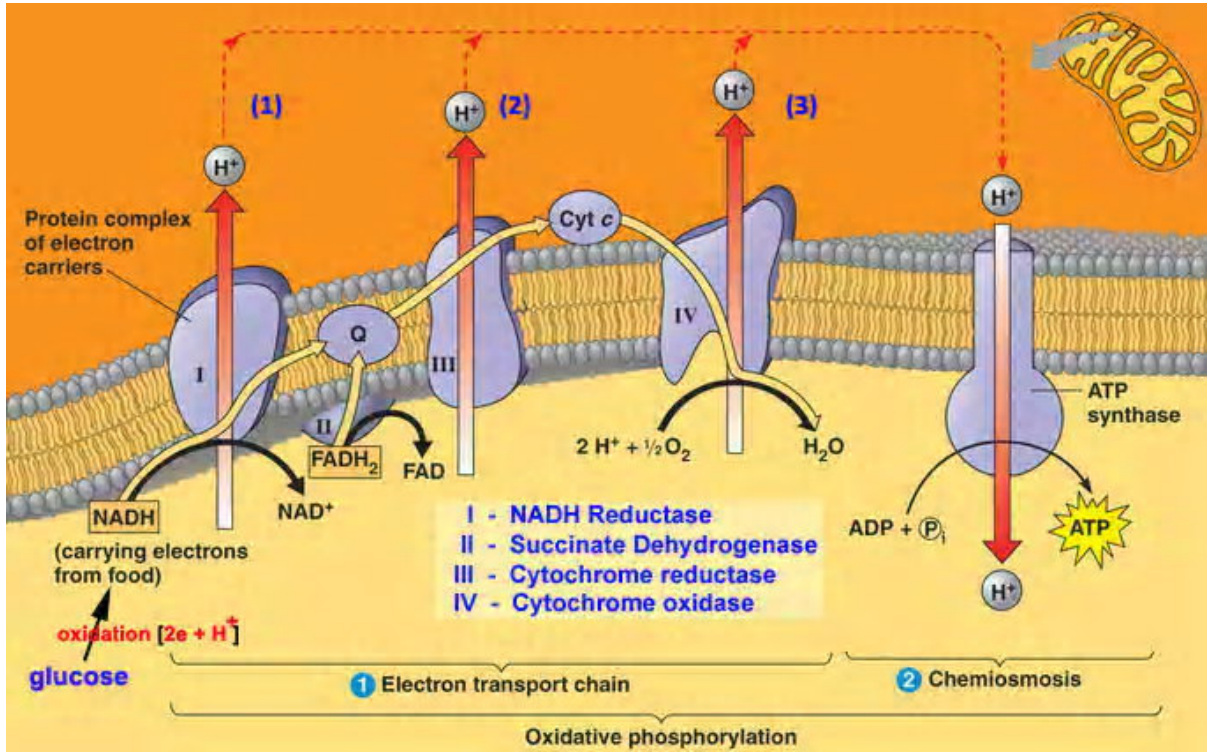


Şekil 2.5. Respiratuar enzim zinciri (33).

Mitokondriyal matriks içinde piruvat, aminoasit ve yağ asitlerinin metabolizması sonucu oluşan asetil koenzim A (asetil CoA), Krebs döngüsüne girerek okside olur (Şekil 3). Karbondioksit (CO_2), indirgenmiş flavin adenin dinükleotid (FADH_2) ve nikotinamid adenin dinükleotit oluşur (40).

Yüksek enerjili elektronlar FADH_2 ve NADH tarafından taşınarak mitokondri iç membranındaki proteinler vasıtasıyla moleküler oksijene ulaştırılır ve H_2O oluşur. Karbonhidrat, protein ve yağ metabolizması sırasında oluşan bu indirgenmiş kofaktörler (NADH ve FADH_2) Kompleks I, III ve IV içinden elektron akışı, matriksten membranlar arası boşluğa proton akışıyla eşleşmiştir. Elektronlar, Kompleks I ve II'den geçerek Ubikinon'a ulaşırlar. Ubikinon elektronların ve protonların bir mobil taşıyıcısı olarak görev görür; elektronları kompleks III'e taşır. Protonlar ise membranlar arası alanda birikerek bir proton gradiyenti oluşturur. Kompleks III de elektronları bir başka bağlayıcı mobil zincir halkası olan sitokrom C'ye geçirir. Kompleks IV, elektronları, indirgenmiş sitokrom c'den O_2 'e transfer eder. O_2 molekülleri Kompleks IV içine yayılır ve Hem a_3 deki demir bakır çekirdek tarafından yakalanır (Hem a bakır içermez). O_2 elektronları sever ama tek seferde 4' den az elektron eklenmesi O_2 ni kararsız hale getirir. Bu yüzden Hem a_3 4 elektron toplanana kadar O_2 ve elektronları birbirinden ayır tutar. Bu 4 elektron Hem a_3 'te biriktiğinde hepsi birden O_2 'e verilir. Sonuç olarak su

oluşur. Membranlar arası alanda biriken protonların matrikse geçme eğilimleri ATP sentezini aktive eder. Bir dönme hareketi oluşmasına sebep olurlar. Bu rotasyon hareketi ADP' ye yüksek enerjili fosfat (Pi) gruplarının transferini katalizleyerek ATP sentezini sağlar (33, 34, 35) (Şekil.2.6).



Şekil 2.6. Respiratuvar enzim zinciri (35)

Kompleks I (NADH dehidrojenaz kompleksi)

Kompleks I, iç mitokondriyal membrana gömülmüştür; NADH bağlayan yeri matriks tarafındadır ki burası, matrikste oluşan NADH ile etkileşebilir. En geniş kompleksdir. NADH ile gelen elektronlar ilk olarak Flavinden, daha sonrada 7 adet demir kükürt merkezden ubikinona geçer. Kompleks I, elektronların NADH'den ubikinona transferini katalize eder (40, 41).

Kompleks II (süksinat dehidrojenaz kompleksi)

Kompleks II, sitrik asit döngüsünde membrana bağlı enzimdir; elektronların süksinattan ubikinona transferini katalize eder. FADH₂ yapısındaki elektronlar, kompleks II tarafından ubikinona aktarılır.

Ubikinon (Koenzim Q, UQ), solunum zincirindeki tek lipid yapılı moleküldür. Elektronları kompleks III' e taşır. Hareketli elektron taşıyıcılarından birisidir. En küçük elektron taşıyıcısıdır (40, 41).

Kompleks III (sitokrom bc₁ kompleksi)

Kompleks III, elektronları ubikinondan sitokrom C'ye transfer eder. Kompleks III yapısında bulunan sitokrom c₁, elektronları sitokrom c yapısına aktarmaktadır. İçinde 6 Hem grubu ve 2 demir kükürt merkez bulunur. Kompleks III, bir proton pompası olarak fonksiyon görür; kompleksin asimetrik oryantasyonunun bir sonucu olarak, UQH₂'nin UQ'a okside olmasıyla serbestleşen protonlar, membranlar arası boşluğa salınırlar ve böylece bir proton gradiyenti oluşur ki bu proton gradiyenti, mitokondriyal ATP sentezi için önemlidir (40, 41).

Sitokrom C

Sitokrom C, elektronları kompleks IV' e taşır. Hareketli elektron taşıyıcılarından biridir. Normalde sitozolde görülmez. Sitozolda görülmesi apoptozisi işaret eder. Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive etme faktörü) ve caspase-9 ile birleşerek apoptozom adlı bir kompleks oluşturur ve diğer caspase' ları aktive ederek hücreyi ölüme götürürler (40, 41).

Kompleks IV (sitokrom oksidaz)

Kompleks IV, elektronların sitokrom C'den O₂'ne transferini ve böylece O₂'in suya indirgenmesini katalize eder. Yapısında Hem a ve Hem a₃ bulunur. Kompleks IV vasıtasıyla sitokrom C'den O₂'e elektronların akışı da matriksten membranlar arası boşluğa net proton hareketine neden olur (40, 41, 42).

ATP Senteaz

ATP senteaz iki alt üniteden oluşur; Fo ve F₁. Fo iç membrana gömülüdür ve matrikstekki F₁ ile etkileşir. Fo subünitinden proton akışı sırasında F₁'de meydana gelen rotasyon hareketi, ADP' ye yüksek enerjili fosfat gruplarının transferini katalizleyerek, ATP sentezini sağlar. Oluşan ATP, sitozolde bulunan ADP ile adenin nükleotid translokator (ANT) yardımıyla değiştirilir. Sonrasında ATP sitozolde gerekli yerlerde kullanılır. Matrikse yollanan 4 proton başına 1 mol ATP sentezlenir (40, 41, 43).

Komplekslerin enerji transfer fonksiyonu, sahip oldukları prostetik gruplar sayesinde olmaktadır. Kompleks I yaklaşık 40 peptid zinciri ve 7 adet demir kükürt kümesine sahiptir. Kompleks III de 20 protein zinciri, 6 hem grubu ve 2 demir kükürt kümesi bulunur. Kompleks IV de ise; 26 protein zinciri, 2 bakır atomu içeren 2 hem a₃, bakır atomu içermeyen 2 hem a bulunur (41).

İnsan hücresinde çok sayıda mitokondri bulunmaktadır. Mitokondri sayısı 1000-100000 arasında değişmektedir ve dokudan dokuya farklılık göstermektedir. Mitokondri ve krista sayısı hücrenin metabolik aktivitesi ile doğru orantılıdır. Sinir hücreleri, iskelet kas hücreleri ve kalp kas hücrelerinde yüksek sayıda mitokondri mevcuttur. Dokunun enerji gereksinimi ve bununla ilişkili olarak, gereken enerjiyi sağlaması için oksidatif fosforilasyona bağımlılığı, karaciğerde olduğu gibi sabit olabilir veya kasda olduğu gibi sürekli değişkenlik gösterebilir (43).

2. 3. 'MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE'

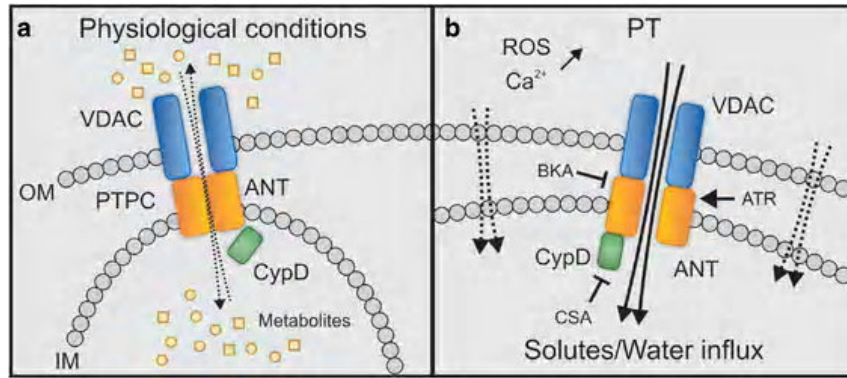
Çok yüksek Ca⁺² konsantrasyonunda, mitokondriyal iç membrandaki mPTP açılır ve 1,5 KDa dan daha küçük molekülleri içeri alır. Ca⁺² bu porun açılmasında tek başına etkili değil fakat adenin nükleotit azalması, yüksek fosfat, en önemlisi oksidatif stres yüksek konsantrasyondaki Ca⁺² un mPTP açılımındaki duyarlılığını artırır (44, 45). mPTP açılınca hücre ölümü kaçınılmazdır. mPTP' nin açılımının 2 sonucu var:

1. si mPTP açılınca membranlar arası boşlukta bulunan hidrojen gradiyenti kaybolur. Hidrojen matrikste artar. Bunun artması pH' ı değiştirir. Bu durumda ATPsenteaz tersine aktivite gösterir. Glikolizle ve kalan mitokondri tarafından üretilen ATP' leri parçalar. ATP seviyesi normal tutulamaz. Hücrenin metabolizması ve iyonik denge bozulur, nekrotik hücre ölümleri olur (46-48).

2. sonuçta ise mPTP açılımı ile matriks dışı iyonların matrikse geçişi artar. Dolayısıyla matriks osmolaritesi artar. Bu matrikse başka madde ve suyun gelmesine neden olur ve mitokondri şişer. Böylece matriks hacmi artar. Kristalar açılır. Matriks basıncı artar. Bu da dış membrana baskı yapar. Sonuçta membran rüptür olur ve mitokondri parçalanır. Sitokrom C ve apoptotik maddelerin sitozole çıkışı artar. Apoptotik hücre ölümü gerçekleşir. Eğer ATP seviyesini korumak için porlar tekrar kapanırsa apoptotik ölüm daha fazla olur (49, 50).

2.3.1. mPTP' nin Moleküler Yapısı

Geçirgenlik fenomeninde ilk olarak mitokondri şişmesine Ca^{+2} yüklemesinin eşlik ettiği, 40 yıldan daha eskiden beri biliniyordu. Başlangıçta mitokondri iç membranında spesifik olmayan Ca^{+2} duyarlı fosfolipazların aktivasyonu ile permeabilitenin sağlandığı düşünülüyordu (51, 52). Ancak Haworth ve Hunter'ın öncü çalışmaları (53, 54) ile daha sonra Crompton ve arkadaşları muhtemel bir gözeneğin varlığını gösterdi (55). Ancak son verilere göre üç proteinin bu porun yapısına katıldığı şeklinde güçlü kanıtlar elde edilmiştir. Bunlar mitokondriyal peptidil-prolil siklofilin-D diye bilinen cis-trans izomeraz, adenin nükleotid translocase (ANT) ve mitokondriyal fosfat taşıyıcı (PİC) (56) (Şekil 2.7). mPTP iç ve dış mitokondriyal membranları arasında uzanan ve iç mitokondriyal membrandan ANT (adenin nükleotid translocator) proteini içeren çok sayıda proteinlerden, oluşan bir kanaldır. ANT' ye bağlanan mitokondriyal matriks proteini siklofilin D (Cyc-D), asıl mPTP oluşumu regülatörü kabul edilir. mPTP açılışına Cyc-D ve ANT rolü tartışılıyor olsa da, CsA' nın (Siklosporin A), Cyc-D ile etkileşimi mPTP' nin iyi bilinen inhibitörüdür (54).



Şekil 2.7. mPTP' nin yapısı.(53)

2.3.2. Siklofilin-D' nin Rolü

1988 yılında Crampton ve arkadaşları siklosporin A' nın, mPTP açılmasını inhibe ettiğini buldu (57). Bu laboratuvarında daha sonra ki çalışmada CsA ve analoglarının, mPTP inhibisyonunu Cyc-D (siklofilin D) üzerinden gösterdiği bulundu (58, 59). CsA analoglarının mPTP inhibisyonu yapmasına benzer etkiyi alakasız bir ilaç olan Sangliflerin-A' nın da Cyc-D üzerinden gösterdiği tespit edildi (60). Cyc-D nükleer gen

tarafından kodlanmış 18 kDa ağırlığında bir matriks proteindir (61, 62). CsA, reoksijenasyon hasarından başlangıçta kardiyak miyositlerde koruyucu etki gösterir. Özellikle langendorff perfüze kalpte reperfüzyon hasarından koruma gösterilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda pek çok laboratuvarıda bunu desteklemiştir. İskemi ve reperfüzyonda enzim salınımı, infarkt sayısı hemodinamik fonksiyonu kullanarak hasar belirlemede iskemi reperfüzyon global ve regional modelleri kullanılarak teyit edilmiştir. Cyc- D' nin olmadığı hayvanlarda kalpte ve beyinde iskemi reperfüzyon hasarından korunma daha iyi olmuştur. Cyc- D olmayan farelerde infarkt sayısında azalma görülmüştür. Böylece mPTP' nin iskemi reperfüzyon hasarından korunmada potansiyel bir role sahip olduğu kanısına varılmıştır (58).

Özellikle stroke olduğunda, koroner trombozis olduğunda, kalp hastalıklarında CsA'nın kardioprotection olarak kullanılması ideal değildir. Çünkü bu Ca^{+2} duyarlı protein fosfataz (kalsinörin) inhibisyonuna neden olur. Kalsinörin inhibe olunca kalp fonksiyonlarına zarar verir. Ayrıca istenmeyen bir immunosupresif etkide söz konusudur. Sangliferin-A ise mPTP açılımını sınırlar ama bu etkisini kalsinörin üzerinden yapmaz. Siklosporin A ve Sangliferin-A tedaviye reperfüzyonun başında eklendiğinde kalpte infarkt sayısı azaltılabilir.

Reperfüzyonda mPTP açılması ROS yapımını ve infarkt alanı artırır. İnflamasyon da, reperfüzyon esnasında infarkt alanı artırır. CsA verildiğinde hem immunosupresyon yaptığı için, hemde mPTP yi kapattığı için iyi diyebiliriz. Ama kalsinörin inhibisyonu bu iyileştirici etkiyi baskılıyor olabilir. Bu nedenle Takrolimus kalsinörini etkilemediği için CsA'dan iyi olduğu sonucuna varılabilir (63, 64, 65).

2.3.3. Adenin Nükleotit Translokaz' ın Rolü

Labaratuar çalışmalarında ATP, ADP ve BKA (Bong kreik acid)' nın mPTP inhibitörü olduğu gösterilmiştir. BKA aslında bir ANT inhibitörüdür. Bunlar Ca^{+2} ın poru açma duyarlılığını azaltıcı etki gösterirler (54, 58, 66). BKA verildiği zaman Ca^{+2} ile açılması gereken por açılmaz. Diğer yandan adenin nükleotit azlığı ise ANT' yi pozitif yönde etkiler ve poru açar . Ayrıca adenin nükleotit azlığında diğer bir ANT inhibitörü olan CAT (Carboxyatractyloside) aktive olur ve mPTP' yi açar. BKA ve CAT , ANT üzerinde zıt çalışır. Biri poru açarken diğeri kapatır (67) .

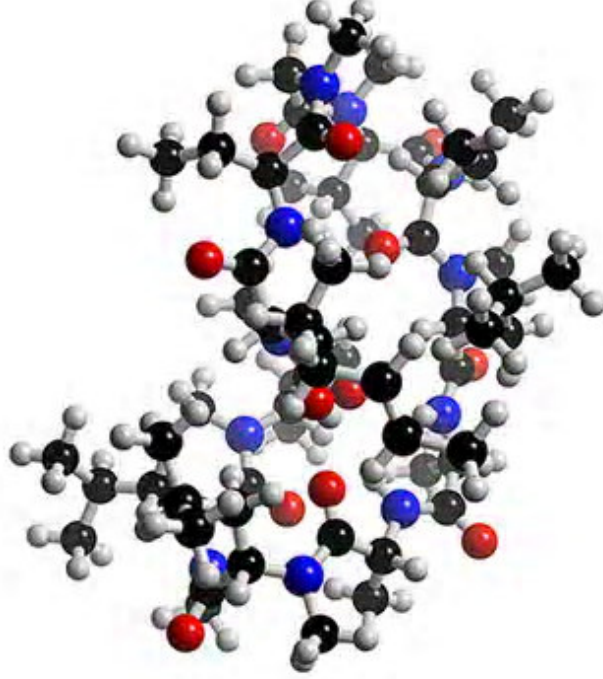
Bir mPTP modelinde de siklofilin D, ANT' ye bağlanır. Ca^{+2} tarafından bu por uyarılır ve konformasyonal değişiklik oluşur (68).

2.3.4. İskemi

Reperfüzyonda mitokondriyal Ca^{+2} artar. Böylece mitokondriyal hasar da artar (55). Reperfüzyonda Ca^{+2} girişı durdurulduğunda hasar azalır. Oksidatif stres varsa Ca^{+2} artmış ise mPTP yi açar. Ca^{+2} ve fosfat artmışsa, adenin nükleotit azalmışsa mPTP' nin açılması gerekir. İskemide pH 7' nin altında olduğu için bütün bu şartlar oluşmasına rağmen mPTP açılmaz. Hidrojen içerde artınca dışarı çıkmak ister ve Ca^{+2} ile yarışır. Ama hidrojen kazanır. Uzamış iske mi sonrası pH 6,5 den az olduğunda mPTP' ler kapalı kalır. Bu, ölçümlerle de gösterilebilir. İskemide ATP' nin azalması ve Ca^{+2} artması fosfolipaz A-2 de bir azalmaya neden olur. Proteazlarda azalma olur. Tamir edici bu enzimler azalınca hücre onarımı olmuyor. Aynı zamanda mitokondride BAX translokasyonu olur. Sitokrom C salınımı başlar ve dış membran geçirgenliği artar. Bunlarda apopitozise neden olur (69) (Şekil.2.8).

2.4. SİKLOSİPORİN A

CsA, *Tolypocladium inflatum* Gams. adlı mantardan elde edilen 11aminoasitli (undekapeptit), siklik bir polipeptittir (70). 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 lipidlerde oldukça fazla çözünme özelliği vardır (71). Açık kimyasal formülü aşağıdaki gibidir (72) (Şekil 2.9.)



Şekil 2.9. Siklosporin A'nın kimyasal yapısı (72)

Tolypocladium inflatum Gams adlı fungustan elde edilen, 11 amino asitli, siklik bir polipeptiddir. Kimyasal formülü C₆₂-H₁₁₁₁-N₁₁-O₁₂'dir. CsA, mide-barsak kanalından kısmen absorbe edilir. Bu nedenle ağızdan alınabilir; fakat biyoyararlanımı az ve fazla değişkendir (73). 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 (74). Plazma proteinleri içinde, albümin'e düşük oranda bağlanırken özellikle YDL (yüksek dansiteli lipoprotein) ve DDL (düşük dansiteli lipoprotein)'den oluşan lipoproteinlere yüksek oranlarda bağlanır (70). CsA halen kullanılan bağışıklık sistemini baskılayıcı ilaçların etkinliği (efikasitesi) en yüksek olanıdır. Antijenin tanınmasını izleyen otoimmün cevabın erken basamaklarını önleyerek bağışıklık sistemini baskılar (75).

İmmünoşüpresif ve ikincil nöronal hasarı önleyici etkisini CD4 tipi T lenfositlerinde, T lenfosit resptörünün 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 (76). 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 interlökin-2 geninin körükleyici bölgesindeki bağlanma yerine bağlanarak gen transkripsiyonunu ve böylece IL-2 üretimini artırır. Bu olay zincirinde siklosporin, mitokondri membranında yer alan mPTP' yi inhibe ederek hücre içine Ca^{+2} girişini engeller. Böylece Ca^{+2} bağımlı kalsinörin inhibisyonu, IL-2 üretimini engelleyerek antijenik uyarının IL-2 aracılığı ile T lenfositlerinde etkinlik artması ve proliferasyonunu önler. İntraselüler Ca^{+2} düzeyinin artması hücre hasarına neden olmaktadır (71, 72). Siklosporin A, mPTP' yi inhibe ederek hücre içi Ca^{+2} düzeyini düşürür ve hücre ölümünü engeller (73). 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 (74).

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 (74, 77, 78).

2.5. TAKROLİMUS (FK506)

Takrolimus (FK506), genellikle transplantasyon sonrası tedavide kullanılan 822 daltonluk (monohidrat) lipofilik makrolid bir antibiyotiktir (79). (Sekil 2.10) Doğal bir ürün olup antinomycete, *Streptomyces Tsukubaensis*'den elde edilir. Bu organizma ilk defa 1984 yılında Japonya'da Tsukaba dağı çevresindeki toprak örneklerinde bulundu (80).

FK506' nın kendisi siklosporinle (kalsinörin inhibisyonu yoluyla etki eden bir immünosupresant) karşılaştırıldığında yaklaşık 100 kat daha aktiftir ve toksisitesi daha azdır (81, 82).

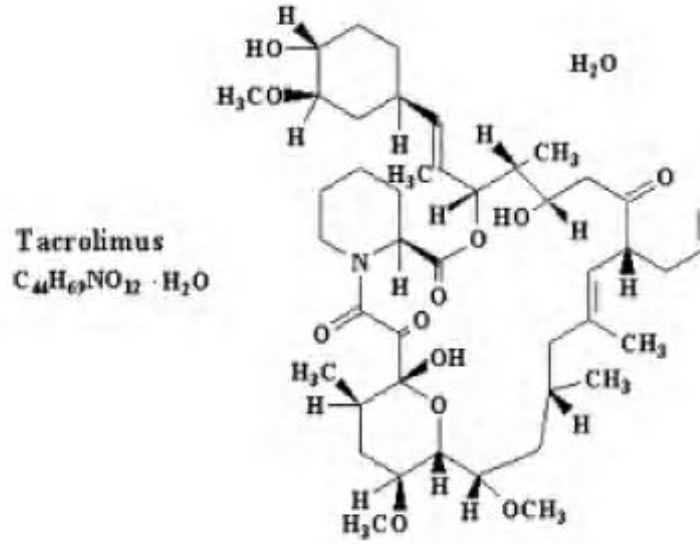
Takrolimus sitozolik hedef proteini FKBP (FK506- binding protein)' e yüksek afinite ile, özellikle FKBP-12' ye, bağlanarak kalsinörini bloke eder. Kalsinörin, kalmoduline(CaM) ve Ca^{+2} ile kontrol edilen bir protein fosfotazdır, heterodimerik bir yapıya sahiptir ve iki alt üiteden oluşur. (Sekil 2.10) Kalsinörin A: katalitik ve kalmodulinin bağlandığı bölüm, kalsinörin B: Ca^{+2} 'un bağlandığı bölüm. Sitokin gen aktivasyonunu artıran transkripsiyon faktörleri (örneğin; Nucleer factor activating Tlenfosit (NF-AT), NF-kB, Aktive protein-1(AP-1), AP-3) kalsinörinin direkt yada indirekt substratlarıdır. Takrolimusun kalsinörini inhibe etmesi, immün ve inflamatuvar cevapta rol oynayan sitokinlerin, lenfokinlerin ($_L-2$, $_L-3$, $_L-4$, TNF-, IFN) ve adhezyon moleküllerinin oluşumunu baskılar(83, 84).

Sıçan renal ve karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı çalışmalarında takrolimusun koruyucu etkileri gösterilmiştir.

FK506 yüksek lipofiliktir, farmakokinetik özelliği kişinin yağ doku oranına göre değişir. Oral biyoyaralanımı %22'dir ve pik konsantrasyona bir ile dört saatte ulaşır (85).

Karaciğer metabolik sisteminde CYP-3A (sitokrom-3A) enzim ailesi ile ilk geçiş eliminasyonuna uğrar ve metabolitleri safra ile atılır, ancak %1-3 kadarı idrarda bulunur (86, 87). Yan etkileri dozla ilişkilidir. Başlıca yan etkileri nefrotoksisite, nörotoksisite, hipertansiyon, DM ve anormal glikoz intoleransıdır. Nefrotoksisite afferent arterioller vazospazmına bağlı renal kan akımında azalma ile oluşur. Kalsiyum kanal blokörü ve anjiotensin reseptör blokörü ile bu yan etki azaltılabilir. Nörotoksisite %8-20 oranında; temör, baş ağrısı, uykusuzluk, daha nadiren afazi, konfüzyon ve psikoz biçiminde ortaya

çıkar. DM ve/veya glikoz intoleransı %10-20 oranında görülür (87). Filler ve ark. yaptığı çalışmada pankreas adacık hücrelerinde vakuolizasyon, degranülasyon gibi morfolojik değişikliklerin takrolimus alımının kesilmesinden sonra düzeldiği gösterilmiştir (88).



Sekil 2.10.Tacrolimus (FK506)'un yapısal şekli

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, 24.11.2011- 15.4.2012 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı ve Hakan Çetinsay Deneysel Araştırma Merkezi laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Proje, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu ve Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Başkanlığının 11/101 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 330 ± 30 gr olan 40 adet Spraque Dawley cinsi erkek sıçanlar ile gerçekleştirildi. Sıçanlar deney süresince $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ arasında olan ortamda barındırıldı. Gece gündüz döngüsü otomatik alet 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

Ağırlıkları ölçülen (ilk vücut ağırlığı= VA_1) hayvanlar rastgele 4 gruba ayrıldı.

1. Kontrol Grubu (KONT): Sekiz gün boyunca serum fizyolojik (SF) solüsyonunun [0,1 m l/kg/hayvan başına intraperitoneal (i.p.)] verildiği grup, n=10

2. Doksorubisin (DOX) grubu: Birinci gün tek doz doksorubisin (10 mg/kg/hayvan başına 1 ml i.p.) ve 8 gün boyunca 0,1 ml intraperitoneal SF verilen grup, n=10

3. Doksorubisin + Siklosiporin A (DOX+CsA) grubu: Birinci gün tek doz doksorubisin (10 mg/kg/hayvan başına 1 ml i.p.) ve sekiz gün boyunca siklosiporin A (1 mg/kg/ hayvan başına 0,1 ml i.p.) verilen grup, n=10

4. Doksorubisin + Takrolimus (DOX+FK506) grubu: Birinci gün tek doz doksorubisin (10 mg/kg/hayvan başına 1 ml i.p.) ve sekiz gün boyunca takrolimus (0,1 mg/kg/ hayvan başına 0,1 ml i.p.) verilen grup, n=10

8 günlük ilaç enjeksiyonları sonrasında hayvan ağırlıkları tekrar belirlendi.

3.3. ARTERYAL KAN BASINCI ÖLÇÜMÜ

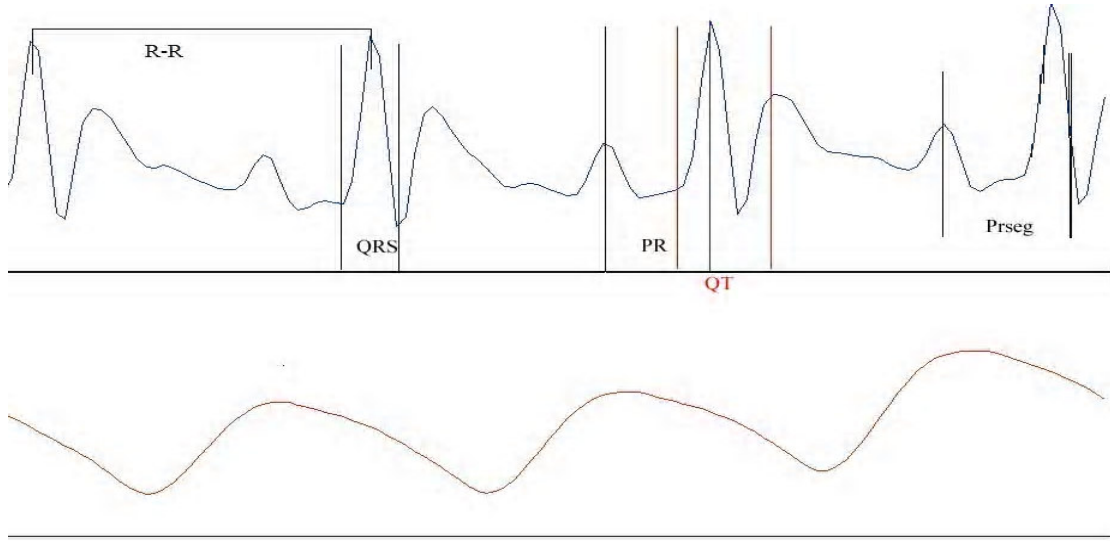
Arteriyel kan basıncı direkt yöntemle femoral arterden kaydedildi. Kayıt öncesi, 8 gün intraperitoneal ilaç enjeksiyonu yapılan sıçanlara anestezi uygulandı. Ketamin (39,35 mg/kg) ve xylazine (4.96 mg/kg karışımı i.p). Anestezi altındaki sıçanın sol kasık bölgesindeki femoral artere paralel olacak şekilde 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 tüplerine alınarak -20°C'de saklandı.



Resim 3.1. Kan basıncı ve EKG kayıt alma işlemleri.

3.4. EKG KAYDI

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.

3.5. EKOKARDİYOĞRAFI

Hayvanların ekokardiyografi çekimleri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Kardiyoloji Ana Bilim Dalında gerçekleştirildi. İşlem öncesi hayvanlara i.p. anestezi uygulanarak sedasyon sağlandı. Net görüntü elde edebilmek için hayvanların göğüsleri traş edildi. Ölçüm "Vivid 7 Pro Dimension 08GE Health Care" cihaz ile 10S prob kullanılarak yapıldı. 2 boyutlu M-mode ekokardiyografi kullanıldı. Parasternal uzun eksen görüntü bulunduktan sonra kayıtlar alındı.

M-mode ekokardiyografi; sol ventrikül diyastol ve sistol sonu çapı, interventriküler septum ve posterior duvar kalınlıkları, sol atriyum çapı, aort çapının ölçülmesinde, sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunun ve fraksiyonel kısalmanın belirlenmesinde kullanılır.

Ekokardiyografide hayvanların kalp hızı (HR), kardiyak output (CO), interventriküler septum diyastolik çapı (IVSD), sol ventrikül diastol sonu çapı (LVIDd), ejeksiyon fraksiyonu (EF) fraksiyonel kısalma (FS) değerlerdirildi



Resim.3.3. M-mode ekokardiyografi cihazı

3.6. BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİN ÖLÇÜMÜ

Kreatin kinaz-MB (CK-MB), laktat dehidrogenaz (LDH), aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) Aktivite Tayinleri: Doksorubisinin oluşturduğu kalp hasarını belirlemede; CKMB, LDH, AST ve ALT gibi enzim aktivite tayinleri, klinik biyokimya laboratuvarında, rutinde kullanılan alet ve kitler ile yapıldı (Beckman Coulter LX-2000, Beckman kids). CKMB, LDH, AST ve ALT nin ölçüm değerlerinin birimi U/l'dir.

3.7. 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 $\text{ort.} \pm \text{SH}$ olarak gösterildi. $P < 0.05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmanın başında hayvanlar vücut ağırlıkları tartıldıktan sonra gruplara rastgele dağıtılmıştır (Tablo 4.1). 8 günlük infüzyon işleminin bitiminden sonra kalp fonksiyonları ve enzim aktiviteleri ölçülmeden önceki hayvan vücut ağırlıkları tekrar belirlenmiştir. Kontrol grubunda ağırlık değişimi olmamıştır. Dox grubundaki hayvanlarda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ağırlık kaybı olmuştur ($F_{3,23}= 17,051$; $p < 0,005$). Dox+FK506 grubundaki hayvanlarda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ağırlık kaybı olmuştur ($F_{3,23}= 17,051$; $p < 0,002$). Dox+CsA gruplarında, kontrole göre vücut ağırlıklarında anlamlı bir azalma belirlenmiştir ($F_{3,23}= 17,051$; $p < 0,001$).

Tablo 4.1. Deney öncesi, sonrası sıçanların vücut ağırlık ortalamaları
Değerler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak verildi (n=10)

Gruplar	İlk Ağırlık(gr)	Son Ağırlık (gr)
Kontrol	393 $\pm$ 7	389 $\pm$ 16
Dox	331 $\pm$ 27	296 $\pm$ 19 ^a
Dox+CsA	325 $\pm$ 38	264 $\pm$ 52 ^b
Dox+FK506	318 $\pm$ 28	264 $\pm$ 39 ^c

Kontrol: Serum fizyolojik (SF) verilen grup, Dox: Tek doz doksorubisin ve 8 gün boyunca SF verilen grup, Dox+CsA: Tek doz doksorubisin ve 8 gün boyunca siklosporin A verilen grup, Dox+FK506: Tek doz doksorubisin ve 8 gün boyunca takrolimus verilen grup.

a: Dox grubu, kontrol grubundan farklıdır. $p < 0,005$

b: Dox+CsA grubu, kontrol grubundan farklıdır. $p < 0,002$

c: Dox+FK506 grubu, kontrol grubundan farklıdır. $p < 0,001$

4.1. BİYOKİMYASAL ÖLÇÜM VERİLERİ

Kardiyak hasarı belirlemede klinikte rutin olarak değerlendirilen CK-MB, LDH AST ve ALT enzim düzeyleri, sekiz günlük ilaç uygulamasının son infüzyonundan sonra ölçülmüştür. Sıçanların plazma CK-MB, LDH AST ve ALT enzim aktiviteleri Tablo 4.2’de verilmiştir. Doksorubisinle birlikte siklosporin A verilen hayvanların plazma CKMB düzeyleri , doksorubisin ve sadece serum fizyolojik uygulanan kontrol grubu hayvanlarına göre anlamlı oranda yüksek bulundu ($F_{3,23}= 18,803$; $p<0,0001$). Gruplar arasında plazma LDH değerleri yönünden anlamlı bir farklılık bulunmadı ($F_{3,23}= 1,009$; $p<0,409$). Doksorubisin , doksorubisin ile takrolimus ve siklosporin A verilen hayvanların plazma AST düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı bir artma görülmüştür ($F_{3,23}=15,470$; $p < 0,001$). AST düzeyleri ise doksorubisin ve doksorubisin ile takrolimus verilen gruplarda, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir ($p < 0,045$; $p < 0,002$).

Tablo 4.2. Sıçanların plazma CK-MB, LDH AST ve ALT Enzim aktiviteleri.Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verildi (n=10)

Gruplar	CKMB(U/L)	LDH (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)
Kontrol	62 $\pm$ 15	244 $\pm$ 76	78 $\pm$ 17	61 $\pm$ 05
Dox	70 $\pm$ 09	189 $\pm$ 76	153 $\pm$ 09 ^c	48 $\pm$ 10 ^d
Dox+CsA	134 $\pm$ 25 ^{a,b}	286 $\pm$ 141	164 $\pm$ 37 ^c	49 $\pm$ 09
Dox+FK506	87 $\pm$ 19	255 $\pm$ 85	144 $\pm$ 23 ^c	41 $\pm$ 04 ^e

CKMB: Kreatin kinaz, LDH: Laktat dehidrogenaz, AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz.

a: Dox+CsA grubu, Kontrol ve Dox gruplarından istatistiksel anlamda farklıdır, $p < 0,0001$.

b: Dox+CsA grubu, Dox+FK506 grubundan istatistiksel anlamda farklıdır, $p < 0,001$.

c: Dox+CsA, Dox, Dox+FK506 grupları kontrolden farklıdır, $p < 0,001$.

d: Dox grubu, kontrolden farklıdır, $p < 0,045$.

e: Dox+FK506 grubu, kontrolden farklıdır, $p < 0,002$.

4.2. GRUPLARIN EKG PARAMETRE DEĞERLERİ

Sıçanların, sekiz günlük ilaç uygulamasının son infüzyonundan sonra EKG kayıtları alınmıştır. PR, QT, R_R, QRS intervalleri ve PR segmenti süreleri Tablo 4.3’de verilmiştir. QT intervali gruplar arasında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($F_{3,23}=2,214$; $p<0,118$). QRS intervali gruplar arasında karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($F_{3,23}= 2,970$; $p < 0,056$). PR intervali gruplar arasında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($F_{3,23}= 1,218$; $p < 0,329$). PR segmenti gruplar arasında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmuştur ($F_{3,23}= 3,545$; $p < 0,033$). Post Hoc Tukey testi kontrol ve doksorubisin+siklosiporin A grupları arasındaki farkın anlamlı olduğunu göstermiştir ($p < 0,039$)

Tablo 4.3. Sıçanların EKG parametre değerleri . Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verildi (n=10)

Gruplar	PR (ms)	QT (ms)	Prseg(ms)	R_R (sn)	QRS (ms)
Kontrol	0,027 $\pm$ 0,002	0,046 $\pm$ 0,003	0,005 $\pm$ 0,003	0,188 $\pm$ 0,014	0,031 $\pm$ 0,001
Dox	0,030 $\pm$ 0,004	0,046 $\pm$ 0,003	0,006 $\pm$ 0,001	0,227 $\pm$ 0,057	0,031 $\pm$ 0,001
Dox+CsA	0,030 $\pm$ 0,005	0,050 $\pm$ 0,003	0,011 $\pm$ 0,006 ^a	0,224 $\pm$ 0,053	0,034 $\pm$ 0,001
Dox+FK506	0,027 $\pm$ 0,004	0,046 $\pm$ 0,003	0,006 $\pm$ 0,001	0,187 $\pm$ 0,049	0,030 $\pm$ 0,003

a: Dox+CsA grubu, kontrolden farklıdır . p < 0,039

4.3.GRUPLARIN EKO PARAMETRE DEĞERLERİ

Sıçanların, sekiz günlük ilaç uygulamasının son infüzyonundan sonra EKO kayıtları alınmıştır. CO, IVSD, LVIDd, EF, FS değerleri Tablo 4.4’ de verilmiştir. Post Hoc Tukey testi, doksorubisin, doksorubisin+siklosiporin A, doksorubisin+takrolimus verilen grupların IVSD değerlerinin kontrol grubundan farklı olduğunu göstermiştir ($F_{3,23}= 64,867$; p < 0,0001). Kontrol grubuna göre, Doksorubisin, Doksorubisin+siklosporin A, Doksorubisin+Tacrolimus verilen gruplarda, LVIDd değerinde istatistiksel olarak anlamlı oranda artış göstermiştir ($F_{3,23}= 47,215$; p < 0,0001).

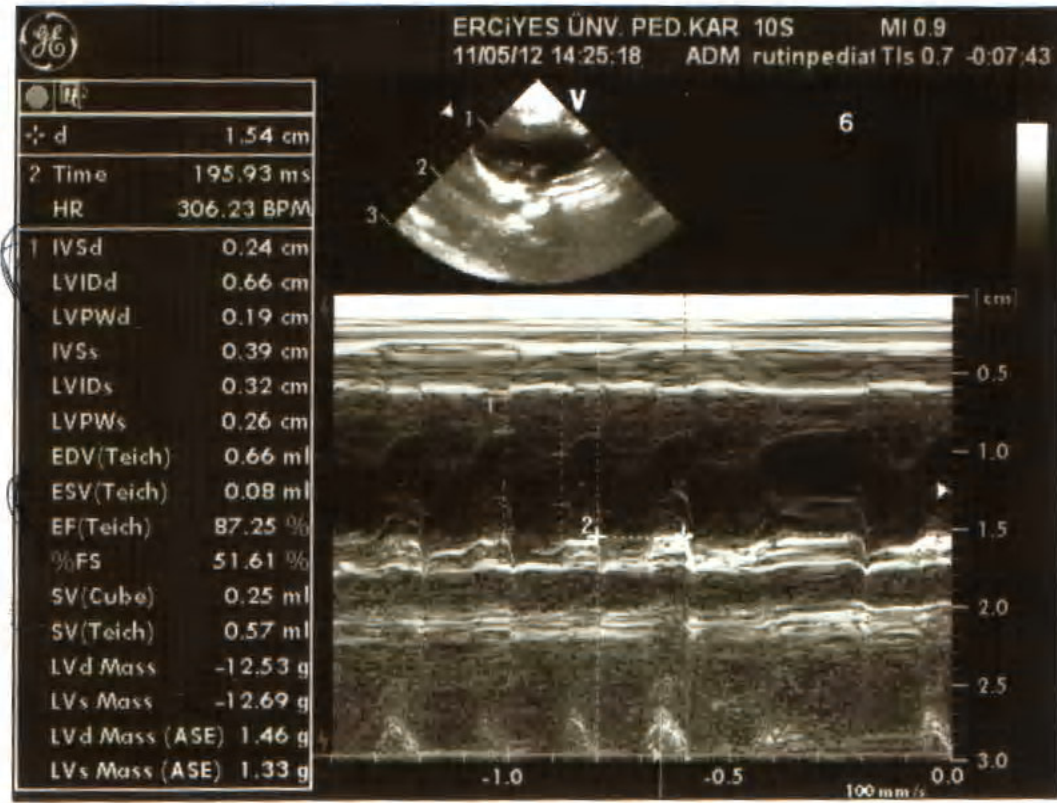
Tablo 4.4: Sıçanların EKO parametre değerleri. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verildi (n=10)

Gruplar	CO(min)	IVSd(mm)	LVIDd(mm)	% EF	% FS	HR(BPM)
Kontrol	0,026 $\pm$ 0,015	0,236 $\pm$ 0,015	0,608 $\pm$ 0,113	89 $\pm$ 3	48 $\pm$ 8	408 $\pm$ 25
Dox	0,025 $\pm$ 0,008	1,633 $\pm$ 0,197 ^a	4,338 $\pm$ 0,806 ^b	87 $\pm$ 4	51 $\pm$ 5	278 $\pm$ 69
Dox+CsA	0,021 $\pm$ 0,014	1,576 $\pm$ 0,191 ^a	4,448 $\pm$ 0,681 ^b	84 $\pm$ 2	47 $\pm$ 3	279 $\pm$ 60
Dox+FK506	0,028 $\pm$ 0,009	1,928 $\pm$ 0,366 ^a	4,686 $\pm$ 0,894 ^b	83 $\pm$ 9	48 $\pm$ 10	334 $\pm$ 63

CO (kardiyak output) , IVSD (interventriküler septum diyastolik çapı), LVIDd (sol ventrikül diyastol sonu çapı), EF (ejeksiyon fraksiyonu),FS (fraksiyonel kısalma).

a: Dox+CsA, Dox ve Dox+FK506 grupları, kontrol grubundan farklıdır . p < 0,0001

b: Dox+CsA, Dox ve Dox+FK506 grupları, kontrol grubundan farklıdır . p < 0,0001



Şekil 4.1. Eko değerleri

4.4.GRUPLARIN KAN BASINCI DEĞERLERİ

Sıçanların, sekiz günlük ilaç uygulamasının son infüzyonundan sonra kan basıncı kayıtları alınmıştır. SKB ve DKB değerleri Tablo 4.5’de verilmiştir. Post Hoc Tukey testi ile, gruplar arasında sistolik kan basıncı değerlerinde istatistiksel anlamda fark görülmemiştir ($F_{3,23}=1,808$; $p < 0,178$). Sadece doksorubisin verilen grubun, diyastolik kan basıncında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda azalma görülmüştür ($F_{3,23}= 3,808$; $p < 0,025$).

Tablo 4.5. Sıçanların kan basıncı değerleri. Değerler ortalama $\pm$ standart SD olarak verildi (n=10)

Gruplar	SKB (mmHg)	DKB (mmHg)
Kontrol	129 $\pm$ 8	89 $\pm$ 8
Dox	114 $\pm$ 34	69 $\pm$ 11 ^a
Dox+CsA	103 $\pm$ 20	82 $\pm$ 13
Dox+FK506	105 $\pm$ 16	87 $\pm$ 13

SKB (sistolik kan basıncı), DKB (diyastolik kan basıncı)

a: Dox grubu, kontrol grubundan farklıdır . $p < 0,025$

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Doksorubisin, solid ve hematopietik tümörlerin tedavisinde kullanılan yüksek etkili kemotörapatik bir ajandır. Kullanımı, doza bağımlı kardiyotoksik etkisinden dolayı sınırlıdır. Doksorubisinin indüklediği, myokardiyal hasarların oluşmasında birinci sırayı serbest oksijen radikallerinin üretimi almıştır (18). Antrasiklin tedavisinin, özellikle hücre içi demir seviyesini artırarak, ROS oluşumunda etkili olduğu pek çok çalışma ile desteklenmiştir. Son çalışmalar, antrasiklinlerin sadece ROS yapımını artırarak kardiyotoksisite oluşturmadağını göstermiştir (18, 19). ROS üretimi, kardiyotoksisite oluştururken birçok mekanizma içerir. Bu mekanizmalar kardiyak proteinlerin ekspresyonunda bozulma, hücrel ve mitokondriyal kalsiyum homeostazisinde bozulma, mitokondrideki DNA lenzyonlarının indüklenmesidir. ROS oluşumu, mitokondrideki enerji oluşumunu, ATP'nin elektrotansportunu bozar. Bunun yanında miyoflamentleri ve sitoskeleton proteinlerin yapısının bozulmasına neden olabilir (18, 23). ROS'un yaptığı hasarlar, apoptotik ve nekrotik yolların aktivasyonunu takiben kalp hücrelerinin ölümü, antrasiklinlerin indüklediği kardiyotoksisite için bize etkin bir açıklama sağlar (23, 24).

Ca^{+2} kalp hücresinde, sitozolde ve mitokondrilerde belirli bir konsantrasyonda bulunur. Aralarında bir denge vardır. Patolojik şartlarda sitozoldeki Ca^{+2} yükselir. Bu durum mitokondride aşırı Ca^{+2} yüklenmesine neden olur. Sonuçta mitokondriyal hasar artar ve

'mitochondrial permeability transition pore (mPTP)'lar açılır. Porların açılması hasarı daha da artırır (48).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, mitokondriyal permabilitedeki bir artışın, apoptotik hücre ölümü başlatıcısı olduğu gösterilmiştir. Nekroz, erişkin insan kalp hasarlarının pek çok formunda oluşur ve bunlardan biri de antikanserojen ilaçların kardiyotoksik etkisidir. Yeni çalışmalar göstermiştir ki, mPTP apoptozisi başlatmaz, bu kompleks nekrozda önemli bir role sahiptir (16, 58). Siklosporin A (CsA), mPTP'yi inhibe edici olarak bilinir. İskemi reperfüzyon hasarında oluşan, özellikle kalp ve beyin nekrozislerinin oluşumu, CsA kullanılarak azaltılabileceği gösterilmiştir.

Siklosporin A ve takrolimus kalsinörini inhibe ederek immünosupresif etki oluşturan ajanlardır. CsA, mitokondriyal matriks proteini siklofilin D (Cyc-D) ile etkileşerek mPTP açılımını inhibe eder. Cyc-D'si olmayan fareleri kullanan çalışmacılar, mPTP'nin hücre nekrozisinde önemli rol oynadığını göstermiştir. Cyc-D'si olmayan fareler, kalsiyum artışı ile indüklenmede olduğu gibi, nekrotik uyarımlara direnç göstermiş, ama klasik apoptotik artırıcıları ile muamele edilince ölmüşlerdir (60).

Bu çalışmada, sıçanlarda doksorubisin tarafından oluşturulan mitokondriyal hasarda, mPTP'nin rolü ve CsA ile FK506'nın koruyucu etkisini göstermek istedik.

Çalışmamızda dört deney grubu oluşturuldu

Sekiz gün boyunca serum fizyolojik (SF) solüsyonunun [0,1 ml/kg/hayvan başına intraperitoneal (i.p.)] verildiği kontrol grubu (KONT), birinci gün tek doz doksorubisin (10 mg/kg/hayvan başına 1 ml intraperitoneal) ve 8 gün boyunca 0,1 ml intraperitoneal SF verilen doksorubisin (DOX) grubu, birinci gün tek doz doksorubisin (10 mg/kg/hayvan başına 1 ml i.p.) ve sekiz gün boyunca siklosporin A (1 mg/kg/ hayvan başına 0,1 ml i.p.) verilen doksorubisin + siklosporin A (DOX+CsA) grubu ve birinci gün tek doz doksorubisin (10 mg/kg/hayvan başına 1 ml i.p.) ve sekiz gün boyunca takrolimus (0,1 mg/kg/ hayvan başına 0,1 ml i.p.) verilen doksorubisin + takrolimus (DOX+FK506) grubu.

Sekiz gün ilaç uygulanan hayvanların, son ilaç uygulamasını takiben kardiyak hasarı belirlemek için EKO, EKG kayıtları alındı ve biyokimyasal ölçümleri yapıldı.

Sekiz gün boyunca ilaç uygulaması yaptığımız, doksorubisin verilen sıçanlarda ikinci günden itibaren diyare, burun kanaması, hematüri, fiziksel aktivitede bozulma ve ağırlık

kaybı olmuştur. Bu belirtiler, DOX+CsA ve DOX+FK506 gruplarında daha fazla görülmüştür.

Çalışmamızda biyokimyasal verileri incelediğimizde, kontrole göre doksorubisin verilen grupta AST ve LDH değerleri yükselmiştir. Tek doz doksorubisin ve sekiz gün boyunca siklosporin A uygulanan grupta ise CK-MB, LDH, AST ve ALT değerleri kontrole ve tek doz doksorubisin verilen gruba göre önemli bir artış göstermiştir. Bu sonuç bize siklosporin A'nın, kardiyak hücrelerde doksorubisinin yapmış olduğu apoptotik etkileri artırdığı ve kardiyak hücreleri hasarlanmaya karşı koruyucu etkisinin olmadığını göstermektedir.

Doksorubisine bağlı kardiyovasküler toksisite, QT süresinin uzaması, aritmiler, myokard iskemisi, hipertansiyon, tromboembolitik komplikasyonlar (7) ve myokardiyal fonksiyon bozukluğunu içine alır. EKG değerlerine baktığımızda, doksorubisinin oluşturduğu kardiyotoksisite yalnızca kalbin mekanik fonksiyonunu değil aynı zamanda ventriküler depolarizasyon ve repolarizasyonunda etkilemiştir. Doksorubisin alan grubun, QT, PR ve R_R interval süresinin kontrol grubuna göre anlamlı bir fark görülmemiştir. Doksorubisin+siklosporin A alan grupta ise, PR, QRS intervali ve PR segmenti süresi kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Doksorubisin+takrolimus alan grubun EKG bulguları ise kontrol grubuna çok yakın çıkmıştır. EKG kayıtları bize siklosporin A'nın kalp fonksiyonlarını bozduğunu, takrolimusun ise düzelttiğini göstermektedir.

Kan basıncı kayıtlarında, sadece doksorubisin, doksorubisin+siklosporin A ve doksorubisin+takrolimus verilen sıçanların sistolik kan basıncı ve diyastolik kan basıncı değerleri, kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalma göstermiştir. Doksorubisin verilen sıçanların, sistolik kan basıncı, diyastolik kan basıncı azalmaları, kalp fonksiyonlarının yavaşlaması ve buna bağlı olarak kalp debisinin azalmış olabileceği düşüncesindeyiz. Tek doz doksorubisin ve sekiz gün boyunca siklosporin A verilen grupta sistolik kan basıncı değerleri, doksorubisin verilen gruba göre daha düşüktür.

EKO kayıtlarında, doksorubisin, doksorubisin+siklosporin A ve doksorubisin+takrolimus alan sıçanlarda interventriküler septum diyastolik çapı(IVSd), sol ventrikül diyastol sonu çapı (LVIDd) değerleri kontrol grubuna göre daha yüksek çıkmıştır. En fazla artış doksorubisin+takrolimus alan sıçanlarda görülmüştür. EKO kayıtları değerlendirildiğinde doksorubisinin myokardiyal fonksiyon bozukluğuna neden

olduğu, siklosporin A'nın iyileştirici etki yapmadığı, takrolimusun ise hasarı artırdığı görülmüştür.

Marechal X. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, tek doz 10mg/kg/gün doksorubisin uygulamasının ardından sekiz gün boyunca 1mg/kg/gün siklosporin A ve 0.1mg/kg/gün takrolimus uygulanmış, doksorubisin+siklosporin A uygulanan hayvanlarda, siklosporin A'nın mPTP açılımını inhibe ederek kardiyak hasarı azalttığı, takrolimusun ise mitokondri üzerine etkisi olmadığı gösterilmiştir. Siklosporin A, doksorubisinin yapmış olduğu kalp hasarına karşı, mitokondrilerin organizasyonundaki bozukluğu ve ATP üretimindeki azalmayı engelleyerek yararlı etkiyi gösterdiği öne sürülmüştür. Bizim çalışmamızda ise, siklosporin A ve takrolimus verilen sıçanlarda kardiyak hasarı azaltmada etkili olmadığı hatta arttığı görülmüştür (89).

Zhou S. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, doksorubisin mitokondrilerin oksidatif stresten etkilenmesini artırarak, enerji üretimini bozduğu belirtilmiştir. İn vivo olarak doksorubisin verilmesinin mitokondriyal solunumu bozduğu, in vitro olarak siklosporin A'nın eklenmesiyle mPTP'lerin açılımını sınırlayarak iyileştirici etki yaptığı öne sürülmüştür (90).

Colombo T ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, düşük dozlarda siklosporin A verilmesinin mPTP açılımını engellediği, doksorubisinin yapmış olduğu akut ve kronik kardiyotoksisitede, mitokondri potansiyel kaybını ve kontraktıl azalmayı engellediği ve iyileştirici etki yaptığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da düşük doz siklosporin A verilmiş fakat kardiyotoksisitede bir azalma gözlenmemiştir (91).

Bir başka çalışmada ise, farelere yüksek doz siklosporin A verildiğinde, doksorubisinin kardiyotoksik etkisini daha da arttırdığı gösterilmiştir. Siklosporin A'nın bu zararlı etkisinin, membran transport protein P-glycoproteinini inhibe ederek oluşturduğu öne sürülmüştür. P-glycoprotein, doksorubisinin hücrel akışını artıran ve intrasellüler retansiyonu azaltarak etki eden enerji bağımlı bir pompadır. Düşük dozda siklosporin A verildiğinde P-glycoprotein inhibe olmamıştır (92).

Önceki çalışmalarda doksorubisinin, mitokondriyal DNA polimeraz aktivasyonunu ve mitokondriyal proliferasyonu artırdığı, başka bir çalışmada ise akut doksorubisin uygulamasının mitokondriyal enerji üretimi inhibisyonuna neden olduğu söylenmektedir (93).

Huss J. ve arkadaşları, kalsinörinin Ppargc1 α (PGC-1 α) gen transkripsiyonunu artırdığını göstermişler. Transjenik farelerin iskelet kasında aktif kalsinörünün overekspresyonu, genelde PGC-1 α ekspresyonunda artışla sonuçlanmış. PGC-1 α ekspresyonu arttığında mitokondriyal enerji metabolizması ile ilgili genleri artırmış, dolayısıyla enerji metabolizmasını düzeltici etki yapmış. Siklosiporin A'nın, mPTP'leri kapatarak apoptozisi azaltırken, kalsinörünü inhibe etmesiyle de ATP yapımını blokladığı belirtilmiştir (94).

Bizim çalışmamızda verilen siklosiporin A miktarı sıçanlara fazla gelmiş, P-glycoproteini inhibe etmiş, böylelikle doksorubisinin kardiyotoksik etkisini daha da artırmış olabilir. CsA, kalsinörünü inhibe ederek PGC-1 α ekspresyonunun azalmasına ve enerji metabolizmasının bozulmasına neden olmuş ve doksorubisinin neden olduğu kardiyak hasarlanmayı daha da artırmış olabilir.

CsA'nın iyileştirici etki göstermemesinin bir diğer nedeni, doksorubisinin kardiyotoksik etkiyi, sadece mPTP üzerinden yapmaması, DNA, Ca⁺² metabolizması ve ROS oluşumu ile olan etkilerinin daha baskın olmasından dolayı olabilir. CsA'nın kalsinörünü inhibe etmesi kalp fonksiyonlarına zarar vermiş, hücreleri radikallere karşı savunmasız hale getirerek istenmeyen immunosupresif bir etki yapmış olabilir.

Sonuç olarak, sadece doksorubisin verilen grup ile doksorubisin+siklosiporin A veya doksorubisin+tacrolimus verilen gruplar karşılaştırıldığında, CsA ve FK506'un iyileştirici etki göstermediği, doksorubisinin kardiyotoksik etkisini daha da arttırdığı belirlenmiştir.

İleriki dönemde, doksorubisinin kardiyotoksik etkisinde mPTP'lerin rolünü göstermede, sadece bu kanallara spesifik kimyasalların kullanılması, çalışmanın sonuçlarına çok yarar sağlayacağı kanısındayız.

6. KAYNAKLAR

1. Liu X. Protection of Pifithrin- α and Melatonin Against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity, Doctor's Degree Thesis, East Tennessee State University Biomedical Science, United States, 2003.
2. Doroshow JH. Doxorubicin-induced Cardiac toxicity. N Engl J Med. 1991; 324: 843–5.
3. Keefe DL. Anthracycline-induced Cardiomyopathy. Semin Oncology 2001; 28:2–7.
4. T.Eschenhagen, T.Force,M.S. Ewer et al., "Cardiovascular side effects of Cancer therapies: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology" European Journal of Heart Failure, vol. 2011; 13: 1-10
5. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. Biochem Pharmacol, 1999; 57:727-741.
6. Li T, Danelisen I, Bello-Klein A, Singal PK. Effects of probucol on changes of antioxidant enzymes in adriamycin-induced Cardiomyopathy in rats. Cardiovasc Res 2000; 46:523-530.
7. Türker A, Kayaalp O. Kanser Kemoterapisinin Esasları ve Antineoplastik İlaçlar içinde: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Ed: Kayaalp O, Hacettepe-Tas, Ankara, 2002; 10: 380-415.

8. Li T. Early Changes in Myocardial Antioxidant Enzymes Due to Adriamycin and Modulation by Probucol. Doctor's Degree Thesis, University of Manitoba, Department of Physiology Faculty of Medicine, Canada, 2000.
9. Shan K, Lincoff AM and Young JB, Anthracycline-induced Cardiotoxicity. *Ann.Intern.Med.* 1996; 125: 47–58.
10. Steinherz LJ, Steinherz PG, Tan CT, Heller G and Murphy ML. Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. *J Am Med Assoc.* 1991; 266: 1672–7.
11. Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD, Perez-Atayde AR, Sallan SE and Sanders SP. Late Cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med.* 1991; 324: 808–15.
12. Šimůnek T, Štěrbá M, Popelová O, Adamcová M, Hrdina R, Gerši V. Anthracycline-induced Cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological Reports.* 2009; 61: 154–171.
13. B. N. Bernaba, J. B. Chan, C. K. Lai, and M. C. Fishbein, “Pathology of late-onset anthracycline Cardiomyopathy,” *Cardiovascular Pathology* 2010; 19: 308–311, 2010.
14. B. M. P. Aleman, A. W. Van Den Belt-Dusebout, M. L. De Bruin et al., “Late Cardiotoxicity after treatment for Hodgkin lymphoma,” *Blood*, vol. 2007; 109: 1878–1886.
15. P. A. Ganz, M. A. Hussey, C. M. Moinpour et al., “Late Cardiac effects of adjuvant chemotherapy in breast Cancer survivors treated on Southwest Oncology Group protocol S8897,” *Journal of Clinical Oncology*, 2008; 26: 1223–1230.
16. P. A. Ganz, M. A. Hussey, C. M. Moinpour et al., “Late Cardiac effects of adjuvant chemotherapy in breast Cancer survivors treated on Southwest Oncology Group protocol S8897,” *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26: 1223–1230.
17. S. M. Swain, F. S. Whaley, and M. S. Ewer, “Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials,” *Cancer* 2003; 97: 2869–2879.
18. T. Šimůnek, M. Štěrbá, O. Popelová, M. Adamcová, R. Hrdina, and V. Gerši, “Anthracycline-induced Cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron,” *Pharmacological Reports*, 2009; 61: 154–171.
19. E. Raschi, V. Vasina, M. G. Ursino, G. Boriani, A. Martoni, and F. de Ponti, “Anticancer drugs and Cardiotoxicity: insights and perspectives in the era of targeted therapy,” *Pharmacology and Therapeutics*, 2010; 125: 196–218.

20. D. Rayson, D. Richel, S. Chia, C. Jackisch, S. van der Vegt, and T. Suter, "Anthracycline-trastuzumab regimens for HER2/neu-overexpressing breast Cancer: current experience and future strategies," *Annals of Oncology* 2008;18: 1530–1539.
21. T. Horie, K. Ono, H. Nishi et al., "Acute doxorubicin Cardiotoxicity is associated with miR-146a-induced inhibition of the neuregulin-ErbB pathway," *Cardiovascular Research* 2010; 87:. 656–664.
22. H. G. Keizer, H. M. Pinedo, G. J. Schuurhuis, and H. Joenje, "Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity," *Pharmacology and Therapeutics* 1990; 47: 219–231.
23. D. B. Sawyer, X. Peng, B. Chen, L. Pentassuglia, and C. C. Lim, "Mechanisms of anthracycline Cardiac injury: Can we identify strategies for Cardioprotection?" *Progress in Cardiovascular Diseases* 2010; 53: 105–113.
24. Y. W. Zhang, J. Shi, Y. J. Li, and L. Wei, "Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced Cardiotoxicity," *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2009; 57: 435–445.
25. G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, and L. Gianni, "Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and Cardiotoxicity," *Pharmacological Reviews* 2004; 56: 185–229.
26. A. P. Halestrap, "What is the mitochondrial permeability transition pore?" *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2009; 46: 821–831.
27. C. P. Baines, "The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury," *Basic Research in Cardiology* 2009;104: 181–188.
28. T. Nakagawa, S. Shimizu, T. Watanabe et al., "Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death," *Nature* 2005; 434: 652–658.
29. A. C. Schinzel, O. Takeuchi, Z. Huang et al., "Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102: 12005–12010.
30. H. Nakayama, X. Chen, C. P. Baines et al., "Ca²⁺ and mitochondrial-dependent Cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure," *The Journal of Clinical Investigation* 2007; 117: 2431–2444.
31. E. Arbustini, A. Brega, and J. Narula, "Ultrastructural definition of apoptosis in heart failure," *Heart Failure Reviews* 2008; 13: 121–135.

32. T. L'Ecuyer, Z. Allebban, R. Thomas, and R. Vander Heide, "Glutathione S-transferase overexpression protects against anthracycline-induced H9C2 cell death," *American Journal of Physiology* 2004; 286: H2057–H2064.
33. Halestrap A P, Pasdois P. The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease . *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 1787: 1402–1415.
34. Halestrap A P. What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2009; 46: 821–831.
35. <http://www.johnkyrk.com/mitochondrion.tr.html> 2011.
36. Köksal BT. Mitokondriyal hastalıklarda klinik ve histopatolojik korelasyon. <http://tez2.yok.gov.tr/> 2008
37. http://www.tokresource.org/tok_classes/biobiobio/biomenu/cell_respiration/index.htm 2011.
38. www.mustafaaltinisik.org.uk/0809-1-4-03ATPsistemi.ppt 2011.
39. Imaizumi N, Aniya Y. The role of a membrane-bound glutathione transferase in the peroxynitrite-induced mitochondrial permeability transition pore: Formation of a disulfide-linked protein complex *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2011; 516: 160–172.
40. Lisa F D, Bernardi P. A CaPful of mechanisms regulating the mitochondrial permeability transition. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2009; 46 : 775–780.
41. Ruiz-Pesini E, Diez C, Lapena AC, Perez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Arenas J, Lopez-Perez MJ. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities . *Clin Chem* 1998;44:1616-20.
42. Aydos K. Spermatozoa Metabolizmas›na Deřiflik Bir Bakış : Kompartmantalizasyon. *j Turkish German Gynecol Assoc* 2009; 6(3); 2005.
43. Cankurtaran M, Arslan S. Nonalkolik steatohepatit etyopatogenezinde oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, mitokondriyal hasar, sitokinler ve endotoksinlerin rolü. *Güncel Gastroenteroloji* 6/1 2002.
44. M. Crompton, The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death, *Biochem. J* 1999; 341: 233–249.
45. F. DiLisa, P. Bernardi, Mitochondria and ischemia–reperfusion injury of the heart: fixing a hole, *Cardiovasc. Res.* 2006; 70: 191–199.

46. A.P. Halestrap, S.J. Clarke, S.A. Javadov, Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion — a target for cardioprotection, *Cardiovasc. Res.* 2004; 61: 372–385.
47. A.P. Halestrap, Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die, *Biochem. Soc. Trans.* 2006; 34: 232–237.
48. A.P. Halestrap, P.M. Kerr, S. Javadov, K.Y. Woodfield, Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart, *Biochim. Biophys. Acta* 1998; 1366: 79–94.
49. A.P. Halestrap, The nature of the stimulation of the respiratory chain of rat liver mitochondria by glucagon pretreatment of animals, *Biochem. J.* 1982; 204: 37–47.
50. D.R. Green, G. Kroemer, The pathophysiology of mitochondrial cell death, *Science* 2004; 305: 626–629.
51. T.E. Gunter, D.R. Pfeiffer, Mechanisms by which mitochondria transport calcium, *Am. J. Physiol.* 1990; 258: C755–C786.
52. A.P. Halestrap, G.P. McStay, S.J. Clarke, The permeability transition pore complex: another view, *Biochimie* 2002; 84: 153–166.
53. R.A. Haworth, D.R. Hunter, The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca^{2+} trigger site, *Arch. Biochem. Biophys.* 1979; 195: 460–467.
54. D.R. Hunter, R.A. Haworth, The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms, *Arch. Biochem. Biophys.* 1979; 195: 453–459.
55. M. Crompton, A. Costi, L. Hayat, Evidence for the presence of a reversible Ca^{2+} -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria, *Biochem. J.* 1987; 245: 915–918.
56. A.W. Leung, A.P. Halestrap, Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore, *Biochim. Biophys. Acta* 2008; 1777: 946–952.
57. M. Crompton, H. Ellinger, A. Costi, Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress, *Biochem. J.* 1988; 255: 357–360.

58. A.P. Halestrap, A.M. Davidson, Inhibition of Ca²⁺-induced large amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin A is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial matrix peptidyl-prolyl cis–trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase, *Biochem. J.* 1990; 268: 153–160.
59. A. Tanveer, S. Virji, L. Andreeva, N.F. Totty, J.J. Hsuan, J.M. Ward, M. Crompton, Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca²⁺ and oxidant stress, *Eur. J. Biochem.* 1996; 238: 166–172.
60. S.J. Clarke, G.P. McStay, A.P. Halestrap, Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A, *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 34793–34799.
61. C.P. Connern, A.P. Halestrap, Purification and N-terminal sequencing of peptidylprolyl cis–trans-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin, *Biochem. J.* 1992; 284: 381–385.
62. N. Johnson, A. Khan, S. Virji, J.M. Ward, M. Crompton, Import and processing of heart mitochondrial cyclophilin D, *Eur. J. Biochem.* 1999; 263: 353–359.
63. S.A. Novgorodov, T.I. Gudź, D.W. Jung, G.P. Brierley, The non-specific inner membrane pore of liver mitochondria — modulation of cyclosporin sensitivity by ADP at carboxyatractyloside-sensitive and insensitive sites, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 180: 33–38.
64. A.P. Halestrap, K.Y. Woodfield, C.P. Connern, Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase, *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 3346–3354.
65. M. Klingenberg, The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier, *Biochim. Biophys. Acta* 2008; 1778: 1978–2021.
66. D.A. Ford, Alterations in myocardial lipid metabolism during myocardial ischemia and reperfusion, *Prog. Lipid. Res.* 2002; 41: 6–26.
67. Gelişen Mitokondriyal Hastalıkların Tanısında Enzim Boyalarının Önemi. *Türk Patoloji Dergisi*, 2009; 25: 53-56.
68. Zhivotovsky B, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G, Adenine nucleotide translocase: a component of the phylogenetically conserved cell death machinery. *Cell Death and Differentiation* 2009; 16: 1419–1425.

69. Leytin V, Allen D.J, Mutlu A, Gyulkhandanyan A.V, Mykhaev S, Freedman J. Mitochondrial control of platelet apoptosis: effect of cyclosporin A, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *Laboratory Investigation* 2009; 89: 374–384.
70. Kayaalp O. T.bbi Farmakoloji. Immün sistem bozukluklar. ve immünomodulator ilaçlar. Hacettepe TasKitabevi, 2000; 9: 372-416.
71. Wenger RM. Cyclosporin: conformation and analogues as tools for studying its mechanism of action. *Transplant. Proc.* 1988; 20: 313-318.
72. Borel JF. Cyclosporin. In: Ishizaka K, Lachmann PJ, Waksman BH, eds. *Progress in allergy* 1986; 86
73. Diasio RB, Lobuglio AF. Immunomodulators. In; Gilman AG (ed). *Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics.* 9th ed. New York:McGraw-Hill Companies, 1996; 1297-99
74. Bennett WM, Porter GA. Nephrotoxicity of common drugs used by urologists. *Urologic Clinics of North America* 1990;17:145-156
75. Schrier RW, Gottschalk CW. Outcome and complications of renal transplantation. *Diseases of the kidney* 1993; 3: 2926-29
76. Wang CH, Salahudeen AK, McClain M, Whitehead J. Lipid peroxidation accompanies cyclosporin nephrotoxicity: Effects of vitamin E. *Kidney International* 1995; 47: 927-34
77. Mihatsch Mj, Thiel G, Ryffel B. Morphologic diagnosis of cyclosporine nephrotoxicity. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 1988; 5: 104-121
78. Vickers AEM, Fischer V,Connors S, et all. Cyclosporin A metabolism in human liver, kidney, and intestine slices. *Drug Metabolism and Disposition* 1992; 20:6:802-809
79. Hooks MA. Tacrolimus, anew immunosupresant- A review of the literature.*Ann Pharmacy* 1994; 28:501–510
80. McDiarmid SV, Busuttil RW, Ascher NL, Burdick J. FK506(tacrolimus) compared with cyclosporine for primary immunosuppression after pediatric liver transplantation. *Transplantation* 1995;59:530-536
81. Shaw LM, Kaplan B, Kaufman D. Toxic effects of immunosuppressivedrugs: Mechanism and strategies for controlling them. *Clin Chem* 1996;42:1316- 1321
82. Plosker GL and Foster RH. Tacrolimus: A further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs* 2000;59:323-389

83. Kincaid R, Higuchi S, Tamura J, Giri P, Polli JW. Calmodulin-dependent protein phosphatase from *Neurospora crassa*. Molecular cloning and expression of recombinant catalytic subunit. *J Biol Chem* 1991;226:18104–112
84. Morris RE. Mechanisms of action of new immunosuppressive drugs. *Kidney* 1996;79:26–38
85. Cameron AM, Nucifora FC, Fung ET, Livingston DJ. FKBP12 binds the inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor at leucine-proline (1400–1401) and anchors calcineurin to this FK506-like domain. *J Biol Chem* 1997;272:27582–88
86. Cameron AW, Steiner JP, Roskams AJ, Ali SM. Calcineurin associated with the inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca^{2+} flux. *Cell* 1995; 83:463–472
87. Venkataraman R, Jain A, Cadoff E, Warty W, Iwasaki K. Pharmacokinetics of FK506: Preclinical and clinical studies. *Transplant Proc* 1990;22:52–56
88. Undre NA, Stevenson P, Schafer A. Pharmacokinetics of tacrolimus: Clinically relevant aspects. *Transplant Proc* 1999;31:21–2445
89. Marechal X, Montaigne D, Marciniak C. Doxorubicin-induced cardiac dysfunction is attenuated by cyclosporin treatment in mice through improvements in mitochondrial bioenergetics. *Clinical Science* 2011;121:405–413
90. Zhou, S., Starkov, A., Froberg, M. K., Leino, R. L. and Wallace, K. B. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. *Cancer Res.* 2001; 61: 771–77.
91. Colombo, T., Zucchetti, M. and D'Incalci, M. Cyclosporin A markedly changes the distribution of doxorubicin in mice and rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994;269: 22–27
92. Bellamy, W. T., Peng, Y. M., Odeleye, A., Ellsworth, L., Xu, M. J., Rogan, T. M. and Weinstein, R. S. Cardiotoxicity in the SCID mouse following administration of doxorubicin and cyclosporin A. *Anticancer Drugs* 1995; 6: 736–743
93. Miyagawa, K., Emoto, N., Widyantoro, B., Nakayama, K., Yagi, K., Rikitake, Y., Suzuki, T. and Hirata, K. Attenuation of doxorubicin-induced cardiomyopathy by endothelin-converting enzyme-1 ablation through prevention of mitochondrial biogenesis impairment. *Hypertension* 2010;55:738–746
94. Garcia-Roves, P. M., Huss, J. and Holloszy, J. O. Role of calcineurin in exercise-induced mitochondrial biogenesis. *Am. J. Physiol.* 2006; 290: E1172–E1179.

**ERCIYES 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

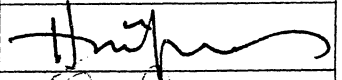
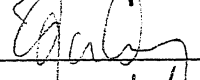
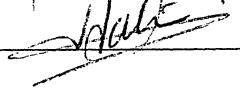
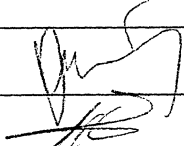
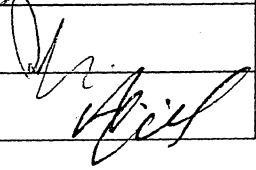
Tarih: 10.08.2011

Toplantı Sayısı: 07

Karar No: 11/101

Etik kurul toplantısı **10.08.2011** tarihinde Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel

Etik Kurul, **Prof.Dr. Harun ÜLGER** Başkanlığı'nda gerçekleştirilmiştir.

Üye Adı/Soyadı	Akademik Ünvanı	Fakültesi	İmza
Harun Ülger	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	
Özlem Canöz	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	
Hatice Özbilge	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Coşkun Tez	Doç. Dr.	Fen Fakültesi	
Servet Kesim	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
M. Betül Aycan	Yrd. Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi(Farmakoloji)	
Abdullah İnci	Prof.Dr.	Veteriner Fakültesi	
Fusun Ferdaş Erdoğan	Doç.Dr	Tıp Fakültesi	
Ahmet Öztürk	Öğrt.Gör.Dr		
Serap Altuntaş Eroğlu	Avukat		
Asiye Gökdelen			

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Prof..Dr.Nurcan DURSUN tarafından yapılan " Doxotubisinin Kalp Myositlerinde Oluşturduğu Mitokondriyal Hasarı Azaltmada "Mitochondrial Permeability Transistion Por'ların (mPTP) rolü" adlı araştırması incelenerek çalışmasının yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına oy birliğiyle karar verildi.

ASLININ AYNI DİR

Dokman Sekreteri:

Bingöl Kacaman


Tarih : 10.08.2011

Etik Kurul Başkanı İmzası



Etik Kurul Başkanı : Prof.Dr. Harun ÜLGER

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Dilek Sivri

Uyruğu: T.C

Doğum Tarihi ve Yeri: 20 Kasım 1986, Trabzon

Medeni Durumu: Bekar

Tel: 0 506 330 2118

email: dileksivri@windowslive.com

Yazıma Adresi: Anaşehir Siteleri A5 Blok 6/22 Anayurt Talas/ Kayseri

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Atatürk Üniversitesi	2009
Lise	Vakıfkebir Anadolu Lisesi	2004

SERTİFİKALAR

Araştırmacılar için Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Mart 2011, Kayseri

İLGİ ALANLARI

Kardiyovasküler Fizyoloji

Yabancı Dil

İngilizce, Almanca