T.C
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA ADRİYAMİSİN İLE OLUŞTURULAN KALP İSKEMİSİ ÜZERİNE KARNOZİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Tezi Hazırlayan
Kalender ÖZDOĞAN

Tezi Yöneten
Prof.Dr. Nurcan DURSUN

Fizyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Ocak 2009
KAYSERİ

T.C
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA ADRİYAMİSİN İLE OLUŞTURULAN KALP İSKEMİSİ ÜZERİNE KARNOZİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Tezi Hazırlayan
Kalender ÖZDOĞAN

Tezi Yöneten
Prof.Dr. Nurcan DURSUN

Fizyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından SBT-07-43. nolu proje ile desteklenmiştir.

Ocak 2009
KAYSERİ

II

Prof. Dr. Nurcan DURSUN Danışmanlığında **Kalender ÖZDOĞAN** tarafından hazırlanan: **"Sıçanlarda Adriyamisin İle Oluşturulan Kalp İskemisi Üzerine Karnozinin Koruyucu Etkisinin İncelenmesi"** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

22 /1 / 2009

JÜRİ		**İmza**
Başkan	: Prof. Dr. Nurcan DURSUN	
Üye	: Prof. Dr. Cem SÜER	
Üye	: Doç. Dr. Gülden BAŞKOL	



ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

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

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU

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, sayın Uz. Biyolog Eylem TAŞKIN'a, çalışmanın her aşamasında değerli fikirlerinden yararlandığımız ve sistemlerde oluşan sorunları hızlı bir şekilde düzeltmede yardımcı olan Prof. Dr. Cem SÜER'e, istatistik değerlendirmelerinde yardımcı olan Prof. Dr. Yunus DURSUN'a uyumlu bir çalışma ortamı sağlayarak destekte bulunan değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Sami AYDOĞAN, Prof. Dr. Nazan DOLU, Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU ve Prof. Dr. Asuman GÖLGELİ'ye, deney hayvanları bakımındaki yardımları için DEKAM personellerinden Vet. Tek. Erkut SOMAK, Biyolog A. Celil ÜNVER ve yardımcı personele, değerli yüksek lisans arkadaşlarıma ve hayatımın her anında bana destek olan sevgili aileme çok teşekkür ederim.

SIÇANLARDA ADRİYAMİSİN İLE OLUŞTURULAN KALP İSKEMİSİ ÜZERİNE KARNOZİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Adriyamisin (ADR) çoğu insan kanserlerinin kemoterapisinde sıklıkla kullanılan bir antrasiklin antibiyotiğidir. Bu ilacın kullanımı doza bağlı kardiyotoksisiteden dolayı sınırlandırılmıştır. Reaktif oksijen türlerinin, adriyamisinin toksisitesinde büyük bir faktör olduğu varsayılmaktadır. Karnozin, enzimatik olmayan doğal bir antioksidandır. Antioksidan karnozinin, reaktif oksijen türlerini etkisiz hale getirici, süperoksit ve hidroksil radikallerini temizleyici ve metalleri okside olmadan önce şelatlayıcı özelliği vardır.

Bu çalışmada, sıçanlarda adriyamisin tarafından oluşturulan akut kardiyak toksisite üzerine biyolojik bir antioksidan olan karnozinin etkisinin araştırılması amaçlandı.

Deney planında 4 grup oluşturuldu. Kontrol (KONT, serum fizyolojik); karnozin [KAR, 10 mg/kg/gün intravenöz (i.v.)], sadece adriyamisin (ADR, toplam 16 mg/kg, i.v.); karnozin (10 mg/kg/gün, i.v.) ile adriyamisinin (ADR, toplam 16 mg/kg/gün, i.v., KAR+ADR) birlikte verildiği grup. Karnozin, adriyamsinle muameleden bir hafta önce ve sonraki 1 hafta boyunca adriyamisinle birlikte verildi (İkişer gün arayla dört defa) . Sıçanlar ADR verilmesinden 24 saat sonra anestezi edildi. Kan örnekleri, plazma kardiyak hasar belirleyicilerinin; Kreatin kinaz (CK), Laktat dehidrogenaz (LDH), Aspartat aminotransferaz (AST), Alanin aminotransferaz (ALT), Malondialdehit (MDA) tarafından lipid peroksidasyonu ve plazma antioksidan enzimleri; Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ölçümü için toplandı. Sıçanların kalpleri hemodinamik çalışmalar ve EKG kayıtları için otopsiyle alındı.

Adriyamisin, belirgin bir şekilde kardiyotoksik etki oluşturmuş olup bunlar; hemodinamik değişiklikler (azalmış LVDP, ±dP/dt), EKG değişiklikleri (artmış ST ve R-R intervalleri), biyokimyasal plazma kardiyak hasar belirleyicilerindeki değişiklikler (artmış CK, LDH, AST, ALT), plazma antioksidan aktivite değişiklikleri (azalmış SOD, GSH-Px, CAT aktivitesi) ve lipit peroksidasyonuna (artmış MDA) neden olmuştur. Adriyamisinin neden olduğu, LVDP, ±dP/dt, ST, R-R, Ramp, CK, LDH, AST, ALT değerlerindeki olumsuzluklar karnozin tarafından normal değerlerine yaklaştırılmıştır (artmış LVDP, ±dP/dt, $p<0.001$; azalmış ST, R-R, $p<0.001$; yükselmiş Ramp, $p<0.001$; azalmış CK, LDH, ALT, $p<0.001$; azalmış AST, $p<0.01$; artmış SOD, GSH-Px, CAT, $p<0.01$; azalmış MDA, $p<0.01$).

Adriyamisinin oksidatif streste yaptığı artış, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi antioksidan enzim aktivasyon baskılayıcı etkisi ile oluşan kardiyotoksisite, karnozin ile engellenmiştir

Anahtar kelimeler: Adriyamisin, Karnozin, Kardiyotoksisite, Langendorff, Antioksidan.

PROTECTIVE EFFECT OF CARNOSINE AGAINST ADRIAMYCIN-INDUCED CARDIAC ISCHEMIA IN RATS

ABSTRACT

Adriamycin (ADR) is an anthracyline antibiotic, widely used in the chemotherapy of many human cancers. The use of this drug however, continues to be limited by its dose-related cardiotoxicity. Reactive oxygen species are hypothesized to be a major factor in the toxicity of adriamycin. Carnosine (CAR) is a non enzymatic natural antioxidant. The antioxidant effect of carnozine is related to its ability to inactivate reactive oxygens species, scavenger of hydroxyl and superoxide radicals and chelate prooxidant metals.

The aim of this work was to investigate the effect of carnosine, a biological antioxidant, on the acut cardiac toxicity induced by adriamycin in rats.

Experimental design consisted of four groups. Control (CONT, saline only); carnosine [CAR, 10 mg/kg/day intravenous (i.v.)], adriamycin (ADR, total 16 mg/kg, i.v.) alone; carnosine (10 mg/kg/day, i.v.) with adriamycin (ADR, total 16 mg/kg , i.v., CAR+ADR). Carnosine was given one week before adriamycin treatment and following one week with adriamycin treatment (4 mg/kg, 4 times). Rats were anasthetized, twenty four h after ADR. Blood samples were collected for analysis of plasma cardiac injury markers: creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), measurment of lipid peroxidation by malondialdehyte (MDA) and plasma antioxidant enzymes: glutathione peroxidase (GSH-Px), Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Rats were then sacrificed and the heart was autopsied for hemodynamic study and ECG was recorded.

Results showed that adriamycin produced evident cardiotoxic effects revealed by; hemodynamic changes (decreased LVDP, ±dP/dt), ECG changes (elevated ST and R-R intervals, decreased Ramp), biochemical plasma cardiac injury marker changes (increased CK, LDH, AST, ALT), plasma antioxidant enzymes activity changes, (decreased SOD, GSH-Px, CAT) and lipid peroxidation (elevated MDA) to the control and carnosine groups. Carnosine treatment led to significant attenuation of cardiotoxic effects of adriamycin (CAR+ADR) revealed by normalisation of the LVDP, ±dP/dt (elevated LVDP, ±dP/dt, $p<0.001$); ST, R-R (decreased ST, R-R, $p<0.001$), Ramp (elevated, $p<0.001$); CK, LDH, AST, ALT (decreased CK, LDH, ALT, $p<0.001$; AST, $p<0.01$), SOD, GSH-Px, CAT (elevated SOD, GSH-Px, CAT, $p<0.01$) and lipid peroxidation (decreased MDA, $p<0.01$).

An increase in oxidative stress, SOD, GSH-Px, CAT inactivations by adriamycin cardiomyopathy were prevented by carnosine.

Key words: Adriamycin, Carnosine, Cardiotoxicity, Langendorff, Antioxidant.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇ KAPAK I

KABUL VE ONAY SAYFASI II

TEŞEKKÜR III

ÖZET IV

ABSTRACT V

İÇİNDEKİLER VI

TABLO ,ŞEKİL, ve RESİMLER IX

KISALTMALAR X

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. KEMOTERAPİK BİR AJAN OLAN ADRİYAMİSİN VE ADRİYAMİSİNE BAĞLI GELİŞEN KARDİYOTOKSİSİTE 3

2.1.1. Adriyamisinin Tanımı, Klinik Kullanımı, Yapısı, Etki Mekanizmaları ve Yan Etkileri 4

2.1.1.1 Tanımı, Klinik Kullanımı ve Yapısı 4

2.1.1.2. Etki Mekanizmaları 4

2.1.1.3. Yan Etkileri 5

2.1.2. Adriyamisin ve Deneysel Kardiyotoksisite 6

2.1.3. Adriyamisine Bağlı Kardiyotoksisitenin Patofizyolojisi 6

2.1.3.1. Adriyamisin Kardiyotoksisitesi ve Serbest Radikaller-Lipit Peroksidasyonu – Antioksidanlar 7

2.1.3.2. Adriyamisin Kardiyotoksisitesine Neden Olan Diğer Etkenler 8

2.1.4. Adriyamisine Bağlı Kardiyotoksisitenin Histopatolojik Bulguları 9

2.1.5. Adriyamisine Bağlı Kardiyotoksisitenin Biyokimyasal Belirleyicileri 9

2.1.5.1. Kreatin Kinaz MB 9

2.1.5.2. Troponinler 10

2.1.6. Adriyamisine Bağlı Kardiyotoksisitenin Önlenmesine Yönelik Çalışmalar.....10

2.2. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ.....10

2.2.1. Serbest Radikal Oluşturan Mekanizmalar.....11

2.2.1.1. Endojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları.....11

2.2.1.2 Ekzojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları.....12

2.2.2. Başlıca Serbest Oksijen Radikalleri.....12

2.2.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$).....12

2.2.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....12

2.2.2.3. Hidroksil Radikali (.OH).....13

2.2.2.4. Nitrik Oksit (NO).....13

2.3. LİPİT PEROKSİDASYONU.....14

2.4. ANTİOKSİDAN SAVUNMA.....15

2.4.1. Endojen Kaynaklı Antioksidanlar.....16

2.4.1.1. Enzim Olanlar.....16

2.4.1.2. Enzim Olmayanlar.....16

2.4.2. Ekzojen Kaynaklı Antioksidanlar.....17

2.5. DOĞAL BİR ANTİOKSİDAN OLAN KARNOZİN.....18

2.5.1. KARNOZİNİN TANIMI, YAPISI VE SENTEZ – YIKIM AŞAMASI.....18

2.5.1.1 Tanımı ve Kimyasal Yapısı.....18

2.5.1.2. Sentez ve Yıkımı.....19

2.5.2. Antioksidan Aktivitesi.....20

2.5.3. Tamponlayıcı Aktivitesi.....20

2.5.4. Membran Koruyucu Özellikleri.....21

2.5.5. Diğer Biyolojik Etkileri.....21

2.6. ANESTEZİ ALTINDAKİ SIÇANDA HEMODİNAMİK ÖLÇÜMLER.....22

2.6.1. Arteryal Basınç Ölçümü 22

2.6.2. Langendorff Kalp Modeli 23

2.6.2.1. Preparatın Hazırlanması 23

2.6.2.2. Perfüzyon Solüsyonunun Hazırlanması 25

3. GEREÇ VE YÖNTEM 26

3.1. DENEY HAYVANLARI 26

3.2. DENEY GRUPLARI 26

3.3. SIÇANLARA İNFÜZYON İÇİN KATETERİZASYON İŞLEMİ 27

3.4. ARTERYAL KAN BASINCI ÖLÇÜMÜ 28

3.5. LANGENDORF DÜZENEĞİ İLE HEMODİNAMİK PARAMETRELERİN ÖLÇÜMÜ 28

3.6. BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER.....29

4. BULGULAR.....34

4.1. HEMODİNAMİK ve EKG VERİLERİ 35

4.2. BİYOKİMYASAL ÖLÇÜM VERİLERİ.....37

5. TARTIŞMA ve SONUÇ 39

6. KAYNAKLAR.....48

ÖZGEÇMİŞ

TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. İnfüzyon öncesi ve sonrası hayvan vücut ağırlıkları.....34

Tablo 2. Grupların, Langendorff sistemi ile değerlendirilen fonksiyonları 35

Tablo 3. Grupların EKG parametre değerleri 36

Tablo 4. Grupların, ortalama, sistolik, diyastolik arteryal kan basınçları ve kalp atım hızları 36

Tablo 5. Grupların plazma kreatin kinaz, laktat dehidrogenaz, aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz düzeyleri 37

Tablo 6. Grupların endojen antioksidan enzim aktivite değerleri ve lipit peroksidasyon düzeyleri 38

Şekil 1. Adriyamisinin kimyasal kapısı 4

Şekil 2. Adriyamisinin serbest radikal bağımlı ve serbest radikal bağımsız etkileri..... 7

Şekil 3. Karnozinin kimyasal yapısı..... 19

Şekil 4. Karnozinin sentez ve yıkımı 19

Şekil 5. Langendorff düzeneği kuruluş şeması 24

Resim 1. PE–50 tubingin vena jugularis e yerleştirilmesi işlemi..... 28

Resim 2. Femoral arter kateterizasyonu sonrası kan basıncı kaydı alınması 29

Resim 3. Kalbin perfüzyon kanalına bağlanıp 15 dk lık stabilitesi sağlandıkta sonra EKG kaydının alınması 30

Resim 4. Laboratuarımızdaki Langendorf Perfüzyon sistemi..... 31

KISALTMALAR

+dP/dt	:	Basınç gelişim hızı
-dP/dt	:	Basınç düşüş hızı
ADR	:	Adriyamisin
ALT	:	Alanin aminotransferaz
AST	:	Aspartat aminotransferaz
Ca	:	Kalsiyum
CAT	:	Katalaz
CK	:	Kreatin kinaz
EDTA	:	Etilendiamin tetraasetikasit
EKG	:	Elektrokardiyografi
GSH-Px	:	Glutatyon peroksidaz
H_2O_2	:	Hidrojen peroksit
.OH	:	Hidroksil radikali
ICRF–187	:	Deksrazoksane
KAR	:	Karnozin
LDH	:	Laktat dehidrogenaz
LVDP	:	Ventrikül basınç gelişimi
MDA	:	Malondialdehit
NO	:	Nitrik Oksit
$O_2^{\cdot -}$	:	Süperoksit radikali
PUFA	:	Poliansatüre yağ asidi
Ramp	:	R dalgasının amplitüdü
RCC	:	Reaktif karbon bileşikleri
SOD	:	Süperoksit dismutaz
SOR	:	Serbest oksijen radikalleri

1. GİRİŞ VE AMAÇ

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

Adriyamisin (ADR) yada doksorubisin (DOX) medikal onkolojide kullanılan kuvvetli antikansorejen etkisi olan antrasiklin antibiyotiğidir. Baş ve boyun tümörleri, göğüs kanseri, kan kanseri, idrar kesesi ve testiküler kanser tedavisinde kullanılmaktadır. 450 – 500 mg/m^2 gibi kümülatif dozlarda yan etkisi olarak, doz bağımlı kardiyomiyopati oluşturmaktadır.

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

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

Oluşturduğu yan etkisi nedeni ile insanlarda tedavi amaçlı kullanımı sınırlı kalmaktadır. Ama kalpte oluşturduğu iskemi ve buna bağlı geliştirdiği kardiyomiyopati özelliği hayvan ile yapılan oksidatif stres çalışmalarında metot olarak kullanılmaktadır.

Karnozin (KAR) L-histidin ve β-alaninden oluşan bir dipeptit olup iskelet kasında (20mM), kalp kasında (10 mM), beyin ve diğer innerve edilen dokularda doğal bir antioksidandır.

Karnozin, serbest radikalleri ortadan kaldırma özelliğiyle güçlü bir antioksidan olarak tanımlanmıştır. Fenokromositoma PC12 hücrelerinde hipoksi ve yeniden oksijenlendirme sonucu gelişen hücre ölümlerini azalttığı bildirilmiştir. Yine hipoksi esnasında, hipoksinin indüklediği faktör 1-α 'nın, H9c2 kardiyomiyoblastlarında L-karnozin ile azaltıldığı bulunmuştur.

Vücutta karnozin metilasyonu anserin yada ophidin'i oluşturur. Karnozin hidrolizi ile β-alanin ve L-histidin ortaya çıkar. Histidin dekarboksilasyonu histamini oluşturur. β-alanin ile histamin etkileşimi, karsinini ortaya çıkarır. Pek çok çalışmada karnozin ve onunla ilgili proteinlerin, membranlarda peroksidasyonu engellediği gösterilmiştir. Böylece bir antioksidan olarak, oksidatif hasarlardan membranları korumaktadır. Yapılan çalışmalarda, lipit peroksidasyonunun yaptığı sarkoplazmik retikulumda Ca-ATPaz pompası inhibisyonun, karnozin yada onunla ilişkili anserin tarafından azaltıldığı bildirilmektedir. Karnozin verilmesinin, sarkoplazmik retikuklumdan kalsiyum salınımını artırdığı böylece intrasellüler Ca^{+2} seviyesini yükselterek kardiyak kontraktilitede artışa sebep olduğu gösterilmiştir. Kardiyak kontraktiliteyi, kontraktil proteinlerin kalsiyuma duyarlılığını artırarak da sağlayabileceği düşünülmektedir.

Karnozin, kalp kasının iskemisini azaltıcı etkisi yanında kalp kasının kontraktilitesini artırıcı rolünü gösteren başka çalışmalar da vardır. İn vitro çalışmalarda riyanodin reseptör aktivitesini direk etkileyerek ve kalsiyum salınımını artırarak izole kalp kas kontraktilitesini artırdığı bildirilmektedir.

Bu çalışmada, karnozinin antioksidan özelliğinin, kalbin iskemik hücrelerinde yapacağı iyileştirici etkiyi fizyolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler ile belirleyerek, böylece önemli bir hastalık gurubu olan kalp iskemisinin iyileşmesinde karnozinin önemini daha net bir şekilde ortaya koymayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KEMOTERAPİK BİR AJAN OLAN ADRİYAMİSİN VE ADRİYAMİSİNE BAĞLI GELİŞEN KARDİYOTOKSİSİTE

Antitümör antibiyotiklerden olan Adriyamisin (ADR) ve diğer antrasiklinler 1960' larda *Streptomyces peucetius var. caesieus* kültürlerinden izole edilmiş bir gurup glikozidik antibiyotiklerdir (1).

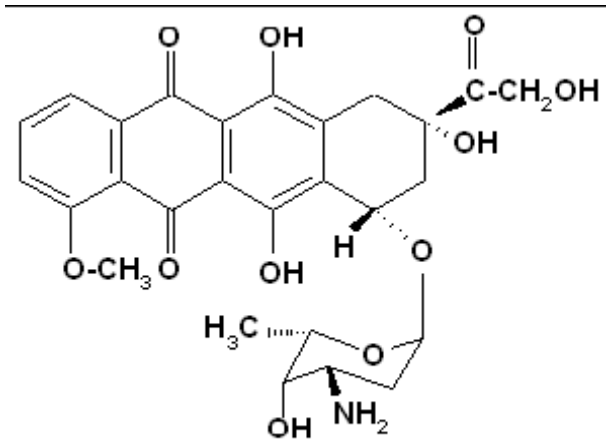
Ancak, antrasiklin antibiyotiklerin kullanımının artmasıyla adriyamisin kemoterapisinin birkaç şiddetli komplikasyonu olarak bilinen akut ve kümilatif doz bağımlı kardiyotoksisite fark edilmiştir (2). Kemoterapötiklerin en önemli yan etkilerinden biri olan kardiyotoksisite ilk kez adriyamisin tedavisi alan çocuklarda kalp yetmezliği geliştiğinin fark edilmesiyle dikkat çekmiş, kullanımları arttıkça diğer antrasiklinlerin ve 5-fluorourasilin de kardiyotoksik etkilerinin olduğu belirlenmiştir (3).

Kemoterapiye bağlı kardiyotoksisite geliştiğinde; hafif kan basıncı değişiklikleri veya geçici elektrokardiyografik değişiklikler görülebileceği gibi; konjestif kalp yetmezliği, disritmi, miyokardit, perikardit, miyokardiyal infarkt ve kardiyomiyopati gibi ağır kardiyak bulgular da oluşabilmektedir (4).

Bu ajanların aktivitelerinden maksimum düzeyde faydalanmak hedeflendiğinden, kemoterapötik ajanların en önemli yan etkisi olan kardiyotoksisitenin belirlenmesine ve önlenmesine yönelik klinik ve deneysel çalışmalar hız kesmeden devam etmektedir.

2.1.1. Adriyamisinin Tanımı, Klinik Kullanımı, Yapısı, Etki Mekanizmaları ve Yan Etkileri

2.1.1.1 Tanımı, Klinik Kullanımı ve Yapısı: Adriyamisin, Streptomyces peucetius kültürlerinden elde edilen, antibiyotik niteliğinde, antrasiklin grubu bir kemoterapötik ajandır (5). Adriyamisin, geniş spekturumlu ve yüksek potansiyelli bir ajan olmasından dolayı, gastrointestinal tümör, sarkomlar, lenfomalar, göğüs ve yumurtalık kanseri gibi katı tümörler ve lösemi gibi kan kanserleri vb. çeşitlerde halen ilk olarak kullanılan bir ilaçtır (6). Bir aglikon ve bir amino şeker gurubundan oluşmuş quinon formdaki adriyamisin şekil 1'de gösterilmiştir (1).



Şekil 1. Adriyamisinin kimyasal yapısı

2.1.1.2. Etki Mekanizmaları

a. DNA'ya Bağlanma (Antitümör Etki): Adriyamisinin intrasellür olarak en yüksek konsantrasyonda olduğu yer, çekirdektir. Hücre adriyamisine maruz kaldıktan sonra floresan mikroskobu ile tesbit edilebilir. Çekirdek içinde antrasiklinler DNA'ya yüksek afinite ile bağlanır. Bu bağlanma DNA çift zinciri içine guanin-sitozin baz çifti arasında enine yerleşmek suretiyle (interkalasyon) olur. Bu mekanizma ile replikasyon ve transkripsiyonu bozarak antineoplastik etkilerini oluştururlar. Adriyamisin döneme özgü olmayan bir ilaçtır. Fakat S dönemindeki hücrelerde etkinliği en fazladır. Ayrıca

topoizomeraz inhibitörüdür ve topoizomeraz II (TopoII)'ye bağlı DNA kırılması yapar (7).

b. Serbest Radikal Oluşturucu Etki: Adriyamisinin indirgenmesi sonucu çeşitli serbest radikaller oluşabilir. Bu radikaller, DNA kırıklarına, lipit peroksidasyonuna, proteinlerin ve DNA'nın alkolasyonuna sebep olur (8). Antrasiklinlerin DNA fonksiyonlarını inhibe etmeleri sadece araya girerek değil, aynı zamanda tek bağlı kesikler ve DNA'nın bunu izleyen kırılmaları ile de olur. DNA molekülünün yakın civarında süperoksit gibi reaktif serbest radikallerin oluşması da bu tür hasardan sorumlu tutulabilir (9).

Antrasiklinler, kinon ve hidrokinon guruplarının getirdiği özellikler sayesinde, hem peroksitleri hem de serbest radikalleri harekete geçirecek potansiyele sahiptir. Adriyamisin toksisitesinde serbest radikal oluşumunun rolü konusu, aktif bir araştırma konusudur (10).

c. Membran İlişkisi: Adriyamisin, direk hücre membranıyla ilişkiye girerek membran fonksiyonunu değiştirir. Adriyamisin, kardiyak hücrelerde lipit biyosentezini değiştirebilir. Bu da membran kompozisyonunda ve de fonksiyonunda bozulmalara neden olur (8). Bunu, hücre membranında doğrudan hasar oluşturarak, membran sinyal ileti yollarını ve hücre içi iyonların homeostazını bozarak yapmaktadır (11,12).

2.1.1.3. Yan Etkileri: Adriyamisin alan hastaların çoğunda sık sık görülen yan etkiler kemik iliği aktivitesinde azalma, sindirim bozukluğu, ağız mukoza iltihabı ve saç dökülmesidir. Ağır lökosit ve trombosit kaybı olabileceğinden dolayı dozu sınırlıdır (13)

Kardiyak yan etki olarak ise; Adriyamisinin neden olduğu üç farklı tip kardiyotoksisite belirlenmiştir (14). Birincisi, tedavinin hemen sonrasında görülen akut ya da subakut hasar. İkincisi, kardiyomiyopati ile sonuçlanan Adriyamisinin neden olduğu kronik kardiyotoksisitedir. Son olarak, adriyamisin tedavisinin tamamlanmasından yıllar sonra başlayan adriyamisin kardiyotoksisitesinin neden olduğu, ventriküler bozukluklar ve aritmidir (15–17).

2.1.2. Adriyamisin ve Deneysel Kardiyotoksisite

Adriyamisin ve diğer kemotropiklere bağlı kardiyotoksisitenin klinik önemi deneysel çalışmaları gündeme getirmiştir. Antrasiklin antibiyotiklerinin kardiyotoksik etkinliği üzerine pek çok mekanizma önerilmiştir. En önemli ve olası gibi görünen mekanizma; kardiyomiyositlerde apoptozisin uyarılması ve kalp kasında adriyamisin tarafından oksidatif stresin oluşturulması üzerine kurulmuştur (18). Çünkü kardiyak miyositlerdeki antioksidanlar, mitokondriyal harabiyetler ve lipit peroksidasyonuna neden olan reaktif oksijen türlerinden korunmak için yetersizdir (19).

Adriyamisin kardiyotoksisitesinin oluşturduğu ve kardiyotoksisiteyi önleyici ajanların olası etkilerinin histopatolojik olarak araştırıldığı deneysel çalışmalarda küçük hayvanların (ör: tavşan rat) ekokardiyografik olarak kardiyak fonksiyonların değerlendirildiği çalışmalarda ise büyük hayvanların (ör: köpek, domuz) kullanılmasının daha uygun olduğu belirlenmiştir (20). Van Vleet ve ark. 17 hafta boyunca haftada bir gün 2,4 mg/kg adriyamisin uygulanan tavşanlarda kardiyotoksisite bulgularının sol ventrikül serbest duvarında ve interventriküler septumda sağ ventrikül serbest duvarına göre daha fazla olduğu saptanmıştır (21). Long ve ark. tavşanlarda adriyamisin dozlarıyla kardiyotoksisite arasındaki ilişkiyi araştırmışlar 100 mg/$m^{2,}$ nin altındaki kümülatif dozlarda miyositlerde değişiklik olmadığını rapor etmişlerdir (22). Herman ve ark. 6 mg/kg kümülatif dozda adriyamisin uygulanan ratlarda miyokart da morfolojik değişiklikler rapor etmişlerdir (23).

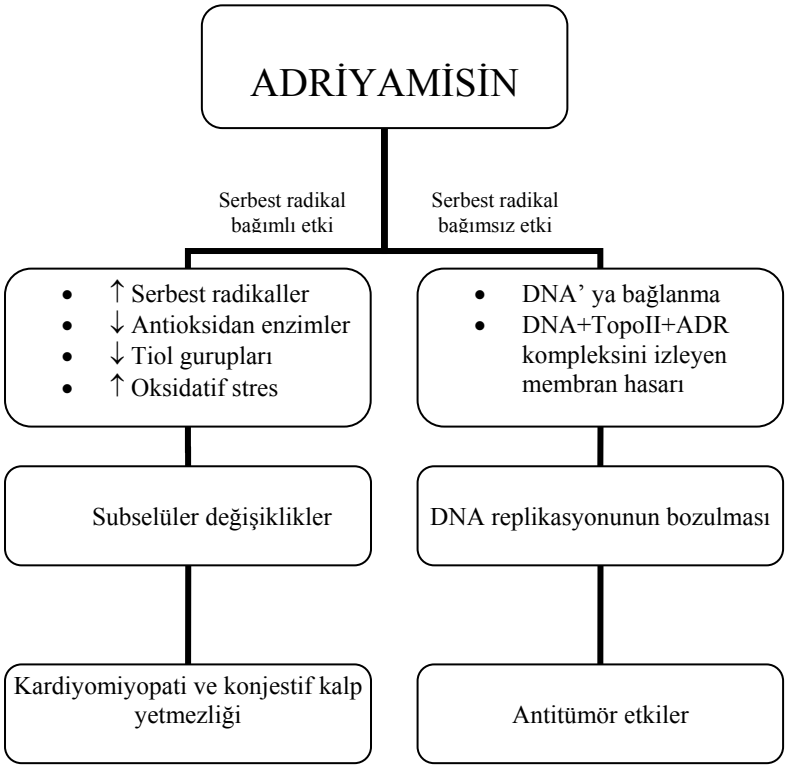
Adriyamisine bağlı kardiyotoksisitenin oluşturduğu deneysel çalışmalarda sürenin önemli olmaksızın 10–15 mg/kg ve üzerindeki kümülatif dozlar (ratlarda ve tavşanlarda) kullanılmaktadır (24).

2.1.3. Adriyamisine Bağlı Kardiyotoksisitenin Patofizyolojisi

Kardiyotoksisiteye neden olan adriyamisinin tam mekanizması belirsizliğini sürdürüyor fakat çalışmaların çoğu adriyamisin kardiyotoksisitesinin patogenezinde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığını göstermektedir (25-27).

Adriyamisin tarafından uyarılan hücresel hasar, demir-antrasiklin kompleksinin oluşumuyla meydana gelen serbest radikaller vasıtasıyla olur, ki buda plazma membranında ciddi hasara ve hücresel iskelet yapısının oluşumuna engel olmaktadır (28).

Kalbin antioksidan savunma mekanizmasının pek fazla gelişmiş olmamasından dolayı, reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olan antrasiklin tarafından bilhassa hasar gördüğü bildirilmektedir. Çünkü, serbest radikallerin salınımındaki mekanizmanın merkezi, miyokardiyumda hasara neden olan adriyamisindir (29). Adriyamisin toksisitesine karşı, kalbi korumada kullanılan antioksidanlar ve demir şelatörlerinin yapımına büyük çabalar sarfedilmektedir (30). Adriyamisinin kardiyotoksik etkisi "serbest radikal bağımlı etki", antitümör etkisi ise "serbest radikal bağımsız etki" olarak tanımlanmıştır. Adriyamisinin serbest radikal bağımlı ve serbest radikal bağımsız etkileri şekil–1 de özetlenmiştir (11).



Şekil 2. Adriyamisinin serbest radikal bağımlı ve serbest radikal bağımsız etkileri

2.1.3.1 Adriyamisin Kardiyotoksisitesi ve Serbest Radikaller-Lipit Peroksidasyonu - Antioksidanlar

Kardiyotoksisite patogenezinde sorumlu tutulan serbest radikaller dış yörüngelerinde çiftleşmemiş elektron bulunduran kararsız aktif moleküller olup, bir elektron vermeye veya hücreden membran fosfolipitlerinde oldukça çok bulunan doymamış yağ

asitlerinden bir hidrojen almaya yatkındırlar. İnvitro çalışmalar adriyamisin gibi quinon halkası içeren antikanser ilaçların, hücre flavin enzimleri ile reaksiyona girip, semiquinon serbest radikal ara ürünlerini oluşturduklarını ve miyosit gibi aerobik şartlarda bu semiquinon serbest radikal ara ürünlerinin çiftleşmemiş elektronlarını oksijene vererek güçlü oksijen radikallerinin oluşturduğu (hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri vb.) göstermiştir. Bu görüş adriyamisine bağlı oluşan oksijen radikallerinin elektron spin Resononce Spektroskopy ile saptanmasıyla desteklenmiştir. Başta hidroksil radikali olmak üzere oluşan radikallerin hücre membran lipitlerine bağlanarak, lipit peroksidasyonuna ve malondialdehit (MDA) gibi sitotoksik ürünlerin de ortaya çıkmasına neden olduğu, doku MDA' sının artmasının da dolaylı olarak olaya katkıda bulunduğu, membran permabilitesini ve hücre fonksiyonlarını bozduğu belirlenmiştir (11,31).

Serbest oksijen radikallerine (SOR) karşı hücrenin savunma mekanizması; glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), redükte gulutatyon (GSH) enzimleri ve E vitamininden oluşmaktadır (32,33). Kardiyomiyositlerin doğal antioksidan enzimler olan CAT ve SOD içeriklerinin düşük olması nedeniyle miyokardın serbest oksijen radikallerinin etkisine oldukça hassas olduğuda saptanmıştır (34). Katalaz, SOD ve GSH-Px aktiviteleri kalpte karaciğere oranla daha düşük bulunmuş, adriyamisine bağlı serbest radikal etkinin neden sadece kardiyak dokuda olduğu, serbest radikallerde artma yanında; endojen antioksidan enzim aktivitelerindeki düşüklükle de izah edilmiştir (34)

Deneysel çalışmalarda (rat, sıçan ve tavşanda) kalp katalaz enzim aktivitesi; karaciğerdeki aktivitenin % 2–4' ü, kalp SOD aktivitesi karaciğerdekinin ~ % 20–30' u, kalp GSH-Px aktivitesi; karaciğerdekinin % 80'i olarak bulunmuştur (35). Ayrıca son zamanlarda çalışmalarda adriyamisinin serbest radikal oluşturucu etkisi yanında, kalbin temel antioksidan enzimi olan GSH-Px'de hızla azalma oluşturarak, kardiyotoksisite gelişmesine katkıda bulunduğu tesbit edilmiştir (34).

2.1.3.2. Adriyamisin Kardiyotoksisitesine Neden Olan Diğer Etkenler

Adriyamisine bağlı kardiyotoksisite sadece serbest radikal bağımlı etki ile açıklanmamış, patogenezde rol alması muhtemel farklı mekanizmalar üzerinde de durulmuştur (5,11) Kardiyomiyopatiye neden olan adriyamisin için önerilen mekanizmalar içerisinde, nükleik asit ve protein sentezinin inhibisyonu, vazoaktif

aminlerin salınımı, adrenerjik fonksiyonlarda değişiklikler, mitokondriyal anormallikler, lizozomal değişiklikler, sarkolemmal Ca (kalsiyum) taşınımında değişiklikler, miyokardiyal elektrolitlerinde dengesizlik, protein oksidasyonu, protein olmayan doku sülfidril gruplarında azalma ve apoptozis de artma bulunmaktadır (13).

Adriyamisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinde etkili mekanizmalar üzerindeki çalışmalar devam etmekte olup, yeni çalışmalar yeni yeni mekanizmaları ortaya çıkarmakta ise de ağırlıklı olarak serbest oksijen radikalleri ve antioksidan sistem fonksiyonları üzerinde durulmaktadır (5,11).

2.1.4. Adriyamisine Bağlı Kardiyotoksisitenin Histopatolojik Bulguları

İnsanlarda, tavşanlarda, farelerde ve sıçanlarda adriyamisinin neden olduğu iki ana tip histopatolojik değişiklik rapor edilmiştir (36). Histopatolojik hasarın birinci tipi daha çok insanlarda kısmi olarak karakterize edilen ve gösterilen miyositlerdeki total kayıplardır. Adriyamisinin toksik etkilerinden dolayı miyositlerde kayıp olsa bile adriyamisin ile işlem görmüş hücrelerin çekirdeklerinde, mitokondri ve Z çizgileri doğal görünümlerini korumaktadır. İkinci tip hasarı ise miyositlerin vakuoler dejenerasyonuna neden olan sarkotübüler sistemdeki şişme temsil etmektedir. Sarkoplazmik retikulum membranlarında peroksidatif hasara neden olan adriyamisinin, bu şişkinliklerin sebebi olduğu varsayılmaktadır (31).

2.1.5. Adriyamisine Bağlı Kardiyotoksisitenin Biyokimyasal Belirleyicileri

Kardiyak hastalıkların tanısında ve uzun süreli takibinde, kardiyak hasarın belirlenmesinde serum aspartat aminotrasferaz (AST), laktat dehidrogenaz (LDH), kreatin kinaz (CK) gibi biyokimyasal belirleyicilerden yararlanılmaktadır. Ancak AST, LDH ve CK düzeyleri iskelet kası hasarının olduğu olaylardan etkilenmektedir. Kardiyak hasarın belirlenmesinde serum CKMB, serum Tn I ve Tn T düzeylerinin daha çok özel olduğu tesbit edilmiştir (37).

2.1.5.1. Kreatin Kinaz MB

Kreatin kinaz, M (musculus) ve B (brain) alt birimlerinden oluşan bir enzim olup, üç farklı CK izoenzimi (CKBB, CKMM, CKMB) belirlenmiştir. En yoğun beyinde bulunan izoenzim CKBB, en yoğun çizgili kaslarda bulunan izoenzim CKMM, en yoğun kalpte bulunan izoenzim CKMB olarak adlandırılır (37–39).

Adriyamisine bağlı kardiyotoksisitenin tanısında CKMB'nin miyokardiyal hasarın göstergesi olabileceği belirlenmiştir(40,41). Lefrak ve ark. 1977 yılında adriyamisine bağlı kardiyotoksisite nedeniyle kalp yetmezliği gelişen hastalarda serum CKMB düzeylerinin arttığı saptamışlar (42), ancak Von Hoff ve ark. serum CKMB düzeylerinin minör miyokardiyal hasarın saptanmasında yetersiz kaldığını belirlemişlerdir (43,44) .

2.1.5.2. Troponinler

Troponinler iskelet ve kalp kasında bulunan kalsiyum aracılığı ile aktin-miyozin etkileşimini düzenleyen düzenleyici üçlü protein kompleksleridir. Troponin T, troponin I ve troponin C olarak adlandırılan, her biri farklı genler tarafından eksprese edilen iskelet ve kalp izoformları belirlenmiştir (45).

Kardiyak TnI'nın ve kardiyak TnT'nin spesifik miyokard hasar belirleyicileri olduğu belirlenmiştir (46). Sağlıklı insan serumunda tesbit edilmeyen troponin I, miyokard hasarını takiben 6 saat içinde yükselmekte ve en az 7 gün yüksek kalmaktadır (39).

2.1.6. Adriyamisine Bağlı Kardiyotoksisitenin Önlenmesine Yönelik Çalışmalar

Adriyamisinin yüksek dozda kullanımının neden olduğu kardiyotoksistenin önlenmesi ve tümöre karşı etkin bir şekilde bu ilacın kullanılabilmesi için düşük dozlarda kullanımı gündeme gelmiştir, fakat düşük dozda kullanım bu türdeki ilaçların tedavi edici gücünü kısıtlamıştır (47).

2.2. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

Günümüzde pek çok öldürücü hastalığın, özellikle kardiovasküler, serebrovasküler hastalıkların, bazı kanser türlerinin ortaya çıkmasında serbest radikallerin önemli rol oynadıkları düşünülmektedir. Serbest radikaller, yapıları, fiziksel, kimyasal özellikleri, hücresel kaynakları ve rol aldıkları reaksiyonlar ile hastalıkların patogenezinde rol oynarlar (48,49).

Serbest radikaller 1, 3, 5 gibi tek sayıda, çiftleşmemiş elektrona sahip, stabil olmayan ve bundan dolayı da son derece reaktif olan basit moleküllerdir (49,50). Serbest radikallerin çiftleşmemiş elektronları kararlı duruma geçme eğiliminde oldukları için, kararlı halde bulunan bir bileşikten elektron alarak, bu bileşiği yeni bir serbest radikal haline dönüştürürler ve bu olay, bir zincir reaksiyonu olarak devam eder (48). Serbest

radikaller, organizmada, hem normal metabolizmanın yan ürünü, hem de iyonlaştırıcı radyasyon, ilaçlar, sigara, hava kirliliği ve diğer zararlı kimyasal maddelerin etkisi ile meydana gelmektedirler (48,50).

Serbest radikallere in vivo örnek olarak, hidrojen peroksit, singlet oksijen, hipoklorid asit, süperoksid radikal, hidroksil radikal, peroksit radikal, nitrik asit radikalini gösterebiliriz. Antioksidanlar tarafından engellenmezse, bu radikaller, en yakınındaki, yağ, protein, karbonhidrat, RNA ve DNA molekülü ile reaksiyona girerek, yapı ve fonksiyonlarını bozmaktadırlar (50,51).

2.2.1. Serbest Radikal Oluşturan Mekanizmalar

Serbest radikal oluşturan kaynaklar endojen ve ekzojen olmak üzere iki gruba ayrılabilirler (52)

2.2.1.1. Endojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Normal olarak mekanizmada, bazı biyokimyasal olayların çeşitli basamaklarında serbest radikaller oluşmaktadır. Her ne kadar serbest radikal yapısına sahip maddelerin organizmaya zarar verme potansiyelleri varsa da, bazı metabolik olayların ilerleyebilmesi için bunların oluşması kaçınılmazdır.

Biyokimyasal mekanizmalar arasında;

- Hücresel oksijen metabolizması (Mitokondriyal elektron transportu),
- Fagositoz,
- Lipit peroksidasyonu,
- Enzimatik aktivite (Çeşitli oksidazlar ve dehidrogenazlar),
- Otooksidasyon,
- Çeşitli hastalık durumları (örneğin yangı),
- Bazı metabolik olaylar (hipoksi, iskemi) bunlar sayılabilir (53–57).

2.2.1.2 Ekzojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Serbest radikaller, ekzojen nedenlerle oluşabilir.

- Radyasyon,
- Sigara dumanı,

- Zehirli gazlar,
- İlaçlar,
- Karsinojen maddeler,
- Pestisitler en önemli serbest radikal üretim kaynağını oluşturur (52).

2.2.2. Başlıca Serbest Oksijen Radikalleri

2.2.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$)

Süperoksit radikali, temel durumdaki oksijen molekülünün bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. En önemli kaynağı mitokondri ve endoplazmik retikulumdaki elektron transport zincir reaksiyonudur (58).

Süperoksit radikalinin yarı ömrü Hidroksil (**.**OH) radikalinden daha uzundur ve moleküllerle daha uzun süre etkileşir. Süperoksit radikali tarafından başlatılan reaksiyonlar **.**OH ve peroksil radikallerini oluşturabilir. Asidik bir ortamda bu süperoksit radikalleri hidrojen peroksit'i oluştururlar. Süperoksit radikali, fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ile reaksiyona girerek reaktif oksijen türevi olan peroksinitriti meydana getirir. Bu türevin doğrudan proteinlere zararlı etkileri olduğu gibi ayrıca bazı nitrat türevi ve hidroksil radikali gibi toksik ürünlere de dönüşebilir (59).

2.2.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Moleküler oksijenin, iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksit (H_2O_2) meydana getirir. H_2O_2, membranlardan kolayca geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır.

Biyolojik sistemlerde H_2O_2'in asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur. İki $O_2^{\cdot -}$ molekülü iki proton alarak H_2O_2ve moleküler oksijeni oluştururlar. Dismutasyon reaksiyonu ya kendiliğinden ya da SOD enzimi tarafından katalizlenir. Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyine sahip reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipit peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir (60,61).

2.2.2.3. Hidroksil Radikali (.OH)

Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilen hidroksil radikali (.OH) canlılarda iki mekanizma ile oluşabilir. Birincisi suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyonun etkisi sonucu, ikincisi hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu) meydana gelir (60).

Hidroksil radikali tüm biyomoleküllerle reaksiyona girebilen çok reaktif bir radikaldir. En çok bilinen hasarı lipit peroksidasyonudur. .OH radikali biyomembranlardaki çoklu doymamış yağ asitlerinin metilen grubundan bir hidrojen atomu kopmasına ve lipit peroksidasyonunun başlamasına neden olur (61,62).

2.2.2.4. Nitrik Oksit (NO)

Nitrik oksit (NO), gaz yapısında ve radikal özelliğinde bir moleküldür. Çok kısa yarılanma ömrüne sahiptir. Nitrik oksit, lipofilik olduğundan dolayı membranları kolayca geçebilme özelliği vardır (63). Ayrıca NO, immunomodülatör, vazodilatör ve nörotransmiter bir moleküldür (64). Organizmada peroksit anyonu ve hidroksil radikali gibi çok etkin radikallerin üretilmesine neden olur. Bu radikaller dokulara zarar verebilir, kalpte kontraktil fonksiyonu bozabilir, çeşitli iyon pompalarını etkisiz kılarak iletim bozukluklarına yol açabilir. Öte yandan NO'in doğrudan doğruya mitokondriyal solunum zincirini inhibe ettiği bilinmektedir (63).

Nitrik oksit, endotel hücreleri, nötrofiller, aktive olmuş makrofajlar ve diğer hücre tiplerinin uyarılmasıyla L-arjininden üretilir (65). Nitrik oksit sentaz enziminin katalizlediği bir dizi reaksiyon sonucunda L-arjinin, oksijen varlığında L-sitrullin ve NO'ya dönüşür. Bu reaksiyon için ortamda oksijenin yanı sıra Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), Flavin adenin dinükleotid (FAD) gibi bazı kofaktörlerin de bulunması gerekir (66).

Nitrik oksit sentezlendikten sonra hızla hedef dokulara yayılarak hücre içinde guanilat siklaz enzimini aktive ederek siklik guanozin monofosfat (cGMP) miktarını arttırır ve bu durum, düz kaslarda gevşemeyle sonuçlanır (63). Nitrik oksit çok kısa yarılanma ömrüne sahip olduğundan hızlı okside olarak nitrit (NO_2) ve nitrata (NO_3) dönüşür. İnsan vücudunda NO, hemoglobine bağlandığında inaktive olur (65).

2.3. LİPİT PEROKSİDASYONU

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştukları zaman organizmalarda çeşitli bozukluklara yol açarlar. Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenirler, fakat lipitler en hassas olanlarıdırlar. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asidleri (Poly unsaturated fatty acid-PUFA)'nın oksidatif yıkımı, lipit peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür

Lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan PUFA zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipit radikali niteliği kazanır. Oluşan lipit radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle dien konjugatları ve daha sonra lipit radikalinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipitperoksil radikali meydana gelir. Lipit peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer PUFA'yı etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak hidroperoksidlerine dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder. Lipit peroksidasyonu ya toplayıcı reaksiyonlarla sonlandırılır ya da otokatalitik yayılma reaksiyonlarıyla devam eder.

Plazma membranı ve organel lipit peroksidasyonu, daha önce bahsedilen serbest radikal kaynaklarının hepsiyle stimüle edilebilir ve metallerin varlığında artar. Bu metaller redoks katalisti olarak görev yaparlar ve süperoksit ve hidrojen peroksidin daha güçlü oksidanlara dönüşümünü katalizlerler.

Lipitlerden, araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine "enzimatik lipit peroksidasyonu", diğer radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna ise "non-enzimatik lipit peroksidasyonu" adı verilir. Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan lipit hidroperoksitlerinin yıkımı, geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Lipit hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehidler oluşurlar. Bu bileşikler, ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ

ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiobarbütirik asitle ölçülebilen malondialdehid (MDA) meydana gelir. Bu metod lipit peroksit seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir fakat lipit peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir.

Lipit peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehidler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece, birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olur. Lipit radikallerinin hidrofobik yapıda olması yüzünden reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerle meydana gelir. Membran permabilitesi ve mikroviskozitesi ciddi şekilde etkilenir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehid, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler, malondialdehidin neden mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar (60) .

2.4. ANTİOKSİDAN SAVUNMA

Hücreler oksidatif hasarı önleyen, yok eden ya da kısmen azaltan bazı mekanizmalara sahiptir. Oksidanlarla mücadelede birinci asama risk faktörlerinin belirlenmesi ve bunlardan uzak durulmasıdır. İkinci yol ise doku hasarına yol açan olayın etkisi ile tetiklenen biyokimyasal tepkimeleri bir ya da birkaç basamakta engellemektir. Bu amaçla yapılabilecek girişimler şunlar olabilir: Na^+ aktif girişinin engellenmesi, K^+ girişinin aktive edilmesi, hücre içi laktik asidozun inhibisyonu, sitotoksik ve vazojenik antiödem girişimler, yeniden fosfolipit sentezi hızlandırıcıları, kalsiyum kanal blokerleri, lipit peroksidasyonu ve siklooksijenaz inhibitörleri, lökotrienlerin inhibisyonu, opiat antagonistleri, H_2 reseptör antagonistleri, atrial natriüretik peptid, hipotermi. Üçüncü asama aktive olmuş nötrofillerin lezyon bölgesine hücumunu ve birikimini inhibe etmek için antiinflamatuvar ilaçların kullanılmasıdır. Dördüncü ve en etkin yol artmış oksidanlara doğrudan etki ederek onları ortamdan kaldırmaktır. Direkt etki ile oksidanları inaktif hale getiren maddelere“antioksidanlar” denir (67,68).

Tüm antioksidanlar baslıca dört yol ile etkilerini gerçekleştirmektedirler. Bu etkiler;

a. Toplayıcı Etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir. Antioksidan enzimler bu tipte etki gösterirler.

b. Bastırıcı Etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan ve inaktif şekle dönüştüren olaya bastırıcı etki denir. A vitamini ve flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

c. Onarıcı Etki

d. Zincir Kırıcı Etki: Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir. Hemoglobin, seruloplazmin, E vitamini ve mineraller bu etkidedir (60).

Bu sistem Doğal (endojen kaynaklı) ve ekzojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar (60,69).

2.4.1. Endojen Kaynaklı Antioksidanlar

2.4.1. 1. Enzim Olanlar

- Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi,
- Hidroperoksidaz,
- Katalaz,
- Süperoksit dismutaz,
- Glutatyon peroksidaz,
- Glutatyon-S-transferaz' dır

2.4.1. 2. Enzim Olmayanlar

- β-karoten (A vitamini),
- α-tokoferol (E vitamini),
- Askorbik asit(C vitamini),
- Ferritin,
- Transferin,

- Glutatyon,
- Seruloplazmin,
- Albümin,
- Billirubin,
- Melatonin,
- Karnozin (60).

2.4.2. Ekzojen Kaynaklı Antioksidanlar

- Pterin aldehit,
- Allopürinol,
- Folik Asit,
- Oksipürinol,
- Tungste,
- Mannithol,
- C vitamini,
- Trolox-C,
- Asetilsistein,
- Adenozin (60) .

Endojen kaynaklı önemli bir kaç antioksidana değinecek olursak;

a. Sitokrom Oksidaz: Solunum zincirinin en son basamağı olan sitokrom oksidaz bakır içeren bir enzimdir. Bu reaksiyon, fizyolojik şartlarda sürekli oluşur ve süperoksit radikalinin suya dönüşümünü sağlayarak oksidatif hasar oluşumunu engeller (60,70).

b. Süperoksit Dismutaz (SOD): SOD toksik süperoksit-radikalleri elimine eden, serbest radikallere karşı doğal bir defans sistemi olup, süperoksit anyonunun H_2O_2' ye dismutasyonunu katalizler (71,72).

c. Katalaz (CAT): Katalaz; kanser, diyabet, katarakt, retinopati, ateroskleroz, iskemik – reperfüzyon hasarı, artrit, nörodejeneratif hastalıklar, beslenme yetersizliği ve yaşlanmayı içine alan pek çok patolojik şartlarda ortaya çıkan oksidatif strese karşı

savunmada antioksidan sistemin öncelikli bir enzimidir. Katalaz tarafından hidrojen peroksit (H_2O_2), su ve moleküler oksijene dönüştürülerek metabolize edilmektedir (Serin, 1998). (73)

Katalaz enzimi peroksizomlarda yerleşmiş olup yapısında dört tane hem grubu vardır. Peroksidaz aktivitesinde olan bu enzim hidrojen peroksit, metil peroksit gibi küçük moleküllere etki eder. Büyük moleküllü lipit hidroperoksitlerine etki etmez (74,75).

d. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px): Glutatyon peroksidaz pirimer enzimatik savunma sistemi olup, mitokondrilerde ve sitosolde bulunur. Hücreleri, organik hidroperoksitler ve hidrojen peroksitler tarafından oluşturulan oksidatif tahribata karşı korur. GSH-Px iki adet glutatyon molekülünü bir adet glutatyon disülfite okside etmektedir (75,76).

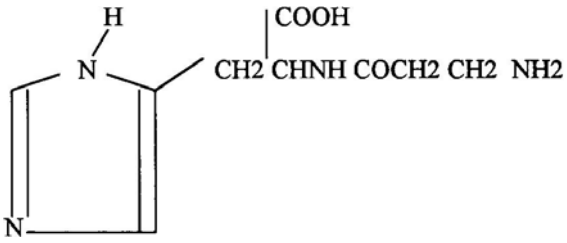
2.5. DOĞAL BİR ANTİOKSİDAN OLAN KARNOZİN

İlk kez Gulewitsch ve Amiradzibi tarafından, 1900 yılında et ekstratılarından izole edilen karnozin (KAR), histidin türevi bir dipeptiddir (77). Karnozinle ilgili pek çok çalışma ve teori olmasına rağmen, KAR'ın biyolojik etkileri hala gizemini korumaktadır.

2.5.1. KARNOZİNİN TANIMI, YAPISI VE SENTEZ – YIKIM AŞAMASI

2.5.1.1 Tanımı ve Kimyasal Yapısı

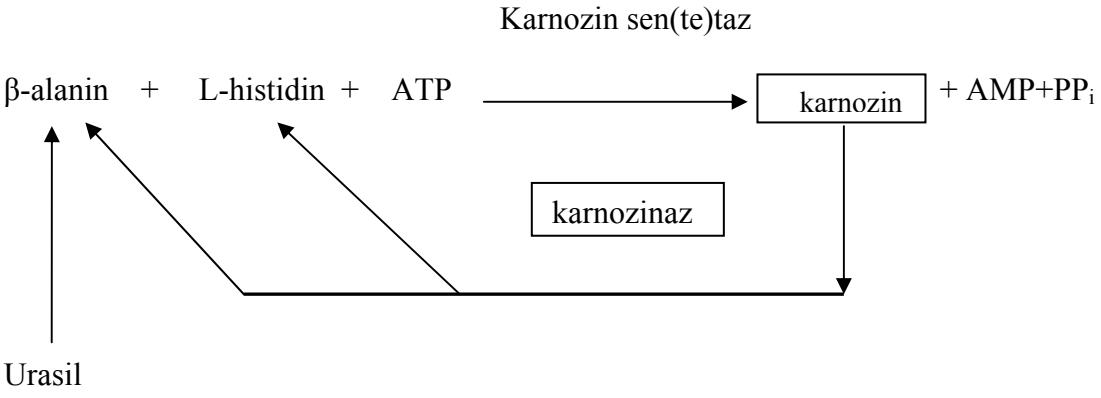
Karnozin, β-alanil-L-histidin yapısında, suda çözünebilen bir fizyolojik dipeptiddir (şekil-3) (78), ve homokarnozin (γ-amino-bütiril-histidin, GABA-histidin), anserin (β-alanil-L-metilhistidin) gibi aminoaçil histidin dipeptidlerin en basit üyesidir (77). Karnozin, iskelet kası ve beyin gibi uyarılabilir, bölünmeyen ve uzun ömürlü dokularda 20mM gibi yüksek konsantrasyonlarda bulunur (79).



Şekil 3. Karnozinin Kimyasal Yapısı

2.5.1.2. Sentez ve Yıkımı

Karnozin, karnozin sentetaz ile β-alanin ve L-histidin amino asitlerinden sentezlenir. Protein yapısına girmeyen β-alanin, urasilin karaciğerde yıkımı ile oluşur. Karnozini, sadece β-alanini hücre içine taşıyan transport sistemine sahip hücreler sentezleyebilir. Bu sistemin iskelet kası hücreleri ve oligodentrositlerde bulunduğu, hücre farklılaşması arttıkça da hücrelerin β-alanin alımının arttığı gösterilmiştir (şekil 4) (80). Geniş bir substrat spesifitesine sahip karnozin sentetazın sitozolde bulunduğu ve farklı dokularda tüm aminoaçil histidin dipeptidlerini sentezleyebildiği bilinmektedir (81).



Şekil 4. Karnozinin Sentez Ve Yıkımı

Doku karnozin düzeyleri, asetilasyon, metilasyon ve hidroliz reaksiyonları ile kontrol edilmektedir. Karnozinin asetilasyonu veya metilasyonu, sırasıyla, N-asetil karnozin veya anserin oluşturmaktadır (82), α–peptidleri hidroliz eden peptidazlara karşı dirençli olan karnozinin hidrolizi (79), doku veya serum karnozinazları tarafından gerçekleştirilir (83). Farklı gen ürünleri olan bu enzimlerin sadece dağılımı değil aktiviteleri de farklılık gösterir. Uygun şartlarda bu iki izoform da karnozini hidroliz ederken; homokarnozine karşı sadece serum karnozinazı hidrolitik aktivite gösterir (77).

Karnozinaz, alt üniteleri biribirine bir veya daha fazla disüfid bağıyla bağlanmış bir dimerdir. Fizyolojik şartlarda, karnozinazın beyinde homokarnozinin, dolaşımda da karnozin ve anserinin yıkılmasından sorumlu olduğu öne sürülmüştür (83).Serum karnozinaz aktivitesinin yaşla birlikte yükseldiği; 10 aydan küçük çocuklarda az ya da tesbit edilmeyecek düzeyde olduğu; 15 yaşına kadar aktivitesinin giderek arttığı ve yetişkin düzeyine ulaştığı belirtilmiştir (82).

Doku karnozin düzeylerinin diyetten etkilendiği, histidinden fakir diyetle beslenen ratlarda doku karnozin seviyelerinin düştüğü, diyete histidin eklenmesiyle de düşen karnozin seviyelerinin arttığı bildirilmiştir. Diyetle yüksek miktarda alınan karnozinin iskelet karnozin seviyesini artırdığı; kalp karaciğer ve iskelet kası karnozin seviyelerini ise etkilemediği gösterilmiştir. Birlikte karnozin ve E vitamini kullanımı, tek başına verilen E vitaminine göre, karaciğer ve kalpte E vitamini ve karaciğerde karnozin seviyelerinin yükselmesine yol açmaktadır. Kas dokusu karnozin seviyeleri; açlık, enfeksiyon, travma ve şoktan sonra düşmektedir (84).

2.5.2. Antioksidan Aktivitesi

Karnozin hayvansal dokularda bulunan suda çözünebilen doğal bir metabolittir. Antioksidan özelliklerinden dolayı aktif oksijen türlerinin temizlenmesi karnozinin biyolojik bir fonksiyonudur. Karnozin, bir hidroksil ve SOR süpürücüsü ve tekli moleküler oksijenin güçlü bir yok edicisidir (85–88). Karnozinin antioksidan aktivitesi, sarkoplazmik retikulum, iskelet kas mikrozomları ve linoleik asit emülsiyonlarınıda kapsayan oksidasyon model sistemlerinde dahi gösterilmiştir (85,89). Karnozin suda çözünebilirliğinden dolayı, hücre içerisinde yüksek konsantrasyonda bulunan oksidasyon aracıları (geçiş metalleri ve oksijen radikalleri gibi) ile hücreler için iyi bir antioksidan sistem olarak çalışmaktadır (84).

Karnozin, metal şelatasyonu ve serbest radikal süpürücü bir kombinasyonla lipit oksidasyonunu önleyebilmektedir (90). Çalışmalar gösteriyor ki, karnozin ve ilgili peptitlerin doku ve organeldeki seviyesi, model membran sistemlerinin peroksidasyonunu önlemiştir (91).

2.5.3. Tamponlayıcı Aktivitesi

Fizyolojik pH da hem karnozin hemde anserinin olağanüstü tamponlayıcı etkisi, onların biyolojik rollerinin bazısını açıklayan bir işlevidir (92). Karnozin, düşük alkali pH’da

lipit peroksidasyonunu kolaylıkla baskılayabilir. Önemli kas aktivitesi sırasında, intrasellüler ortamda meydana gelen asidifikasyon durumundan tamponlayıcı etkisiyle kas hücrelerini korumaktadır. Karnozin, peroksidasyonun baskılanmasını sağlayarak da bunu gerçekleştirir. Ayrıca karnozin bazı enzimatik reaksiyonları durdurur ki, bunu da ağır metal iyonlarını bağlayıcı özellikleriyle göstermektedir (93).

2.5.4. Membran Koruyucu Özellikleri

Sarkoplazmik membran fragmentleriyle yapılan çalışmalarda, karnozin ilavesiyle, lipit peroksidasyonunun neden olduğu Ca pompasına Ca bağlanma ve Ca-ATPaz inhibisyonunun ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir (93). Bileşiklerin ikisi birden reaksiyona ilave edildiğinde malondialdehit konsantrasyonunun doza bağımlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir. Farklı modellerde lipit peroksidasyonunda da benzer sonuçlar gösterilmiştir. Kısmen hidrofilik yapıya sahip olan karnozin molekülü, membranın çift katmanlı lipit yapısındaki hasarlara bağlanabilir ve hasarın yanında oluşan peroksidasyon ürünlerinin giderilmesinde etkilidir (84).

2.5.5. Diğer Biyolojik Etkileri

Karnozin, nörotrasmitter, antioksidan sistem (94,91) ve antiglikasyon (95) gibi pek çok biyolojik olayla ilişkilidir. Diğer etkileri arasında:

- İnsan fibroblast kültürlerinin hayfick limitini artırabilir (79)
- Kas kasılmasını ve oksidatif fosforilasyonu regüle edebilir (79)
- Hücre içi iyonize Ca^{+2} düzeylerini artırarak, kalp kası kontraktilitesini artırır (84)
- İnsan nötrofillerinin interlökin–1 β üretimini artırır ve apopitozu önler (84)
- Trasforme hücreleri öldürerek antikanser aktivite gösterir (79)
- Kas aktivitesinde artan laktik asiti nötralize ederek, hücre içi pH'nın düşmesini önler ve önemli bir tampon etkisi gösterir (84,81)
- Reaktif karbon bileşikleri (RCC) ile oluşan protein çapraz bağlanma reaksiyonlarını önler (95)
- Serbest radikal tutucu, aynı zamanda serbest radikal oluşum engelleyici (96–99)
- Mitokondrial apoptozis yollarının inhibitörü (100)
- Lenste katarak oluşumu engelleyici (101)

- İrritan faktörlere karşı gastrik mukoza koruyucusu (102)
- Nöroprotektif ajan (103)
- Serebral ve kardiyak iskemiyi azaltıcı etkiler (104,105) sayılabilir.

2.6. ANESTEZİ ALTINDAKİ SIÇANDA HEMODİNAMİK ÖLÇÜMLER

2.6.1. Arteryal Basınç Ölçümü

Birçok çalışmada, vazokontriktör ya da vazodilatör bir ilacın uygulanmasına yanıt olarak sadece arteriyel basınçtaki akut değişikliklerin ölçülmesi yeterli olmaktadır. Bu durumlarda, deneyin gerçekleştirilmesinin en kolay yolu anestezi altındaki hayvanlarda çalışmaktır. Bununla birlikte, anestezik kullanılması bazal damar tonusünü ve refleksleri etkileyebilir ve bu nedenle anestezi altındaki hayvanlarda alınan yanıt ile bilinci açık hayvanlardan alınan yanıt arasında fark görülebilir. Bu nedenle çalışmanın süresine bağlı olarak kullanılacak anestezik önemli olabilir. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan anestezikler sodyum pentobarbital, kloraloz, üretan ya da ketamin-ksilazin kombinasyonlarıdır.

Anestezi edilmiş sıçanda arteriyel basıncın akut ölçümü genellikle karotid ya da femoral arterin kanüle edilmesiyle gerçekleştirilir. Karotid arterin kanüle edilmesi için, sıçan anestezi altına alınır, operasyon masasının üzerine sırtüstü yerleştirilir. Anestezi işlemi hayvanın bazal sıcaklık değerini düşürür, bu nedenle sıçanın vücut sıcaklığının korunması için operasyon masası ile hayvanın ısıtılması yararlı olacaktır. Sıçanın ayakları bant kullanılarak sabitlenebilir. Boynuna dikey bir insizyon (kesi) yapılır. Karotid arter, trakeyi çevreleyen kasların arasından (sternohyoid, omohyoid ve sternomastoid kaslar) keskin olmayan diseksiyonlarla açığa çıkartılır. Karotid arter yavaşça vagus sinirinden ayrılır ve iki ligatur karotid'in altına gevşek olarak yerleştirilir. Distal (rostral) ligatür sıkıca bağlanır ve bull-dog vasküler klamp kan akımını durdurmak için disekte edilen arterin en proksimal noktasına yerleştirilir. İyi bir makas kullanılarak karotid üzerinde küçük bir insizyon yapılır (iris makası bu amaçla kullanılabilir) ve heparinlenmiş serum fizyolojik (50 U/ml) ile doldurulmuş olan kateter karotid içinde ilerletilir. Kateter klamp'e kadar ilerletildikten sonra, ikinci ligatür insizyon ile klamp arasında olacak şekilde hafifçe bağlanır. Klamp dikkatli bir şekilde kaldırılır, kateter biraz ilerletilir, böylece kateterin ucu aortaya ulaşır. Kateterin aortaya

girişi için gereken mesafe kanülasyondan önce ex vivo olarak belirlenir. Proksimal ligatür tümüyle bağlanır; distal ligatür kateter etrafından bağlanır. Kateter üç yönlü musluk aracılığıyla sıçanın kalbi ile aynı seviyede olan basınç transdüserına bağlanabilir.

Femoral arteri izole etmek için, kasık bölgesinde femurun başlangıcına paralel olacak şekilde 2 cm genişliğinde bir insizyon yapılır. Abdominal duvarın kenarında insizyonun distal ucuna kadar genişletilen keskin olmayan diseksiyona başlanır, böylece femoral arter femoral venden ve sinirden izole edilebilir. Sonrasında, kateter femoral artere karotid arterde yapıldığı gibi yerleştirilir. Ancak, 225 ile 350 g aralığındaki sıçanlarda arter içine girmek için PE-50'den hazırlanan kateter geniş olabilir. Bu durumda, PE-10 tubing (3-4 cm) PE-50 tubing'in ucuna ısıtılarak yerleştirilir.(106,107)

2.6.2. Langendorff Kalp Modeli

Langendorff, izole kalpte akut deneyler yapılmasını ve pek çok parametrenin aynı anda ölçülmesine sağlayan kullanışlı bir yöntemdir. İzole perfüze kalp preparatı ilk kez Oskar Langendorff isimli bir Alman doktoru tarafından tanımlanmıştır. Çalışmadan istenen şartlara göre modifiye edilebilir. Bugüne kadar pek çok modifikasyona uğramış olan preparat fizyolojik, farmakolojik ve biyokimyasal araştırmalarda çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Preparat en çok akut ilaç etkilerini araştırmak için kullanılsa da önceden belli bir uygulamaya tabi tutulmuş hayvanların kalplerindeki değişiklikler ve bu kalplere ilaçların akut etkileri de incelenebilmektedir

2.6.2.1. Preparatın Hazırlanması

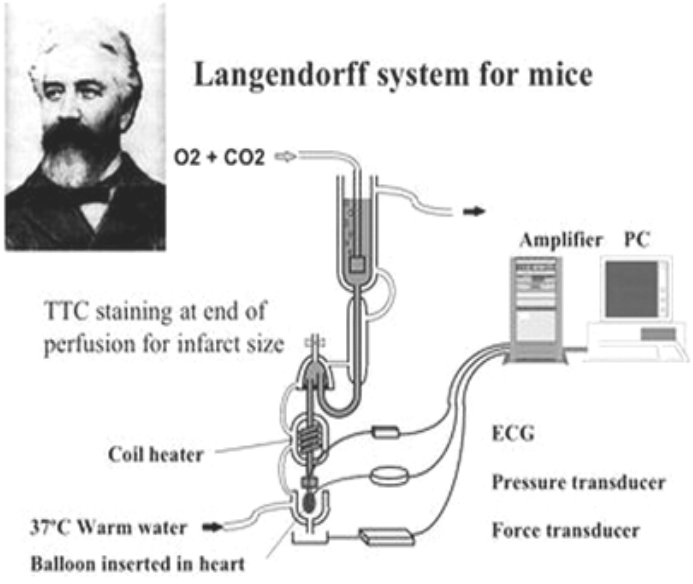
Assendan (çıkan) aort öncelikle izole ve kanüle edilir. Buradan belli bir basınçla verilen perfüzyon sıvısı aort kapaklarını kapatır ve sıvı sol ventrikül içine gidemez ancak koroner arterleri perfüze eder. Perfüzat daha sonra koroner sinüsten sağ atriuma boşalır ve daha sonra pulmoner arterlerden atılır. Langendorff preparatı bu yönüyle perfüzatın sol atriuma boşaltıldığı ve koroner perfüzyonun kalbin kendi kasılma gücüyle gerçekleştiği çalışan kalp (working heart) preparatlarından ayrılır.

Yeterli el becerisiyle, kalbin izolasyonu ve perfüzyonu 60 saniyenin altında bir sürede gerçekleştirilebilir. Anestezi yapıldıktan sonra, kalpte herhangi bir mekanik hasar oluşturmadan assendan aorta izole edilip kalp soğuk perfüzyon solüsyonuna konulmalıdır. Kalbin atması soğuk solüsyon içinde durur ve perfüzyon için hazır

bekletilen kanüle kolayca takılabilir. İplikler aortu kanüle sabitlemek için bağlandıktan sonra perfüzyona derhal başlanabilir.

Perfüzyon sıvısı bir ısı sarmalı aracılığıyla ısıtılmış ve %95 O_2 + %5 CO_2 ile oksijenlendirilmiştir. Perfüzyon başladığı anda kanül içinde hava kabarcığı olmamasına dikkat edilmelidir; varsa kalp hafifçe sıkılarak hava uzaklaştırılmalıdır. Preparat kayıtlar için gerekli prosedür yerine getirildikten sonra cidarları ısıtılan bir kalp odacığı içine alınmalıdır. Bu şekilde preparatın termoregülasyonu daha hassas bir şekilde yapılmış ve kalbin dış cidarları kurumaya karşı korunmuş olur. (şekil 5)

Bu yöntemle sayesinde, pik sistolik basıncı, end diastolik basınç,+dp/dtmax, -dp/dtmax, slope (eğim) indeks (+dp/dtmax/-dp/dtmax), kontraksiyon-zaman eğrisi altında kalan alan, kalp hızı, basınç hız çarpanı, sol ventrikül volümü, koroner rezistans, oksijen kullanımı, refrakter periyod gibi parametreler ölçülebilir.



Şekil 5. Langendorff düzeneği kuruluş şeması

2.6.2.2. Perfüzyon Solüsyonunun Hazırlanması

Preparat genellikle modifiye Krebs veya Tyrode solüsyonları ile perfüze edilir. Preparatın iyi çalışması perfüzyon solüsyonunun kalitesine de bağlıdır. Solüsyon kesinlikle hiçbir partikül içermemelidir. Bunun için kaplar çok temiz olmalı, mümkünse deiyonize edilmiş distile su kullanılmalı ve solüsyon için en yüksek saflıkta tuzlar tercih edilmelidir. Çözelti hazırlanması bittikten sonra mutlaka uygun filtrelerle (örn. 5 μm) süzülmelidir.

a. Perfüzyon ve Akımla İlişkili Parametreler I: Perfüzyon iki ayrı şekilde yapılabilir;

Sabit Basınç veya Sabit Akım: Sabit basınçla perfüzyonda koroner akımı, sabit akımla perfüzyonda da koroner perfüzyon basıncını kaydetmek mümkündür. Eğer yeterli basınç veya akımda perfüzyon yapılırsa preparatın yaşayabilirliği (viabilitesi) açısından iki metodun birbirine üstünlüğü yoktur. Elde edilen parametreler (basınç veya akım) birbirleriyle ters orantılı oldukları için herhangi birinin ölçülmesi diğeri hakkında da fikir verir.

b. Perfüzyon ve Akımla İlişkili Parametreler II

Bazı Langendorff sistemlerinde kullanılan perfüzat yeniden sirküle edilir. Kullanılmış perfüzat sıvısı da pek çok biyokimyasal parametrenin ölçülebilmesi için bize fayda sağlar. Bunlardan en sık kullanılanları arasında LDH, CK, troponin T ölçümleri. pH, pO_2, pCO_2 gibi parametrelerin *online-realtime* ölçümü için modüller üretilmiştir.

Kasılma Gücü ile İlişkili Parametreler: Sol ventrikül içine sol atrium yoluyla bir balon yerleştirilir. Balona belli bir basınç uygulanarak preload (ön yükleme) oluşturulur. Balon içinde oluşan basınç intraventriküler basıncı simüle eder. Yeni cihazlarda ultrasonik sensörlerle ventrikül boyutlarını, segment uzunluklarını ve duvar kalınlıklarını da ölçmek mümkündür.

Elektriksel Parametreler: Yerleştirilen iki elektrodla bipolar elektrogram kaydedilebilir. Elektrogram için metal veya suction elektrodlar kullanılır. Kalpten monofazik aksiyon potansiyelinin kaydı için özel cihazlar da üretilmiştir. Langendorff preparatında ritim ve hız değişikliklerinin deneyimizi etkilemesini istemiyorsak kalbi sağ atriuma yerleştirilen iki elektrotla yarabiliriz. Uygun izolasyon yöntemleri izlenirse, uyarı yapılması elektrogram kayıtlarının alınmasına engel değildir (108).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, 20.3.2007- 15.7.2008 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı ve Hakan Çetinsay Deneysel Araştırma Merkezi laboratuarlarında gerçekleştirildi. Proje, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu ve Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Başkanlığının 07/01 nolu kararı ile onaylanmıştır.

3.1. DENEY HAYVANLARI

Çalışmamızda 160–243 g ağırlıklarında ≅ 4 aylık 36 adet Spraque Dawley dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar, oda sıcaklığı 24±1 ^{0}C, nemi % 60–70 olan ve gece-gündüz döngüsü otomatik olarak 12 saat gece, 12 saat gündüz olacak şekilde ayarlanan ortamlarda, her kafeste (polipropilen yapıda) bir sıçan olacak şekilde barındırıldı. Çalışma süresince hayvanlara pelet şeklinde sıçan yemi ve çeşme suyu verildi.

3.2. DENEY GRUPLARI

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

Kontrol grubu (KONT): İki hafta boyunca serum fizyolojik (SF) solüsyonunun [0,2 ml/kg/hayvan başına intravenöz (i.v.), n=8] verildiği grup,

Karnozin (KAR) grubu: İki hafta boyunca karnozinin (10 mg/kg/hayvan başına 0,2 ml SF içinde i.v., n=8) verildiği grup,

Adriyamisin (ADR) grubu: Çalışmanın ikinci haftası ikişer gün arayla dört defa adriyamisinin uygulandığı (4 mg/kg/hayvan başına 0,2 ml SF içinde i.v., n=10), iki haftanın diğer günlerinde ise SF verilen grup,

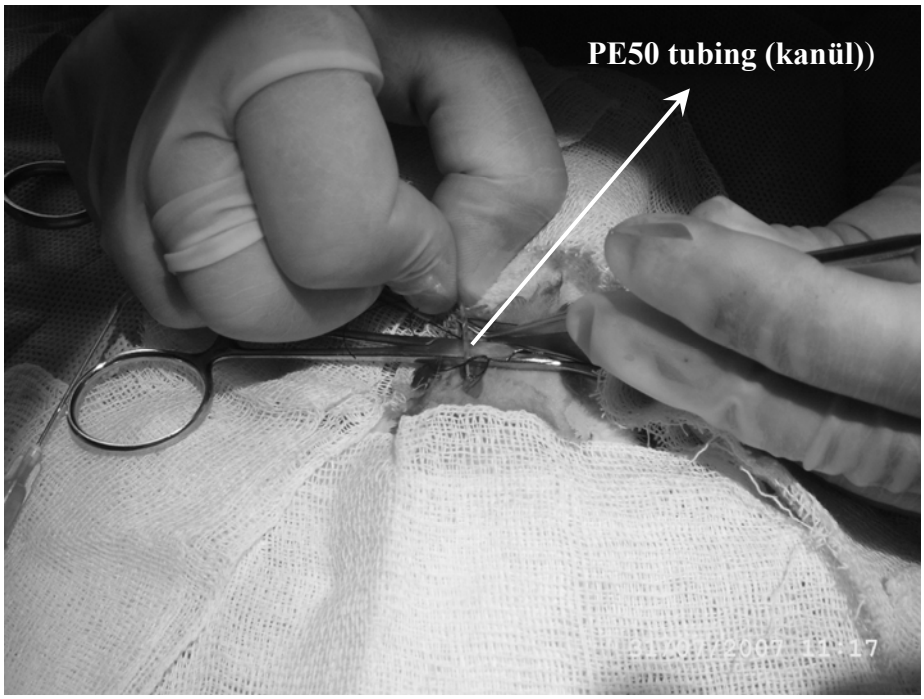
Karnozin + Adriyamisin (KAR+ADR) grubu: Adriyamisin uygulamasından bir hafta öncesi karnozinin (10 mg/kg/hayvan başına 0,2 ml SF içinde i.v.) verilmeye başlandığı ve ikinci hafta karnozin ile birlikte adriyamisinin ikişer gün arayla dört defa uygulandığı (4 mg/kg/hayvan başına 0,2 ml SF içinde i.v., n=10) grup.

İki haftalık infüzyon işlemlerinin bitiminde, hayvanların ağırlıkları tekrar belirlendi (VA_2)

3.3. SIÇANLARA İNFÜZYON İÇİN KATETERİZASYON İŞLEMİ

Sıçanlara uygulanacak kateterizasyon işlemi öncesi yapılacak anestezi, ketamin (39,35 kg/mg) ve xylazine (4,96 kg/mg) karışımından oluşan anestezik maddenin intramuskular (i.m.) olarak enjeksiyonuyla gerçekleştirildi. Anestezi altındaki hayvanların boğaz kısımları ve boyun kısımlarındaki kılları traş edildikten sonra, batikonla silinen boğaz kısmından yapılan bir kesi ile deri altı dokular ve fasyalar künt disseksiyon yardımı ile ayrılarak vena jugularis'e ulaşıldı. Damar, çevresindeki sinirlerden itinalı bir şekilde izole edildi. Damara PE–50 (Intramedic, Clay Adams, MD) tubing yerleştirildikten sonra sabitlemenin kolay olması için önceden 3/0 ipekler hazırlandı. Enjektör iğnesi ile dikkatli bir şekilde damara PE–50 tubingin gireceği yer açıldı. PE–50 damarı zedelemeyecek şekilde pensetler yardımı ile yavaş bir şekilde damar içerisine yerleştirildi (Resim 1) ve 3/0 ipek ile damardan çıkmayacak şekilde damara sabitleme yapıldı. Bu işlemden sonra batikonla silinmiş iki kulak arasındaki ense kısmına yapılan kesi arasından boğaz kısmındaki kesiye doğru bir trokar kılıfı aracılığı ile geçit açıldı. Trokar kılıfı içindeki trokar milinin çıkarılmasından sonra tubing trokar kılıfından geçirilerek enseden çıkarıldı. Trokar kılıfının deri altından çekilip çıkarılması ile tubingin bir ucu vende iken diğer ucu da enseden vücut dışına çıkarılmış oldu. Ense kısmından dış ortama çıkarılmış olan PE–50 tubing 3/0 ipekle derinin kesik uçlarına bir dikiş işlemi ile bağlandı ve daha sonra uç kısmına intravenöz enjeksiyonu yapmamızda bize kolaylık sağlayacak olan, biraz daha geniş çaplı yumuşak silastik tubing, PE–50 tubing üzerine geçirildi. Heparinli serum fizyolojik içeren enjektör yumuşak silastik tubing içerisine girdirilip, damar yolu kontrol edildi. 24 saat sonra işlemlerin tekrarlanabilmesi için metal pim yumuşak silastik tubinge yerleştirildi.

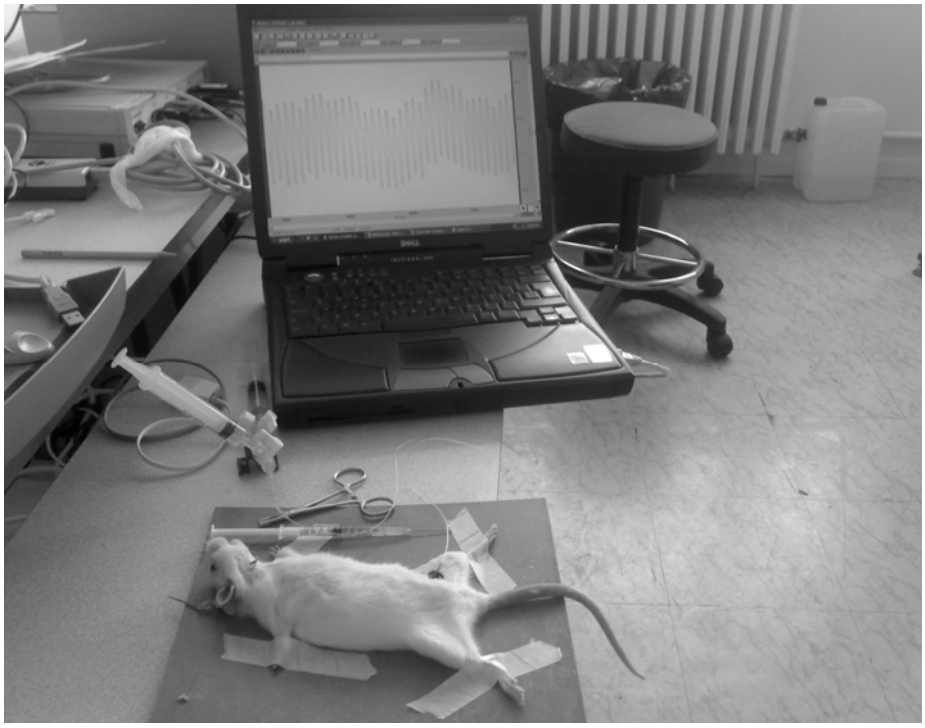
Yapıştırıcı flaster ve siyanoakrilat da kullanılarak tubing ense derisine sıkı bir şekilde tespit edildi. Tubinglerin enseden dışarıya çıkmış olan uçlarının uzunluğu 1–1,5 cm arasında idi. Operasyonu tamamlanan sıçanlar kafesleri içerisine solunumu engellenmeyecek şekilde kafeslerine yerleştirildi.



Resim 1. PE–50 tubingin vena jugularis e yerleştirilmesi işlemi

3.4. ARTERYAL KAN BASINCI ÖLÇÜMÜ

Arteryal kan basıncı direkt yöntemle femoral arterden kaydedildi. Kayıt öncesi, iki hafta boyunca infüzyon yapılan sıçanlara anestezi uygulandı (ketamin 39,35 kg/mg ve xylazine 4,96 kg/mg karışımı i.m). 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 (Resim 2).



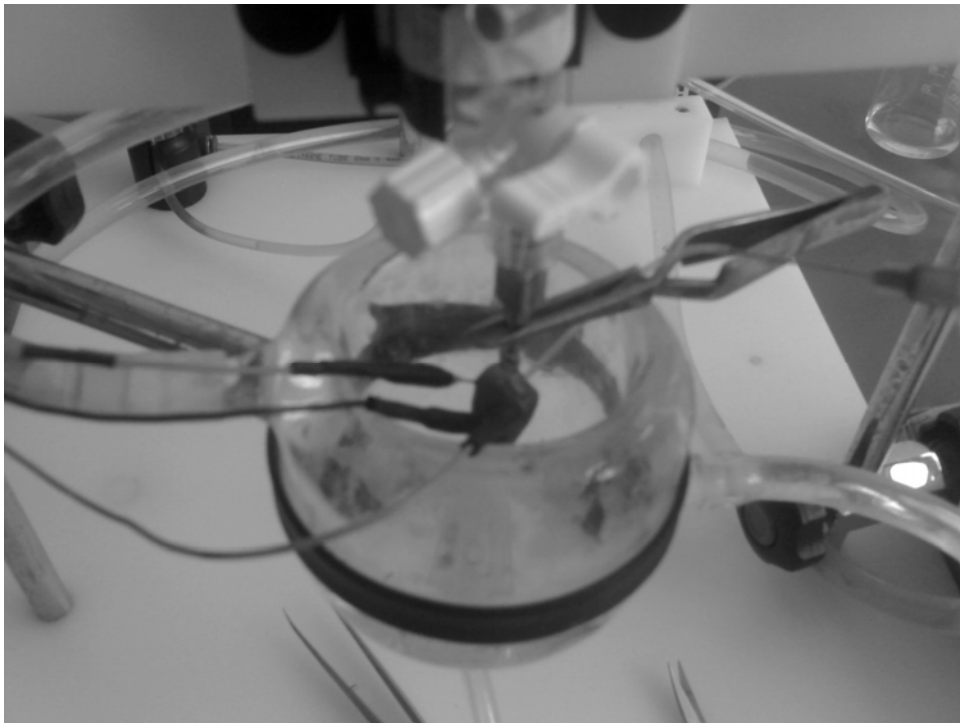
Resim 2. Femoral arter kateterizasyonu sonrası kan basıncı kaydı alınması

3.5. LANGENDORF DÜZENEĞİ İLE HEMODİNAMİK PARAMETRELERİN ÖLÇÜMÜ

Arteryal kan basınç kayıt işlemi bitiminde, biyokimyasal ölçümler için hayvanlardan ≅1,5 ml kan heparinli ependorf tüplerine alındı ve 3000 rpm' de 5 dk süreyle $+4^0$C'de santrifüj edilerek plazması ayrıldı. Elde edilen plazmalar -20 °C'de saklandı.

Anestezi altındaki sıçanların, sağ sternotomi ile toraksı açıldı ve kalbe herhangi bir mekanik hasar vermeden aortu izole edildi. Vücuttan ayrılan kalp dokusu soğuk perfüzyon solüsyonuna bırakıldı (kalbin atması soğuk perfüzyon solüsyonunda geçici bir süre durur ve perfüzyon için hazır bekletilen kanüle takılmasını kolaylaştırır). Kalp, aorttan Langendorff perfüzyon sistemindeki perfüzyon solusyonunun geldiği kanüle sabitlendi ve izole organ banyosu kalbin korunmasını sağlamak için kalbi içine alacak şekilde sabitlendi. Sistem 37°C sabit ısı altında Krebs solüsyonu ile (mmol/L: NaCl 118; KCl 4,7; $CaCl_2$ 2,0; $MgSO_4$ 1,2; $NaHCO_3$ 25; KH_2PO_4 1,2; Glikoz 11,1) perfüze edildi. 8 ml/dk sabit akımla verilen perfüzat sıvısı aort kapaklarını kapatıp, perfüzat sıvısının sol ventriküle geçişini engelledi ve koroner perfüzyon sağlandı. Daha sonra içi

su dolu elastik bir balon kalbin sol ventrikülüne yerleştirilip, 15 dk' lık stabilizasyon süresinden sonra kayıtlar alınmaya başlandı (Resim 3).



Resim 3. Kalbin perfüzyon kanalına bağlanıp 15 dk lık stabilitesi sağlandıkta sonra EKG kaydının alınması

Balona belirli bir basınç uygulanarak preload (önyük) oluşturuldu (8 mmHg). Oluşan yanıtlar yani sol ventrikül basınç gelişimi (LVDP), basınç gelişim hızı (kasılma, +dP/dt) ve basınç düşme hızı (gevşeme, -dP/dt) bir analog-dijital sistem (MP 30 Biopac System) ve bir basınç çevirici ile bilgisayara kayıt edildi. (Resim 4). Ayrıca tüm izole kalplerimizin sağ atriumuna iki, apeksine bir elektrot yerleştirilerek elektrogram (EKG) kaydı yapıldı.



Resim 4. Laboratuarımızdaki Langendorf Perfüzyon sistemi

3.6. BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

a. Plazma GSH-Px Aktivitesi Tayini: GSH-Px tarafından katalizlenen bir reaksiyonda H_2O_2 ile glutatyonun (GSH) oksidasyon hızının ölçülmesi esasına dayanan Paglia ve Valentine'nin birleşik enzimatik yöntemi (109) ile ölçüldü.

Çalışma günü 2,63 ml fosfat tamponu (0,05 M, pH=7,4, 5 ml EDTA içeren); 0,10 ml NADPH (8,4 mM); 0,01 ml GSSG-Redüktaz (100ü/ml GSH-Px protein enzimi içeren); 0,01 ml NaN_3 (112,5mM); 0,10 ml Redükte Glutatyon (0,15 M) içeren toplam 2,85 ml karışım hazırlandı ve çözdürülen plazma örneği (0,05 ml) ile karıştırıldı. Karışım çalışma esnasında buz banyosunda tutuldu. Bir numune için 2,8 ml karşım 4 dk +20 ^{0}C'de su banyosunda ısıtılarak hemen kullanıldı.

GSH-Px aktivitesi, UV-spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda, NADPH'nın NADP'ye dönüşümü sırasında gözlenen OD düşüşü üzerinden, doğrudan tayin edildi. Plazma GSH-Px aktivitesi U/ml cinsinden verildi.

b. Plazma Cu, Zn SOD aktivitesi tayini: SOD enzim değerleri Sun ve ark.(110) tarafından geliştirilen "Süperoksit üreticisi olarak ksantin oksidaz sisteminin

kullanılması ve nitroblue tetrazoliumun (NBT) redüksiyonunun inhibe edilmesi" esasına dayanan metod ile belirlendi.

Plazma SOD aktivitesi dondurulmuş plazma numunelerinde çalışıldı. Çalışma günü dondurulmuş plazma numuneleri kendi halinde çözüldü. 0,1 ml plazma üzerine sırasıyla 0,9 ml soğuk % 0,9 NaCl, 0,3 ml kloroform ve 0,5 ml etanol eklenerek vorteksle 1 dk karıştırıldı. Elde edilen karışım 18.000x g'de 1 saat santrifüj edildikten sonra oluşan süpernatanın 0,5 ml'si doğrudan plazma Cu, Zn-SOD ölçümünde kullanıldı.

Her deney tüpünde 1 ml 0,3 mmol/L ksantin; 0,5 ml 0,6 mmol/L EDTA; 0,5 ml 150 mol/L NBT; 0,3 ml 400 mmol/L Na_2CO_3; 6 ml 1 g/L bovin serum albuminden oluşan 2,45 ml karışım konuldu. Karışım üzerine 0,5 ml süpernatan eklenerek su banyosunda 25 ^{0}C'ye ısıtıldı. Kör tüpüne süpernatan yerine 0,5 ml distile su, standart tüplerine sırayla hazırlanan çözeltiler pipetlendi. 25 ^{0}C'ye kadar ısıtılma işleminden sonra, her bir tüpe eşit zaman aralıklarıyla 50 µl taze hazırlanmış ksantin oksidaz çözeltisi eklendi ve tüpler 20 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonucu yine eşit zaman aralıklarıyla tüplere, 1 ml 0,8 mmol/L $CuCl_2$ eklenerek reaksiyon durduruldu. Oluşan renk şiddeti, 560 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okundu.

Bir SOD ünitesi, NBT redüksiyon hızını % 50 inhibe eden enzim miktarı olarak tanımlandı ve her bir numune için ünite (U/L) cinsinden Cu, Zn-SOD miktarı hesaplandı.

c. Plazma CAT aktivite tayini: Katalaz aktivitesi tayininde kullanılan ve Beers ve Sizer tarafından geliştirilen (111) ve Luck tarafından modifiye edilen (112) yöntem H_2O_2' nin katalaz tarafından O_2 ve H_2O ya parçalanması esnasında reaksiyon karışımındaki absorbans değişiminin ölçümü esasına dayanmaktadır. Çalışma günü çözdürülen plazma örneklerinin 0,1 ml'sinin distile su ile 1/5 oranında seyreltildikten sonra enzim aktivite tayini yapıldı. Quartz küvete konan 1 ml numune üzerine 0,5 ml 37,5 mM tamponlanmış H_2O_2 substratı eklendi. Numunelerin OD'leri kendi fosfat tamponu körlerine karşı UV spektrofotometresinde 240nm'de izlendi. Plazma katalaz aktivitesi nmol/ml cinsinden verildi.

d. Plazma MDA seviyesinin tayini: Stocks ve Dormandy (113) tarafından geliştirilen ve Jain (114) tarafından modifiye edilen temel prensibi " Lipit peroksidasyonu sonucu açığa çıkan MDA'nın tiobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek 532 nm dalga

boyunda maksimum absorbans veren renkli bir kompleks oluşturması" esasına dayanan metodu kullanılarak yapıldı.

0,6 ml plazma 2,4 ml fosfat tamponlu salin eklenerek, 1/5 oranında seyreltildi. Tüplere ½ hacim (1,5 ml) %30 trikloroasetikasit (TCA) eklenerek vorteksle iyice karıştırıldı. Kör tüpüne numune yerine 0,6 ml distile su pipetlenerek aynı işlemden geçirildi. Numune ve kör tüpleri 2 saat buz banyosunda inkübe edildikten sonra 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek 3 ml berrak süpernatan ağzı kapaklı cam tüplere aktarıldı. Üzerlerine sırayla 0,225 ml 0,1 M EDTA ve 0,75 ml taze hazırlanmış %1 TBA eklendi. Tüplerin ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra, 15 dk süreyle su banyosunda kaynatıldı. Kendi halinde soğuduktan sonra, oluşan rengin şiddeti 532 nm dalga boyunda köre karşı spektrofotometrede okunarak standart eğriden değerlendirildi. Plazma MDA düzeyi mikromol/litre (µmol/L) cinsinden verildi.

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

İstatistiksel hesaplamalar, Excell ve SPSS 11.0 programları kullanılarak yapıldı. İkiden 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 ort.±SH olarak gösterildi. $P<0.05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Karnozin (KAR) ve Adriyamisin (ADR)'nin verildiği iki haftanın sonunda, karnozin verilen sıçanlardan biri, adriyamisin verilen sıçanlardan üçü kaybedilmiştir. Bu nedenle çalışmanın diğer kısımlarında grupların n sayısı;

KONT n=8, KAR n=7, ADR n=7, KAR+ADR n=10 olarak değişmiştir.

Çalışmanın başında hayvanlar gruplara rastgele dağıtılmıştır. Gruplar arasında VA_1 yönünden istatistiksel fark bulunmamıştır. İki haftalık infüzyon işlemlerinin bitiminden sonra kalp fonksiyonları ve enzim aktiviteleri ölçülmeden önceki hayvan vücut ağırlıkları tekrar belirlenmiştir. Kontrol grubunda ağırlık değişimi olmamış, KAR grubunda artış, ADR ve ADR+KAR gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. İnfüzyon öncesi ve sonrası hayvan vücut ağırlıkları

	GRUPLAR			
PARAMETRELER	**KONT**	**KAR**	**ADR**	**KAR + ADR**
VA_1 (g)	191±7 (n=8)	200±4 (n=8)	187±5 (n=10)	200±5 (n=10)
VA_2 (g)	190±7 (n=8)	207±5 [a] (n=7)	164±6 [b] (n=7)	185±5 [c] (n=10)

VA_1: Deney öncesi hayvan vücut ağırlığı, VA_2: Deney sonrası hayvan vücut ağırlığı, KONT: Serum fizyolojik verilen grup, KAR: Karnozin verilen grup, ADR: Adriyamisin verilen grup, KAR+ADR: Karnozin+Adriyamisin verilen grup.

a: $p<0,05$ VA_2'nin VA_1' e göre, b: $p<0,001$ VA_2'nin VA_1' e göre, c: $p<0,01$ VA_2'nin VA_1' e göre. Değerler ortalama ±SH olarak verildi.

4.1. HEMODİNAMİK ve EKG VERİLERİ

Adriyamisin grubunda LVDP değeri KONT ve KAR grubuna göre önemli derecede azalmış (KONT ve KAR grubuna göre, p<0,001), karnozinle birlikte adriyamisin verilen grubun LVDP değeri ADR verilen gruptan daha yüksek bulunmuştur (ADR grubuna göre p<0,001).

±dP/dt değerleri ise LVDP yi destekler nitelikte, ADR verilen grupta KONT ve CAR verilen gruba göre önemli derecede azalmıştır (KONT ve KAR'a göre, p<0,001). Buna karşılık KAR+ADR verilen grupta ise KONT ve KAR gruplarının değerlerine yakın değerler elde edilmiştir. (Tablo 2)

Tablo 2. Grupların, Langendorff sistemi ile değerlendirilen fonksiyonları (LVDEP ve ±dP/dt)

	GRUPLAR			
PARAMETRELER	**KONT (n=8)**	**KAR (n=7)**	**ADR (n=7)**	**KAR+ADR (n=10)**
LVDP (mmHg)	94±1,3	85±1,1	13±0,6[a,c]	63±5[a,c,d]
+dP/dt (mmHg/s)	1381±95	1296±13	260±14[a,c]	1149±10[b,d]
-dP/dt (mmHg/s)	2011±157	1889±10	337±16[a,c]	1009±93[a,c,d]

LVDP: Ventrikül basınç gelişimi, +dP/dt: Basınç gelişim hızı, -dP/dt: Basınç düşüş hızı, a: p<0,001 KONT grubuna göre, b: p<0,01 KONT grubuna göre, c: p<0,001 KAR grubuna göre, d: p<0,001 ADR grubuna göre. Değerler ortalama ±SH olarak verildi.

Sadece ADR verilen grupta ST intervali ve R-R aralığı süresi KONT ve KAR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda artma gösterirken (KONT ve KAR a göre, p<0,001), karnozinle birlikte adriyamisinin verilen (KAR+ADR) grupta ise bu süreler ADR grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (ADR' ye göre, p<0,001). Diğer bir EKG parametresi olan R amplitüdü KONT ve KAR grubuna göre ADR grubunda azalırken (KONT' e göre p<0,01; KAR' a göre, p<0,001), KAR+ADR grubunda ise bu amplitüd ADR grubuna göre anlamlı olarak artmıştır (ADR grubuna göre, p<0,001,Tablo 3)

Tablo 3. Grupların EKG parametre değerleri (ST, R-R intervali ve Ramp)

PARAMETRELER	GRUPLAR			
	KONT (n=8)	**KAR (n=7)**	**ADR (n=7)**	**KAR+ADR (n=10)**
ST interval (ms)	17±0,5	16,5±0,9	52±0,5[b,c]	14,8±3[d]
R-R (sn)	1,25±0,07	1,07±0,12	2,1±0,21[b,c]	1,06±0,68[d]
Ramp (mV)	3,07±0,55	3,49±0,48	1,07±0,63[a,c]	4,08±0,23[d]

ST:S-T dalgaları arasındaki mesafe. R-R: İki R dalgası arasındaki mesafe. Ramp: R dalgasının amplitüdü. a: p<0,01 KONT grubuna göre, b: p<0,001 KONT grubuna göre, c: p<0,001 KAR grubuna göre, d: p<0,001 ADR grubuna göre. Değerler ortalama ±SH olarak verildi.

Adriyamisin verilen gurubun ortalama, sistolik, diyastolik basınçları ve kalp atım hızı KONT grubunun değerlerine göre ve KAR grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (KONT a göre; OKB ve SKB p<0,01; DKB p<0,05; KAH p<0,001; KAR' a göre; OKB p<0,01; SKB, DKB ve KAH p<0,001). Bir hafta öncesinde karnozin verilmeye başlanan ve 1 hafta sonra, 2 şer gün arayla 4 kez ADR verilen (KAR+ADR) grupta ise OKB, SKB, DKB ve KAH değerleri ADR grubuna göre yükselmiştir (OKB ve KAH, p<0,01; SKB p<0,05; DKB p<0,001,Tablo 4).

Tablo 4. Grupların, ortalama, sistolik, diyastolik arteryal kan basınçları ve kalp atım hızları

PARAMETRELER	GRUPLAR			
	KONT (n=8)	**KAR (n=7)**	**ADR (n=7)**	**KAR+ADR (n=10)**
OKB (mmHg)	83±2	91±5	62±5[a,d]	81±4[f]
SKB (mmHg)	94±2	100±5	69±6[a,e]	89±5[g]
DKB (mmHg)	72±2	79±6	55±4[b,e]	74±4[h]
KAH (atım sayısı / dakika)	350±3	338±9	274±7[c,e]	329±6[f]

OKB: Ortalama kan basıncı, SKB: Sistolik kan basıncı, DKB: Diyastolik kan basıncı ve KAH: Kalp atım hızı.

a: p<0,01 KONT grubuna göre, b: p<0,05 KONT grubuna göre, c: p<0,001 KONT grubuna göre, d: p<0,01 KAR grubuna göre, e: p<0,001 KAR grubuna göre, f: p<0,01 ADR grubuna göre, g: p<0,05 ADR grubuna göre, h: p<0,001 ADR grubuna göre. Değerler ortalama ±SH olarak verildi.

4.2. BİYOKİMYASAL ÖLÇÜM VERİLERİ

Kardiyak hasar belirleyici olarak klinikte rutin olarak da değerlendirilen plazma CK, LDH, AST ve ALT enzim düzeyleri adriyamisinin son infüzyonundan 24 saat sonra ölçülmüştür. Kontrole göre ADR verilen grupta CK, LDH, AST ve ALT değerleri kontrole göre yükselmiş, bu yükselmeler CK, LDH, ve AST'de istatistiksel olarak da anlamlıdır (KONT' a göre; CK, LDH $p<0,001$; AST $p<0,05$). Bir hafta öncesi koruyucu olarak karnozin başlanan ve sonraki hafta adriyamisin ile karnozinin birlikte verildiği KAR+ADR gurubunda CK, LDH, AST ve ALT' de ADR verilen gruba göre önemli azalmaya neden olmuştur (ADR' ye göre; CK, LDH ve ALT $p<0,001$; AST $p<0,01$). (Tablo 5.)

Tablo 5. Grupların plazma kreatin kinaz, laktat dehidrogenaz, aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz düzeyleri

	GRUPLAR			
PARAMETRELER	**KONT (n=8)**	**KAR (n=7)**	**ADR (n=7)**	**KAR+ADR (n=10)**
CK (U/l)	263±29	207±33	531±28[a,c]	209±35[e]
LDH (U/l)	258±35	169±38	499±45[a,c]	151±33[e]
AST (U/l)	64,5±3	65±3	99±14[b,d]	58±4[f]
ALT (U/l)	38±2	26,5±3	55±9[d]	27,3±4,2[e]

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

a: $p<0,001$ KONT grubuna göre, b: $p<0,05$ KONT grubuna göre c: $p<0,001$ KAR grubuna göre, d: $p<0,05$ KAR grubuna göre, e: $p<0,001$ ADR grubuna göre f: $p<0,01$ ADR grubuna göre. Değerler ortalama ±SH olarak verildi.

Serbest oksijen radikalleri aracılığı ile oluşan sitotoksisite veya hücre ölümüne karşı organizmayı koruyan ve antioksidan sistem olarak bilinen süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimlerinin aktiviteleri ve bu radikallerin yaptığı lipit peroksidasyonuyla ilişkili olarak değişen malondialdehit (MDA) düzeylerine, son doz adriyamisin verilmesinden 24 saatlik bir süre sonrasında, plazmada bakılmıştır. Bu üç enzimin aktivitesi ADR grubunda KONT' a göre önemli

azalma göstermiş (KONT' a göre; SOD ve CAT p<0,01; GSH-Px p<0,03), KAR grubuna göre ise sadece GSH-Px ve CAT enzimlerindeki azalma istatistiksel anlamlılık göstermiştir (KAR' a göre; GSH-Px ve CAT p<0,01). Karnozinle birlikte adriyamisin verilen grupta ise enzimlerim üçünde de ADR grubuna göre anlamlı artış olmuştur (ADR' ye göre SOD, GSH-Px ve CAT p<0,01).

MDA seviyesi ise ADR grubunda KONT ve KAR grubuna göre anlamlı olarak artarken (KONT ve KAR' a göre p<0,01), KAR+ADR grubunda, ADR grubuna göre anlamlı oranda azalmıştır (ADR'ye göre p<0,01). (Tablo 6.)

Tablo 6. Grupların endojen antioksidan enzim aktivite değerleri ve lipit peroksidasyon düzeyleri

PARAMETRELER	GRUPLAR			
	KONT (n=8)	**KAR (n=8)**	**ADR (n=8)**	**KAR+ADR (n=9)**
MDA (µmol/l)	0,90±0,07	0,74±0,05	1,26±0,09[a,d]	0,57±0,04[b,e]
SOD (U/ml)	1,18±0,08	1,57±0,07[b]	0,57±0,05[a]	1,56±0,10[b,e]
GSH-Px (U/ml)	0,21±0,01	0,22±0,01	0,14±0,02[c,d]	0,22±0,01[e]
CAT (nmol/ml)	1,03±0,10	1,20±0,07	0,47±0,07[a,d]	1,26±0,11[e]

GSH-Px: Glutatyon peroksidaz, SOD: Süperoksit dismutaz, CAT: Katalaz, MDA: Malondialdehit

a: p<0,01 KONT grubuna göre, b: p<0,02 KONT grubuna göre, c: p<0,03 KONT grubuna göre, d: p<0,01 KAR grubuna göre, e: p<0,01 ADR gurubuna göre. Değerler ortalama ±SH olarak verildi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Adriyamisin (ADR), solid ve hematopoietik tümörlerin tedavisinde kullanılan yüksek etkili kemotörapatik bir ajandır (115). Bununla birlikte, doza bağımlı kardiyotoksik etkisinden dolayı kullanımı sınırlıdır (116). Hem klinik hem de temel bilimler adriyamisinin neden olduğu kardiyomiyopatinin gelişimini araştırmaya odaklanmıştır (31,117). Adriyamisin kaynaklı kardiyomiyopatilerin nedeni multifaktoriyel ve kompleks olmasına rağmen, miyokardiyumda görülen değişiklikler oksidatif stresin artışı ile açıklanabilmektedir (11,118). Serbest radikallerin oluşumu ve endojen miyokardiyal antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması, adriyamisinin kalp yetmezliği patogenezinde önemli rol oynadığını destekler (31). Son çalışmalar, adriyamisin bağımlı kardiyotoksisitenin, lipit peroksidasyonu, protein çapraz bağı ve DNA fragmantasyonu ile hücre hasarı sonucu ortaya çıkan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) ve hidrojen peroksit radikalini (H_2O_2) içeren reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu içerdiğini göstermektedir (119). Reaktif oksijen türleri; süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve bazı antioksidanlar tarafından normal olarak elimine edilir. Kalbin antioksidan savunma mekanizması fazla gelişmediği için, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu hızlandıran adriyamisin uygulamasından, kalp dokusu çok etkilenmektedir. Kardiyomyositlerin doğal antioksidanları olan katalaz ve süperoksit dismutaz kalpte diğer dokulara göre daha azdır, bu nedenle kalpte artan serbest oksijen radikallerinin miyokartda yaptığı hasar

daha fazla olmaktadır. Organizmanın serbest radikallere ve lipit peroksidasyonu sonucu oluşan zararlı ürünlere karşı kendisini koruyucu enzimatik ve nonenzimatik mekanizmaları mevcuttur. Enzimatik sistemler içinde en önemlileri SOD, CAT, GSH-Px ve glukoz 6 fosfat dehidrogenazdır (G6PD). Enzimatik olmayan antioksidan koruma mekanizmaları ise glutatyon, N-Asetilsistein, A, E, C vitaminleri, flavonoidler, β karoten, probucol, oksipurinol, melatonin, sistein dibi antioksidan maddelerdir (120-122). Adriyamisinin yaptığı lipit peroksidasyonu, enzimatik olmayan eritropoietin, melatonin, glutamin ve probucol gibi maddelerle engellenmeye çalışılmıştır (123-126). Bazı çalışmalarda adriyamisine bağlı olarak oluşan oksidatif stresin vitamin E, aspirin, deksrazoksan gibi antioksidanlarla ve desferroksamin gibi maddelerle azaltılabileceği bildirilmektedir (127,128).

Bir dipeptid olan karnozin (β-alanin-L histidin) kalp kas hücresinde 2-10 mM düzeyinde bulunmaktadır (129). Kronik enfeksiyonlu hayvanlarda karnozinin doku seviyesinin azaldığı bildirilmektedir (130). Ayrıca kalp kontraktilitesini bozan patolojik durumlarda (131), travma (132) sırasında da karnozinin doku seviyesi azalmaktadır. Endojen olarak sentezlenen L-karnozin; beyinde, kalp kasında, böbrek, mide, olfaktör bulbus ve iskelet kasında bulunmaktadır (93). Karnozin suda çözülebilen, aktif oksijen türlerini yakalayabilen önemli bir antioksidandır. Özellikle hidroksil ve süperoksit radikal ile singlet oksijen molekül tutucusudur. Karnozinin suda çözülme özelliği, onun hücre içerisinde önemli antioksidan görev yapmasını sağlamaktadır (85). Zayıf alkali pH' da karnozin lipit peroksidasyonu inhibe etmektedir. Lipit peroksidasyonunun neden olduğu Ca^{+2}-ATPaz (sarkoplazmik retikulumda) inhibisyonu, karnozin ilavesi ile azaltılmakta ya da inhibe edilmektedir (20). Karnozinin verilmesi, intrasellüler kalsiyum konsantrasyonunu ve kas proteinlerinin kalsiyum duyarlılığını artırma ile kalp kas kontraktilitesini artırmaktadır. Bu çalışmada kümülatif adriyamisin uygulamasına bağlı gelişen kardiyotoksisite ve bu toksisitenin oluşumunda etkin rol oynayan serbest oksijen radikallerinin detoksifikasyonunda görev alan enzim aktiviteleri ölçülerek, karnozinin antioksidan koruyucu etkinliği araştırılmıştır.

Langendorff ile yapılan kalp fonksiyon değerlendirmelerinde LVDP, ±dP/dt' nin ADR verilen grupta önemli derecede azaldığı, KAR ile ADR verilen grupta ise bu değerin tam normale dönmese de KONT ve KAR verilen grubun değerlerine yaklaştığı

görülmüştür. Bu değerlerin düşmesi, kalp fonksiyonlarının ADR verilmesi ile ileri derecede bozulduğunun göstergesidir.

Langhu L. ve ark., tek doz (15 mg/kg/fare, i.p) adriyamisin uygulamasının kalp fonksiyonlarına etkisini ekokardiyogratif sistem ile değerlendirmiştir. Sistol ve diyastolde sol ventrikül çapı ile LVDP artarken, franksiyonel kısalma yüzdesi (%FS) ve ±dP/dt ise azalmıştır (123). Bu sonuçlar bizim çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir

Karnozinin izole kalp sol ventrikül sistolik basınçta doza bağımlı olarak giderek artan bir artışa neden olduğu, diyastolik basınçta ise önemli değişme oluşturmadığı bildirilmektedir. Yine izole kalbe uygulanan karnozin, +dP/dt'yi doza bağımlı olarak % 44 artırmıştır. (1–10 mM karnozin dozlarında). Perfüzyon solusyonundan karnozinin çekilip kontrol solusyonu verilmesi, +dP/dt'de % 50 azalmaya neden olmuştur (başlangıç değerine dönme) (133).

Adriyamisin verilen hayvanlarda OKB, SKB ve DKB azalmaları, azalan kalp fonksiyonu ve buna bağlı gelişen azalmış kalp debisine bağlı olabileceği düşüncesindeyiz. Zicba R. ve ark.'nın tavşanlarda yaptığı çalışmada, adriyamisinin (2 mg/kg/haftada, 7 hafta), OKB'si, kardiyak indeksi (CI), strok indeksi (SI=SV/vücut ağırlığı) azalttığı, total periferik direnci (TPR) ise artırdığı gösterilmiştir. KAR ile birlikte ADR verildiğinde ise bu değerlerin ADR verilen gruba göre düzelme gösterdiği bildirilmektedir (105). Diyetle verilen L-karnozinin DOCA-tuz hipertansiyonlu sıçanlardaki artan kan basıncını azalttığı (134), konjenital karnozinaz enzim eksikliği olan hastalarda artan L-karnozin ile hipotansiyon arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (135).

Bu çalışmada, adriyamisinin oluşturduğu kardiyotoksisite yalnızca kalbin mekanik fonksiyonunu değil aynı zamanda ventriküler depolarizasyon ve repolarizasyonunuda etkilemiştir. ST segmentini, R-R aralığını uzatmış ve R amplitüdünü azaltmıştır. Çalışmamızda adriyamisinin oluşturduğu bu anormal EKG bulguları KAR ile ADR verildiğinde daha az düzeyde ortaya çıkmıştır. Adriyamisinin neden olduğu kardiyotoksisite, EKG'de kendini gösteren ventriküler depolarizasyon ve repolarizasyonu etkiler (136). Assir A.M.A. ve Abdel Wahab A.F.I. (137) çalışmalarında, sıçanlara tek doz ADR verilmesinin, sinus taşikardisi, QRS voltaj azalması, T dalga değişiklikleri oluşturduğunu bildirmiştir. Başka çalışmalarda da ST

segment uzaması, sinus taşikardisi, T dalga düzleşmesi, QT interval uzaması, R dalga voltajında azalma gibi anormal EKG kayıtları bulunmuştur (41,136,138). EKG' deki değişiklikler sinüs taşıkardisi, T dalga flatteri, QT intervalinin uzaması, R dalga voltajının azalması gibi çeşitli aritmilerle ilgilidir (137). Venkatesan yaptığı bir çalışmada (41), adriyamisin uyguladıktan 48 saat sonra EKG kayıtlarında ST intervalinin uzadığını bulmuştur. Farelerle yapılan çalışmalarda ise ST intervalinin süresi ile adriyamisinin oluşturduğu kardiyotoksisite arasında güçlü ilişki olduğu gösterilmiştir (139,140). Adriyamisin uygulanan farelerdeki ST intervalinin süresinin uzaması, aksiyon potansiyeli süresindeki uzmanın göstergesidir (140). Le Marc ve arkadaşları, adriyamisin ile inkübasyonundan sonra purkinje liflerindeki aksiyon potansiyeli süresinin uzadığını göstermişlerdir. Aksiyon potansiyeli süresinin uzaması reaktif oksijen ürünlerinin oluşumu ile açıklanmaya çalışılmıştır (141). Yine bir başka çalışmada, adriyamisin uygulamasından 3 gün sonra alınan EKG kayıtlarında PR, ST ve QT intervallerinin yükseldiği ve vitamin E uygulandığında anlamlı derece azaldığı gösterilmiştir (142).

Bu çalışmada adriyamisine bağlı miyokard zedelenmesinin belirlenmesinde kullanılan CK, LDH, AST ve ALT aktivite değerleri ölçülmüştür. Adriyamisin verilen grubun CK, LDH, AST ve ALT değerleri kontrol grubuna göre yükselmiş, karnozin ile birlikte adriyamisin verilen grupta ise bu değerler normale yaklaşmıştır. Adriyamisinin CK'da 2,9, LDH'da 2,4 misli kontrole göre artışa neden olduğu, karnozin ile adriyamisin verildiğinde karnozinin bu artışı engellediği gösterilmiştir (137). Başka çalışmacılar da CK ve LDH'ın adriyamisin verilmesinden 48 saat sonra arttığını bildirmektedir (40,41,143,144). Bizim çalışmamızda enzimlere 24 saat sonra bakılmış, CK' da 2,01; LDH' da 1,93; AST' de 1,53 ve ALT' de 1,44 misli artış bulunmuştur. Miyokardiyal hücre membran hasarının sonucu olarak serum CK seviyesinin arttığı bildirilmiştir (145). Demerdash E. ve ark. 12 günlük intraperitoneal probukol yada mısır yağı uygulaması sonrasında 15 mg/kg tek doz adriyamisin uyguladıkları ratlar üzerinde yapmış oldukları çalışmada 13. günde ve sonrasında periyodik olarak aldıkları kan örneklerine kardiyak hasar göstergesi olarak serum CK düzeylerini incelemişler ve sadece adriyamisin alan ratların serumlarında CK düzeylerinde SF alan ratlara göre anlamlı bir yükseklik saptarken, adriyamisine ilaveten probukol ve mısır yağı alan rat serumlarındaki CK seviyelerinin sadece adriyamisin alan ratlara göre anlamlı şekilde düşük olduğu tesbit edilmiştir. CK seviyesindeki yüksekliğin 6. saatte pik değere

ulaştığını ve 24 saat sonra da yüksekliğin devam etmekle birlikte düzeyinin azaldığını bildirmişler, probukol ve mısır yağının adriyamisinin kardiyotoksisitesini engellediğini öne sürmüşlerdir (146)

Adriyamisinin neden olduğu kardiyotoksisitenin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Fakat bir çok kanıt bu istenmeyen etkilerin serbest radikallerin oluşumundan kaynaklandığını işaret etmektedir. Adriyamisinin kimyasal yapısı serbest radikallerin ve oksidatif stresin oluşması için elverişlidir. Adriyamisin-demir çelatları ve adriyamisin-demir kompleksleri reaktif hidroksil radikallerinin oluşumunu katalizler (147). Adriyamisin uygulanması antioksidanların azalması ve serbest oksijen radikallerinin artması sonucu oksidatif stresin artışına neden olur (11). Adriyamisinin neden olduğu kardiyotoksisite sarkoplazmik retikulum bozukluğu, riyanodin reseptörü gibi Ca^{+2} aracılı proteinlerin ekspresyonunun azalması gibi Ca^{+2} metabolizmasındaki değişiklilerle ile de ilişkilidir (148)

Karnozin; in vivo antioksidan olarak görev yapan doğal bulunan bir dipeptitdir. Hipotezimiz, hidrofilik antioksidan olan karnozin uygulaması ile adriyamisinin neden olduğu kardiyotoksisite etkisinin azaltılacağı şeklindedir. Bu çalışmanın sonuçları; ADR verilen grup ile ADR ve KAR verilen grubun verileri karşılaştırıldığında, kardiyak hasar belirleyicilerinden olan plazma CK, LDH, AST ve ALT seviyesinde ve ST interval süresinde azalma olduğu, LVDP' nin kontrol değerlerine yaklaştığı bulunmuştur. Bu sonuçlar karnozin uygulamasının, adriyamisine bağlı hasarı azalttığı, Adriyamisinin akut kardiyotoksisitesine karşı koruyucu olduğunu göstermiştir.

Son çalışmalar sıçanlarda oluşturulan oksidatif stres ve kardiyak hasar üzerinde karnozinin rolünü açıklamaya odaklanmıştır (149). Karnozin, adriyamisinin oluşturduğu kardiyotoksisite etkisini nasıl azaltabilir? İlk olarak karnozin, ortamdan serbest radikallerin temizlenmesini sağlayarak lipit peroksidasyonu inhibe eder. İkinci olarak; membran stabilize edici etkisi ile kardiyak hasarı engelleyebilir ki bu etkisi EKG parametreleri ve serum CK, LDH ve troponin I seviyeleri ölçülerek gösterilebilir. Adriyamisinin neden olduğu oksidatif hasar nedeniyle membran fonksiyonundaki bir değişiklik EKG' deki değişiklikten sorumludur (150). Üçüncü olarak; karnozin intrasellüler Ca^{+2} modülasyonunu sağlayarak iyileştirici etki oluşturabilir. Sıçan kalbinde, verilen karnozin dozu ile ilişkili olarak kalp kas hücre Ca^{+2} seviyesinde artış olduğu ve buna bağlı kalp kontraktilitesinin arttığı bildirilmektedir. İntrasellüler Ca^{+2}

artışı, karnozinin riyanodin reseptörleri ile Ca^{+2} kanallarından Ca^{+2} serbestlenmesini artırması ve Ca^{+2} kontraktil proteinlerinin duyarlılığını artırması ile oluşur (151). Çalışmamızda, adriyamisinin neden olduğu kardiyak hasarı düzeltmede karnozinin, Ca+ metabolizmasını değiştirerek kalbi güçlendirici etkisinden çok, lipit peroksidasyonu ve buna bağlı membran stabilize edici etkisini göstermek istedik.

Adriyamisin uygulamasıyla membran lipitlerinin peroksidasyonuna sebep olan reaktif oksijen metabolizması, kardiyotoksisite gelişiminden sorumlu tutulan mekanizmalardan biridir. Malondialdehit (MDA), lipit peroksidasyonunun en önemli ürünü ve in vivo olarak ölçülebilen birkaç lipit peroksidasyon göstergesinden bir tanesidir. Bu yüzden adriyamisin verildiğinde, başka dokular yerine en fazla kalp dokusunun etkilenmesi, antioksidan savunması zayıf olan kalpde adriyamisinin radikal oluşumunu artırarak yada antioksidan sistemi zayıflatarak hasar oluşturduğu düşüncesindeyiz. Venditti P. ve ark. oksidatif hasar yatkınlığının organlara göre değiştiğini belirtmiştir. Antioksidan kapasiteye göre organları karaciğer, kan, kalp, kas olarak sıralamıştır. Bu araştırmacılara göre, ömürleri kısa olan ve oluştukları dokuda etkin olan antioksidan enzimlerin ve serbest radikallerin doku düzeylerinin saptanması, tanısal değer bakımından plazma değerlerinden daha kıymetlidir. Plazma antioksidan enzim aktivitelerinin doku enzim aktiviteleri ile paralellik göstermediğini, bu bulgunun antioksidan kapasitenin organlara göre farklılık göstermesine bağlı olabileceğini ortaya koymuşlar ve bu tür çalışmalarda doku enzim aktivitesinin çalışılmasının daha güvenli olacağını savunmuşlardır. Ancak klinikte plazma değeri belirlenmesinin doku değerlerinin belirlenmesinden daha pratik olabileceğini de belirtmişlerdir (152). Çalışmamızda kalp dokusu yerine plazmadaki antioksidan enzim seviyelerine bakılmıştır. Langendorff ile kalp fonksiyonu değerlendirme sonrası, kalp dokusundaki enzim aktivitelerinde değişim olabileceği ve bizleri yanıltabileceği düşüncesi ile plazma tercih edilmiştir.

Çalışmamızda adriyamisin verilmesi, plazma MDA düzeylerini kontrol grubuna göre önemli derecede yükseltmiş, adriyamisin ile karnozin verilen grupta ise MDA değerleri normale yakın bulunmuştur. Adriyamisine bağlı kardiyotoksisitenin patofizyolojisinden, kalp dokusundaki MDA düzeylerinde yükselmenin sorumlu tutulduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (47,153–156).

Çeşitli antioksidan ajanların MDA düzeylerinde azalma sağlayarak adriyamisin kardiyotoksisitesini önlediği gösterilmiştir (157). Demirkaya'nın çalışmasında, yüksek ve düşük doz kümülatif adriyamisin uygulamasından yedi gün sonra bakılan MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı değişme tespit etmemiştir (158). Iliskovic N. ve ark. doksurubisinin son dozundan üç hafta sonra kalp dokusunda MDA düzeyinde anlamlı artış saptadıklarını bildirmişlerdir (153). Luo X. ve ark. 10 mg/kg tek doz adriyamisin verilen ratlarda plazma ve doku MDA düzeylerindeki yükselmenin ikinci saatte pik yaptığını, 24. saatte plazma MDA düzeyinin başlangıç düzeyine döndüğünü, ancak dokuda MDA yüksekliğinin devam ettiğini göstererek, adriyamisinin ilk dozunun MDA veya benzer başka sitotoksik maddelerin salınımını indükleyerek kardiyotoksisiteyi başlattığını ileri sürmüşlerdir (145).

Aerobik organizmalarda oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit anyon radikali meydana gelir. Oluşumlarına neden olan diğer radikallerle birlikte organizmada genel bir oksitleyici gibi davranmaktadır. Süperoksit radikalleri (SOR)' nin doku hasarına yol açmasında asıl tehlikeli olan mekanizma, Haber-Weiss (Fenton) reaksiyonu sonucunda hidroksil radikalinin oluşmasıdır. Süperoksit dismutaz enzimi bunun parçalanmasını sağlayarak hücreyi koruyucu bir rol üstlenir (159). Kardiyomiyositleri SOR'lara karşı koruyan antioksidan enzimlerden biri GSH-Px' dir. GSH-Px kalp için koruyucu olan en önemli antioksidan enzimdir (13). Katalaz da hücrede yer alan önemli bir antioksidan enzim ve serbest oksijen radikal temizleyicisidir.

Serbest oksijen radikalleri aracılığı ile oluşan sitotoksiste ve hücre ölümüne karşı organizmanın ilk hat antioksidan savunma sistemi olarak bilinen süperoksit dismutaz, yüksek derecede reaktif olan süperoksit anyonunu O_2 ye ve daha az reaktif olan hidrojen perokside (H_2O_2) dönüşümünü katalize ederek hücreyi oksidan hasardan korumaya çalışan mitokondriyal matriks enzimidir(160). Çalışmamızda, adriyamisin verilmesi plazmada ölçümlerini yaptığımız antioksidan enzimlerin (SOD, GSH-Px, CAT) aktivitelerini azaltırken, karnozinle adriyamisinin birlikte verildiği grupta bu değerler neredeyse normale dönmüştür. Fadıllıoğlu E. ve ark. ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada kümülatif 20 mg/kg adriyamisin uygulanan rat kalp dokularında SOD aktivite düzeyleri ile adriyamisin ve ergoisteini birlikte uyguladıkları rat kalp dokularındaki SOD enzim seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düşük olarak saptamışlardır. Sadece

adriyamisin ve adriyamisin ile birlikte ergoisteini birlikte alan ratların kalp dokularında SOD enzim düzeylerini karşılaştırdıklarında da anlamlı farklılık olmadığını bildirmişlerdir (161). Durak İ. ve ark. Çalışmalarında adriyamisin ve adriyamisin + vitamin alan kobayların kalp dokularında SOD enzim aktivite düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğunu saptamışlardır (162). Kang JH, in vitro olarak Cu, Zn-SOD aktivitesinin, karnozinle doza bağımlı arttığını bildirmişlerdir(163). 2007 yılında yapılan bir çalışmada, adriyamisinin sıçan kalp dokusunda GSH-Px, GST(glutatyon-s-transferaz), CAT ve SOD aktivitelerini azalttığını fakat glutamin (antioksidant, enerji verici ve detoksifiye edici) ile bunların normal aktivitelerini sürdürdüğü bildirilmektedir. Bu çalışmada adriyamisin verilmesi, MDA seviyesini önemli derecede artırmıştır (125). Adriyamisin verilerek (2 hafta, 10 mg/kg i.p) kardiyomiyopati oluşturulan sıçanlarda, kontrol grubu hayvanlarına göre MDA' nın arttığı, SOD ve CAT' ın çok değişmediği ama GSH-Px' in azaldığı bildirilmektedir(126).

Demir F. adriyamisin verilen tavşanlarda miyokardiyal MDA'nın yükseldiği, GSH-Px'in düştüğünü, "adriyamisin+melatonin" grubunda ise SOD ve GSH-Px düzeyinin yükseldiğini saptamışlardır ve adriyamisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinde miyokardiyal lipit peroksidasyonunda artış ve antioksidan sistemlerdeki azalmanın rol oynayabileceğini göstermiştir(47).

Lipit peroksidasyonu gelişimi hemen hemen adriyamisin ile yapılan çalışmaların çoğunda gösterilmiştir. Antioksidan enzimlerdeki aktivite değişimleri ise; değerlendirilen doku yada plazmaya, verilen adriyamsin miktarına ve verilme şekliyle son adriyamisi dozundan sonraki doku yada plazma alma süresine göre değişmektedir.

Çalışmamızda;

- Adriyamisin tek doz yerine, 4 kez her seferinde eşit miktarda toplamda 16 mg/kg olacak şekilde i.v. (insanlarda verilen yöntem ile) uygulandı,
- Karnozin 2 hafta boyunca hergün i.v. olarak KAR ve KAR+ADR gruplarına 10 mg/kg olacak şekilde uygulandı,
- Son Adriyamisin dozu verildikten 24 saat sonraki plazmada enzim aktivitelerine ve MDA ya bakıldı.

Çalışmamızda adriyamisin ile MDA düzeyi artmış, SOD, GSH-Px ve CAT aktiviteleri azalmıştır. Karnozin verilmesi özellikle SOD aktivitesini değiştirmiş, buna bağlı GSH-Px ve CAT aktiviteside değişerek adriyamisinin oluşturduğu lipit peroksidasyonunu azaltmıştır.

Karnozin sadece kalp dokusu değil başka doku yada eritrositlerde adriyamisine bağlı gelişen azalmış SOD, GSH-Px ve CAT aktivitesini artırmış ve böylece plazma aracılığı ile kalpte etkin antioksidan savunma oluşturmuştur. Kalp dokusunda adriyamisinin neden olduğu antioksidan savunma zayıflığı ve buna bağlı gelişen artmış lipit peroksidasyonu ile bunlar üzerine iyileştirici yada koruyucu maddelerin etkisini göstermede, sadece kalp dokusunun değerlendirilmesi yeterli değildir. Plazmayada bakılması bulguların değerlendirilmesinde gelişebilecek hataları engelleyecektir.

Karnozin, adriyamisinin neden olduğu kalp yetmezliğini lipit peroksidasyonunu engelleyerek azaltmıştır. Karnozin, kalp kasında kontraktiliteyi etkileyen sarkoplazmik retikulum proteinlerinin aktivite yada sentezini etkileyerek de adriyamisinin oluşturduğu kalp yetmezliğini engeleyebilir. Karnozinin lipit peroksidasyonunu azaltıcı etkisi yanında kalp yetmezliğini düzeltici diğer etkilerinin de çalışılması gerektiği düşüncesindeyiz.

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 Oncol 2001; 28:2–7.
4. Gharib MI, Burnett AK. Chemotherapy-induced cardiotoxicity: current practice and prospects of prophylaxis. Eur J Heart Fail. 2002;4:235–42.
5. Wojtacki J, Lewicka-Nowak E, Leśniewski-Kmak K. Anthracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention--review of the literature. Med Sci Monit. 2000;6:411–20.
6. Hortobagyi GN. Anthracyclines in the treatment of cancer: an overview. Drugs 1997;4:1–7.
7. Del Bino G, Skierski JS, Darzynkiewicz Z. Diverse effects of camptothecin, an inhibitor of topoisomerase I, on the cell cycle of lymphocytic and myelogenous leukemic cells. Cancer Res. 1990;50:5746–50
8. Chachoua A, Hoschster H. and Muggia FM, Doxorubicin. In Droz JP, Cvitkovic E, Armand JP, and Khoury S. (eds), Handbook of Chemotherapy in Clinical Oncology. Rhöne-Poulenc, Houston, 1988;125–7.
9. Tritton TR, Cell surface actions of adriamycin. Pharmac. Ther.1991;49:293 309.

10. Cummings J, Anderson L, Willmott N, Smyth JF. The molecular pharmacology of doxorubicin in vivo. Eur J Cancer. 1991;27:532–5.

11. Singal PK, Iliskovic N, Li T, Kumar D. Adriamycin cardiomyopathy: Pathophysiology and prevention. FASEB J. 1997;11:931–6.

12. Brazzolotto X, Andriollo M, Guiraud P, Favier A, and Moulis JM Interactions between doxorubicin and the human iron regulatory system. Biochim Biophys Acta. 2003;1593: 209–18.

13. 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.

14. Shan K, Lincoff AM and Young JB, Anthracycline-induced cardiotoxicity. Ann.Intern.Med. 1996;125:47–58.

15. 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.

16. Steuiherz LJ, Steinhen PG and Tan C. Cardiac failure and dysrhythmias 6-19 years after anthracycline therapy: a series of 15 patients. Med Pediatr Oncol. 1995;24:352–61.

17. 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.

18. Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, Leeuweburgh C.: Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity and Bcl2. Bax ratio Cancer Res. 2002;62:4592–8.

19. Seifert CF, Nesser ME, Thompson DF.: Dexrazoxane in the prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity. Ann Pharmacother. 1994;28:1063–72.

20. Herman EH, Ferrans VJ. Preclinical animal models of cardiac protection from anthracycline-induced cardiotoxicity. Semin Oncol. 1998; 25: 15–21.

21. Van Vleet JF, Ferrans VJ. Clinical and pathologic features of chronic adriamycin toxicosis in rabbits. Am J Vet Res 1980; 41: 1462–9.

22. Long HJ, Diamond SS, Ratio CP, Burningham RA Dose-response relationships of chronic adriamycin toxicity in. rabbits. Eur J Cancer Clin Oncol. 1984; 20:129.

23. Herman EH, Lipshultz SE, Rifai N, et al. Cardiac troponin T: elevated serum levels and loss from cardiac myocytes in doxorubicin toxicity. Circulation 1996; 94: 1–85.

24. Jaenke RS. An anthracycline-induced cardiomyopathy in rabbits. Lab Invest 1974;30: 292–304.

25. Kumar D, Kirshenbaum LA, Danelisen I, Singal PK. Apoptosis in adriamycin cardiomyopathy and its modulation by probucol. Antioxid Redox Signal, 2001;3:135–45.

26. Olson RD, Mushlin PS. Doxorubicin cardiotoxicity, analysis of prevailing hypothesis. Faseb J. 1990;13:3076–86.

27. Rabelo E, DE Angelis K, Bock P, Fernandes TG, Ceruo F, Kelin AB. Baroreflex sensitivity and oxidative stres in adriamycin induced heart failure. Hypertension, 2001, 38, 576–80.

28. Billingham ME, Mason JW, Bristow MR, Daniels JR. Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphological changes. Cancer Treat Rep. 1978;62:865–72.

29. Potemski P, Polakowski P, Wiktorowska-Owczarek AK, Owczarek J, Pluzanska A, Orszulak-Michalak D. Amifostine improves hemodynamic parameters in doxorubicin-pretreated rabbits. Pharmacol Rep. 2006;58:966–72.

30. Muzaffar I, Kiran D, Tarique A, Agrawal, Krishna P. Protective effects of telmisartan against acute doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. Pharmacol Rep. 2008;60:382–90.

31. Singal PK, Deally CM, Weinberg LE. Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. J Mol Cell Cardiol. 1987;19:817–28.

32. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. Nutr. Rev. 1994;52:253–65.

33. Cross CE, Halliwell B, Borish ET et al. Oxygen radicals and human disease. Ann Int Med. 1987;197: 526–45.

34. Myers C. The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. Semin Oncol. 1998;25:10–14.

35. Doroshow JH, Locker GY, Myers CE. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive radicals. J Clinlnvest 1980;65:128–35.

36. Danelisen I. Metabolism of Retinol in Adriamycin-Induced Cardiomyopathy. Master's Degree Thesis, University of Manitoba, Department of Physiology Faculty of Medicine, Canada, 2000.

37. Apple FS. Tissue specificity of cardiac troponin I, cardiac troponin T and creatine kinase MB. Clinica Chimica Acta. 1999;284:151–9.

38. Lang H, Wfirzburg U. Creatine Kinase, an Enzyme of Many Forms. Clin Chem. 1982;28:1439–47.

39. Haider KH, Stimson WH. Cardiac myofibrillar proteins: biochemical markers to. estimate myocardial injury. Mol Cell Biochem. 1999;194:31–9.

40. Saad SY, Najjar TA, Al-Rikabi AC. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. Pharmacol Res.2001;43:211–8

41. Venkatesan N. Curcumin attenuation of acute adriamycin myocardial toxicity in rats. Br J Pharmacol. 1998;124:425–7.

42. Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S and Gottlieb JA. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. Cancer.1973;32:302–14.

43. Von Hoff DD, Rozencweig M, Piccart M. The cardiotoxicity of anticancer agents. Semin Oncol. 1982;9:23–33.

44. Allen A. The cardiotoxicity of chemotherapeutic drugs. Semin. Oncol. 1992;19:529–42

45. Collins JN, Cole FJ, Weineter LJ, Riblet JL, Britt LD. The usefulness of serum troponin levels in evaluating cardiac injury. Am Surg. 2001;67:821–25.

46. Hudson MP, Christenson RH, Newby LK, Kaplan AL, Ohman. EM. Cardiac markers: point of care testing. Clin Chim Acta. 1999;284:223–37.

47. Demir F. Doksorubisin ile Oluşturulmuş Deneysel Kardiyotoksisite Üzerine Melatonin, L-Triptpfan ve Pentoksifilin'in Etkileri, Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri 2004.

48. Kazanc MB. Antioksidan vitaminler. Sendrom. 1997:14–23

49. Seven A, Candan G. Antioksidant defense systems. Cerrahpasa J Med. 1996;27:41–50.

50. Rock CL, Jacob RA, Bowen PE. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E and the carotenoids. J Am Diet Assoc. 1996;96:693–02.

51. Sies H, Stahl W, Sundquist AR. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. Ann N Y Acad Sci. 1992;30:669:7–20.

52. Arıcıoğlu Aysel (1994): Serbest Oksijen Radikalleri ve Hücre Hasarı Doktor 2/3. p: 139–242.

53. Barber DA, Harris SR. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. Am Pharm,. 1994; 9: 26–35.

54. Halliwell B. Free Radicals, Antioxidants, and Human Bisease: Curiosity, Cause, or Consequence? Lancet. 1994;344:8924, 721–24.

55. Mc Cord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant / antioxidant balance. Clin Biochem. 1993;26:351–57.

56. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. Am J Med. 1991;91:14–22.

57. Salman E, Bayraktaroğlu M, Doğan DV. Askobik asitin serbest oksijen radikal temizleyici olarak açık Kalp Cerrahisinde kullanımı. Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi 1994;2:216–20.

58. Halliwell B. Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. Acta Neurol Scand 1989;126:23–33.

59. Andrade Junior DR, Souza RB, Santos SA, Andrade DR. Oxygen free radicals and pulmonary disease. J Bras Pneumol 2005;31:60–68.

60. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza yayınları, Konya 1995.

61. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine(3ed). New York: Oxford University Pres.1999:936.

62. Bosgelmez I, Güvendik G, Söylemezoglu T. Hekzavalan Kromun fare beyin dokusunda indükledigi oksidatif stres üzerinde taurinin koruyucu ve antidotal etkisi. Kocatepe Tıp Dergisi 2004;5:63–67.

63. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Synder SH. Nitric oxide: A physiologic Messenger. Annals of Internal Medicine. 1994;120;227–37.

64. Joshi MS, Ponthier JL, Lancaster JR. Cellular antioxidant and pro-oxidant actions of nitric oxide. Free Radical Biology & Medicine 1999;27:1357–66.

65. Mulligan MS, Hevel JM, Marletta MA, Ward PA. Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. Proc Natl Acad Sci. 1991;88:6342–88

66. Ozkan M, Yüksekol I. Nitrik oksit ve akciğerler. Toraks Dergisi 2003;4: 88–94.

67. Külahçıoğlu GF. Yaşlanmada Monoamin Oksidaz İnhibitörlerinin İnhibitörlerinin Sıçan Kalp Dokusunda Oksidan Stres ve Antioksidan Sistemlere Etkileri. Doktara Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir 1996.

68. Rumley AG, Paterson JR. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. Ann Clin Biochem. 1998;35:181–200.

69. Bankson DD, Kestin M, Rifai N. Role of Free Radicals in Cancer and Atherosclerosis. Clin Lab Med. 1993;13:463–80.

70. Gassen M. and Youdim MB. Free radical scavengers: chemical concepts and clinical relevance. J Neural Transm. 1999;56:193–10.

71. Fulbert JC, Succari M and Cals MJ. Semi-automated assay of erythrocyte Cu-Zn Superoxide dismutase activity. Clin. Biochem. 1992;25:115–19.

72. Durak I, Yurtarslani Z, Canpolat O, Akyol O. A methodological approach to superoxide dismutase activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium reduction. Clin Chim Acta. 1993;214:103–4.

73. Serin E, Yılmaz E, Yılmaz S, Ünsaldı E, Durmuş AS. İskemi-reperfizyon hasarında serbest oksijen radikalleri. Artroplasti Artroskopik Cerrahi. 1998;9:36–39.

74. Akgül E. Tip II Diyabetes Mellituslu Hastalarda Oksidan ve Antioksidan Mekanizmaların İncelenmesi. Uzmanlık tezi, Fırat Üniversitesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ 1996

75. Yalçın AS. Antioksidanlar. Klinik Gelişim. 1998;11: 409–11.

76. Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology. 2000;153:83–104.

77. Teufel M, Saudek V, Ledig JP, Bernhardt A, Boularand S, et al. Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. J Biol Chem. 2003;278:6521–31.

78. Barger G, Tutin F. Carnosine, constitution and synthesis. Biochem J. 1918;12:402–7.

79. Hipkiss AR. Carnosine, a protective anti-ageing peptide? Int J Biochem Cell Biol. 1998;30:863–68.

80. Bakardjiev A, Bauer K. Biosynthesis, release, and uptake of. carnosine in primary cultures. Biochemistry. 2000;65:779–82.

81. Bonfanti L, Peretto P, De Marchis S, Fasolo A. Carnosine-related dipeptides in the mammalian brain. Prog Neurobiol 1999;59:333–53.

82. Lenney JF, George RP, Weiss AM, Kucera CM, Chan PWH, Rinzler GS. Human serum carnosinase: characterization, distinction from cellular carnosinase, and activation by cadmium. Clin Chim Acta. 1982;123:221–31.

83. Jackson MC, Kucera CM, and Lenney JF. Purification and properties of human serum carnosinase. Clin Chim Acta.1991;196:193–05.

84. Garibella SE, Sinclair AJ. Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. Age Ageing. 2000;29:207–10.

85. Kohen R, Yamamoto J, Cundy KC *et al.* Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine and anserine present in muscle and brain. Proc Natl Acad Sci. 1988;85:3175–9.

86. Pavlov AR, Revina AA, Dupin AM *et al.* The mechanism of interaction of carnosine with superoxide radicals in water solutions. Biochim Biophys Acta. 1993; 1157:304–12.

87. Dahl TA, Midden WR, Hartman PE. Some prevalent biomolecules against singlet oxygen damage. Photochem Photobiol. 1988; 47:357–62.

88. Hartman PE, Hartman Z, Ault KT. Scavenging of singlet molecular oxygen by imidazole compounds: high and sustained activities of carboxy terminal histidine dipeptides and exceptional activity of imidazole-4-acetic acid. Photochem Photobiol 1990;51:59–66.

89. Boldyrev AA, Dupin AM, Bunin AY *et al.* The antioxidative properties of carnosine, a natural histidine containing dipeptide. Biochem Intern. 1987;15:1105–13.

90. Boldyrev AA, Stvolinsky SL, Tyulina OV *et al.* Biochemical and physiological evidence that carnosine is an endogenous neuropro-tector against free radicals. Cell Mol Neurobiol. 1997;17:259–71.

91. Quinn PJ, Bildyrev AA, Formazuyk VE. Carnosine: its properties, function and potential therapeutic applications. Mol Aspects Med. 1992;13:379–44

92. Bate-Smith EC. The buffering of muscle in rigor: protein, phosphate and carnosine. J Physiol. 1938;92:336–43.

93. Boldyrev AA, Severin SE. The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance. Adv Enzyme Regul. 1990;30:175–94.

94. Boldyrev AA. Problems and perspectives in studying the biological role of carnosine. Biochemistry 2000;65:751–56.

95. Hipkiss AR, Brownson C. A possible new role. for the anti-ageing peptide carnosine. Cell Mol. Life Sci 2000;57:747–53.

96. Klebanov GI, Teselkin Yu O, Babenkova IV, Lyubitsky OB, Rebrova OYu, Boldyrev A.A. Effect of carnosine and its components on free-radical reactions. Membr Cell Biol. 1998;12:89–99.

97. Nagasawa T, Yonekura T, Nishizawa N, Kitts DD. In vitro and in vivo inhibition of muscle lipid and protein oxidation by carnosine. Mol Cell Biochem. 2001; 225:29–34.

98. Tamba M, Torreggiani A. Hydroxyl radical scavenging by carnosine and Cu(II)-carnosine complexes: a pulse-radiolysis and spectroscopic study. Int J Radiat. Biol. 1999;75:1177–88.

99. Kang JH, Kim KS, Choi SY, Kwon HY, Won MH, Kang TC. Protective effects of carnosine, homocarnosine and anserine against peroxyl radicalmediated Cu, Zn-superoxide dismutase modification. Biochim Biophys Acta. 2002;1570: 89–96.

100. Kang KS, Yun JW, Lee YS. Protective effect of L-carnosine against 12-O-tetradecanoylphorbol–13-acetate or hydrogen peroxide-induced apoptosis on v-myc transformed rat liver epithelial cells. Cancer Lett. 2002;178:53–62.

101. Babizhayev MA, Deyev AI, Yermakova VN, Semiletov YA, Davydova NG, Doroshenko VS, Zhukotskii AV, Goldman IM. Efficacy of N-acetylcarnosine in the treatment of cataracts. Drugs RD. 2002;3:87–103.

102. Suzuki H, Mori M, Seto K, Miyazawa M, Kai A, Suematsu M, Yoneta T, Miura S, Ishii H. Polaprezinc attenuates the Helicobacter pylori-induced gastric mucosal leucocyte activation in Mongolian gerbils – a study using intravital videomicroscopy. Aliment. Pharmacol Therapeut. 2001;15:715–25.

103. Chez MG, Buchanan CP, Aimonovitch MC, Becker M, Schaefer K, Black C, Komen J. Doubleblind, placebo-controlled study of L-carnosine supplementation in children with autistic spectrum disorders. J Child Neurol. 2002;17:833–37.

104. Stvolinsky SL, Dobrota D. Antiischemic activity of carnosine. Biochemistry. 2000, 65, 849–55.

105. Zieba R, Wągrowska-Danilewicz M. Influence of carnosine on the cardiotoxicity of doxorubicin in rabbits. Pol J Pharmacol. 2003;55:1079–87.

106. Van Vliet BN et al. Direct and indirect methods used to study arterial blood pressure. J. Pharmacol Toxicol Methods. 2000;44:361–73.

107. Kurtz TW, Griffin KA, Bidani AK, et al. Recommendations for Blood Pressure Measurement in Humans and Experimental Animals. Part 2: Blood Pressure Measurement in Experimental Animals. Hypertension. 2005;45:299–10.

108. Langendorff O. Untersuchungwen am Uberlebenden Saugethierhenzen. Pflügers Arch 1895;61: 291.

109. Paglia DE, Valentina WN. Studies on the quantitavive and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med. 1967;70:158-69.

110. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 1988;34: 497–500.

111. Beers RF, Sizer IW. A spectrophotemetric method for. measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J Biol Chem. 1952;95:133–40.

112. Luck, H. (1965) Catalase. In: Bergmeyer HU. (eds). Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie-GMBH, Weinheim, New York 1965, pp. 885-94.

113. Stocks J, Dormandy TL. The autooxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. Br J Haematol. 1971;20: 95–111.

114. Jain SK. Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erytrocytes. Biochem Biophys Acta. 1988;937: 205–10.

115. Fisher PW, Salloum F, Das A, Hyder H, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 Inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. Circulation 2005;111: 1601-10.

116. Kim Y, Ma AG, Kitta K, Fitch SN, Ikeda T, Ihara Y, Simon AR, Evans T, Suzuki YJ. Anthracycline-induced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis. Mol Pharmacol. 2003; 63: 368-77.

117. Singal PK, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Thomas TP, Li T. Combination therapy with probucol prevents adriamycin-induced cardiomyopathy. J Mol Cell Cardiol 1995; 27:1055-63.

118. Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. N Engl J Med 1998; 339: 900-5.

119. Xin YF, Zhou GL, Deng ZY, Chen YX, Wu YG, Xu PS and Xuan YX. Protective effect of lycium barbarum on doxorubicin-induced cardiotoxicity. Phytotherapy Research 2007;21: 1020–4.

120. Di Ilio C, Sacchetta P, Boccio G, La Rovere G, Federici G. Glutathione Peroxidase, Glutathione S-Transferase and Glutathione Reductase Activities in Normal and Neoplastic Human Breast Tissue. Cancer Lett. 1985;29.37–42.

121. Melov S, Schneider JA, Day BJ, Hinerfeld D, Coskun P, et al. A Novel Neurolojical Phenotype in Mice Lacking Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase. Nat Genet. 1998;18:159–63

122. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med. 2001;31:1287–312.

123. Li L, Takemura G, Li Y, Miyata S, Esaki M, et al. Preventive Effect of Erythropoietin on Cardiac Dysfunction in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. Circulation 2006;113;535–43.

124. Dziegiel P, Murawska-Cialowicz E, Jethon Z, Januszewska L, Podhorska-Okolow M, et al. Melatonin stimulates the activity of protective antioxidative enzymes in myocardial cells of rats in the course of doxorubicin intoxication. J. Pineal Res. 2003;35:183-7.

125. Anbin Ezhilan R, Rajesh R, Rajaprabhu D, Meena B, Ganesan B and et al. Antioxidant defense of glutamine on myocardial antioxidant status in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. Journal of Cell and Animal Biology. 2008;2:107–11.

126. 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: 523–30.

127. Bryant J, Picot J, Levitt G, Sullivan I, Baxter L, Clegg A. Cardioprotection against the toxic effects of anthracyclines given to children with cancer: a systematic review. Health Technol Assess. 2007;11:1–84.

128. Bast A, Haenen GR, Bruynzeel AM, Van der Vijgh WJ. Protection by flavonoids against anthracycline cardiotoxicity: from chemistry to clinical trials. Cardiovasc Toxicol. 2007;7:154–9.

129. Chan WKM, Decker EA, Chow CK, Boissonneault GA. Effect of dietary carnosine on plasma and tissue antioxidant concentrations and on lipid oxidation in rat skeletal muscle. Lipids. 1994; 29: 461–6.

130. Fitzpatrick D, Amend JF, Squibb RL and Fisher H. Effects of chronic and acute infections on tissue levels of carnosine, anserine and free histidine in rats and chickens. Proc Soc Exp Biol Med. 1980; 165: 404–8.

131. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C et al. Septic shock in humans: advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. Ann Int Med. 1990;113: 227–42.

132. Fisher DE, Amend JF, Strumeyer DH, and Fisher H. A role for carnosine and anserine in histamine metabolism of the traumatized rat. Proc Soc Exp Biol Med 1978; 158: 402–5.

133. Roberts PR, Zaloga GP. Cardiovascular effects of carnosine. Biochemistry. 2000;65:856–61.

134. Niijima A, Okui T, Matsumura Y, Yamano T, Tsuruoka N. and at al. Effects of L-carnosine on renal sympathetic nerve activity and DOCA-salt hypertension. in rats. Autonom Neurosci: Basic Clin. 2002;97: 99-102,

135. Willi SM, Zhang Y, Hill JB, Phelan MC, Michaelis RC. and et al. A deletion in the long arm. of chromosome 18 in a child with serum carnosinase deficiency. Pediatr Res. 1997;41:210–13.

136. Steinherz LJ, Steinherz PG, Tan C. Cardiac failure and dysrhythmias 6-19 years after anthracycline therapy: series of 15 patients. Med Pediatr Oncol. 1995;24: 352–361.

137. Assiri A and Abdel-Wahab A.F.I. Carnosine protects aganist doxorubicin-induced cardiotoxicity. Saudi Pharmaceutical J. 2003;11: 23–31.

138. Praga C, Beretta G, Vigo PL, Lenaz GR and Bonadonna G. Adriamycin cardiotoxicity: a survey of 1273 patients. Cancer Treat Rep. 1979; 63: 827–34.

139. van Acker FA, van Acker SA, Kramer K, Haenen GR. and et al. 7-Monohydroxyethylrutoside protecs aganist chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity when administered only once per week. Clin Cancer Res. 2000; 6: 1337–41.

140. van Acker SA, Kramer K, Voest EE, Grimbergen JA, Zhang J, and et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity monitered by ECG in freely moving mice: a new model to test potential protectors. Cancer Chemother Pharmacol. 1996; 38: 95–101.

141. Jabr RI, Cole WC. Alterations in electrical activity and membrane currents induced by intracellular oxygen-derived free radical stress in guinea pig ventricular myocytes. Circ Res. 1993; 72:1229–44.

142. Puri A, Maulik SK, Ray R, Bhatnagar V. Electrocardiographic and biochemical evidence fort he cardioprotective effect of vitamin E in doxorubisin-induced acute cardiotoxicity in rats. Eur J Pediatr Surg 2005; 15: 387–91.

143. Pacher P, Liaudet L, Bai P, Virag L, Mabley JG, Hasko G and Szabo C. Activation of poly (ADP-ribose) polymerase contributes to development of doxorubicin-induced heart failure. J Pharmacol Exp Ther. 2002;300: 862–7.

144. Dowd NP, Scully M, Adderley SR, Cunningham AJ and Fitzgerald DJ. Inhibition of cyclooxygenase-2 aggravates doxorubicin-mediated cardiac injury in vivo. J Clin Invest. 2001; 108: 585–90.

145. Luo X, Evrovsky Y, Cole D. and et al. Doxorubicin-induced acute changes in cytotoxic aldehydes, antioxidant status, and cardiac function in the rat. Biochemica et Biophysica Acta. 1997;1360: 45–52.

146. El-Demerdash E, Ali AA, Sayed-Ahmed MM. and Osman A.M. New aspects in probucol cardioprotection against doxorubicininduced cardiotoxicity. Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 2003;52:411–16.

147. Bristow MR, Thompson PD, Martin RP, Mason JW, Bollingham ME. and et al. Early anthracycline cardiotoxicity. Am J Med 1978;65:823–32.

148. Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Slezak J, Singal PK. Free radicals and the heart. J Pharmacol Toxicol Meth. 1993; 30: 55–67.

149. Fontana M, Pinnwn F, Lucente G and Pecci L. Prevention of peroxynitrite-dependent damage by carnosine and related sulphonamido pseudodipeptides. Cell Mol Life Sci. 2002, 1570 (2): 546–51.

150. Gianni L, Zweier JL, Levy A and Myers CE. Characterization of the cycle of iron-mediated electron transfer from adriamycin to molecular oxygen. J Biol Chem. 1985; 260: 6820–26.

151. Sinha BK, Polliti PM. Anthracyclines. Cancer Chemother Biol Resp Modifiers Ann. 1990; 11: 45–57.

152. Venditti P, Balestrieri M, De Leo T, Di Meo S. Free radical involvement in doxorubicin induced electrophsiological alterations in rat papillary muscle fibres. Cardiovasc Res. 1998;38:695–702.

153. Iliskovic N, Hasinoff BB, Malisza KL, Li T, Danelisen I, Singal PK. Mechanisms of beneficial effects of probucol in adriamycin cardiomyopathy. Mol Cell Biochem. 1999;196:43–49.

154. Siveski-Iliskovic N, Kaul N, Singal PK. Probucol promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. Circulation. 1994;89:2829–35.

155. Luo X, Reichetzer B, Trines J, Benson LN, Lehotay DC. L-carnitine attenuates doxorubicin-induced lipid peroxidation in rats. Free Radic Biol Med. 1999;26:1158–65.

156. Arafa HM, Abd-Ellah MF, Hafez HF. Abatement by naringenin of doxorubicininduced cardiac toxicity in rats. J Egyp Natl Canc Inst. 2005;17:291–300.

157. Gutteridge JM. Anthracycline toxicity, iron and oxygen radicals and chelation therapy. J Lab Clin Med. 1993;122:228–9.

158. Demirkaya E. Doksorubisine bağlı kardiyak toksisitenin önlenmesinde bitkisel antioksidanların etkinliklerinin in-vivo araştırılması. Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi. Askeri Tıp Fakültesi. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD Uzmanlık Tezi, Ankara–2003.

159. Deng S, Wojnowski L. Genotyping the risk of anthracycline-induced cardiotoxicity. Cardiovasc Toxicol. 2007;7:129–34.

160. Maitre B, Jornot L, Jonod AF. Effects of inhibition of catalase and superoxide dismutase activity on antioxidant enzyme. mRNA levels. Am J Physiol. 1993;265:636–43.

161. Fadillioglu E, Erdogan H, Sogut S, Kuku I. Protective effects of erdosteine against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. J Appl Toxicol 2003;23:71–4.

162. Durak I, Ozturk HS, Kavutcu M, Birey M, Yel M. and et al. Protective role of antioxidant vitamins on adriamycin-induced free radical production and cardiotoxicity in guinea pigs. Cancer Res Ther Cont. 1998;5: 133–41

163. Kang JH. Protective effects of carnosine and N-acetylcarnosine on salsolinol-mediated Cu,Zn-superoxide dismutase inactivation. Bull Korean Chem Soc. 2007;28:360-764.

164. Narin F, Demir F, Akgün H, Baykan A, Üzüm K. ve ark. Doxorubicin-induced experimental cardiotoxicity and effect of pentoxphylline on cardiotoxicity. Türk Kardiyol Dern Arş. 2004;32:279–87.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Kayseri'de doğdu. İlköğrenimini Selçuk İlköğretim Okulu'nda, orta öğrenimini Argıncık Lisesi'nde, lise öğrenimini ise Seyyid Burhaneddin Endüstri Meslek Lisesi'nde tamamladı. 2001 yılında Erciyes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji lisans öğrenimine başladı. 2005 yılında Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen aynı anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.