TÜRKİYE CUMHURİYETİ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKSORUBİSİN KARDİYOTOKSİSİTESİNDE OLUŞAN NEKROTİK HASARDA P53 GENİNİN ROLÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERYEM ŞEYDA KAYA

DANIŞMAN

PROF. DR. MERAL ERDİNÇ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR 2015

TÜRKİYE CUMHURİYETİ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKSORUBİSİN KARDİYOTOKSİSİTESİNDE OLUŞAN NEKROTİK HASARDA P53 GENİNİN ROLÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERYEM ŞEYDA KAYA

DANIŞMAN

PROF. DR. MERAL ERDİNÇ

FARMAKOLOİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR 2015

Bu tez, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri komisyonu tarafından 14-TF-94 nolu Yüksek Lisans proje numarası ile desteklenmiştir.

T.C

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

"Doksorubisin Kardiyotoksisitesinde Oluşan Nekrotik Hasarda p53 Geninin Rolü" başlıklı Yüksek Lisans tezi 23/06/2015 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Meral ERDİNÇ

Tezi Teslim Eden : Meryem Şeyda KAYA

Jüri Üyesinin

Ünvanı	Adı Soyadı	Üniversitesi
Başkan :	Prof. Dr. Meral ERDİNÇ	D.Ü. Tıp Fakültesi
Üye :	Doç. Dr. Hilmi İSİ	D.Ü. Tıp Fakültesi
Üye :	Doç. Dr. Hasan AKKOÇ	D.Ü. Tıp Fakültesi

Yukarıdaki imzalar tasdik olunur.

…../…../……

Prof. Dr. Ali CEYLAN

Dicle Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgisinden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, öğrencisi olmaktan her zaman onur duyduğum, bana olan desteğini ve güvenini hiçbir zaman esirgemeyen, ve ayrıca bütün çalışmalarımız sırasında göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrı için değerli hocam Sayın Prof. Dr. Meral ERDİNÇ'e;

Ayrıca bu tezin hazırlanması sırasında bilgisini ve ilgisini esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Hasan AKKOÇ'a ve her zaman yanımda olup yardımını eksik etmeyen değerli arkadaşım Uzm. Ecz. Zeynep ERDOĞMUŞ'a ve Uzm. Ecz. Emre UYAR'a;

Bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Meryem Şeyda KAYA

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

1.Ön Sayfalar Sayfa

1.1. Kapak

1.2. İç Kapak

1.3. Onay Sayfası ….....I

1.4. Teşekkür Sayfası …….....II

1.5. İçindekiler Dizini ……...…….....III

1.6. Şekiller Dizini ……...…….....V

1.7. Tablolar Dizini …….....VI

1.8. Simgeler ve Kısaltmalar Dizini ……..…...……....VII

2.Özet Sayfalar

Türkçe Özet ……..……..VIII

İngilizce Özet ……..X

3.Tez Metni

1. Giriş ve Amaç …….…….....1
2. Genel Bilgiler……..…….…….…….2
2.1. Doksorubisin…….……...…….....2
    2.1.1. Genel Bilgiler……..…….....2
    2.1.2. Yapısı.....2
    2.1.3. Etki Mekanizması…….…….…….…3
    2.1.4. Metabolizması……...…….....3
    2.1.5. Yan Etkileri……..……...3
    2.1.6. Doksorubisin ve Kardiyotoksisite…….……..4
2.2. Hücre Ölüm Yolakları……..…….……...……..6
    2.2.1. Apoptozis……..…….…….6
    2.2.2. Nekroz...……...……...……..7
2.3. Siklosporin A…….……..10

2.3.1. Genel bilgi ve Etki Mekanizması…….……..…...11
2.3.2. Siklosporin A ve Nekroz……..……..…...12
3.Gereç ve Yöntem ……...…….……...……..…13
3.1.Gereç ……....…….……...…..13
3.1.1.Kullanılan Araç ve Gereçler ……..…13
3.1.2.Kullanılan Deney Hayvanları …….……...14
3.1.3.Kullanılan Kimyasal Maddeler ……14
3.2.Yöntem ……..…….…....15
3.2.1. Farmakolojik İnceleme ……...…15
3.2.3. Moleküler İnceleme…….……..…….16
3.3. İstatistiksel Değerlendirme …….……...….17
4.Bulgular ……....……..…….....18
4.1.Farmakolojik Bulgular ……..…….……..19
4.2.Moleküler Bulgular ……..……...…….…….…….. 23
5.Tartışma ……....……..……..…….….25
6.Sonuç ve Öneriler ……....……..……..…….…...28
7.Kaynaklar …….……...……..……....…..…29
8.Özgeçmiş ……...……...…….…..….32

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Doksorubisinin yapısı…… ……..….2

Şekil 2: Doksorubisin metabolizması sırasında ortaya çıkan metabolitler…….……..5

Şekil 3: Apoptotik sinyal yolakları…….…….....……7

Şekil 4: Nekrotik sinyal yolakları …….……...…..……..9

Şekil 5: p53 proteininin DNA'ya bağlanması……...…….10

Şekil 6: Siklosporin A'nın moleküler yapısı ……..…….….11

Şekil 7: Langendorff sistemi……. 16

Şekil 8: Langendorff sistemi…….……...…….16

Şekil 9: Bütün gruplarda, Perfüzyon Basıncı (mmHg)…….....……19

Şekil 10: Bütün gruplarda, Kalp Atım Hızı (atım/dk)……..…….….20

Şekil 11: Bütün gruplarda, Sol Ventrikül Gelişen Basıncı (mmHg)....……...……...21

Şekil 12: Bütün gruplarda, Sol Ventrikül Sistolik Basınç Yükselme Hızı…….....22

(mmHg/sn)

Şekil 13: Bütün gruplarda, Sol Ventrikül Diyastolik Basınç Gevşeme Hızı…...…...23

(mmHg/sn)

Şekil 14: p53 geninin actb genine göre ekspresyon seviyesi…….……...24

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: Doksorubisin yan etkileri……..…….4

Tablo 2: Krebs-Henseleit Solüsyonu……..……...15

Tablo 3: Gruplara (n=8) ait kalp hızı, perfüzyon basıncı, LVDP,……..……...18

LV(dP/dt)max ve LV(dp/dt)min verileri

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Dox : Doksorubisin

ROS : Serbest Oksijen Radikalleri

MPTP : Mitokondriyel Transfer Poru

CypD : Siklofilin D

CsA : Siklosporin A

actb : β-actin

KAH : Kalbin dakikadaki kalp atım hızı

PP : Perfüzyon basıncı

LVDP : Sol ventrikül gelişen basınç

LV(dp/dt)max : Sol ventrikülün birim zamandaki maksimum sistolik basıncı

LV(dp/dt)min : Sol ventrikülün birim zamandaki minimum diastolik basıncı

i.p. : İntraperitonel

i.v. : İntravenöz

i.m. : İntramuskuler

ÖZET

Doksorubisin (Dox), lösemi ve lenfoma gibi farklı kanser türlerine karşı kullanılan geniş spektrumlu antrasiklin türevi bir antibiyotiktir. Kardiyotoksisite, doksorubisinin kullanımını kısıtlayan en önemli yan etkidir. Doksorubisinin oluşturduğu kardiyotoksisite mekanizması tam olarak çözülememekle beraber, en

önemli hasarı doksorubisin metabolitlerinin ve serbest oksijen radikallerinin (ROS) yaptığı bilinmektedir. Özellikle ROS'ların etkisiyle hücrede nekroz mekanizmasına ait sinyal yolakları aktifleşmektedir.

Bu çalışmada, nekroz mekanizmasındaki Mitokondriyel Transfer Poru'nun (MPTP) açılması sırasında Siklofilin D (CypD) proteinine bağlanarak görev aldığı düşünülen p53 proteininin Dox kardiyotoksitesindeki rolü ve ayrıca MPTP'nin açılmasında regülatör olan CypD proteininin inhibe eden immunosupresant etkili Siklosporin A (CsA)'nın nekroz mekanizmasına ve doksorubisin kardiyotoksisitesine karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla kullanılan erkek Sprague-Dawley ratlar dört gruba ayrılmıştır: 1. grup: Kontrol grubu; 2. grup: Tek doz Dox Grubu (10 mg/kg i.p.); 3. grup: Tek doz Dox(10 mg/kg i.p.)+CsA Grubu (3 mg/kg, 7 gün); 4. grup: CsA Grubu (3 mg/kg, 7 gün). Bütün gruplarda Dox ile oluşturulan deneysel kardiyotoksisite sonrası, anestezi altında, kalpler izole edilmiştir. İzole edilen kalpler aorttan kanüle edilerek perfüzyon sistemine takılmıştır ve peristaltik pompa yardımı ile 37^{o}C'ye ısıtılan, karbojen (%5 CO2 ve %95 O2 karışımı) ile havalandırılan Krebs-Henseleit solüsyonu ile perfüze edilmiştir. Kalpte koroner perfüzyon basıncı, sol ventrikül gelişen basıncı (LVDP) ve kalbin dakikadaki kalp atım hızı (KAH), ve sol ventrikül içine yerleştirilen balon ile sol ventrikül gelişen basınç (LVDP) kaydedildi. Ayrıca kalbin kontraksiyon gücünü gösteren sol ventrikül sistolik basınç yükselme hızını ve sol ventrikül diyastolik basınç gevşeme hızını ifade eden LV(dP/dt)max ve LV(dP/dt)min kaydedilmiştir. Yapılan bu farmakolojik deneylere ek olarak, elde edilen dokulardan izole edilen mRNA'lar, cDNA'ya dönüştürülerek Real Time PCR metodu ile p53 geninin ekspresyon seviyesi actb geninin ekspresyon seviyesine bağlı olarak ölçülmüştür ve gruplar arasında karşılaştırılmıştır.

Deneyler sonucunda, tek doz Dox (10 mg/kg) verilen grupta kontrol grubuna göre koroner perfüzyon basıncının ve LV(dP/dt)min değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı ($p<0.001$); KAH, LVDP ve LV(dp/dt)max değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde azaldığı ($p<0.05$) görülmüştür. Buna karşılık Dox+CsA grubunda Dox grubuna göre koroner perfüzyon basıncının ve LV(dp/dt)min değerlerinin istatistiki olarak anlamlı bir şekilde azaldığı ($p<0.05$); KAH, LVDP ve LV(dp/dt)max değerlerinde ise istatistiki olarak anlamlı bir biçimde arttığı ($p<0.001$) görülmüştür. Moleküler analizlerde ise p53 geninin ekspresyonunun Dox grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde arttığı ($p<0.001$); Dox+CsA grubunda ise Dox grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı ($p<0.001$) görülmüştür.

Sonuç olarak Dox grubunda bozulan kalp kontraktilesi ve kalp hemodinamiği ile karakterize kardiyotoksik etkinin CsA ile anlamlı olarak korunduğu ve ayrıca p53 geninin doksorubisine bağlı oluşan nekrotik hasarda görevinin olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Doksorubisin, Kardiyotoksisite, Nekroz, Siklosporin A, p53 ekspresyonu

ABSTRACT

Doxorubicin is a wide spectrum antibiotic that used against various cancers such as lymphoma and leukemia. Cardiotoxicity is the most significant side effects that limit the clinic usage of doxorubicin. Doxorubicin related cardiotoxicity mechanism is not completely explained; however, most of the damage is done by doxorubicin metabolites and reactive oxygen species (ROS). Especially, ROS activates the signaling pathways of necrosis in cell.

In this study, the role of p53 expression and the effect of Cyclosporin A in doxorubicin related necrosis have been studied, since CsA is the inhibitor Cyclophilin D protein which is one of the key regulator of necrosis. Male Sprague-Dawley rats were used for this purposes and were divided into four groups: 1. group: Control group; 2. group: Single dose doxorubicin (10 mg/kg i.p.); 3. group: Single dose doxorubicin (10 mg/kg i.p.) + Cyclosporine A (3 mg/kg, 7 days); 4. group: Cyclosporine A (3 mg/kg, 7 days). The hearts were isolated under anesthesia after consisting experimental cardiotoxicity in all groups. The isolated hearts were cannulated through the aorta and attached to the perfusion system that was perfuzed with 37^{o}C carbogen (5% CO2 and 95% O2 mixture) aerated Krebs-Henseleit solution by a peristaltic pump support. Heart coronary perfusion pressure, left ventricular developed pressure (LVDP) and heart rate per minute were compared

between the groups. Also LV(dP/dt)max and LV(dP/dt)min which are left ventricular systolic pressure rise rate and left ventricular diastolic pressure relaxation rate were recorded. In addition to this studies, isolated mRNA's from tissue sample which were taken from all groups were transcribed to cDNA and then analyzed with Real Time PCR in order to quantify relative expression levels of p53 gene according to actb gene expression. The expression levels of this gene were compared between groups.

Coronary perfusion pressure and LV(dP/dt)min values are statistically significantly increased; and, heart rate, LVDP and LV(dP/dt)max values are statistically significantly decreased ($p<0.001$) in single dose Dox group (10 mg/kg) according to control group ($p<0.05$). However, coronary perfusion pressure and LV(dP/dt)min values are statistically significantly decreased ($p<0.05$); and, heart rate, LVDP and LV(dP/dt)max values are statistically significantly increased in Dox+CsA group (10 mg/kg) according to Dox group ($p<0.001$). In molecular analysis, it is found that the p53 gene expression is statistically significantly increased in single dose doxorubicin group (10 mg/kg) according to control group ($p<0.001$). Additionally, the expression of p53 gene is statistically significantly reduced in Dox+CsA group (10 mg/kg) according to Dox group ($p<0.001$).

As a result of this study, the Dox cardiotoxicity which is characterized by the damaged cardiac contractility and cardiac hemodynamics significantly maintained in CsA treated group. Moreover, p53 gene expression has an important role in doxorubicin related necrotic damage.

Keywords: Doxorubicin, Cardiotoxicity, Necrosis, Cyclosporin A, p53 expression

GİRİŞ VE AMAÇ

Antineoplastik bir ilaç olan doksorubisinin en önemli doz kısıtlayıcı yan etkisi kardiyotoksisitedir. Kardiyotoksisitenin en önemli sonuçlarından biri genellikle nekroz şeklinde kendini gösteren hücre veya doku ölümüdür. Genellikle apoptozis sırasında görev aldığı bilinen p53 geninin, son zamanlarda yapılan çalışmalarda nekroz mekanizmasında da görev aldığı görülmüştür. p53 proteininin, nekroz sırasında açılarak hücredeki su ve çözünmüş maddelerin mitokondri içerisine dolmasına sebep olan Mitokondriyel Transfer Porunun açılmasında regülatör olarak görev yapan Siklofilin D proteinine bağlanarak, porun açılmasını yönettiği gösterilmiştir. Bu porun açılmasını inhibe eden ve immunosupresant bir ilaç olan Siklosporin A'nın yapılan çalışmalarda nekroz hasarına karşı koruyucu olarak kullanılabileceği kanıtlanmıştır.

Bu çalışmada, ratlarda doksorubisin ile oluşturulan deneysel kardiyotoksik modelde oluşan nekrotik hasarda p53 geninin ekspresyon seviyesinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca nekroz mekanizmasında görev alan Siklofilin D proteinine bağlanarak onun çalışmasını dolayısıyla da nekrozu inhibe eden Siklosporin A'nın, nekroz üzerine koruyucu etkisi ve p53 geninin Doksorubisin ile beraber Siklosporin A almış ratlardaki ekspresyon seviyesinin araştırılması da hedeflemiştir. Bu amaçlarla, ratların kalpleri izole edilerek in vitro olarak perfüze edilecektir ve perfüze edilen kalplerde; koroner perfüzyon basıncı, sol ventrikül gelişen basıncı ve kalbin dakikadaki atım hızı incelenerek gruplar arasında karşılaştırılacaktır. Yapılan farmakolojik deneylere ilave olarak bütün gruplardan elde edilen kalp dokuları moleküler olarak incelenecek ve dokularda bulunan p53 geninin mRNA ekspresyon seviyesi Real Time PCR ile ölçülecektir.

Elde edilecek olan sonuçlar, doksorubisin ile oluşan nekrotik hasar mekanizmasında Siklosporin A'nın protektif etkisini kanıtlayacak ve p53 geninin bu hasardaki rolünü ortaya çıkaracaktır. Böylece bu geni hedef alan nekrotik hasarı önleyici tedavi yöntemlerinin araştırılması mümkün olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

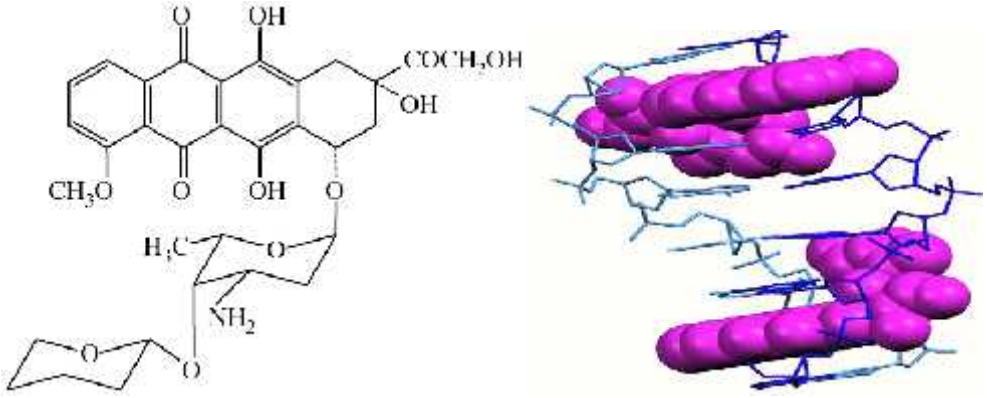
2.1. DOKSORUBİSİN

2.1.1. Genel Bilgiler

Doksorubisin; antrasiklin türevi, geniş spektrumlu bir antibiyotik olmakla beraber; lösemi ve lenfoma gibi farklı kanser türlerine karşı güçlü antikanser etki göstermektedir. Antrasiklin türevi antibiyotikler, ilk defa 1963 yılında *Streptomyces peucetius variete caesiu* isimli mantar türü kültüründen izole edilmiştir (1,2). Doksorubisin; bu grup antibiyotiklerin ilk kez ve en yaygın bir şekilde tedavide kullanılan üyesidir (3). Antrasiklinler; yumuşak doku ve kemik sarkomaları, lenfoma, lösemi, göğüs kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri, Wilms tümörü, nöroblastom, hepatoblastom gibi bir dizi malignite tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (4)

2.1.2. Yapısı

Antrasiklin molekülü, ilaca kırmızı rengini veren tetrasiklik çekirdek ve aminoşekerden (daunosamin) oluşur. Doksorubisinin kimyasal ve uzaysal düzlemdeki yapıları Şekil 1'de gösterilmiştir. Daunorubisin molekülünün 14. karbonu hidroksil grubu alarak doksorubisini oluşturur (5).



A) Kimyasal Düzlemde Doksorubisin **B) Uzaysal Düzlemde Doksorubisin**

Şekil 1: Doksorubisinin yapısı(5)

2.1.3. Etki Mekanizması:

Doksorubisin hücre içerisinde 4 farklı şekilde etki gösterir (6,7):

- Hücre çekirdeğinin içine girerek, DNA topoizomeraz II-DNA-antrasiklin kompleksini oluşturur. Bu sayede DNA replikasyon ve RNA transkripsiyon mekanizmalarını inhibe eder.
- DNA ve RNA polimerazlara bağlanıp onları inhibe ederek DNA replikasyon ve RNA sentez mekanizmalarını bozar.
- Hücre membranına bağlanarak; hücre membran fonksiyonunu bozar.
- Mikrozomlarda sitokrom P-450 redüktaz enzimi ile reaksiyona girerek; serbest oksijen radikallerini oluşturur.

2.1.4. Metabolizması:

Doksorubisin vücuda intravenöz (i.v.) olarak uygulanır. Asidik ortamda stabil olmamasından dolayı oral yolla ve doku hasarı yapıcı özelliğinin yüksek olmasından dolayı intramuskuler ve subkutan yolla vücuda verilmez (8, 9). Vücuda alındıktan sonra hızla parçalanarak doksorubisinol ve daunorubisinolü oluşturur. Bu metabolitler ana bileşikten daha az aktiftir (10). Kalp, miyokard,

karaciğer, dalak gibi dokularda i.v. uygulama sonrası birikir ve bu dokularda plazma konstrasyonundan daha yüksek oranlara ulaşır (5-10 kat) (11).

İtrahı, karaciğer ve böbrek aracılığı ile olur. Karaciğerden biyotransformasyonla ve safradan ekskresyon ile; doksorubisinol ve daunorubisinol metabolitleri halinde atılır (12).

2.1.5. Yan Etkileri

Doksorubisinin en önemli yan etkileri aşağıdaki tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Doksorubisin yan etkileri (13-16)

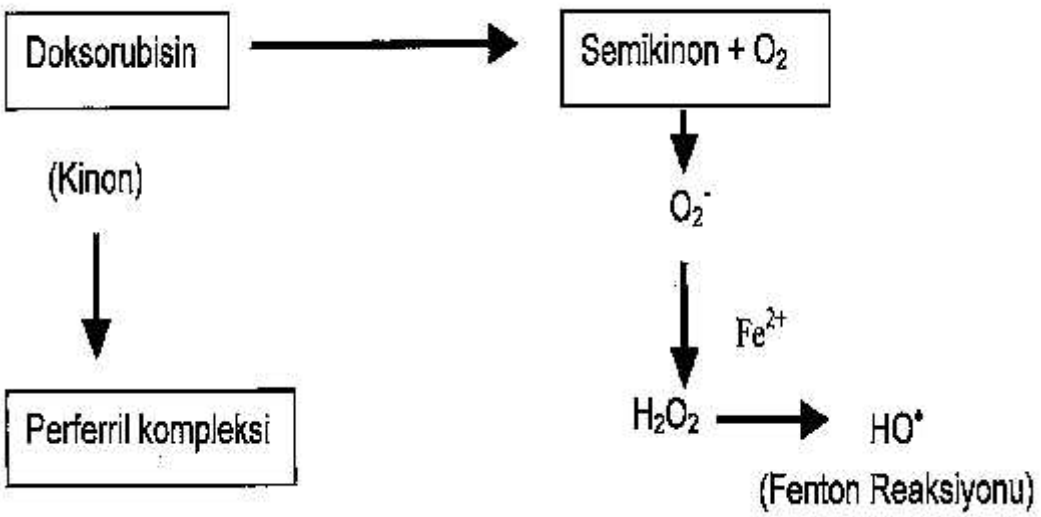
Yan Etki	**Mekanizması**
Saç Dökülmesi	Anti-mitotik etki
Kemik İliği Supresyonu	Anti-mitotik etki
Mukozit	Anti-mitotik etki
Nefrotoksisite	Serbest radikal aracılı hasar
Radyosensitizasyon	2000 rad üzeri radyasyonda toksisite hızla gelişir ve en çok etkilenen organ kalptir.
Kardiyotoksisite	Birden çok mekanizma ile gerçekleşir. Klinik olarak doz sınırlayıcı olan yan etkidir.

2.1.6. Doksorubisin ve Kardiyotoksisite

Kardiyotoksisite, doksorubisin kullanımını kısıtlayan en önemli yan etkidir ve bu yan etkinin oluşma mekanizması tam olarak açıklanamamış olup birçok teori üretilmiştir (17). Nükleik asit ve protein sentezinde inhibisyon, adrenerjik fonksiyonlarda değişiklikler, vazoaktif amin salınımı, lizozomal değişiklikler, mitokondriyal anormallik, Na-KATPaz (sodyum potasyum adenozin trifosfataz) ve Ca-ATPaz adenilat siklazda değişiklik, sarkolemmal kalsiyum (Ca++) transportunda değişiklik, miyokardiyal elektrolit değişikliği, ROS oluşumu, miyokardiyal antioksidan enzim düzeyinde azalma, lipid peroksidasyonu, protein olmayan doku sülfidril bileşiklerinde azalma ve programlanmış hücre ölümü bu teorilerden birkaçıdır (18).

Kardiyotoksisitenin sebebi oldukça komplike ve birçok nedene bağlıdır. Kardiyotoksisite ile meydana gelen değişikliklerin ortak sonucu ROS oluşumu ve lipit peroksidasyonudur (19). Özellikle doksorubisin ve metabolitlerine bağlı ROS oluşumu günümüzde en fazla kabul gören teoridir. Antrasiklinler ve dolayısıyla da doksorubisin, ROS ve redoks resiklusu oluşmasında oldukça etkin maddelerdir. Bir antrasiklin molekülü birden çok ROS oluşturabilmektedir (20, 21).

Doksorubisin kardiyotoksisitesinde ROS ile oluşan toksik etkinin mekanizmanın açıklanmasında kabul edilen iki teori vardır: Birinci teori kinon halkasının enzimatik olarak indirgenmesidir (22). Şekil 3'de görülebileceği gibi oksijen molekülü indirgenerek semikinon, hidrokinon ve ROS'u oluşturur (22,24). Oluşan maddeler mikrozomal ve mitokondriyal enzimleri inhibe eder, lipid peroksidasyonu yapar, elektron transport zincirini bozar. İkinci teori ise doksorubisin-metal kompleksinin oluşarak redoks siklusunu başlatması ve böylece yüksek miktarda oksidan oluşmuna sebep olmasıdır. Doksorubisin, demir metalini major hücresel demir deposu olan ferritinden alır. Ferritin, antrasiklin bağımlı



mikrozomal lipid peroksidasyonunda oldukça etkili bir katalizördür (23,24).

Şekil 2: Doksorubisin metabolizması sırasında ortaya çıkan metabolitler(24)

Hücre ve dokular aslında ROS'ları bulundurdukları antioksidanlar ile ortamdan uzaklaştırarak temizleyebilme yeteneğine sahiptirler. Ancak kalp dokusunda antioksidan enzimler daha az miktarda bulunduğundan ROS'ların temizlenmesi daha zordur ve daha çok zaman alır. Bu durum doksorubisin tedavisi sonrası oluşan kalp hasarının sebebini açıklamaktadır (24).

2.2. Hücre Ölüm Yolakları

Hücre ölümü, hücrenin biyolojik fonksiyonlarının durmasına verilen isimdir. Hücre ölümü genellikle iki ana grupta toplanır: kontrollü hücre ölümü (apoptozis) ve kontrolsüz hücre ölümü (nekroz) (25).

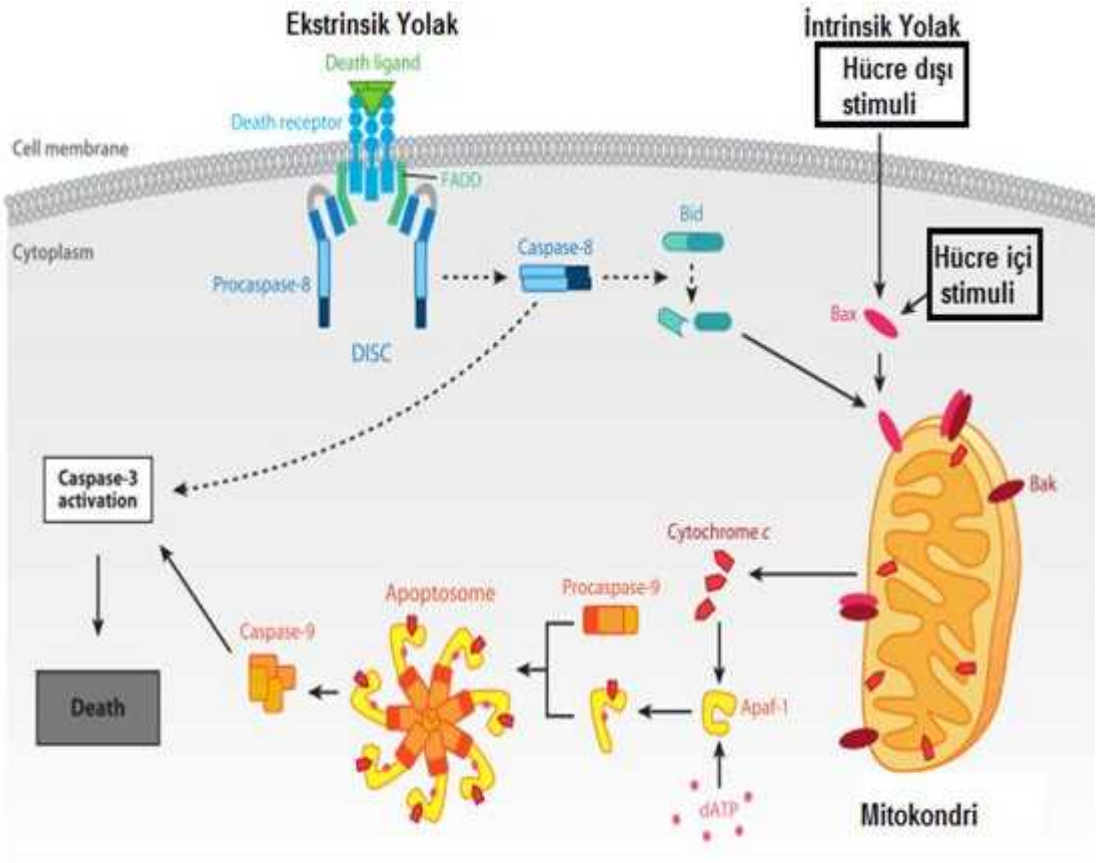
2.2.1. Apoptozis:

Apoptotik hücre; sitoplazmanın küçülmesi, hücre zarı yüzeyinde çıkıntıların oluşması, hücre çekirdeğinin yoğunlaşması, ve en sonunda hem sitoplazmanın hem de hücre çekirdeğinin zarla çevrelenmiş küçük apoptotik gövdelere dönüşmesi şeklinde karakterize edilir (25, 26). Apoptozis, kontrollü hücre ölümüne verilen isimdir ve hücrelerde iki sinyal yolağı ile kontrol edilir: hücre membranının yüzeyindeki reseptörler ile çalışan ekstrinsik yolak; ve mitokondri ve endoplazmik retikulumdaki reseptörler ile çalışan intrinsik yolak. Her iki sinyal yolağı da kaspaz enzimlerinin aktivasyonu ile sonlanır(Şekil 4) (25, 26).

Ekstrinsik sinyal yolağı, solübl ve hücre membranına bağlanabilen ligandlardan [Fas ligandı ya da Tümör Nekrozis Faktör alfa (TNF-a) gibi] gelen sinyaller ile aktive olur (25). Şekil 4'ten de görülebileceği gibi bu ligandlar hücre zarı yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerine bağlanarak bu reseptörleri aktive ederler. Aktive olan ölüm reseptörlerinin hücre içinde kalan kısımlarında bir takım konformasyonal değişiklikler meydana gelir ve böylece kaspaz-8 aktive olur. Aktif

kaspaz-8 yolağın devamında bulunan pro-kaspazları aktive eder (25). Kaspaz-8 ayrıca mitokondriye giderek oradaki apoptotik olayların başlamasını indükleyen BH3[B hücresi lösemi/lenfoma-2(Bcl-2) homoloji alanı 3]-only protein Bid [BH3-etkileşim alanı ölüm agonisti]'in karboksil kısmını böler ve mitokondriyel apoptotik olayları indükler (Şekil 4) (25,26).

İntrinsik sinyal yolağı, çeşitli biyolojik, kimyasal ve fiziksel stimuliler ile indüklenebilir (27). Bu stimuliler mitokondri ve endoplazmik retikuluma proapoptotik Bcl-2 proteinleri (Bax ve BH3-only proteinleri) ile iletilir. Bu ölüm sinyalleri mitokondriden sitoplazmaya sitokrom-c gibi apoptojenlerin salınmasını sağlar. Sitoplazmik Sitokrom-C prokaspaz-9'u aktive ederek kaspaz 9'un oluşmasını sağlar. Kaspaz 9 daha sonra sinyal yolağının devamında gelen kaspazları bölerek ve aktive ederek apoptozise sebep olur (Şekil 4) (25, 27).



Şekil 3: Apoptotik sinyal yolakları(25)

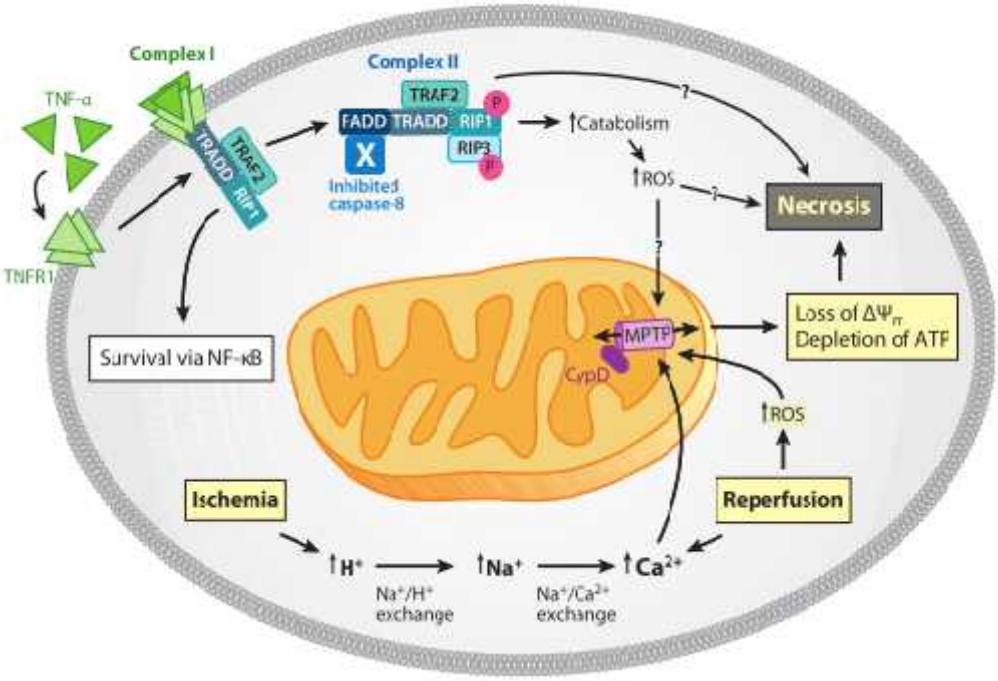
2.2.2. Nekroz

Apoptozisin aksine kontrol edilemeyen hücre ölümüne nekroz denir (28). Ancak yapılan çalışmalar, kontrol edilebilen nekrozun olduğunu göstemekle beraber; kontrol edilebilen nekrozun özellikle miyokard enfraktüsü, kalp yetmezliği ve inmede çok önemli bir etkisi olduğunu ispatlamıştır. Nekrozun en önemli iki özelliği; hücre zarının bütünlüğünün bozulması ve hücresel ATP miktarının tükenmesidir. Nekrotik hücrelerin sitoplazmik içeriği, hücre zarının bütünlüğünün bozulması sonucunda ekstraselüler kısma yayılarak enflamasyon oluşturur (28).

Yapılan son çalışmalara göre nekroz iki farklı sinyal yolağı ile gerçekleşmektedir (25, 29). Birinci yolak hücre zarındaki ölüm reseptörlerinin (TNFR1) aktivasyonu ile gerçekleşir. TNF oldukça komplike bir sinyal yolağı olmakla beraber gelen uyaranın içeriğine göre hücrede; apoptozis, nekroz, hücre canlılığının devamı ve hatta hücre proliferasyona bile sebep olabilir. Eğer TNFR1 reseptörünün aktivasyonu Kompleks-1 ve ardından Kompleks-2 oluşumunu indüklerse nekroz yolağı aktive olmuş demektir (29). İkinci yolak ise mitokondriyel transfer porunun mitokondri iç zarında açılması ile oluşur (Şekil 5) (25, 29).

MPTP, mitokondrinin hem iç hem dış zarı ile bağlantılı bir por olup 1.5 kDa'ndan düşük moleküllerin geçişine izin verir (29). Bu porun açılması artan kalsiyum konsantrasyonu, oksidatif stres, artan fosfat konsantrasyonu ve adenin nükleotitlerin tükenmesi ile indüklenebilir. Açılan pordan mitokondri içine giren sitoplazmik moleküller ve su mitokondrinin şişmesine sebep olur ki bu olay nekrozun en önemli belirtecidir. MPTP'nin moleküler yapısı henüz aydınlatılamamasına rağmen, MPTP'nin oluşmasında görev alan en önemli moleküller; Adenin Nukleotit Translokaz (ANT), Fosfat Taşıyıcısı(PiC) ve FoF1 ATP sentaz iken; bu porun açılma mekanizmasını regüle eden ve nekrozun önlenmesi için birçok çalışmada inhibisyonu hedeflenen en önemli molekül Siklofilin D'dir. CypD, küçük bir matriks peptidyl-prolyl cis-trans izomeraz (PPIase) enzimidir ve bu enzimin aktivitesi nekroz için oldukça mühimdir. Bu molekül, MPTP'nin açılmasını onun kalsiyuma ve oksidatif strese olan hassasiyetini arttırarak gerçekleştirmektedir. CypD'nin MPTP açılma mekanizmasında kilit rol oynadığının

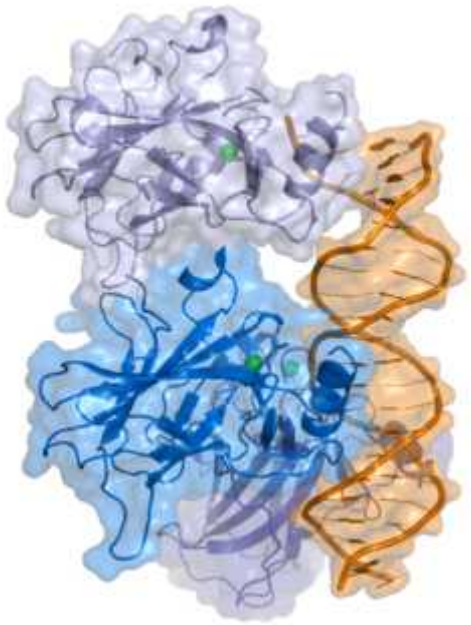
kesin kanıtı CypD knokcout farelerden izole edilen mitokondriler kullanılarak yapılan çalışmalar ile ispatlanmıştır. Bu mitokondrilerde artan kalsiyum konsantrasyonuna karşı MPTP'nin açılma hassasiyeti oldukça büyük bir şekilde azalmıştır. Ancak CypD'nin hücrede hiç olmaması MPTP'nin açılmasını tamamıyla önlemez; bu mitokondrilerde hala çok yüksek kalsiyum konsantrasyonu ve oksidatif stres gibi yeteri kadar güçlü uyaranlar ile MPTP açılabilir. Özetle, yapılan çalışmalarda, CypD knockout ratların artan kalsiyum konsantrasyonu ve oksidatif stres ile indüklenmiş nekroza karşı direnç kazandığı görülmüştür (30).



Şekil 5: Nekrotik Sinyal Yolakları (25)

p53 (hücresel tümör antieni p53, fosfoprotein p53, tümör supresör p53), çeşitli organizmalarda homolog genler tarafından kodlanan bir tümör proteinidir (31). İnsanlarda TP53 ya da farelerde Trp53 geni tarafından kodlanır. Hücrelerde tümör supresör olarak görev yapan bu protein, kanser hücrelerinin oluşumunu engeller. Ayrıca bu protein, mutasyonları engelleyerek hücre genomunun stabilitesini korur. 1979 yılında ilk defa keşfedildiğinde moleküler ağırlığı 53 kDa olduğundan

ötürü p53 olarak isimlendirilmiştir. Şekil 5'ten de görülebileceği gibi, p53 proteini DNA'ya bağlanarak genomu mutasyona uğramaması için regüle eder (31).



Şekil 5: p53 proteininin DNA'ya bağlanması (31)

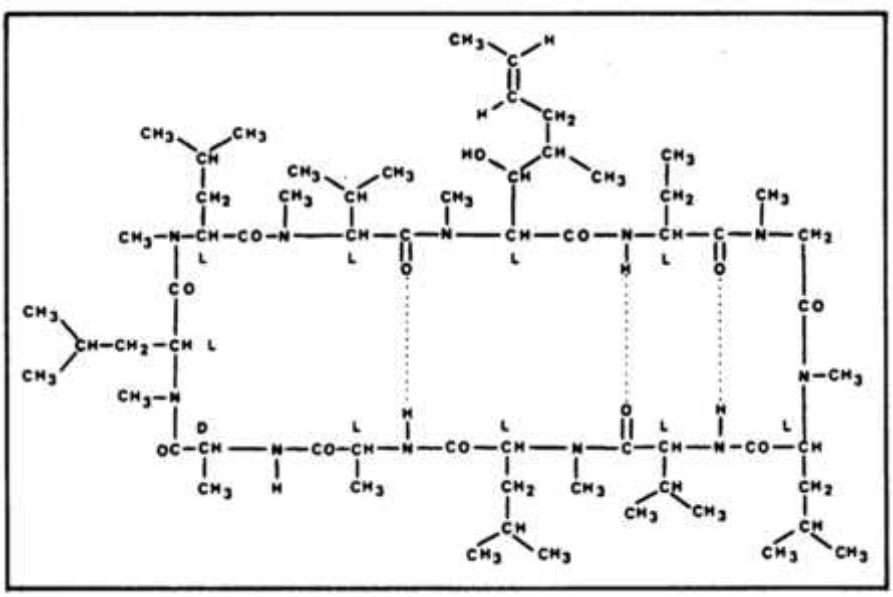
p53 proteini, sitoplazmada ise oldukça önemli bir transkripsiyonel aktivatör ve hücresel stres sensörüdür (32). DNA hasarı, oksidatif stres ve iskemik hasara karşı yanıt oluşmasını sağlayan bu protein, özellikle hasarlı hücrelerin yaşamasını engelleyerek apoptosisde yer alır (32). p53 proteini, stres sırasında ivedilikle mitokondrinin yüzeyine gider ve oradaki anti- ve proapoptotik Bcl-2 türevi proteinleri inhibe veya aktive ederek mitokondri dış zar permeabilizasyonunu sağlar ve apoptitik olayları başlatır (33). Ayrıca yapılan son çalışmalara göre, oksidatif stres kaynaklı mitokondriyel transfer porunun açılması ile meydana gelen nekrozda, bu porun açılması sırasında CypD proteinin p53 proteinine bağladığı ve böylece MPTP'nin açılmasını regüle ettiği kanıtlanmıştır (34, 35).

2.3. Siklosporin A

2.3.1. Genel Bilgi ve Etki Mekanizması

Cyclosporin A (CsA), 111 amino asidlik lipofilik siklik peptid olup 1202 kDa ağırlığındadır (36). Bu ilaç, özellikle organ ve doku transplantasyonlarında, karaciğer, pankreas, kalp, kemik iliği, böbrek ve kalp-akciğer nakillerinden sonra

doku reddinin önlenmesinde kullanılır. İlk olarak 1970 yılında antifungal antibiyotiklerin araştırılması sırasında keşfedilmiştir (36). *Tolypocladium inflatum* isimli bir mantardan izole edilen nötral ve lipofilik metabolitler incelenirken, bu metabolitlerden iki tanesinin (CsA ve CsB) ortalama bir anti-fungal etkisinin olduğu lakin somatik hücre çoğalmasını engellemeden spesifik olarak T-lenfosit çoğalmasını inhibe ederek oldukça yeni bir mekanizma ile immunosupresyonu sağladığı gözlemlenmiştir. CsB'ye kıyasla daha büyük etkisinin olduğu görünen CsA'nın organ transplantasyonlarında doku reddini önlemek amacıyla klinikte kullanılması 1983 yılında FDA tarafından onaylanmıştır (37). Kullanıldığı uzun süreler içinde bu ilacın gözlenen en önemli doz sınırlayıcı yan etkisi karaciğer, böbrek ve kalpte oluşturduğu toksisitesidir (36, 37).



Şekil 6: Siklosporin A Moleküler Yapısı (36)

2.3.2. Siklosporin A ve Nekroz

Mitokondriyel transfer poru, nekroz sırasında açılarak mitokondrinin içine sitoplazmada bulunan su ve çözünmüş maddelerin geçmesini sağlayarak, hücreyi nekroza hazırlar (38). Daha önce de bahsedildiği gibi bu porun açılmasında regülator olarak görev alan proteinlerden birisi CypD proteinidir.1988 yılında Crampton ve ark.'ın yaptığı çalışmalarda, CsA'nın MPTP açılmasının potent

inhibitörü olduğu ve bu aktiviteyi CypD molekülüne bağlanarak gerçekleştirdiği gösterilmiştir. CsA verilen ratların tıpkı CypD-knockout farelerede olduğu gibi kalsiyum ve oksidatif stres ile indüklenmiş nekroza karşı oldukça dirençli olduğu görülmüştür (38). Bu çalışmalar temel alınarak yapılan diğer çalışmalarda, CsA'nın nekroza karşı kalp dokusu başta olmak üzere birçok dokuda protektif olarak kullanılabileceği ispatlanmıştır (38, 39).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ:

3.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

- Biopac MP30 Amplifikatör (Dört kanalda birçok parametrenin kayıt ve analizini yapar).
- MAY WBC30-440C Organ Banyosu için su sirkülatör cihazı
- MAY FDT-10A Force Displacement Transducer cihazı
- Langendorff Sistemi (MAY 0702)
- Hassas Terazi (Sartorius BP 1215)
- Santrifüj Cihazı (Janetzki T5)
- Magna Lyser Homojenizatör (Roche)
- Mikro-Santrifüj Cihazı (Thermo)
- Vortex (Thermo)
- Multiskan UV Absorbans Cihazı (Thermo)
- Isıl Döngüleyici (Thermo)
- Light Cycler 480 Real Time PCR Cihazı (Roche)
- Pipet Seti (Ependrof)
- Cerrahi alet seti
- Bilgisayar

3.1.2. Kullanılan Deney Hayvanları

Çalışmada 09/04/2014 tarihli etik onayı ile Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi (DÜSAM) den temin edilen 30 adet Sprague-Dawley erkek rat kullanıldı. Çalışma süresince 'Hayvan Haklarının Korunması' hususundaki esaslara özenle uyuldu.

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Doksorubisin Hydrochloride (Sigma Aldrich)
- Siklosporin A (Sigma)
- Ketamin HCL (Ketalar 50 mg/ml,10ml flakon, Pfizer)
- Ksilazin (Rompun %2, Bayer)
- Heparin (Liquemine flakon 25.000 IU, Roche)
- Krebs-Henseleit Solüsyonu(Tablo 2)
- RNA High Pure Doku İzolasyon Kiti (Roche)
- Magna Lyser Green Beads Homojenizatör Boncukları (Roche)
- Transcriptor First Strand cDNA Sentez Kiti (Roche)
- Fast Start Essential Probe Master Real Time PCR Kiti (Roche)
- Real Time Ready Catalog Assay Kitleri (B-actin ve p53 genleri için)(Roche)
- Saf etanol
- Ultrapür su

Tablo 2: Krebs-Henseleit Solüsyonu

NACl	6,9 gr/L
NAHCO3	2,1 g/L
KCl	0,35 g/L
CaCl2	0,28 g/L
MgCl2	0,11 g/L
Na2HPO4	0,12g/L
Glukoz	2 g/L

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Farmakolojik İnceleme

Çalışmamızda bütün gruplara anastezi oluşturmak amacıyla 100 mg/kg Ketamin +15 mg/kg Ksilazin i.m. olarak uygulandı. Anestezi altında ve cerrahi işlemler sırasında oluşabilecek bir koagülasyonu önlemek amacı ile femoral venden 500 IU/kg heparin uygulandı. Daha sonra ratlarda sağ sternotomi ile toraks açıldı, kalpte herhangi bir mekanik hasar oluşturmamaya özen göstererek assendan aort ve diğer damarlar kesilerek kalp izole edildi. Buzlu krebs solüsyonu içerisine bırakılan ve kısa bir kanül ile aortadan kanüle edilen kalpler Langendorff sistemine takıldı (Şekil 7, 8).

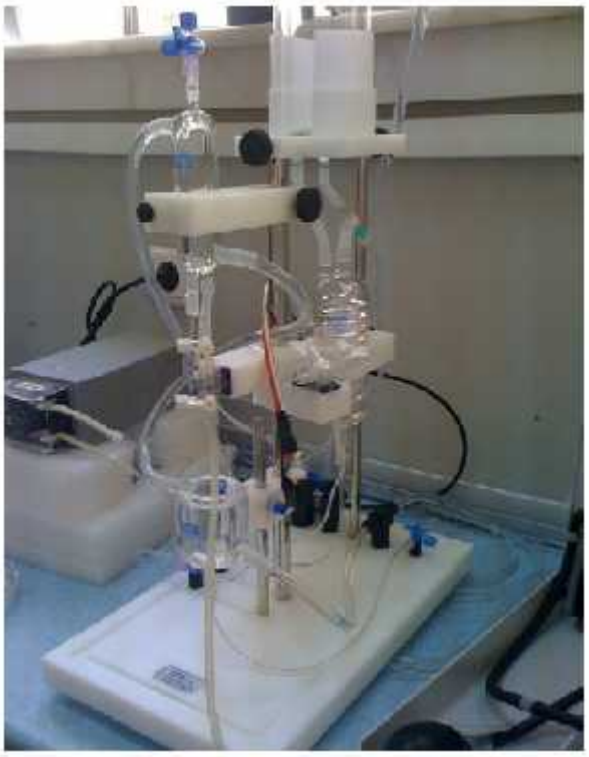
Krebs solüsyonu ile (%5 CO_2 ve % 95 O_2 karşımı ile havalandırılan) sabit akımla koroner perfüzyon sağlanarak peristaltik pompa yardımı ile perfüzyon yapıldı. Kalpte koroner perfüzyon basıncı (PP) aortik infüzyon kanülüne bağlı olan basınç transdüseri ile ölçüldü. Bir polietilen katetere bağlanan lateks balon sol atriumda mitral kapaktan sol ventrikül içine yerleştirildi. Diğer ucunda ikinci bir basınç transdüseri bulunan kateter distile su ile doldurularak ve kateter ucundaki lateks balon periyodik olarak

distile su ile şişirilerek 5-6 mmHg'lık basınç oluşturuldu. Maksimum kardiyak fonksiyon değerlerine ulaşmak için gerekli olan 30-45 dakikalık stabilizasyon süresinden sonra lateks balonun bulunduğu sol ventrikülde, Sol Ventrikül Gelişen Basıncı(Left Ventricular Developed Pressure)(LVDP)ölçüldü. Ayrıca kalbin kontraksiyon gösteren sol ventrikül sistolik basınç yükselme hızını ve sol ventrikül diyastolik basınç gevşeme hızını ifade eden LV(dP/dt)max ve LV(dP/dt)min kaydedildi.

Bunların yanı sıra kalplere takılan elektrotlar yardımı ile kalbin dakikadaki atım sayısı olan kalp atım hızı (KAH) kaydedildi. Bütün gruplarda elde edilen verilen, Biopac MP 30 Amplifikatör ile bilgisayar ortamında kayıt altına alındı.



Şekil 7: Langendorff Sistemi



Şekil 8: Langendorff Sistemi

3.2.2. Moleküler İnceleme

Çalışmamızda bulunan bütün gruplardan elde edilen doku örnekleri, moleküler olarak incelenmek üzere parafinin içinde ve -80^{o}C'de saklandı. Çalışma sırasında örnekler hassas terazi ile 40-50 mg arasında tartıldı ve içerisinde Magna Lyser Green Beads

(Roche) bulunan tüplere konuldu. Daha sonra tüplere High Pure RNA doku izolasyon kitinin (Roche) içerisinde bulunan lysis/binding bufferdan 500 ul eklendi. Magna Lyser cihazında 7000 devirde 70 saniye döndürüldükten sonra ivedilikle soğuk çelik bloğun üzerine alındı. Yaklaşık bir saat bekletildikten sonra homojenatın hepsi yeni bir ependrofa aktarıldı ve üzerine homojenatın yarısı kadar (yaklaşık 250 ul) saf etanol eklendi. Daha sonra bu karışım vortekslendi ve kolonlu ependrof tüplere aktarıldı. Bundan sonraki işlemler High Pure RNA doku izolasyon kitinin prosedürüne uygun olarak yapıldı ve MultiScan UV Absorbans cihazı (Thermo) ile 260 nm dalgaboyunda total RNA miktarları tespit edildi.

Elde edilen total RNA'lardan cDNA yapmak amacıyla Transcriptor First Strand DNA sentez kiti (Roche) kullanıldı. Bütün işlemler kitin prosedürüne uygun olarak yapıldıktan sonra; ısıl döngüleyici (Thermo) kullanılarak 10 dk 25 ^{o}C; 60 dk 55 ^{o}C; ve 5 dk 85 ^{o}C profilinde çalıştırıldı ve elde edilen cDNA'lar bir sonraki işleme kadar -20 ^{o}C 'de bekletildi.

Bir önceki işlemde elde edilen cDNA'ler çözündükten sonra 1/5 oranında seyreltildi. Fast Start Essential Probe Real Time PCR Master kiti (Roche) prosedüre uygun bir biçimde kullanılarak master mix solüsyonları actb ve p53 genleri için ayrı ayrı hazırlandı ve real time PCR plate kuyucuklarına yüklendi. Daha sonra 5 ul seyreltilmiş örnek alınarak kuyucuklara eklendi ve hazırlanan plate Light Cycler 480 cihazına konularak real time PCR işlemi için göreceli kuantifikasyon modunda ve belirlenen profilde; Denetürasyon:95 ^{o}C'de 10 dk'ya 1 döngü olarak; Amplifikasyon:95 ^{o}C'de 5 sn; 54 ^{o}C'de 20 sn; 72 ^{o}C'de 1 sn; 55 döngü olarak; Soğuma: 40 ^{o}C'de 30 saniye 1 döngü olarak ayarlandı ve cihaz çalıştırıldı.

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmamızda elde edilen veriler aritmetik ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. İstatistiksel analizler SPSS 11.0 (Chicago, ill., USA) programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası karşılaştırma tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc Tukey testi kullanılarak yapıldı. Tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

4.BULGULAR

Bütün gruplarda (n=8) istatistiki sonuçlar aritmetik ortalama±standart sapma olarak hesaplanmış ve Tablo 3'de toplu olarak gösterilmiştir. Gruplara ait koroner perfüzyon basıncı, kalp atım hızı, LVDP, LV(dP/dt)max ve LV(dP/dt)min değerleri Şekil (9,10,11,12, 13)'de gösterilmiştir**.**

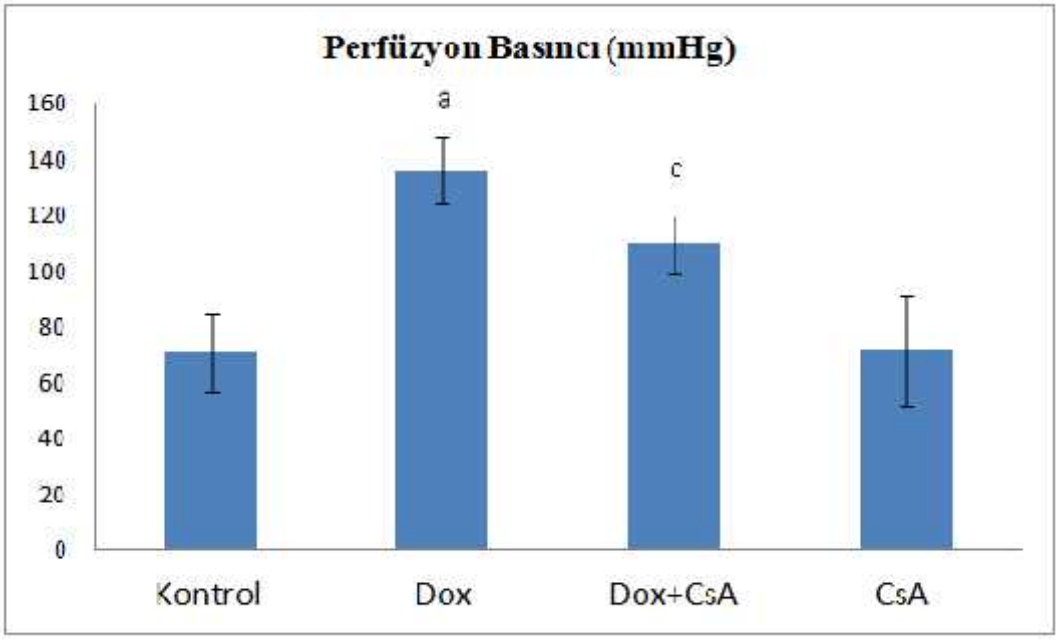
Tablo 3: Gruplara (n=8) ait kalp hızı, perfüzyon basıncı, LVDP, LV(dP/dt)max ve LV(dp/dt)min verileri. (Sonuçlar aritmetik ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. PP: Perfüzyon basıncı, LVDP: Sol ventrikül gelişen basıncı, LV (dP/dt) max: Sol ventrikül sistolik basınç yükselme hızı, LV (dp/dt) min: Sol ventrikül diyastolik basınç gevşeme hızı. CsA: Siklosporin A. [a] $p<0.001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, [b] $p<0.05$ Dox grubu ile karşılaştırıldığında, [c] $p<0.01$ Dox grubu ile karşılaştırıldığında, [d] $p<0.001$ Dox grubu ile karşılaştırıldığında)

	Kontrol (n=8)	**Dox (n=8)**	**Dox+CsA (n=8)**	**CsA (n=8)**
Kalp hızı (atım/dk)	269,88±23,97	182,12±22,83[a]	222,38±31,02[b]	279,50±17,74
PP (mmHg)	70,66±13,93	136,10±11,81[a]	109,40±10,87[c]	71,30±19,78
LVDP (mmHg)	83,96±10,39	48,81±6,06[a]	62,75±8,83[b]	84,31±10,10
LV(dP/dt) max (mmHg/sn)	1294,9±116,32	734,12±124,19[a]	881,25±85,28[b]	1312,6±72,85
LV(dP/dt) min (mmHg/sn)	1200,2±64,26	711,12±132,97[a]	898,12±123,11[b]	1131,0±122,83
P53 (% Actb)	5,02±1,18	40,42±6,0[a]	17,56±8,45[d]	6,12±1,81

4.1. Farmakoloik Bulgular

Çalışmamızdaki bütün gruplarda ölçtüğümüz koroner perfüzyon basıncı ve LVDP değerleri mmHg cinsinden; kalp atım hızı atım/dk, $LV(dP/dt)_{max}$ ve $LV(dP/dt)_{min}$ değerleri ise mmHg/sn olarak hesaplanmıştır.

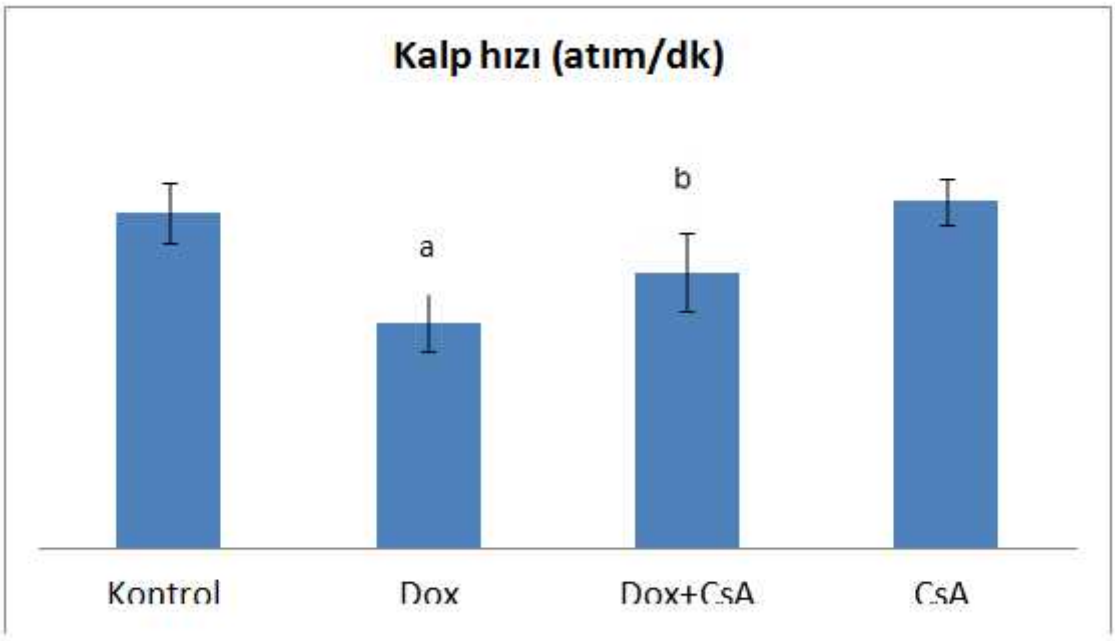
Deney gruplarımızda tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc Tukey testi kullanılarak ikili karşılaştırma yapıldığında; koroner perfüzyon basınçlarının Dox grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı görüldü ($p<0.001$). Artan koroner perfüzyon basıncının Dox+CsA grubunda Dox grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir ($p<0.01$). Tek başına CsA verilen grupta kontrol grubuna göre koroner perfüzyon basınçlarında anlamlı bir fark görülmemiştir.(Şekil 9)



Şekil 9: Bütün gruplarda, Perfüzyon basıncı (mmHg) (n= 8) (^{a} $p<0.001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ^{c} $p<0.01$ Dox grubu ile karşılaştırıldığında**)**

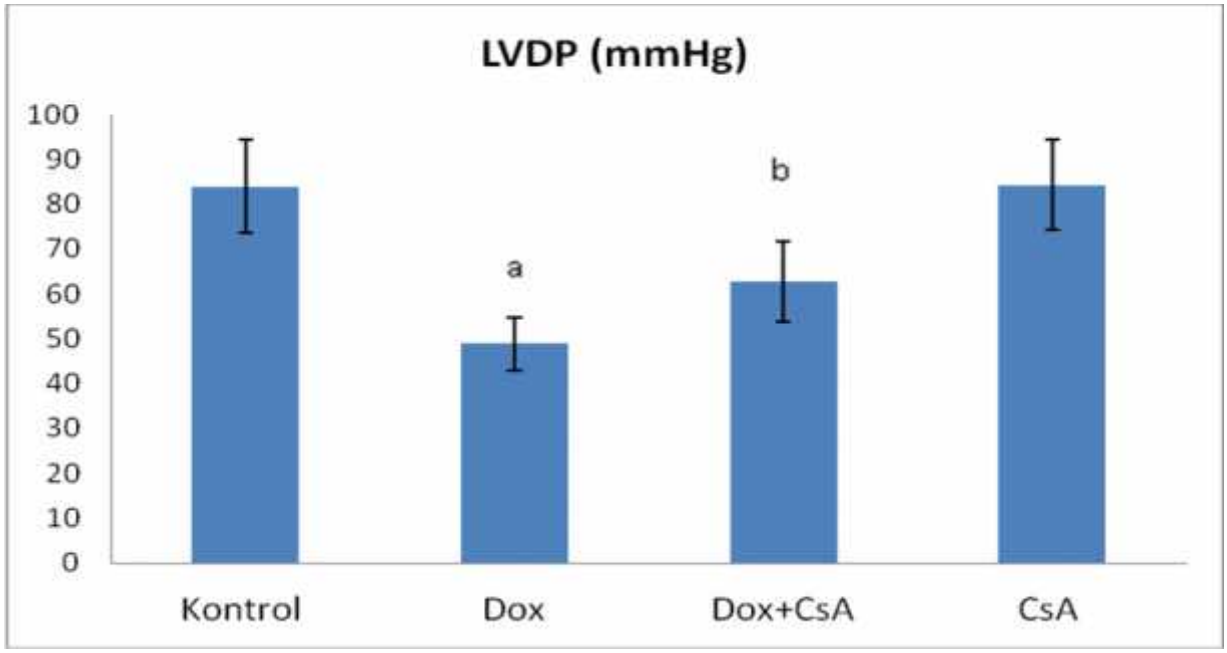
Kalp atım hızlarının; Dox grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalırken ($p<0.001$), Dox+CsA grubunda Dox ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttığı

gözlenmiştir (p<0.01). Tek başına CsA verilen grupta ise kontrol grubuna göre fark gözlenmemiştir (Şekil 10).



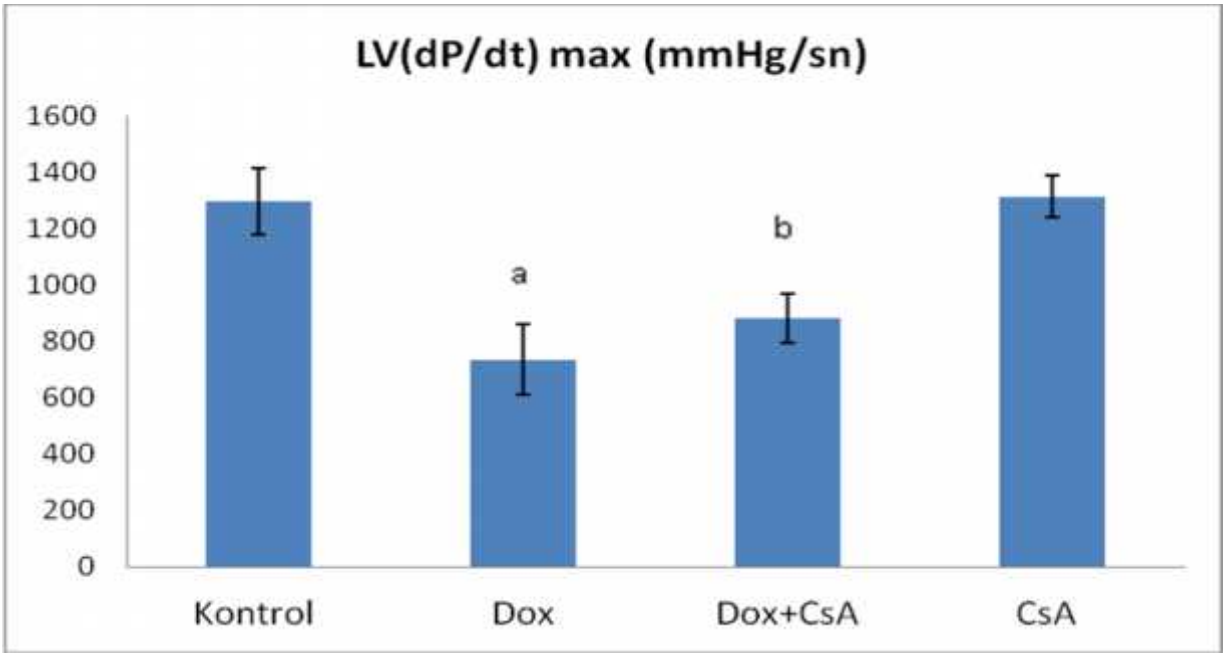
Şekil 10: Bütün gruplarda, Kalp Atım Hızı (atım/dk) (n=8) ([a] p<0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, [b] p<0.05 Dox grubu ile karşılaştırıldığında**)**

LVDP yanıtlarına bakıldığında, Dox grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür (p< 0.001). Dox grubundaki bu azalmanın Dox+CsA grubunda anlamlı olarak arttığı görüldü (p< 0.05). Tek başına CsA verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir fark görülmemiştir. (Şekil 11)



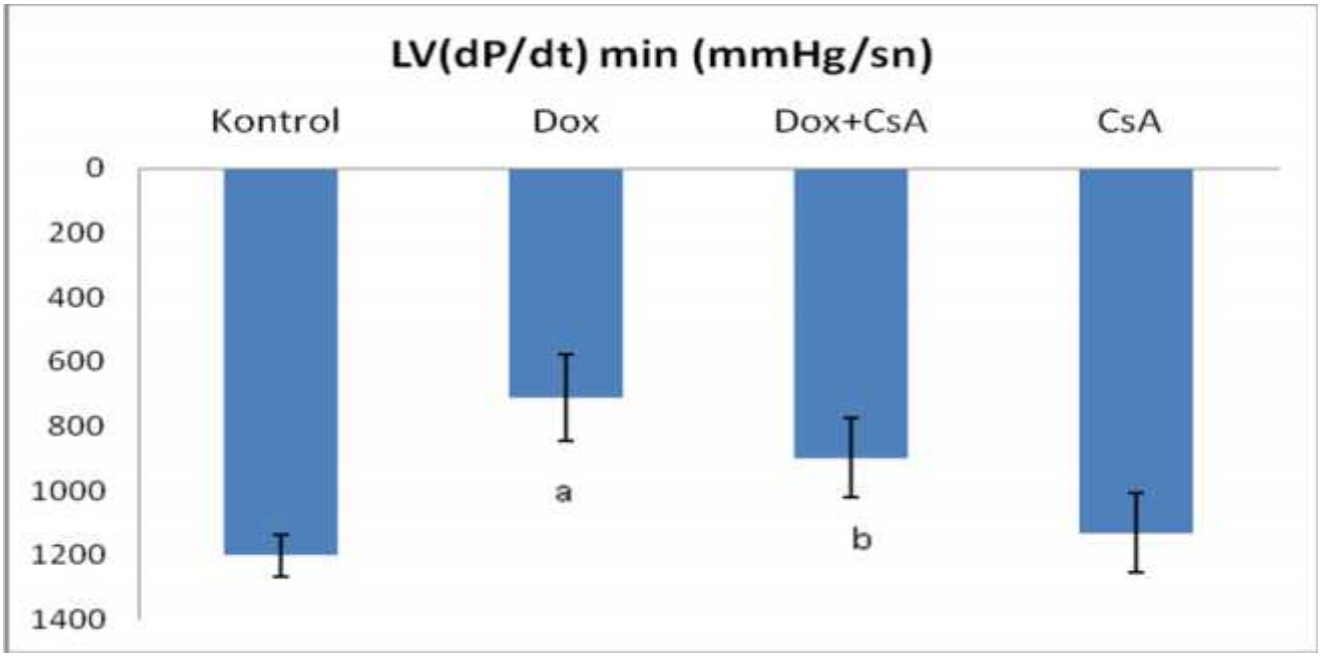
Şekil 11: Bütün gruplarda, Sol Ventrikül Gelişen Basıncı (mmHg) (n=8) ([a] $p<0.001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, [b]$p<0.05$ Dox grubu ile karşılaştırıldığında **)**

LV(dP/dt)max yanıtlarına bakıldığında, Dox grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu ($p< 0.001$) gözlenmiştir. Dox grubundaki bu azalmanın Dox+CsA grubunda anlaml olarak arttığı görülmüştür ($p< 0.05$). LVDP yanıtlarına benzer olarak tek başına CsA verilen grupta kontrol grubuna göre anlaml bir fark görülmemiştir (Şekil 12).



Şekil 12: Bütün gruplarda ölçülen sol ventrikül sistolik basınç yükselme hızı (mmHg/sn) (n=8) ([a] $p<0.001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, [b]$p<0.05$ Dox grubu ile karşılaştırıldığında)

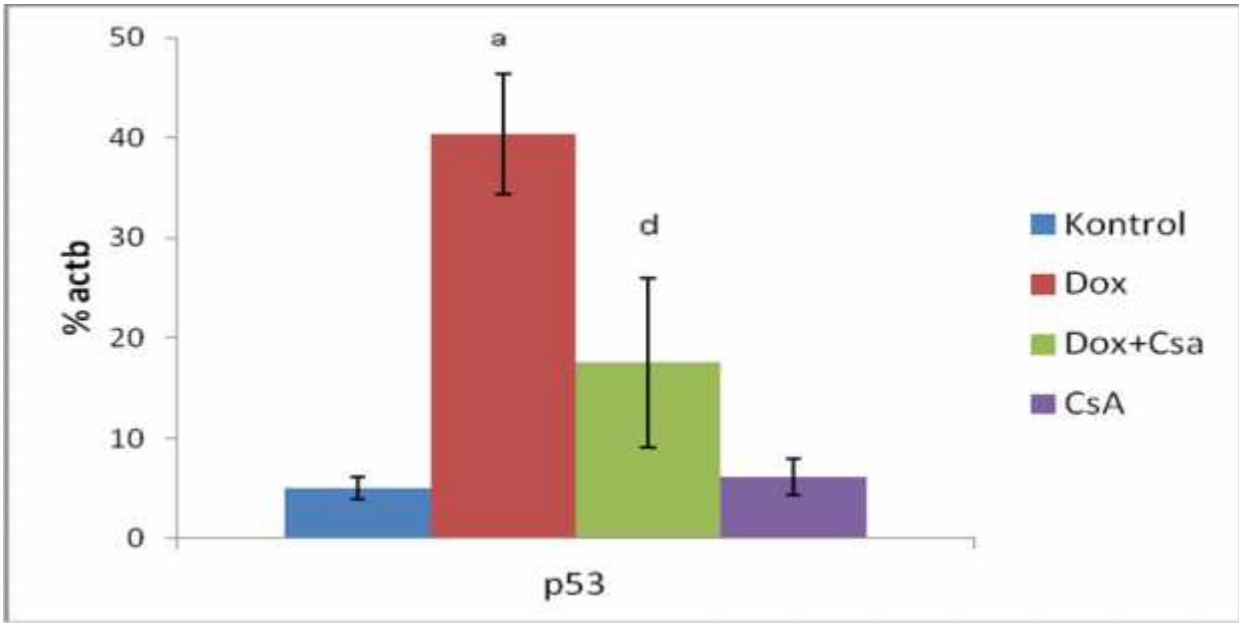
LV(dP/dt)min yanıtlarına bakıldığında, Dox grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu ($p< 0.001$) gözlenmiştir. Dox grubundaki bu artışın Dox+CsA grubunda anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($p< 0.001$) (Şekil 13).



Şekil 13: Bütün gruplarda ölçülen sol ventrikül diyastolik basınç gevşeme hızı (mmHg/sn) (n=8) ([a] p<0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, [b]p<0.05 Dox grubu ile karşılaştırıldığında**)**

4.2. Moleküler Bulgular

Light Cycler 480 cihazı ile yapıla Real Time PCR analizinin gruplar arası sonuçları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc Tukey testi kullanılarak yapıldı. p53 geninin b-actb genine göre ekspresyon seviyesi, Dox grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken ($p< 0.001$); Dox+CsA grubunda Dox ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir ($p< 0.01$). Tek başına CsA verilen grupta ise kontrol ve Dox grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir. (Şekil 14)



Şekil 14: p53 geninin aktin genine göre ekspresyon seviyesi (n=8) ([a] p<0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, [d] p<0.001 Dox grubu ile karşılaştırıldığında)

5.TARTIŞMA

Bu çalışmada ratlara doksorubisin verilerek kardiotoksik etki oluşturulmuştur. Birçok hematolojik malignitelerde ve solid tümörlerin tedavisinde geniş kullanıma sahip olan doksorubisin gibi antrasiklin türevlerinin miyokardda belirgin toksisiteye yol açtıkları bilinmektedir (40, 41). Oluşan bu toksik etkiler oldukça önemli bir sorun teşkil etmekte, zira yaşam kalitesini önemli ölçüde düşürürken bazen ölümlere neden olabilmektedir. Bu nedenle antrasiklinler ile tedavide kardiyotoksik etkilerini azaltmak amacı ile çhalen değişik yöntemler denenmektedir. İlacın maksimum kümülatif dozunun azaltılması şeklinde bir yaklaşım, terapötik etkilerinin de azalmasına yol açacağından, kardiotoksik etkiyi azaltacak yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (40, 41).

Son yıllarda yapılan çalışmalar bu ilacın özellikle hücreler üzerinde oluşturduğu moleküler toksisite mekanizmasını anlamaya yöneliktir. Doksorubisin ve metabolitlerine bağlı kardiyotoksik etkinin hücrelerde yarattığı değişikliklerin en önemli ortak sonucunun fazla miktarda ROS açığa çıkarması olduğu ispatlanmıştır(38). Doksorubisin ile indüklenmiş kardiyotoksisiteyi önlemek için yapılan çalışmalarda ROS'ların özellikle hücre ve dokulardan temizlenmesi hedeflenmiştir. Ahmed ve ark.'ının 2005 yılında yaptığı çalışmada, melatoninin kardiyoprotektif etkisine kardiyak dokudaki ROS miktarının azaltılmasıyla ulaşıldığı bildirilmiştir (42). 2014 yılında yayınlanan bir çalışmada ise aynı amaca quercetin kullanılarak ulaşılmıştır (43). Hücrelerde artan ROS miktarı, hücre ölüm yolaklarını aktif hale getirmekte ve bu artış özellikle nekroz mekanizmasındaki MPTP'lerin açılmasında etkili olduğu düşünülmektedir (30, 38). MPTP'nin, mitokondri dış zarı üzerinde bulunan ve boyutu 1.5 kDa'ndan düşük moleküllerin sitoplazmadan mitokondri içerisine geçmesine izin veren bir por olduğu ve artan kalsiyum, ROS, fosfat konsantrasyonları ile adenin nükleotitlerinin tükenmesinin bu porun açılmasını indüklediği bildirilmiştir (30, 38). MPTP'nin moleküler yapısı ve açılma prensibi henüz bütünüyle aydınlatılamamıştır; ancak özellikle artan oksidatif stres durumunda bu porun açılmasını regüle ettiği ispatlanan yegane molekülün CypD olduğu gösterilmiştir (42). Bir matriks peptidyl-prolyl cis-trans izomeraz (PPIase) enzimi olan ve nekroz sinyal yolağında oldukça önemli bir rolü olan bu protein, özellikle nekrozun inhibisyonu için yapılan çalışmalarda genellikle hedef protein olmuştur (42). Ancak bu proteinin inhibisyonu nekrozu tamamıyla önlemez; sadece hücrelere nekroza karşı direnç kazandırdığı bilinmektedir. (38, 42).

p53 proteininin, 17. kromozomda bulunan TP53 geni tarafından kodlandığı ve özellikle DNA hasarı, oksidatif stres ve iskemik hasara karşı ivedelikle hücresel yanıt oluşmasını

sağlayan bir hücresel stres sensörü olduğu bilinmektedir (32). Bu proteininin, apoptosis sinyal yolağında görev aldığı ve mitokondri dış zarının permeabilizasyonunu sağlayarak, apoptotik proteinlerin mitokondriden sitoplazmaya geçişine sebep olarak apoptosisi indüklediği bildirilmiştir (32). Apoptosise ek olarak, nekroz mekanizmasında da görev aldığı, beyin iskemisi üzerinde Vaseva ve arkadaşları (2012) ve akciğer kanseri üzerinde Lu ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (34, 35). Doksorubisine bağlı nekrotik hasar mekanizmasında da rolünün olduğu düşünülmektedir. p53 proteininin, özellikle oksidatif stres kaynaklı MPTP açılmasında regülatör olarak görev alan CypD'ye bağlanarak porun açılmasını yönettiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (35).

Doku ve organ transplantasyonlarında doku reddini önlemek amacıyla kullanılan immunosupresant bir ilaç olan CsA'nın son yıllarda yapılan çalışmalar ile yeni bir terapötik alanının olduğu keşfedilmiştir (36). Vaseva ve ark. beyin iskemik hasarındaki nekroz mekanizmasının ve CypD proteininin çalışmasını önlemek için CsA kullanıp, nekrotik hasarın azaltılmış olduğu bildirilmiştir (34). 2013 yılında yapılan başka bir çalışmada ise, CsA'yı CypD inhibitörü olarak akciğer kanser hücrelerinde kullanmış ve böylece apoptotik olmayan hücre ölümü sayısının azaldığı gösterilmiştir (35). Kalpte yapılan bir çalışmada ise, hem iskemi reperfüzyon hasarı hem Dox hasarı oluşturulup, CsA'nın hücre ve doku ölümüne karşı protektif etkisi gözlemlenmiştir (45). Singh ve ark. 2005 yılında rat böbreğinde oluşan iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olarak CsA kullanılabileceğini kanıtlamışlardır (46). Karaciğerde thioacetamid hasarına karşı CsA"nın protektif etkisi ise Fan ve ark.'nın yaptıkları çalışma ile kanıtlanmıştır (47). CsA'nın, nekroz mekanizmasında MPTP'nin açılmasını regüle eden CypD proteinine bağlanarak, bu proteinin çalışmasını engelleyen dolayısıyla da nekrozu inhibe ettiği bildirilmiştir (34, 35). Ancak daha önce de bahsedildiği gibi CypD'nin tamamıyla inhibe edilmesi, hücrenin nekroza girmesini tam anlamıyla engellemediği; sadece hücreye nekroza karşı direnç kazandırdığı görülmüştür. Yani CsA'nın da nekroz mekanizmasında yaptığı iş CypD'nin çalışmasını engelleyerek hücrelere nekroza karşı direnç kazandırmaktır. Bu nedenden ötürü CsA dokulardaki nekrotik hasara karşı protektif olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (47).

Doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin moleküler mekanizmasını anlamak, yeni terapötik yaklaşımların keşfedilmesi açısından oldukça önemlidir. Bu kardiyotoksisiteye bağlı olarak oluşan nekroz sırasında p53 proteininin rolü bu açıdan önemli bir soru işaretidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu proteininin nekroz mekanizmasında görevli olup olmadığı ve görevinin ne olduğu araştırılmıştır (34, 35). p53 proteininin doksorubisin kardiyotoksitesindeki

rolü yapılan bu çalışmalara ek olarak tarafımızca da araştırılmıştır. Ayrıca son yıllarda bu antrasiklinlerin kardiyoprotektif etkili ilaçlar ile kombine edilerek tedavide kullanılması oldukça rağbet gören bir yöntem olmuştur (45, 46). Çalışmamızda doksorubisin ile oluşturduğumuz kardiotoksisiteye karşı kardiyoprotektif olarak CsA'nın etkisini ve bu koruyucu etki sırasında da p53 geninin ekspresyon seviyesi araştırılmıştır.

Yaptığımız çalışmalar sonucunda p53 geninin ekspresyon seviyesinin tıpkı Lu ve arkadaşlarının çalışmasındaki gibi Dox grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde arttığı görülmüştür (35). Dox+CsA verilen grupta ise bu kez anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ile p53'ün nekroz mekanizmasında literatür ile uyumlu bir şekilde rol oynadığı gösterilmiştir (34, 35). Ayrıca yapılan farmakolojik deneylerde de , Dox+CsA grubunda Dox grubuna göre koroner perfüzyon basıncının ve LV(dp/dt)min değerlerinin anlamlı olarak azaldığı; kalp atım hızı, LVDP ve LV(dp/dt)max değerlerinde ise anlamlı bir artışın olduğu görülmüştür (39). Literatür ile uyumlu olan bu sonuçlar ile, CsA'nın doxorubisin kardiyotoksisitesi üzerine protektif etkisinin olduğunu gösterilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, geniş kullanıma sahip bir antineoplastik ilaç olan doksorubisin ile deneysel kardiyotoksisite mekanizması oluşturulmuştur ve nekroz inhibitörü olan CsA'nın bu toksik etki üzerindeki protektif rolü incelenmiştir. Ayrıca bu toksik etki ile oluşan nekroz mekanizmasında p53 proteininin rolü araştırılmıştır.

Farmakolojik deneyler sonucunda, tek doz Dox (10 mg/kg) verilen grupta kontrol grubuna göre koroner perfüzyon basıncının ve LV(dP/dt)min değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olarak arttığı ($p<0.001$); KAH, LVDP ve LV(dp/dt)max değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı olarak azaldığı ($p<0.05$) görülmüştür. Buna karşılık Dox+CsA grubunda Dox grubuna göre koroner perfüzyon basıncının ve LV(dp/dt)min değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olarak azaldığı ($p<0.05$); KAH, LVDP ve LV(dp/dt)max değerlerinde ise istatistiksel olarak anlamlı olarak arttığı ($p<0.001$) görülmüştür.

Moleküler deneyler sonucunda ise, p53 geninin ekspresyonunun doxorubisine bağlı kardiyotoksisitede istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde arttığı gözlenmiştir. Buna ek olarak, nekroz mekanizmasındaki CypD proteinine bağlanarak onu inhibe eden CsA, Dox ile beraber rata verildiği zaman oluşan kardiyotoksik hasarın istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde azaldığı görülmüştür. p53 geninin ekspresyonun da CsA verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde azaldığı gözlenmiştir.

Bu bulgulara göre, doksorubisin kardiyotoksisitesine bağlı oluşan nekrotik hasarda CsA'nın koruyucu etkisinin olduğu görülmüştür ve bu toksisteyi önlemek için p53 geninin ekspresyon seviyesini azaltmayı hedef alan yeni terapötik tedavilerin denenmesi klinik kullanım açısından daha yararlı sonuçlar oluşturabilecektir. Sonuç olarak yine bu hasarı engellemek için, doksorubisin ile yapılan tedavilere CsA eklenmesinin de klinik kullanım açısından yararlı olabilecektir.

7. KAYNAKLAR

1. Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. Mol Cell Biochem. 2000;207:77-85.
2. Kayaalp SO, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Cilt I, IX. Baskı, Hacettepe-TAŞ, 2002:394-5.
3. Chabner BA, Myers CE, Coleman N, Johns DG. The clinical pharmacology of antineoplastic agents (second of two parts). New Eng J Med. 1975;292:1159-68.
4. Volkova, M., & Russell, R. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Current Cardiology Reviews*, 2011; *7*(4), 214–20.
5. Aubel-Sadron G, Londos-Gagliardi D. Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. Biochimie. 1984;66:333-52.
6. Lipshultz SE, Alvarez JA, Scully RE. Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. Heart. 2008;94:525-33.
7. Bolis FM, Holcenberg JS, Poplack DG. General Principles of Chemotherapy. In: Pizzo PA, Poplack DG (eds) Principle and Practice Pediatric Oncology. J.B. Lippincott Company, USA, 1989:186-9.
8. Muggia FM, Green MD. New anthracycline antitumor antibiotics. Crit Rev Oncol Hematol. 1991;11:43-64.
9. Hideg K, Kálai T. Novel antioxidants in anthracycline cardiotoxicity. Cardiovasc Toxicol. 2007;7:160-4.
10. Lipshultz SE, Cohen H, Colan SD, Herman EH. The relevance of information generated by in vitro experimental models to clinical doxorubicin cardiotoxicity. Leuk Lymphoma. 2006;47:1454-8.
11. Robert J, Gianni L,. Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. Cancer Surveys. 1993;17:219-52.
12. Woo MH, Evans WE, Relling MV. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. In: Pui C-H (ed), Childhood Leukemias, Cambridge University 1999:275-6.
13. Bolis FM, Holcenberg JS, Poplack DG. General Principles of Chemotherapy. In: Pizzo PA, Poplack DG (eds) Principle and Practice Pediatric Oncology. J.B. Lippincott Company, USA, 2001:186-9.
14. Schimmel KJM, Richel DJ, van den Brink RBA, Guchelaa HJ. Complications of treatment cardiotoxicity of cytotoxic drugs. Cancer Treat Rev. 2004;30:181-191.
15. Venkatesan N, Punithavathi D, Arumugam V. Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats. Br J Pharmacol. 2000;129:231-4.
16. 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.
17. Ferrans VJ. Anthracycline cardiotoxicity. Adv Exp Med Biol. 1983;161:519-32.

18. Lipshultz SE, Cohen H, Colan SD, Herman EH. The relevance of information generated by in vitro experimental models to clinical doxorubicin cardiotoxicity. Leuk Lymphoma. 2006;47:1454-8.
19. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. Prog Cardiovasc Dis. 2007;49:330-52.
20. Belham M, Kruger A, Mepham S, Faganello G, Pritchard G. Monitoring left ventricular function in adults receiving anthracycline-containing chemotherapy. Eur J Heart Fail. 2007;9:409-14.
21. Menna P, Salvatorelli E, Minotti G. Cardiotoxicity of antitumor drugs. Chem Res Toxicol. 2008;21:978-89.
22. Gutteridge JM. Anthracycline toxicity, iron and oxygen radicals and chelation therapy. J Lab Clin Med. 1993;122:228-9.
23. Basser RL, Green MD. Strategies for prevention of anthracycline cardiotoxicity. Cancer Treat Rev. 1993;19:57-77.
24. Corna G, Santambrogio P, Minotti M, Cairo G. Doxorubicin paradoxically protects cardiomyocytes against iron-mediated toxicity: role of reactive oxygen species and ferritin. J Biol Chem. 2004;279:13738-45.
25. Whelan, R. S., Kaplinskiy, V., & Kitsis, R. N. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annual Review of Physiology*, 2010; *72*, 19–44.
26. Chiong, M., Wang, Z. V, Pedrozo, Z., Cao, D. J., Troncoso, R., Ibacache, M., … Lavandero, S. Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death & Disease*, 2010; *2*(12), e244.
27. Koshinuma, S., Miyamae, M., Kaneda, K., Kotani, J., & Figueredo, V. M. Combination of necroptosis and apoptosis inhibition enhances cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Journal of Anesthesia*. 2013; 52, 107-9
28. Kung, G., Konstantinidis, K., & Kitsis, R. N.. Programmed necrosis, not apoptosis, in the heart. *Circulation Research*, 2011; *108*(8), 1017–36.
29. Baines, C. P. The mitochondrial permeability transition pore and the cardiac necrotic program. *Pediatric Cardiology*, 2011; *32*(3), 258–62.
30. Halestrap, A. P., & Richardson, A. P. The mitochondrial permeability transition: A current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2015; *78C*, 129–141.
31. Zirngibl, K., & Moll, U. M. P53 Further Extends Its Reach. *Oncoimmunology*, 2013; *2*(5), e24959.
32. Green, D. R., & Kroemer, G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*, 2009; *458*(7242), 1127–30.
33. Vaseva, A. V, & Moll, U. M.. The mitochondrial p53 pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009; *1787*(5), 414–20.
34. Vaseva, A. V, Marchenko, N. D., Ji, K., Tsirka, S. E., Holzmann, S., & Moll, U. M. P53

Opens the Mitochondrial Permeability Transition Pore To Trigger Necrosis. *Cell*, 2012; *149*(7), 1536–48.

35. Lu, J. H., Shi, Z. F., & Xu, H. The mitochondrial cyclophilin D/p53 complexation mediates doxorubicin-induced non-apoptotic death of A549 lung cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2014; *389*(1-2), 17–24.
36. Laupacis, a., Keown, P. a., Ulan, R. a., McKenzie, N., & Stiller, C. R. Cyclosporin A: A powerful immunosuppressant. *Canadian Medical Association Journal*, 1982; *126*(9), 1041–1046.
37. Kuruş, M., Eşrefoğlu, M., Şahna, E., Sevđl, S., & Otlu, A. Deneysel Araştırma Siklosporin A ' ya Bağlı Kalp Hasarında Melatoninin Histopatolojik Etkileri Üzerine Deneysel Bir Çalışma, 2008; *13*(1), 9
38. Halestrap, A. P. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochemical Society Transactions*, 2010; *38*(4), 841–60.
39. Duan, X., Ji, B., Yu, K., Liu, J., Hei, F., & Long, C. (2011). Acidic buffer or plus cyclosporine a postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury. *Perfusion*. 2011; 34, 93-95
40. Allen A. The cardiotoxicity of chemotherapeutic drugs. Semin. Oncol. 1992; 19: 529-542.
41. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Giaanni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. Pharmacol Rev 2004; 56: 185-229.
42. Ahmed, H. H., Mannaa, F., Elmegeed, G. A., & Doss, S. H. Cardioprotective activity of melatonin and its novel synthesized derivatives on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2005; *13*, 1847–1857.
43. Dong, Q., Chen, L., Lu, Q., Sharma, S., Li, L., Morimoto, S. and Wang, G. Quercetin attenuates doxorubicin cardiotoxicity by modulating Bmi-1 expression. British Journal of Pharmacology, 2014; 171: 4440–4454.
44. Giorgio, V., Soriano, M. E., Basso, E., Bisetto, E., Lippe, G., Forte, M. a, & Bernardi, P. Cyclophilin D in mitochondrial pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010; *1797*(6-7), 1113–8.
45. Gharanei, M., Hussain, a, Janneh, O., & Maddock, H. L. Doxorubicin induced myocardial injury is exacerbated following ischaemic stress via opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2013; *268*(2), 149–56.
46. Singh, D., Chander, V., & Chopra, K. Cyclosporine protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidneys. *Toxicology*, 2005; *207*(3), 339–47.
47. Fan, S., & Weng, C. F. Co-administration of cyclosporine A alleviates thioacetamide-induced liver injury. *World Journal of Gastroenterology*, 2005; *11*(10), 1411–1419.

8. ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Hatay'ın İskenderun ilçesinde doğdum. İlköğretim ve lise öğrenimimi Hatay'da tamamladım. 2007 yılında İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünü kazandım ve 2012 yılında mezun oldum. 2012 yılında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım. 2013 yılında Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı ile Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ne araştırma görevlisi olarak atandım ve bu nedenle Yüksek Lisans eğitimimi Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda devam ettim ve halen aynı bölümde devam etmekteyim.

Meryem Şeyda KAYA