

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**DOKSORUBİSİN'İN KARDİYOTOKSİK ETKİSİ ÜZERİNDE
NİTRİK OKSİTİN ROLÜ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Ayşenur BAHADIR

Trabzon-2006

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**DOKSORUBİSİN'İN KARDİYOTOKSİK ETKİSİ ÜZERİNDE
NİTRİK OKSİTİN ROLÜ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Ayşenur BAHADIR

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nilgün YARIŞ

Trabzon-2006

İÇİNDEKİLER

	<i>Sayfa No</i>
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Antrasiklinler	3
2.1.1. Antrasiklinlerin antitümör aktivitesi	4
2.1.2. Antrasiklinlerin yan etkileri	4
2.1.3. Antrasiklin tedavisi ile oluşan kardiyotoksisitenin belirlenmesi	7
2.1.4. Doksorubisinin kardiyotoksisite mekanizması	9
2.2. Nitrik Oksit	12
2.2.1. Nitrik oksit oluşumu	12
2.2.2. Nitrik oksitin patofizyolojik olaylardaki etkisi	14
2.2.3. Nitrik oksitin kardiyovasküler sistem üzerine etkisi	15
2.2.4. Doksorubisin kardiyotoksisitesinde nitrik oksitin rolü	16
3. MATERYAL VE METOD	19
4. BULGULAR	24
5. TARTIŞMA	28
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	33
7. ÖZET	35
8. SUMMARY	36
9. KAYNAKLAR	37

1. GİRİŞ

Antrasiklinler oldukça etkili antikanser ilaçlardır. İlk antrasiklinler *Streptomyces peucetius*'tan 1960 yılında izole edilmiş olup doksorubisin ve daunorubisin olarak isimlendirilmiştir. Doksorubisin çocukluk çağı solit tümörleri, yumuşak doku sarkomları, agresif seyirli lenfomalarda ve meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır (1). Çocukluk çağı tümörlerinin tedavisinde kullanılan tedavi protokollerinin %60'ı antrasiklin grubu ilaçları içermektedir (2). Bu grup ilaçların en önemli yan etkisi kardiyotoksisite gelişimidir (1). Günümüzde çocukluk çağı kanserlerinde yaşam oranlarının artması nedeni ile kardiyak toksisite gibi geç yan etkiler daha sık tespit edilebilmektedir.

Antrasiklinlere bağlı gelişen kardiyotoksisite kümülatif doza bağımlıdır. Sonuçta hastalarda geriye dönüşümü olmayan kronik kardiyomiyopati ve konjestif kalp yetmezliği gelişebilmektedir (1-3). Doksorubisine bağlı kardiyotoksisite mekanizması ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Günümüzde en fazla kabul gören görüş doksorubisin metabolizması sırasında açığa çıkan serbest radikallerin miyokard hücrelerini hasara uğratmasıdır (1,4,5). Serbest radikal temizleyicileri kullanılarak kardiyotoksisite riskinin azaltılabileceği gösterilmiştir (6-8).

Nitrik oksit güçlü bir vazodilatör ve miyokard kasılmasında önemli bir mediatör olup kalp yetmezliği, iskemi/perfüzyon hasarı, kardiyomiyopati gibi kalp hastalıklarının patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (9). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda doksorubisin kardiyotoksisitesinde de nitrik oksitin rolü olduğuna dair bulgular elde edilmiştir. Doksorubisinin plazmada ve kardiyak dokuda nitrik oksit sentezini artırdığı gösterilmiştir (10,11). Nitrik oksit artışının indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enzimleri vasıtası ile gerçekleştiği düşünülmektedir (12,13). Doksorubisinin redüksiyonu sonucu meydana gelen serbest radikallerden süper oksit, nitrik oksitle reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturur. Peroksinitrit oldukça güçlü

bir oksidan olup hücre membranlarındaki lipitlerin peroksidasyonuna ve miyokard hasarına neden olmaktadır (4,14-16).

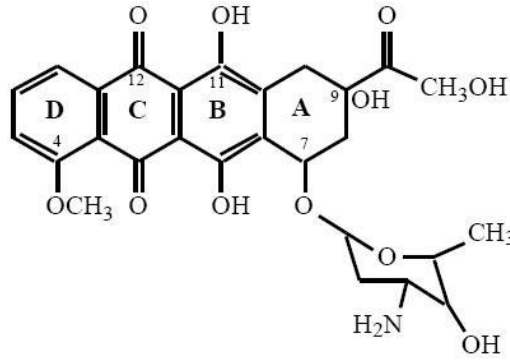
Bu tezde sıçanlarda yapılacak deneysel bir çalışma ile doksorubisine bağı gelişen kardiyotoksisitede nitrik oksitin rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla tek başına ve NOS enzim inhibitörleri ile birlikte doksorubisin uygulandığında sıçan kalbindeki miyokardiyal hasarın derecesi ve lipit peroksidasyon ürünlerinin düzeyi değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Çocukluk çağı kanserlerinin yaşam oranları günümüzde %75-%85'e ulaşmıştır. Bu nedenle çocukluk çağı kanserlerinden kurtulanların prevalansının giderek artması beklenmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2010 yılında, 15-45 yaş grubundaki her 250 kişiden birinin, çocukluk çağı kanserinden kurtulanlar tarafından oluşturulacağı tahmin edilmektedir (17). Çocukluk çağı kanserinden sağ kalanların artan prevalansı, antineoplastik tedavinin geç etkilerinin görülme sıklığını da artırmıştır (18). Bu nedenle günümüzde kanser tedavisine bağlı ortaya çıkan geç yan etkilerin önlenmesi ve tedavisi konusunda yoğun çalışmalar sürmektedir. Antikanser kemoterapiye bağlı geç yan etkilerden biri de kardiyak toksisitedir. Kemoterapötik ajanlar içerisinde kardiyak yan etkileri en bariz olanı antrasiklinlerdir (19).

2.1. Antrasiklinler

Antrasiklinler, pigment üreten *Streptomyces peucetis*'tan 1960 yılında izole edilmiştir. İlk antrasiklinler daunorubisin ve doksorubisin (Dox) olarak isimlendirilmiş, solid ve hemotolojik kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaya başlanılmıştır (1). En sık kullanılan antrasiklin, kinon halkası içeren bir glikozid antibiyotik olan doksorubisindir (Şekil1). Doksorubisin meme kanseri, çocukluk çağı solid tümörleri, yumuşak doku sarkomları ve agresif seyirli lenfomalarda daha fazla etkinlik gösterirken, daunorubisin akut lenfoblastik veya myeloblastik lösemilerde daha etkilidir. Klinikte, epirubisin, idarubisin ve mitaksantron gibi farklı antrasiklin deriveleri de kullanılmaktadır (1).



Şekil 1: Doksorubisin

2.1.1. Antrasiklinlerin antitümör aktivitesi

Antrasiklin antibiyotikler DNA'ya bağlanıp, interkalasyonu önleyerek etkilerini gösterirler. İlacın çoklu halka yapısı, DNA çift heliksinin iki komşu nükleotidi arasına sokularak (interkalasyon) tek ve çift sarmal kırıklarına neden olur. Sonuçta DNA replikasyonu ve transkripsiyonu önlenerek, DNA ve RNA sentezi inhibe edilir (1,6). En önemli antitümöral etki mekanizması budur. Topoizomeraz-II'nin inhibisyonu, apoptozisin indüklenmesi de antrasiklinlerin antitümöral aktivitesine katkıda bulunmaktadır. Serbest radikal ürünlerinin oluşumunun antitümöral etkideki rolü tartışmalıdır (1).

Yapılan birçok çalışmada antrasiklinlerin tümör hücrelerini öldürme mekanizması ile kardiyak hasar mekanizmasının birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir. Kalp dokusunda DNA replikasyonu olmamaktadır, hücreler yenilenmez. DNA'ya bağlanarak antikanser etkinlik gösteren alkilleyici ajanlar, bleomisin, sisplatin ve aktinomisin-D gibi ajanların kardiyomiyopatiye sebep olmadıkları gözlenmiştir (6). Bu iki nokta da antrasiklinin antitümör etkisi ile toksik etkisinin farklı mekanizmalarla gerçekleştiği görüşünü desteklemektedir.

2.1.2. Antrasiklinlerin yan etkileri

Antrasiklinler kullanımları esnasında, sıklıkla kemik iliğinin baskılanması, mide bulantısı ve kusma, alopesi, mukozit, ateş, doza bağımlı kardiyomiyopati ve konjestif kalp

yetmezliği gibi yan etkiler gösterirler. Bu grup ilaçların kullanımındaki en önemli sınırlandırmayı kardiyotoksisite oluşturmaktadır (19). Akut kardiyotoksisite genellikle geçicidir ve ciddi sorun oluşturmeyen hipotansiyon, taşikardi, ritm bozuklukları gelişmektedir. Kronik kardiyotoksisite ise daha ciddi sorunlar oluşturmakta, ilerleyici sol ventrikül fonksiyon bozukluğu, konjestif kalp yetmezliği ile birlikte, ağır vakalarda ölümlerle sonuçlanabilmektedir (20). Günümüze değin çocukluk çağı kanserlerinin yaklaşık %40-50'sinin tedavisinde antrasiklin grubu ilaçlar kullanıldığı tahmin edilmektedir ve halende tedavi protokollerinin yaklaşık %60'ı antrasiklin grubu ilaçları içermektedir (2). Antrasiklin grubu ilaçlar ile tedavi edilen kanser hastalarının yaşam sürelerinin uzaması ile birlikte kardiyak toksisite gelişimi daha da büyük sorun oluşturmaktadır.

Doksorubisine bağlı gelişen kardiyotoksisite; akut, subakut ve kronik olmak üzere üç ayrı grup olarak incelenmektedir (6,20).

Akut kardiyotoksisite

Doksorubisine bağlı gelişen akut kardiyotoksisite ilaç uygulandıktan sonra erken dönemde, genellikle ilk 24 saat içerisinde oluşur. Aritmi, hipotansiyon, kasılma fonksiyonunda orta dereceli depresyon izlenir. Elektrokardiyografik değışiklikler geçicidir. Seyrek olarak akut toksisite ile birlikte sol ventrikül yetmezliği, perikardit veya fatal olabilen perikardit- miyokardit sendromu gelişebilmektedir (20,21).

İkiyüzden fazla çocukta yapılan değerlendirmede, erken kardiyotoksisite oranının, %2,8-%4 olduğu belirlenmiştir (23). Diğer çalışmalarda ise %2,1-%1,6 olarak bildirilmiştir (3,21). Akut kardiyotoksisite genellikle geçicidir ve kalıcı kardiyak hasar oluşturmaz.

Subakut kardiyotoksisite

Subakut toksisite en sık görülen antrasiklin toksisitesidir. Yavaş seyirlidir, genellikle tedavinin verilmesinden dört ile sekiz hafta içerisinde oluşur. Ancak tedavi bitiminden sonraki ilk bir yıl içerisinde de görülebilmektedir (3). Klinik olarak sağ ve sol kalp yetmezliği gelişebilir. Subakut toksisiteye bağlı konjestif kalp yetmezliği medikal tedaviye iyi yanıt vermektedir (20,22).

Kronik kardiyotoksisite

Doksorubisine bağlı gelişen kronik kardiyotoksisite tedavinin ilk bir yılı içerisinde görülebilmektedir. Ancak tedaviden sonraki dört ile yirmi yıl arasında da izlenebilmektedir. Bu nedenle ilk bir yıl içerisinde görülen kardiyotoksisite gelişimi kronik kardiyotoksisite, bir yıldan sonra görülen kardiyotoksisite gelişimi geç başlangıçlı kronik kardiyotoksisite olarak adlandırılmaktadır (19,20). Subakut dönemde mevcut olup düzelmiş olan kardiyak bulgular hastalarda yeniden görülebileceği gibi, hastalarda hiçbir semptom olmaksızın konjestif kalp yetmezliği tablosu gelişebilir. Çocuk hastalarda konjestif kalp yetmezliği, ventriküler aritmi ve bunlara bağlı gelişen ani ölümler bildirilmiştir (21). Geç görülen konjestif kalp yetmezliğinin oranı %1,7 ile %11 arasındadır. Kremer ve arkadaşlarının 1966-2001 yılları arasında yayınlanan 12507 çocuk hastayı içeren 58 makale üzerinde gerçekleştirdikleri sistematik incelemede kardiyotoksisite oranının %0 ile %16 arasında bildirildiği tespit edilmiştir. Buna karşın subklinik kardiyotoksisite oranı %57'ye kadar çıkmaktadır (24,25).

Doksorubisine bağlı gelişen kardiyak toksisitede en önemli risk faktörü kümülatif dozdur. Antrasiklinlere bağlı gelişen konjestif kalp yetmezliği gelişimi, 100 mg/m² gibi düşük dozda %7 oranında izlenirken 550 mg/m² dozunda %15, 600 mg/m² dozunda %30 ve 700 mg/m² dozunda %40 olarak doza bağımlı artmış olduğu görülmüştür (21). Başka bir çalışmada 399 hasta retrospektif olarak analiz edilmiş, >550 mg/m² dozunda kalp yetmezliği insidansı %30 olarak bildirilmiştir. Antrasiklin dozu arttıkça < 500 mg/m²'de %1'in altında olan risk 600 mg/m²'de %36'ya yükselmiştir ve güvenli doz limiti 500 mg/m² olarak belirlenmiştir (26). Kremer ve arkadaşlarının 607 hastada gerçekleştirdikleri çalışmada ise; antrasiklin kümülatif dozu >300 mg/m² ve diğer risk faktörüne sahip bireylerde kalp yetmezliği gelişimi izlenmiştir. Kümülatif doz 550 mg/m²'de ise risk %10 olarak bulunmuştur (3). Bu Von Hoff ve arkadaşlarının adultlarda yaptığı çalışmadaki %7 oranına göre daha yüksektir (21). Antrasiklin için güvenli en yüksek doz 450-550 mg/m² olarak belirlenmiş olmasına rağmen, 300 mg/m²'den yüksek dozda tedavi alacak çocuklarda kardiyotoksisiteden koruyucu ajanlar ve farklı kemoterapi yaklaşımlarının uygulanması önerilmektedir (3,6,21,24).

Antrasiklinlere bağlı kardiyotoksisite gelişimini artıran diğer risk faktörleri; mediastinal bölgeye radyoterapi uygulanması, 65 yaşından büyük yada dört yaşından küçük olma, önceden var olan kardiyak hastalık (valvuler, iskemik, miyokardiyal),

siklofosfamid, ifosfamid kullanımı, karaciğer hastalığı, hipertansiyon, hipertermi, trizomi-21 varlığı, kadın cinsiyet (3,19,24,25). Bu risk faktörlerine sahip bireylerde antrasiklinler daha düşük dozlarda kardiyotoksisite gelişimine neden olmaktadır.

2.1.3. Antrasiklin tedavisi ile oluşan kardiyotoksisitenin belirlenmesi

Antrasiklinlere bağlı kardiyotoksisite gelişimi oranının tedaviden 15 yıl sonra, %5 olacağı tahmin edilmektedir. Subklinik kardiyak anormalliklerin oranının artması, geç dönem kardiyotoksisite insidansını artırmaktadır. Bu nedenle hastalara, erken kardiyotoksisite gelişimini saptayabilmek için yakın takip ve uzun izlem periyodu önerilmektedir (19,20,22). Böylece geriye dönüşümü olmayan ciddi konjestif kalp yetmezliği ve kardiyomyopati gelişimi önlenir. Antrasiklin kardiyotoksisitesinin belirlenmesi amacı ile birçok yöntem geliştirilmektedir.

Hastalarda göğüs röntgenogramı ileri dönemdeki kalp yetmezliğine bağlı gelişen kardiyomegali ve plevral effüzyonu gösterir. Kardiyomyopatiyi saptamada erken dönemde faydası yoktur ve tamamen normal olabilir (26,27). Elektrokardiyografik değişiklikler de spesifik değildir. Sinüs taşikardisi, T dalgasında düzleşme, R dalgasında progresyon kaybı ve uzun QT intervali gibi değişiklikler izlenebilir. Antrasiklin dozu arttıkça QT intervalinde uzama olduğu görülmüştür. Elektrokardiyografik değişiklikler daha çok ekokardiyografi ile sol ventrikül fonksiyonunda ciddi azalmanın olduğu geç dönemde izlenmektedir (19).

Ekokardiyografi noninvaziv bir yöntemdir. Subklinik kardiyotoksisitede anormal sistolik fonksiyonu (kısalma fraksiyonu, ejeksiyon fraksiyonu, stres velosite indeksi) ölçülmesi veya ardyükte artma izlenir. Böylece sağlıklı görünen hastalarda bulguların erkenden saptanarak tedavisi mümkün olabilmektedir. Kısalma fraksiyonunun ölçülmesi takipte önemlidir. Doksorubisin dozu arttıkça kardiyotoksisite gelişimine bağlı olarak, kısalma fraksiyonu da orantılı olarak azalmaktadır (20,24,28). Radyonüklit ventrikülografi, Teknisyum-99 kullanılarak yapılmaktadır ve sol ventrikül fonksiyonunun ölçülmesi ve anormal duvar hareketinin gösterilmesini sağlamaktadır. Subklinik kardiyotoksisitenin saptanmasında sensitivitesi yüksektir ancak ekokardiyografiye göre daha pahalı bir yöntemdir (19,20,27).

Anjiyokardiyografik yöntemler de dilate kardiyomiyopati, miyokardit, miyokardiyal infarktüsün gösterilmesinde tercih edilmektedir. Bu amaçla İndiyum-111 ve Metaiodobenzilguanidin kullanılmaktadır. Miyokardiyal hücre nekrozunu göstermede sensitivitesi yüksek ancak spesifitesi düşüktür. Bununla beraber normal kardiyak fonksiyona sahip olup, doksorubisin kullanımına bağlı nekroz gelişen hastaların gösterilmesinde faydalıdır (19,29,30).

Miyosit hasarının gösterilmesi için birçok biyokimyasal belirleyici ile çalışmalar yapılmıştır. Miyosit hasarı oluştuğunda kreatin kinaz-MB izoenziminin, laktat dehidrogenaz-1 serum konsantrasyonunun kümülatif doksorubisin dozu ile orantılı olarak yükseldiği gösterilmiştir, ancak spesifik değildir (10,31). Miyokardda bulunan Troponin-T ve Troponin-I düzeyleri de miyokardiyal infarkt, akut miyokardit gibi miyokardiyal hasar durumlarında serumda artmış olarak bulunurlar (31). Atriyal natriüretik peptid kalp defekti bulunan çocuklarda yüksek düzeyde ölçülmüştür. Bu nedenle doksorubisine bağlı gelişen kardiyotoksistide miyokardiyal hasarın erken tespit edilmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir (32). Doksorubisinin redüksiyonu sonucu ortaya çıkan serbest radikaller lipid peroksidasyonunu artırarak hasara neden olmaktadır. Bu nedenle lipid peroksidasyon ürünleri tiyobarbitürat reaktif asid maddelerin doku ve plazmada ölçümünün toksisitenin gösterilmesinde kullanılabileceği düşünülmüştür. Doksorubisin alan sıçanlarda kontrol grubuna göre daha yüksek izlenmiştir (4,7).

Endotelin-1 ve nitrik oksit; vasküler endotel ve miyokard hürelerinden salgılanır ve konjestif kalp yetmezliğinde plazma düzeyleri yükselir. Doksorubisine bağlı kardiyotoksistide plazma düzeyi sistolik fonksiyonlar ve histopatolojik miyokardiyal hasar bulgularına korele olarak artmaktadır. Bu nedenle kardiyak toksisitenin takibinde kullanılabilecekleri düşünülmektedir (10,11).

Antrasikline bağlı kardiyomiyopatinin gösterilmesinde endomiyokardiyal biyopsi altın standart yöntemdir. Sensitivitesi ve spesifitesi yüksektir. Histolojik değişiklikler doksorubisinin total kümülatif dozu ≥ 240 mg/m² olduğunda hastalarda gözlenmeye başlamaktadır. Bristow ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 100-600 mg/m² arasında doksorubisin tedavisi alanlarda, doksorubisinin total kümülatif dozu ile orantılı olarak histolojik hasarın arttığı gösterilmiştir (30). İnsan ve hayvan kalp dokusunun biyopsi örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde miyokardiyal hücrelerde vakuolizasyon ve şişme, miyofibriler kayıp, sitoplazmik vakuolizasyon görülmektedir (27,30). Elektron

mikroskopik incelemede ise sitoplazmik vakuolizasyon, miyofibril kaybı ve miyofibrillerde dağılma, parçalanma, mitokondriyal dejenerasyon, sarkoplazmik retikulumda şişme ve yapısında bozulma gibi bulgular saptanmıştır (7,19,26). Billingham ve arkadaşları histopatolojik olarak antrasiklinlere bağlı gelişen kardiyotoksisiteyi, sitoplazmik değişikliklerin ciddiyetini ve miyosit hasarının yüzde oranını belirleyerek skorlamışlardır (33).

Billingham Skorlaması

Grade 0 : Normal kardiyak mikroskopi

Grade 1 : Hücrelerin %5'inden azında hasar

Grade 1,5 : %5-15 hücre hasarı

Grade 2 : %6-25 hücre hasarı

Grade 2,5 : %26-35 hücre hasarı

Grade 3 : %35 ve daha fazla hücre hasarı

Erken dönemde miyofibrillerde hasar ve sarkoplazmik retikulumda şişme izlenmektedir. Hasarın ciddiyeti arttıkça mitokondriyal ve nükleer değişiklikler belirginleşmektedir. Ciddi hasarda hücrelerin %35'inden fazlası zarar görmektedir (33). Yüksek biyopsi skoruna sahip olanlarda konjestif kalp yetmezliği gelişme riski daha fazladır (30).

Endomiyokardiyal biyopsi kardiyotoksitenin belirlenmesinde sensitiv olmasına rağmen invaziv bir yöntem olması nedeni ile sık kullanılamamaktadır. Endomiyokardiyal biyopsi esnasında gelişebilecek olan ventriküler taşikardi, göğüs ağrısı, hemiperikardiyum, kalp tamponadı, femoral arterden kateterin ilerletilmesine bağlı gelişebilecek olan damar içinde tromboz, hematoma ve retroperitoneal kanama gibi komplikasyonlar kullanımını sınırlamaktadır (27).

2.1.4. Doksorubisinin kardiyotoksisite mekanizması

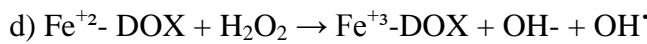
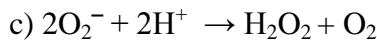
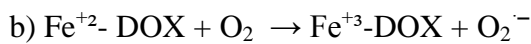
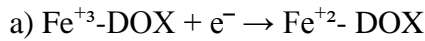
Doksorubisine bağlı gelişen miyokardiyal hasarın mekanizması ile ilgili birçok teori öne sürülmüştür: Doksorubisinin neden olduğu; serbest radikal oluşumu ve lipid peroksidasyonu (4,5,34,35), adrenerjik fonksiyonlarındaki değişiklikler (36), sarkolemmal

kalsiyum transportunda değişme (35,37), makrofajlardan sitokin (tümör nekrozis faktör alfanın ve interlökin-2'nin) salınması (38,39), apoptozis (programlı hücre ölümü) (40). Doksorubisine bağlı gelişen kardiyotoksisitede bu mekanizmalardan en sık kabul gören görüş ise serbest radikal oluşumudur (4,5,35). Literatürde serbest radikal temizleyicilerinin kullanılarak miyosit hasarının önlenmesi ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Melatonin, vitamin E, askorbik asit, N-asetil sistein bunlar arasında sayılabilir (7,8,41,42). Günümüzde demir şelasyonu yaparak etki gösteren Deksrakozanın tedavi öncesi verilmesinin antrasikline bağlı kardiyotoksisiteyi önleyebileceği gösterilmiştir (43).

Doksorubisin kardiyotoksisitesinde serbest radikal teorisi

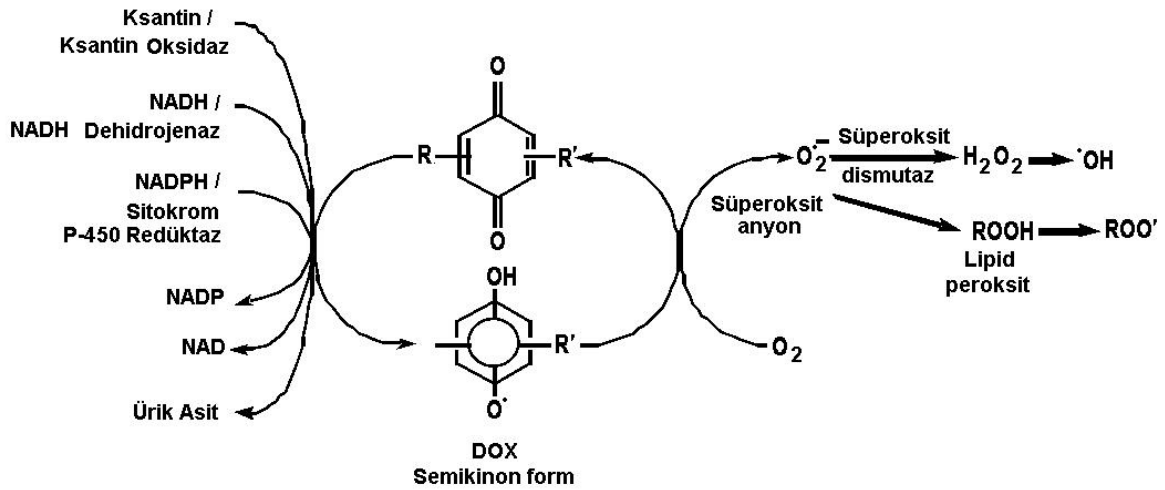
Doksorubisin iki mekanizma ile serbest radikal oluşturur.

1. Doksorubisin güçlü demir ve bakır şelatörüdür. İlacın halka yapısındaki 11. ve 12. pozisyonlarda bulunan oksijen (O₂), demiri (Fe) bağlar ve Fe⁺³-doksorubisin (Fe⁺³-DOX) kompleksi oluşturur (a). Hüresel indirgeyici sistem nonenzimatik yol ile bu kompleksi indirgeyebilir (b) ve sonuçta hidrojen peroksit oluşur (c). Hidrojen peroksit de reaksiyonun sonunda Fe⁺²'yi okside ederek reaktif hidroksil radikalini oluşturur (d) (1,5,6) (Şekil 2).



Şekil 2: Doksorubisin-Fe kompleksi.

2. Doksorubisinin kinon formunda olan C halkası flavin bağımlı redüktazlarla (NADPH sitokrom p450 redüktaz, NADH dehidrogenaz, ksantin oksidaz) semikinon formuna indirgenebilir. Semikinon form serbest radikal özelliğine sahiptir. Oksijen varlığında semikinonda bulunan elektron, moleküler oksijene transfer edilir. Böylece süperoksit (O₂⁻) serbest radikali meydana gelir ve doksorubisin eski haline geri döner. Süperoksit anyonu, süperoksit dismutaz enzimi vasıtası ile elektron vererek moleküler oksijene ve hidrojen peroksit dönüşür (1,5,6) (Şekil 3).



Şekil 3: Doksorubisinin serbest oksijen radikali oluşturmadaki enzimatik yol.

Hücre hasarının önlenmesinde bu yoldaki hidrojen peroksidin eliminasyonu önemlidir. Çünkü en güçlü serbest radikallerden olan hidroksil radikali oluşumuna yol açacak birçok reaksiyona girebilme kapasitesine sahiptir. Hidrojen peroksid iki enzim tarafından inaktive edilir. Katalaz enzimi hidrojen peroksidi eşit miktarda su ve oksijene, glutatyon peroksidaz enzimi ise glutatyonu kullanarak su ve okside glutatyonu dönüştürür. Kalp kasında katalaz aktivitesi zayıftır. Ayrıca doksorubisine bağlı oluşan serbest radikaller glutatyon peroksidazı inhibe ederler. Bu durum antrasiklinlerden en çok etkilenen organın neden kalp olduğunu açıklamaktadır (4).

Serbest radikaller mikrozomal ve mitokondriyal lipid peroksidasyonunu uyarıcı etki göstererek membran fonksiyonlarını bozarlar (1,4,44). Ayrıca doksorubisin-Fe kompleksi reaktif oksijen radikalleri olmadan da lipid üretimini başlatabilir. Doksorubisin-Fe⁺³ kompleksinin fosfolipit olan kardiyolipine güçlü afinitesi vardır. Bu fosfolipit mitokondri ve sarkoplazmik retikulum membranları üzerinde bulunur ve membrana bağlı birçok enzimin aktivitesinden sorumludur. Bundan dolayı doksorubisine bağlı gelişen kardiyotoksisitede en fazla etkilenen organeller mitokondri ve sarkoplazmik retikulumdur. Doksorubisin-kardiyolipin kompleksi hücre membran fonksiyonlarını bozarak miyosit hasarına ve sonunda miyokardiyal disfonksiyona yol açar (4,6).

Doksorubisinin etkisi ile endotelial hücrelerde ve miyositlerde apoptotik hücre ölümü meydana geldiği yapılan hayvan deneylerinde gösterilmiştir (1,40,45). Bu çalışmalarda kardiyomiyositlerin apoptozise uğramasının kalp yetmezliği gelişimine

katkıda bulunduğuna işaret edilmektedir. Miyosit kaybı kalp yetmezliğini başlatabilir ya da mevcut durumun daha da kötüleşmesine sebep olabilir. Tümör hücrelerindeki doksorubisine bağlı apoptotik etki sitostatik mekanizmalar ile düzenlenirken, miyosit ve endotelial hücrelerdeki apoptotik etkisi ise oksijen radikallerinin etkisiyle gerçekleşir. (40,45). Hidrojen peroksid bu etkiye katkıda bulunmaktadır. Doksorubisine bağlı gelişen apoptozis kanser tedavisinde yararlı etkiye sahip olmasına rağmen, vasküler hücre ve miyositlerdeki doksorubisinin proapoptotik etkisi, kardiyotoksiteden sorumlu tutulmaktadır (40).

Doksoşrubisine bağılı gelişen kardiyotoksitenin diğere muhtemel mekanizmalarından biri de mitokondri iç membranında kalsiyum ve sodyum iyonlarının değış-tokuş mekanizmasının bozulmasıdır. Elektron transport zincirinin bozulması serbest oksijen radikallerinin oluşumu ile sonuçlanarak hücre hasarına neden olur (35,37).

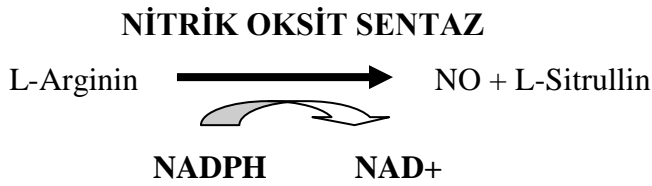
Son yıllarda yapılan çalışmlar nitrik oksidin kardiyak fonksiyonlar ve hastalıklar üzerinde rolü olduğunu göstermektedir (46-49). Doksoşrubisine bağılı kardiyak hasarda da NO'nun rolü olduğuna dair kanıtlar mevcuttur (11,13,50).

2.2. Nitrik Oksit

İlk kez 1980 yılında Furchgott ve Zawadzki tarafından endotel kökenli vazodilatasyon yapıcı bir madde (Endotelium Derived Relaksing Factor, EDRF) tanımlandı (51). Yedi yıl sonra, 1987'de bu relaksasyonu sağılayan esrarengiz mediatörün nitrik oksit (NO) olduğü iki ayrı grup tarafından eş zamanlı olarak bildirildi (52,53). Günümüzde ise endotel kaynaklı nitrik oksidin hem insanlarda hem de hayvanlarda, sürekli bir vazodilatatör etki yaparak vasküler tonusun fizyolojik düzenleyicisi olduğü ortaya konuldu. Bunun yanı sıra nörotransmitter hücre içi sinyalleme ajanı, antimikrobik sitotoksik mediatör olarak da görev yaptığı anlaşılmıştır (46,54,55).

2.2.1. Nitrik oksit oluşumu

Nitrik oksit birçok hücrede bir aminoasit olan L-Arginin'den nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile üretilir. Reaksiyon moleküler oksijen ve kofaktör olarak NADPH gerektirir (56,57) (Şekil 4).



Şekil 4: Nitrik oksitin oluşumu

Nitrik oksitin ortaya çıktıktan sonra 3-5 saniyelik yarı ömrü vardır ve hızla hemoglobin, metilen mavisi ve superoksit anyonu tarafından nötralize edilir. Nitrik oksit, biyolojik olarak aktif olan en küçük moleküllerden biridir. Bir eşlenmemiş elektronunun olması nedeni ile başka moleküllerle hızla reaksiyona girebilen bir serbest radikaldir. Düşük molekül ağırlığı ve lipofilik yapısı nedeni ile kolay ve hızlı bir şekilde ökaryotik membranlardan ve prokaryotik hücre duvarlarından geçebilir. Hemen her hücre tarafından üretilir ve her hücre üzerinde fizyolojik ve/veya patolojik etki gösterebilir (9,46).

Nitrik oksit sentazın, endotelial NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) olmak üzere üç izoformu vardır (58). Nöronal NOS, sinir ve bazı diğer dokularda (akciğer, pankreas, mide ve uterus) bulunur. Nörotransmisyonu yani nöronal hücrelerarası iletişim ve hücre içi iletişimi sağlayan NO'yu üretir. Endotelial NOS, endotel hücrelerinde bulunur ve sentezlenen NO vazodilatasyon yaparak kan basıncını ve organ perfüzyonunu düzenler. Nöronal ve endotelial NOS hücre içinde sürekli mevcut olup aralıklı ve küçük miktarlarda NO üretimini sağlar. Her ikisinde kofaktör olarak kalsiyum(Ca^{+2})/kalmodulin'e bağımlıdır ve intraselüler Ca^{+2} düzeyini yükselten agonistlere yanıt verir. Kalsiyum yükselmesi kalmodulin'in NOS'a bağlanmasını uyarır ve normal fizyolojik dozlarda (nanomolar) NO sentezlenir. Kalsiyum şelasyonu yapan maddeler ve kalmodulin inhibitörleri ile bu yolla sağlanan NO sentezi önlenir (53,58,59).

İndüklenebilir NOS hemen hemen bütün çekirdekli hücrelerde bulunmaktadır. Endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri, makrofaj, nötrofil, kardiyak miyosit ve endokard hücrelerinde gösterilmiştir. Prototip makrofajdır. Bu enzim hücresel ajanlar tarafından uyarım sonucu uzun süreli ve fazla miktarda NO üretiminden sorumludur. Sentez uyarısı esas olarak endotoksin ve sitokinler (IL-1, TNF) tarafından yapılır, bazı hücrelerde sentez IL-8, IL-10, TGF- β gibi antiinflamatuvar maddelerce yavaşlatılabilir,

glukokortikoidlerle enzimin indüksiyonu önlenebilir. Enzimin aktivasyonu kalsiyumdan bağımsızdır (53,58,59,60).

2.2.2. Nitrik oksitin patofizyolojik olaylardaki etkisi

Farklı hücrelerde NO'nun üretiminde veya etkinliğinde bozuklukla seyreden NO dengesindeki değişiklikler birçok fizyopatolojik sürece katkıda bulunmaktadır. İskemi ve reperfüzyon hasarı, inme, sepsis, nörotoksisite, makrofaj kaynaklı hasarlar, vasküler hastalıklar, diyabetes mellitus, otoimmün hastalıklar, inflamasyon, ağrı, kanser, respiratuvar hastalıklar, pulmoner hipertansiyon gibi çok çeşitli patolojilerde NO'nun rolünün olabileceği bildirilmiştir(9,46,60-62).

İnflamasyonda NO'nun fizyolojik etkisi koruyucu ve antiinflamatuvar yöndedir. Ancak yüksek miktarlarda salgılandığında ortamın redoks ve oksijenasyon durumuna bağlı olarak hedef hücrelerde peroksinitrit oluşumuna neden olur. Oluşan peroksinitrit, mitokondriyal solunumu, DNA sentezini inhibe ederek sonuçta hücre ölümüne neden olur (57,60,61). Nitrik oksit, trombositlerde siklik GMP (sGMP) düzeylerini yükselterek hem in vivo ve hem de in vitro olarak trombosit adezyon ve agregasyonunu inhibe eder. Prostaglandin dışındaki en önemli inhibitör faktördür. Gelecekte antitrombotik ajan olarak kullanılması ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (57,61,63). Nitrik oksit, postganglioner parasempatik orijinli nöronların ucundan salıverilir ve gastrointestinal sistem boyunca, özofagustan anal sfinktere kadar, tonus ve motiliteyi düzenler (54). İnflamatuvar barsak hastalığındaki mukozal hasarlanmaya NO'nun katkı sağladığı bildirilmiştir (55). Nitrik oksit, renal kan akımı, glomeruler filtrasyon, renin salgılanması ve tuz itrahi gibi renal fonksiyonların kontrolünde önemli bir parakrin modülatör ve mediatördür. Ayrıca diyabetik nefropati, inflamatuvar glomerüler bozukluk, septik şokta görülen akut böbrek yetmezliği, ilaçların nefrotoksik etkileri gibi böbrek fonksiyon bozukluğu durumlarında önemli rol oynamaktadır (64,65). Pankreas adacık hücrelerine infiltre olan makrofajlarda iNOS aktivitesi olduğu ve buna bağlı olarak fazla miktarda oluşan NO'nun bu hücrelerdeki harabiyetten sorumlu olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle NO'nun diabetin patogenezinde de rol oynayabileceği düşünülmüştür (60). Öğrenme ve bellek fonksiyonu üzerinde de NO'nun rolü önemlidir. Eksitator aminoasitlerin beyin gelişimi, öğrenme ve hafıza üzerine olan etkilerine NO'nun aracılık ettiği detaylı çalışmalarla gösterilmiştir.

Fazla miktarda oluşturulan NO'nun nörodejeneratif hasarlanmalara neden olduğu ileri sürülmektedir (9,46,60,66).

2.2.3. Nitrik oksitin kardivasküler sistem üzerine etkisi

Nitrik oksitin normal fizyolojik olayların düzenlenmesinde ve çeşitli patolojik süreçlerin gelişiminde rol oynadığı sistemlerden birisi de kardiyovasküler sistemdir. Miyokard kontraktilesi, vasküler tonus, trombosit-endotel etkileşimleri ve lökosit adezyonunun düzenlenmesine aracılık ederek kardiyak patolojilerde rol oynamaktadır (9,46,57,60,67). Esansiyel hipertansiyonun patogeneğinde endotelial NO üretiminin veya etkinliğinin azalmasının rol oynadığı düşünülmektedir. Aterosklerozda endotel disfonksiyonu nedeni ile NO'nun üretimi ve salınımı azalmıştır. İlave olarak NO'ya karşı vasküler düz kas duyarlılığı azalır. Sonuçta NO'nun antitrombotik ve vazodilatatör etkisinin kalkması aterosklerozu kolaylaştırır (63). Nitrik oksitin vasküler düz kasta dilatasyon etkisi dışında kalp kası fonksiyonlarında parakrin, otokrin, intrakrin regülatuar rolü üzerine çok sayıda çalışma mevcuttur. Kalpte NO endojen NOS'lar tarafından sentezlenir. Atrial ve ventrikül miyositlerin sarkoplazmik retikulumunda nNOS ve eNOS ekspresyonu gösterilmiştir. Ayrıca kolinerjik ve kolinerjik olmayan sinir uçlarında nNOS aktivitesi gösterilmiştir. Miyositlerde yüksek miktarlarda eNOS üretilmektedir. Ayrıca miyositler, inflamatuvar sitokinlerle uyarıldığında iNOS enzimi de üretmektedir. Endokardiyal, endotelial hücrelerde ve miyositlerde iNOS aktivitesi gösterilmiştir. Kalp yetmezliği, dilate kardiyomiopati gibi kardiyak hastalıklarda iNOS miktarının arttığı tespit edilmiştir (9,48,57,68). Nitrik oksitin kalpte oluşturduğu etkiler sGMP'ye bağımlı ve bağımsız etkiler olarak ortaya çıkmaktadır. Nitrik oksit kalp kasında inaktif solubl guanilat siklazı aktive eder oda GTP'nin sGMP'ye dönüşümünü sağlar. Bu şekilde meydana gelen sGMP aracılığı ile düz kas hücrelerini gevşetir. Kalp üzerinde hem pozitif hem de negatif inotropik etkisi olmakla birlikte, sonuç olarak kalp kasılmasını inhibe etme yönündeki etkisi hakimdir. Bununla uyumlu olarak çeşitli agonistlerle (β -agonistleri) oluşturulan pozitif inotropik etki eNOS aktivasyonu ile veya NO vericileri ile azalmaktadır. Ayrıca NO, miyositlerin mitokondriyal solunumunu inhibe ederek kalbin oksijen tüketimini azaltır (9,57).

Miyokard kontraktilesinde bozulma özellikle sepsiste belirgindir ve bu olayda sitokinlerin rolü önemlidir. TNF- α , IL-6 ve IL-2'nin kalp kasında in vitro olarak hızlı ve geri dönüşebilir negatif inotropik etki yaptığı gösterilmiştir. Septik şokta gelişen hipotansiyon ve miyokard depresyonundan aşırı NO yapımı sorumludur. Bu etkide eNOS aktivasyonunun aracı olduğu, iNOS aktivasyonunun da bu etkiye katkıda bulunduğu bildirilmiştir (61,70). Miyokard iskemisinde erken dönemde endotel disfonksiyonu oluşur. Nitrik oksit aracılı vazodilatasyon gerçekleşemez ve koroner arterlerde vazokonstriksiyon oluşur. İskemiye takiben reperfüzyonun oluşumuna bağlı olarak da dokuya nötrofil göçü başlar ve lökositlerden ortama serbest oksijen radikallerinin salgılanması hasarı başlatır. Reperfüzyon sırasında O_2^- ve NO üretimi beraber olmaktadır. İki molekül birleşerek güçlü bir oksidan olan peroksinitriti ($ONOO^-$) oluşturur (9,46,62). Nitrik oksit sentaz inhibisyonu ile peroksinitriti oluşturan NO komponentinin baskılanmasının reperfüzyon hasarını önleyeceği düşünülmüştür. Buna karşın iskemi-reperfüzyon hasarında NO'nun koruyucu rolü de bulunmaktadır. Lökosit migrasyonu ve adezyonunu önleyerek mikrovasküler permeabilite de lökosit aracılı artışı baskılayarak inflamatuvar hasarı belirli ölçüde sınırlayabilmektedir. Eksojen uygulanan NO'nun iskemi-reperfüzyonda kardiyoprotektif olduğu, antiaritmik koruma sağladığı bildirilmiştir (61,62,67,71). Nitrik oksitin toksisitesi ile koruyucu etkinliği arasında hassas bir denge bulunmaktadır. Bu hassas denge NO'nun indirgenmiş formlarının oluşumu ile ayarlanmaktadır.

Kardiyak miyositlerde bulunan iNOS'un indüksiyonu sonucu salgılanan fazla miktardaki NO, çeşitli inflamatuvar mediatörleri artırmakta ve miyosit kontraktilesini inhibe etmekte, ayrıca sitotoksik etki, apoptoz ve nekroza neden olmaktadır (9). De Belder ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, dilate kardiyomiyopati hastalarda iNOS'un miyokardiyal sentezinin arttığı gösterilmiştir. Son dönem kalp yetmezliği mevcut olan 22 hastada (n=8 dilate kardiyomiyopati, n=14 iskemik kalp hastalığı) yapılan çalışmada, dilate kadiyomiyopati ve iskemik kalp hastalığına sahip hastalarda miyokardiyumdan iNOS sentezi olduğu tespit edilmiştir (49).

2.2.4. Doksorubisin kardiyotoksitesinde nitrik oksitin rolü

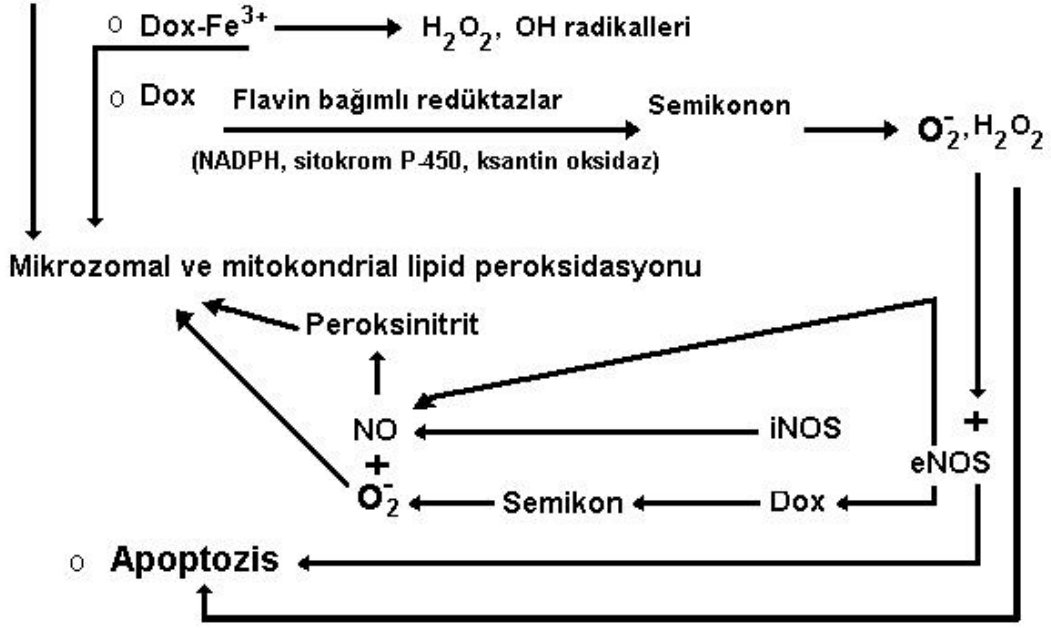
Nitrik oksitin çeşitli kardiyak patolojilerdeki, özellikle kardiyomiyopatideki rolünün gösterilmesi doksorubisine bağlı kardiyotoksitedeki katkısının araştırılmasına

neden olmuştur. Antrasiklin kardiyotoksitesitesi kardiyomiyosit bütünlüğünde bozulma ve kardiyak fonksiyon kaybı ile sonuçlanan birden fazla sayıda biyokimyasal yolakla ilgili bozukluğun neden olduğu hücrel hasarın birikimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda antrasiklinin kardiyak toksitesisinde NOS aktivitesinin ve NO metabolizmasındaki bozuklukların sorumlu olabileceğini düşündüren bulgular elde edilmiştir. Doksorubisin uygulanmasının sıçanlarda plazma ve kalpte NO düzeyini artırdığı gösterilmiştir (10,11). Aortik endotel hücrelerinde eNOS ekspresyonunda doksorubisine bağlı artış saptanmıştır (50). Ayrıca hidrojen peroksitein endotel hücrelerinde eNOS ekspresyonunu artırdığı belirlenmiştir (72). Bu bulgu antrasiklin uygulanmasına bağlı açığa çıkan hidrojen peroksitein eNOS artışından sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Kalivendi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada doksorubisinle birlikte antisense eNOS oligonükleotid uygulanmasının doksorubisine bağlı apopitozisi azalttığı rapor edilmiştir. Hidrojen peroksitein mitokondride oluşumunun engellenmesinin de doksorubisine bağlı apopitozisi azalttığı gösterilmiştir. Sonuçta doksorubisine bağlı apopitozisin doksorubisinin eNOS tarafından redoks aktivasyonu ile ilişkisi olduğu yorumu yapılmıştır (50).

Doksorubisin, eNOS'un redüktaz domainine bağlanmakta ve bir elektron redüksiyonu ile doksorubisin semikinon formu oluşmaktadır. Sonuçta süper oksit meydana gelmektedir. Bu reaksiyonda doksorubisin redüksiyona uğrarken, eNOS bağımlı NADPH tüketimini artırmakta ve eNOS'un redüktaz domaini için kofaktör olan flavinin oluşmasını sağlamaktadır (13). Nitrik oksit ve süper oksit beraber peroksinitriti oluştururlar. Oluşan peroksinitrit güçlü bir hücre oksidanıdır, DNA hasarına ve lipit peroksidasyonuna neden olur. Ayrıca oksidatif stresi artırır, mitokondriyal akonitazdan demir salgılanmasını sağlar. Doksorubisin kardiyotoksitesitesinden peroksinitrit oluşumu sorumlu tutulmaktadır (15,73). Serbest radikal temizleyicilerin (alfa-tokoferol, N-asetilsistein gibi) kullanılması ile peroksinitriti temizleyerek, oksidatif hasardan korunulabileceği düşünülmektedir. Süper oksit temizleyicileri doksorubisinin kardiyotoksik etkisinden, hem hidroksil radikal formasyonunu önleyerek hem de peroksinitrit oluşumunu engelleyerek koruyucu etki gösterebilirler (7,8,20,41).

Sonuç olarak NO'nun miyokard fonksiyonları ve miyokard hastalıklarındaki rolü, doksorubisinin NO metabolizması ve NOS aktivitesi üzerindeki etkileri doksorubisinin kardiyak toksitesitesinde NO'nun katkısı olduğu görüşünü desteklemektedir (Şekil 5).

o **Serbest radikal oluşumu**



Şekil 5: Dokсорubisin kardiyotoksitesinde NO'nun rolü.

3. MATERYAL VE METOD

Bu tezde, dokсорubisinin (Carlo Erba, Türkiye) tek başına ve NOS inhibitörleri ile birlikte kullanımında kardiyak toksisite bulguları değerlendirildi. NOS inhibitörlerinden nonselektif inhibitör olan N^G-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME, Sigma), indüklenebilen NO inhibitörü olan N⁶-(1-iminoetil)-L- lizin (L-NIL, Sigma) kullanıldı.

Araştırma için 12 haftalık 24 adet erkek "Sprague-Dawley" cinsi sıçan kullanıldı. Hayvanlar farmakoloji bölümünde sıcaklığı 22±1°C'de tutulan, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsü sağlanan odalarda kafes içinde takip edildi. Herhangi bir yem ve su kısıtlaması uygulanmadı. Sıçanların ağırlığı 240-320 gr arasında değişmekteydi (ortalama

262±18 gr). Çalışma süresince sıçanların sağlık durumu günde iki kez değerlendirildi ve aktivitelerinde azalma olup olmadığı kaydedildi. Haftada 2 kez tartıldı.

Sıçanlar her grupta 6 adet sıçan olmak üzere rastgele 4 gruba dağıtıldı.

1. grup: Kontrol Grubu

Bu gruptaki sıçanlara serum fizyolojik 10 ml/kg dozunda haftada bir kez, 5 hafta boyunca intraperitoneal yoldan enjekte edildi.

2. grup: Doksorubisin Grubu

Bu gruptaki sıçanlara haftada bir kez, doksorubisin 3 mg/kg dozunda, 5 hafta boyunca intraperitoneal yoldan enjekte edildi (Total kümülatif doz 15 mg/kg).

3. grup: Doksorubisin + L-NAME Grubu

İkinci deney grubundaki sıçanlardan farklı olarak bu gruptaki sıçanlara haftada bir kez doksorubisine ilave olarak, her doksorubisin enjeksiyonundan 30 dakika önce L-NAME 30 mg/kg dozunda, 5 hafta boyunca intraperitoneal yoldan enjekte edildi.

4. grup: Doksorubisin + L-NIL Grubu

İkinci deney grubundaki sıçanlardan farklı olarak bu gruptaki sıçanlara haftada bir kez doksorubisine ilave olarak, her doksorubisin enjeksiyonundan 30 dakika önce L-NIL 3 mg/kg dozunda, 5 hafta boyunca intraperitoneal yoldan enjekte edildi.

KALBİN CERRAHİ OLARAK ÇIKARILMASI:

Hayvanlar en son enjeksiyondan sonra, 1 hafta süre ile gözlemlendi ve 6. haftanın bitiminde farmakoloji bölümünde cerrahi olarak kalp çıkarıldı.

Operasyondan önce bir gece aç bırakılan sıçanlara eter ile inhalasyon anestezisi uygulanarak hareketsiz kalmaları sağlanacak şekilde strafor üzerine sabitlendi. Hayvanların anestezinin cerrahi safhasına girip girmedikleri ekstremiteler ve kulak refleksleri ile saptandı. Uygun bölge temizliği ve steril şartlar sağlanarak linea alba üzerinden karın alt yarısına transvers kesi ile girilerek toraksa doğru ilerlendi, diyafragma kesilerek toraksa girildi. Çift taraflı torakotomi ile göğüs kafesi açılarak, en üst seviyede mammarian arterler bağlandı. Akciğerler ekartörlerle sağ tarafa çekilerek kalbin perikard dokusu sıyrıldı. Göğüs boşluğunun arka kısmında vertebralara yaslanarak yukarıdan aşağıya doğru uzanmakta olan torasik aorta dokusu orta kısmından 5/0 ipek ile askıya alındı. Daha sonra renal arterden plazma lipid peroksidasyon

ürünlerinin tayini için kan alındı. Askıya alınmış olan torasik aorta bir klemp ile tutulup kalple birlikte çevre dokulardan hızlıca uzaklaştırıldı. Cerrahi olarak çıkarılan kalbin sol ventrikülü elektron mikroskopik inceleme, ışık mikroskopik inceleme ve lipit peroksidasyonu tayini için üç parçaya ayrılarak gerekli solüsyonların içine koyuldu.

HİSTOPATOLOJİK ÇALIŞMA:

Işık Mikroskopi ve Elektron Mikroskopi Çalışması:

Sıçanlardan çıkarılan kalp sol ventrikülünün bir parçası ışık mikroskop için %10'luk formalin içerisinde, bir parçası da elektron mikroskop için %2'lik glutaraldehit fiksatiflerine kondu.

A- Işık mikroskopi için formalinde 48 saat bekletilen doku parçaları aşağıdaki yöntem ile takip edildi.

- 1- %70 alkol içerisinde 24 saat bekletildi,
- 2- %90 alkol içerisinde 24 saat bekletildi,
- 3- %96 alkol içerisinde 24 saat bekletildi,
- 4- %100 alkol -1 içerisinde 24 saat bekletildi,
- 5- %100 alkol -2 içerisinde 15 dk bekletildi,
- 6- %100 alkol -3 içerisinde 15 dk bekletildi,
- 7- Ksilen-1 içerisinde 30 dk bekletildi,
- 8- Ksilen-2 içerisinde 30 dk bekletildi,
- 9- Ksilen-3 içerisinde 30 dk bekletildi,
- 10- Ksilenden çıkarılan doku 37 °C etüvde sırası ile; parafin-1, parafin-2, parafin-3 içerisinde arka arkaya 15'er dakikalık sürelerle bekletildi.
- 11- 37 °C'lik etüvden parafin-3'ten çıkarılan doku 58 °C'lik etüvde sırası ile; parafin-1, parafin-2 içerisinde 15'er dakika, parafin-3 içerisinde 30 dakika bekletildi.
- 12- Son olarak parafin bloklara gömülen dokulardan Leica RM 2155 marka mikrotom aracılığı ile 5 mikron kalınlığında kesitler alındı; deparafinizasyon yapılarak hematoksilin eosin ile boyanarak lamalar kapatıldı.

Hazırlanan preparatlar tek bir histolog tarafından Olympus BH2 marka ışık mikroskopta incelendi.

B- Elektron mikroskopi takibi ise aşağıdaki yöntemle gerçekleştirildi.

- 1- Doku, %2'lik glutaraldehit içerisinde 4 °C'de 2 saatin üzerinde tutuldu.
- 2- Potasyumbisülfat içerisinde (PBS) 4 °C'de 10 dakika bekletildi.
- 3- %1'lik Osmiyum tetroksit (OsO₄) içerisinde 4 °C'de 60 dakika bekletildi.
- 4- PBS'de 4 °C'de 10 dakika bekletildi.
- 5- %1'lik uronil asetat içerisinde 4 °C'de 60 dakika bekletildi.
- 6- PBS'de 4 °C'de 10 dakika bekletildi.
- 7- %50'lik alkolde oda ısısında 10 dakika bekletildi.
- 8- %70'lik alkolde oda ısısında 10 dakika bekletildi.
- 9- %96'lık alkolde oda ısısında 10 dakika bekletildi.
- 10- %100'lük alkolde oda ısısında 10 dakika bekletildi.
- 11- Propilen oksit içerisinde oda ısısında 10 dakika bekletildi.
- 12- 1:1 oranında hazırlanan propilen oksit: epon içerisinde oda ısısında 60 dakika bekletildi.
- 13- 1:3 oranında hazırlanan propilen oksit: epon içerisinde oda ısısında 60 dakika bekletildi.
- 14- Saf epon içerisinde oda ısısında 60 dakika bekletildi.
- 15- Saf epon(kapsül içinde) içerisinde 60 °C de 18 saat bekletildi.
- 16- Saf epon içinde bloklanan dokulardan Leica Reichert Ultracut R marka mikrotomda önce 700-900 nm kalınlığında yarı-ince kesitler alındı ve toluidin mavisi ile boyandı. Olympus BH2 marka ışık mikroskopta uygun bölgeler belirlendikten sonra 70-90 nm kalınlığında ince kesitler alındı. Kesitler kurşun sitrat ve uranil asetat ile kontrastlandı.

Hazırlanan preparatların tek bir histolog tarafından JEOL 1010 elektron mikroskop ile gerekli inceleme ve değerlendirmeleri yapıldıktan sonra, resimleri çekildi.

Doksorubisin toksik etkisine bağlı ortaya çıkan; miyositlerde ve interstisyumda ödem, sarkoplazmik retikulumda ödem, miyositlerde vakuolizasyon, miyofibril kaybı, mitokondrilerde zedelenme (ödem, atrofi, krista kümeleşmeleri ve krista kaybı) gibi

miyokard hasarına ilişkin bulgular ışık ve elektron mikroskopik olarak değerlendirildi. Hasar yok (-) veya var (+) şeklinde kaydedildi.

LİPİT PEROKSİDASYONU TAYİNİ:

Deney gruplarında açığa çıkan serbest radikalleri dolaylı olarak değerlendirmek amacı ile sıçan kalbinde ve plazmada lipit peroksidasyon ürünleri tayin edildi. Lipid peroksidasyonu; tiyobarbiturat reaktif maddelerinden (TBS-RS) olan malondialdehit (MDA) düzeyinin biyokimya bölümünde ölçümü ile belirlendi.

Doku MDA Ölçümü:

Kalp dokusunda MDA düzeyini belirlemek için sıçan kalplerinden ayrılan numuneler tartıldı ve 10µm deferoksamine % 0,04 BHT, %2 Etanol içeren % 1,15'lik KCl çözeltisinde homojenize edildi (parçalandı). Homojenat 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatandan 150 µL alınarak üzerine 1 ml TCA-TBA-HCl [TCA (Trikloroasetik asit) %15, TBA (Tiyobarbitürik asit) %0,375 (W/V= kütle/hacim) ve 0,25 Normalite (N) HCl] reaktifi koyuldu ve 100 °C'de 1 saat inkübe edildi. Soğutma işleminden sonra örnekler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip, süpernatanın absorbansı spektroskopik olarak 532 nm dalga boyunda okundu. Tetrametoksiopropan standart olarak kullanıldı ve sonuçlar nmol/gr yaş doku olarak ifade edildi.

Plazma MDA Ölçümü:

Plazmada MDA düzeyi "Yogi" yöntemi ile ölçüldü. Her bir sıçandan elde edilen 150 µL plazmaya 1,2 ml 0,083 N H₂SO₄ ve 150 µL fosfotungistik asit (%10) ilave edilerek karıştırıldı. 4500 rpm'de 10 dakika santrifüjlenip süpernatant atıldı. Protein çökeleği 2 ml distile su ile yeniden çözüldü ve 500 µL %0,67'lik TBA eklendi. 100 °C'de 1 saat inkübe edildi. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant spektroskopik olarak 532 nm dalga boyunda okundu ve Tetrametoksiopropan standart olarak kullanılarak sonuçlar nmol/ml olarak hesaplandı.

İSTATİKSEL YÖNTEM

İstatiksel analizler “SPSS (Statistical Package for Social Screnu) for Windows©” paket programı kullanılarak bilgisayarda yapıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapmalar ve yüzdeler olarak ifade edildi.

Doksohubisin, Doksohubisin+L-NAME, Doksohubisin+L-NIL gruplarında ışık ve elektron mikroskopik olarak saptanan toksisite bulguları kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Doksohubisin+L-NAME ve Doksohubisin+L-NIL grupları Doksohubisin grubu ile ve birbirleri ile karşılaştırıldı.

Aynı gruba ait sayısal verilerin (ortalamaların) karşılaştırılmasında “Wilcoxon”, farklı gruplar için “Mann Whitney U” testi, nominal verilerin (oranların) karşılaştırılmasında “Fisher” testi kullanıldı. Sonuçta $p \leq 0,05$ olması istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

ETİK KURUL ONAYI

“Doksohubisin’in Kardiyotoksik Etkisi Üzerinde Nitrik Oksitin Rolü” adlı çalışmamız 2005/13 etik kurul dosya kayıt numarası, 12.07.2005 tarihli 400 sayılı raporla Karadeniz Teknik Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığından onay almıştır.

4. BULGULAR

Sıçanların altı haftalık izlem süresi içerisinde, Doksohubisin+L-NIL grubunda yer alan bir sıçan ikinci haftanın sonunda öldü. Sıçanın ölüm nedenini belirlemek amacı ile yapılan otopsisinde ölümünü açıklayacak herhangi bir bulguya rastlanmadı. İzlem süresince doksohubisin alan gruptaki sıçanların aktivitelerinde kontrol grubuna göre belirgin azalma gözlemlendi. Buna karşılık Doksohubisin+L-NAME ve Doksohubisin+L-

NIL grubundaki sıçanların aktiviteleri doksorubisin alan grubun aktivitesine göre daha iyi idi. Aktivite azalmasının dışında sıçanların sağlık durumunda değişiklik izlenmedi.

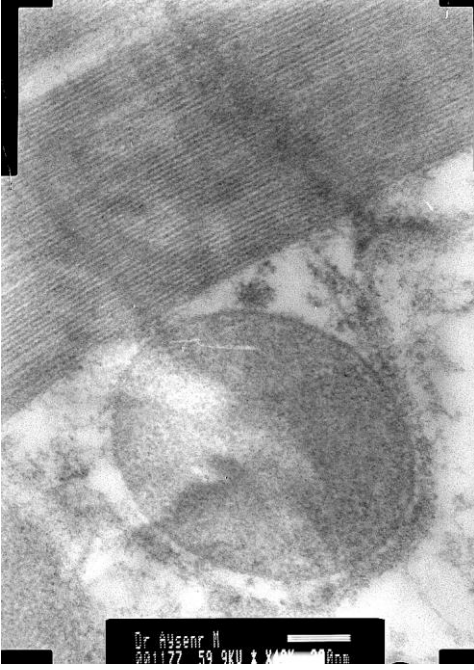
Sıçanların ağırlıkları karşılaştırıldığında (Tablo-1); kontrol grubunda deneyin başından sonuna kadar %12'lik kilo artışı saptandı ($p=0.02$). Buna karşılık grup-II, grup-III ve grup-IV'te sırası ile %12, %7 ve %6 olmak üzere kilo kaybı izlendi. En fazla kilo kaybı tek başına doksorubisin uygulanan grupta saptanmış olup ilk ve son tartı arasında istatistiki olarak anlamlı fark saptandı ($p=0.02$). Grup-III ve grup-IV'te kilo kaybı oranları birbirine yakındı ve bu gruplarda sıçanların başlangıç ve son kiloları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı (sırası ile $p=0.20$ ve $p=0.78$).

Tablo-1: Sıçanların çalışma başlangıcı, çalışma sonu ağırlıklarının karşılaştırılması

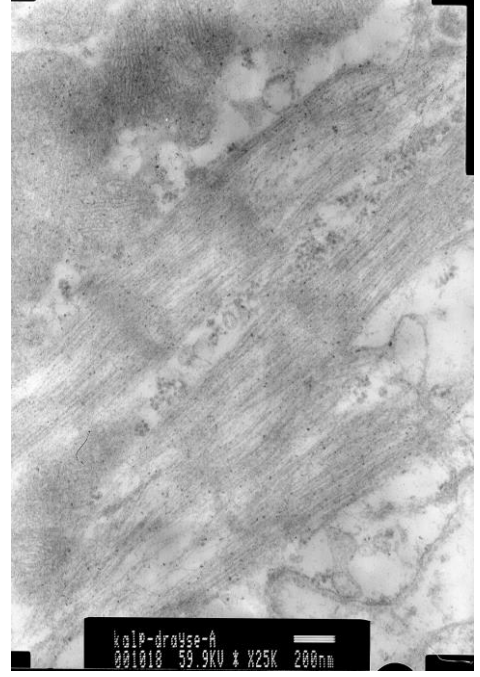
Ağırlık (gr) (ortalama±SD)	Grup-I*	Grup-II*	Grup-III*	Grup-IV*
İlk tartı	260± 8	278± 28	254± 12	258± 14
Son tartı	292±14	246± 35	237± 16	256± 12
Tartı farkı	+ %12	- %12	- %7	- %6
P	0.02	0.02	0.20	0.78

*Grup I= Kontrol, Grup II= Doksorubisin, GrupIII= Doksorubisin+L-NAME, GrupIV= Doksorubisin+L-NIL

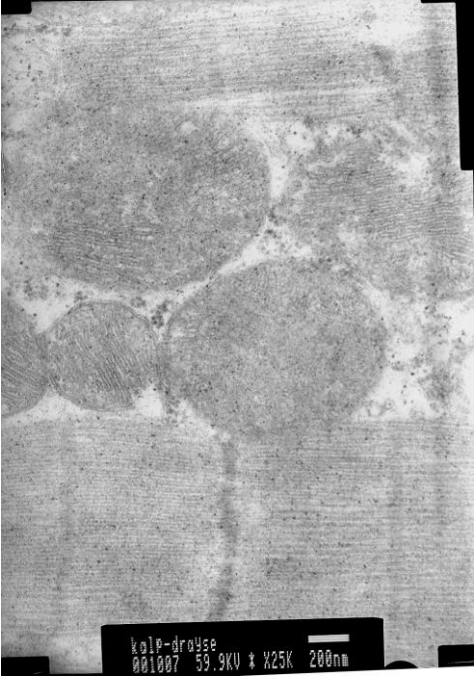
Doksorubisinin tek başına ve NOS inhibitörleri ile birlikte kullanımında ortaya çıkan miyokardiyal toksisite bulguları ışık ve elektron mikroskopi ile histopatolojik olarak değerlendirildi. Grupların elektron mikroskobik incelenmesine ilişkin elde edilen fotoğraflardan birer örnek şekil 6-9'da sunuldu.



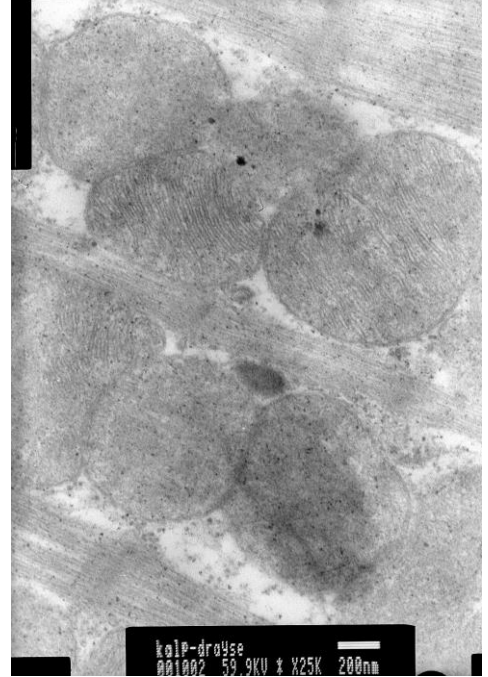
Şekil 6: Kontrol grubu



Şekil 7: Dokсорubisin grubu.



Şekil 8: Dokсорubisin+L-NAME grubu



Şekil 9: Dokсорubisin+L-NIL grubu

Kontrol grubundaki sıçanların hiçbirisinde herhangi bir miyokardiyal toksisite bulgusu saptanmamışken grup-II'deki sıçanların hepsinde histopatolojik olarak en az bir miyokardiyal hasar bulgusu mevcuttu. Grup-II'deki sıçanların %50'sinde miyosit ödemi, miyositlerde vakuolizasyon, miyofibril kaybı, %83'ünde intersitisiel ödem ve sıçanların hepsinde mitokondriyal hasar saptandı. Grup-III ve grup-IV'te ise miyokardiyal toksisite daha düşük oranda tespit edildi. Grup-III'de hiçbir sıçanda miyosit ödemi, intersitisiel ödem, miyositlerde vakuolizasyon, miyofibril kaybı saptanmazken sıçanların %66'sında sarkoplazmik retikulum ödemi ve mitokondriyal hasar bulgusu olduğu görüldü. Grup-IV'te ise sıçanların %80'inde intersitisiel ödem, sarkoplazmik retikulum ödemi, miyositlerde vakuolizasyon görülmezken %40'ında miyosit ödemi ve mitokondriyal hasar bulgusu saptandı. Miyofibril kaybı yoktu (Tablo 2).

Tablo-2: Histopatolojik myokardiyal toksisite bulgularının değerlendirilmesi

Histopatolojik Bulgular	Grup-I*		Grup-II*		Grup-III*		Grup-IV*	
	+(n)	-(n)	+(n)	-(n)	+(n)	-(n)	+(n)	-(n)
	0	6	3	3	0	6	2	3
Miyosit ödemi								
İntersitisiel ödem	0	6	5	1	0	6	1	4
Sarkoplazmik retikulum ödemi	0	6	6	0	4	2	1	4
Miyositlerde vakuolizasyon	0	6	3	3	0	6	1	4
Miyofibril kaybı	0	6	4	2	0	6	0	5
Mitokondriyal hasar	0	6	6	0	4	2	2	3

*Grup I= Kontrol, Grup II= Doksorubisin, GrupIII= Doksorubisin+L-NAME, GrupIV= Doksorubisin+L-NIL
n=Sıçan sayısı

Histopatolojik kardiyak toksisite bulgularının karşılaştırılmasında (Tablo-3); doksorubisin alan grupta intersitisiel ödem, sarkoplazmik retikulum ödemi, miyosit vakuolizasyonu, mitokondriyal hasar kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek oranda pozitif bulundu. Miyosit ödemi ve miyofibril kaybının karşılaştırılmasında ise bir fark bulunamadı. Doksorubisinle beraber L-NAME alan grupta sadece sarkoplazmik retikulum ödemi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda fazla bulundu. Doksorubisinle beraber L-NIL alan grubun kontrol grubu ile toksisite bulguları açısından karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi.

Tablo-3: Kontrol grubu ve ilaç gruplarında toksisite bulgularının karşılaştırılması

Histopatolojik Bulgular	P Değerleri		
	Grup I X II	Grup I X III	Grup I X IV
	>0.05	>0.05	>0.05
Miyosit ödemi			
İntersitisiyel ödem	0.02	>0.05	>0.05
Sarkoplazmik retikulum ödemi	0.002	0.02	>0.05
Miyositlerde vakuolizasyon	0.02	>0.05	>0.05
Miyofibril kaybı	>0.05	>0.05	>0.05
Mitokondriyal hasar	0.002	>0.05	>0.05

*Grup I= Kontrol, Grup II= Doksorubisin, GrupIII= Doksorubisin+L-NAME, GrupIV= Doksorubisin+L-NIL

Histopatolojik toksisite bulguları yönünden tek başına doksorubisin uygulanan grupta, doksorubisinle birlikte L-NAME ve L-NIL alan grupların karşılaştırılmasında; bulgular doksorubisin alan grupta daha belirgin olmakla beraber aralarındaki fark istatistiki olarak anlamlı değildi. Doksorubisin+L-NAME ve Doksorubisin+L-NIL gruplarının kendi aralarındaki karşılaştırılmasında da toksisite bulguları arasında istatistiksel olarak fark izlenmedi.

Lipit peroksidasyonunu göstermek amacı ile ölçülen doku ve plazma MDA düzeyleri karşılaştırıldığında (Tablo-4, Tablo-5); doksorubisin grubunun plazma MDA düzeyi (9.3 ± 3.4), diğer tüm gruplara göre daha yüksek olarak ölçülmüş olup bu değer hem kontrol grubundan hem de Doksorubisin+L-NAME grubundan istatistiki olarak anlamlı derecede farklı idi (sırası ile $p=0.03$, $p=0.03$). Buna karşın doku MDA değerlerinin gruplar arasında belirgin bir fark göstermediği görüldü. Bu durum kalp dokusundan homojenat hazırlanmasının ve MDA tayininin teknik olarak zorluğuna bağlandı.

Tablo-4: Plazma ve doku MDA düzeyleri ve gruplar arası karşılaştırılması

MDA Düzeyi (ortalama \pm SD)	Grup-I*	Grup-II*	Grup-III*	Grup-IV*
Plazma (nmol/ml)	6.2 \pm 0.5	9.3 \pm 3.4	5.6 \pm 1	6.3 \pm 1.4
Doku (nmol/gr yaşdoku)	2.4 \pm 0.8	2.3 \pm 0.7	1.9 \pm 0.6	1.5 \pm 0.1

*Grup I= Kontrol, Grup II= Doksorubisin, GrupIII= Doksorubisin+L-NAME, GrupIV= Doksorubisin+L-NIL

Tablo-5: Plazma ve doku MDA düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması

P Değerleri	Grup I XII	Grup I XIII	Grup I X IV	Grup II X III	Grup II X IV	Grup III X IV
P (plazma)	0.03	0.48	0.8	0.03	0.2	0.42
P (doku)	1	0.39	0.08	0.48	0.3	0.5

*Grup I= Kontrol, Grup II= Doksorubisin, GrupIII= Doksorubisin+L-NAME, GrupIV= Doksorubisin+L-NIL

5. TARTIŞMA

Doksorubisin, çocukluk çağı solid ve hemotolojik kanserlerinde yirmi yıldan uzun süredir yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu bir antineoplastik antibiyotiktir. Ancak kümülatif doza bağımlı olarak gelişen kardiyotoksisite bu ilaçların kullanımını sınırlandırmaktadır (3,24).

Doksorubisine bağlı kardiyak toksisitenin gelişim mekanizmalarının belirlenmesi amacı ile çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bunlardan en fazla kabul gören serbest radikal oluşumuna bağlı gerçekleşen miyokard hasarıdır. Antrasiklinlerin kalp sarkozomunda, mitokondrisinde ve sitoplazmasında ilacın konsantrasyonuna bağlı olarak süperoksit anyonunu ve hidrojen peroksit oluşumunu artırdığı tespit edilmiştir (1,5,6). Serbest radikal oluşumunu azaltan ajanlarla yapılan çalışmalarda da doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin azaltıldığı gösterilmiştir (8,41,42).

Nitrik oksit vasküler tonusun en önemli düzenleyicisidir. Kardiyak fonksiyonlar ve hastalıklar üzerinde önemli rol oynamaktadır. Kardiyak NO üretimi eNOS ve iNOS enzimi vasıtası ile olmaktadır (16,48,59). Bazal NO üretimi kardiyomiyosit kontraktilesini ve kan akımını düzenlerken, aşırı miktarda üretilen NO ise dilate kardiyomiyopati ve konjestif kalp yetmezliği gibi kardiyak patolojilerde rol oynamaktadır (9,46,53,60). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda doksorubisin kardiyotoksisitesinde de NO'nun rolü olduğuna dair bulgular yayınlanmıştır (10,11,13,50).

Bizim çalışmamızda da doksorubisine bağlı kardiyak toksisitede NO'nun rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla sıçanlar üzerinde yapılan deneylerde doksorubisin tek başına ve NOS enzim inhibitörleri (L-NAME ve L-NIL) ile birlikte kullanımında kardiyak toksisite bulguları değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır. Tek başına doksorubisin tedavisi alan sıçanlarda beraberinde L-NIL ve L-NAME alan sıçanlara göre daha yüksek oranda kilo kaybı izlenmiştir. Ayrıca aktivitelerinde de belirgin azalma gözlenmiştir. Literatürde hayvan deneylerinde doksorubisin toksisitesine bağlı klinik bulgular arasında

aktivite azalması, kilo kaybı, asid oluşumu sayılmaktadır. Guerra ve arkadaşları 13,5 mg/kg kümülatif dozda doksorubisin uygulanan sıçanlardan kardiyomiyopati bulguları saptananlarında, kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük kilo alımı olduğunu bildirmişlerdir (11). Hirano S ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; haftalık 1,25 mg/kg, 4 hafta (total doz 5 mg/kg) ve 2,5 mg/kg, 4 hafta (total doz 10 mg/kg) intravenöz doksorubisin verilen sıçanların ağırlıklarında kardiyomiyopati bulgularına paralel olarak azalma olduğu görüldüğü, bunun özellikle 2,5 mg/kg/hafta tedavi alan grupta daha belirgin olduğu rapor edilmiştir (74). Deneysel çalışmalarda sıçanlarda 1,5-3 mg/kg/hafta intravenöz yada intraperitoneal yoldan 5-9 hafta (10-20 mg/kg kümülatif dozlarda) doksorubisin uygulanmak suretiyle oluşturulan kardiyotoksisite modellerinde saptanan histopatolojik bulgular insandakine benzerdir. Sıçan kalbinin ışık ve elektron mikroskopik incelemesinde sitoplazmik vakuolizasyon, miyofibril kaybı, sarkoplazma ödemi, mitokondrielerde hasar rapor edilmiştir (7,75). Bizim çalışmamızda da sıçan kalbinin histopatolojik incelenmesinde doksorubisin alan grupta belirgin kardiyak hasar bulguları izlenmiştir. Özellikle intersitisiyel ödem ($p=0.02$), sarkoplazmik retikulum ödemi ($p=0.002$), miyositlerde vakuolizasyon ($p=0.02$), mitokondriyal hasar ($p=0.002$) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Doksorubisin+L-NAME, Doksorubisin+L-NIL alan gruplarda da kardiyak toksisite bulguları izlenmiş olmakla beraber kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık gösterilememiştir.

Literatürde doksorubisine bağlı kardiyak hasarda NO'nun katkısına ilişkin ilk yapılan çalışmalardan birisi Guerra ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada sıçanlara dokuz hafta boyunca 1,5 mg/kg (total doz 13,5 mg/kg) doksorubisin verilerek plazma NO düzeyi ölçülmüştür. Sıçan kalplerinin histopatolojik incelemesinde kardiyak hasar bulguları tespit edilmiş ve plazma NO düzeyinin kontrol grubuna göre belirgin olarak yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada kardiyomyopati skoru ile NO düzeyi arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (11). Sayed Ahmed ve arkadaşları ise sıçanlara hem tek doz yüksek doz doksorubisin (20 mg/kg) hem de giderek artan dozlarda günlük doksorubisin (5-25 mg/kg) verdikten sonra kardiyak NO düzeyini ölçmüşler. Tek ve artan dozlarda kümülatif doksorubisin uygulanmasına bağlı kardiyotoksisitede kardiyak NO düzeyinin arttığını göstermiştir. Ancak plazma NO düzeyinde artış saptayamamışlar ve doksorubisine bağlı NO artışının dokuya spesifik olduğunu öne sürmüşlerdir (10).

Doksohubisin ile yirmidört saat inkübe edilen sıçan kardiyak hücre kültüründe yapılan çalışmada da doksohubisinin hem hücrelerde NOS aktivitesini hem de süpernatanda NO miktarını belirgin olarak artırdığı ve bu artışın demir eklenmesi ile inhibe edildiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada doksohubisinin kardiyomiyositlerde NO sentezini, demir hemostazını etkileyerek artırdığı sonucuna varılmıştır (12). Fadilloğlu ve arkadaşları sıçanlara doksohubisinle beraber erdostein vererek kalp dokusunda NO düzeyini ölçmüşler ve NO düzeyini diğer gruplara göre tek başına doksohubisin alan grupta belirgin olarak yüksek bulmuşlardır (76). Bizim çalışmamızda da NOS inhibitörlerinin kullanımı ile doksohubisin kardiyotoksisitesinin şiddetinin azaltılmasının, doksohubisinin kalpte NO artışına neden olduğunu dolaylı olarak gösterdiği düşünülmüştür. Nitekim literatürde de doksohubisine bağlı NO artışının antioksidanlar ve NOS inhibitörleri ile engellendiğini gösteren yayınlar mevcuttur. Aldieri ve arkadaşları doksohubisin uygulanan hücre kültür vasatına NG-nitro-L-arjinin metil ester, L-canavanin, NG-monometil-L-arjinin gibi farklı NOS inhibitörleri ekleyerek NO üretiminin baskılandığını göstermişlerdir (12). Fadilloğlu ve arkadaşlarının çalışmasında da antioksidan etkili mukolitik bir ajan olan erdosteinin doksohubisinle beraber uygulamasında plazma NO düzeyi tek başına doksohubisin alan gruba göre daha düşük bulunmuştur (76).

Doksohubisinin neden olduğu kardiyak NO artışının iNOS aracılığı ile gerçekleştiği saptanmıştır. Aldieri ve arkadaşları kalp hücrelerinde doksohubisinle muameleden sonra NO miktarının artmasının iNOS gen ekspresyonunda artma ile birlikte olduğunu göstermiştir (12). Pacher ve arkadaşları da iNOS geni delesyona uğratılmış farelerde doksohubisin uygulaması sonrası kardiyak fonksiyonların daha iyi korunduğunu tespit etmişlerdir (77). Weinstein ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada farelere doksohubisin uygulandığında miyokardiyal iNOS'un arttığı immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir (73). Kardiyak iNOS'un indüksiyonunun, intrinsek antioksidan olan glutatyon peroksidazın inaktivasyonuna neden olarak oksidatif stresin neden olduğu miyokardiyal hasarı artırdığı gösterilmiştir (14).

Çeşitli çalışmalarda NOS inhibitörlerinin doksohubisin kardiyotoksisitesini önlediği gösterilmiştir. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz inhibitörü Aminoguanidinin doksohubisinle beraber sıçanlara verilmesinin doksohubisine bağlı mortalite oranını, asit gelişimini azalttığı ve sıçan kalbinde histopatolojik değişiklikleri düzelttiği izlenmiştir (78). Aynı şekilde Pacher ve arkadaşlarının doksohubisinle beraber Aminoguanidin verilen farelerde

yaptığı çalışmada doksorubisine bağlı gelişen kardiyak fonksiyonlardaki bozulmanın ve mortalitenin azaldığı, kalp dokusundaki histopatolojik değişikliklerin düzeldiği gösterilmiştir (77). Barnabe ve arkadaşlarının neonatal sıçan kardiyak miyositlerinden hazırlanan hücre kültürlerinde yaptıkları çalışmada, doksorubisinle inkübasyon öncesinde vasata NOS inhibitörleri olan L-NAME ve NG-monometil-L-arjinin(L-NMMA) eklenmiştir. Sonuçta L-NAME ve L-NMMA'nın tedavi öncesi verilmesinin miyositlerde doksorubisine bağlı gelişen hasarı engelleyebileceği tespit edilmiştir (79). Bizim çalışmamızda da iNOS inhibitörü olan L-NIL ve nonspesifik NOS inhibitörü olan L-NAME'in doksorubisine bağlı histopatolojik toksisite bulgularında azalma sağladığı gösterilmiştir.

Doksohubisin kardiyotoksitesinde miyokarda NO oluşumunun katkısı gösterildikten sonra NO'nun hangi mekanizma ile miyokarda hasara neden olduğu da araştırma konusu olmuştur. Bu konuda yapılan çalışmalar NO'nun yine doksohubisin tarafından oluşturulan süperoksit ile birlikte peroksinitrit oluşumuna katkıda bulunduğunu göstermektedir. Doksohubisin toksisitesi serbest radikal oluşumuna bağlıdır. Oksijen ve hidroksil serbest radikalleri NADPH sitokrom P 450 redüktaz ve mitokondrial NADH dehidrogenaz gibi flavo enzimlerin katalize ettiği doksohubisin redoks siklusu ile üretilmektedir. Bu enzimler doksohubisine bağlı kardiyomiyopati gelişimine katkıda bulunmaktadır. Nitrik oksit sentaz yapısal olarak P-450 redüktaza benzer ve doksohubisin metabolizmasında benzer rol oynayabileceği düşünülmüştür (13,16,72). Nitrik oksit sentazın üç izoformu da tümör dokusunda doksohubisin-redoks siklusunu katalize etme ve serbest radikal oluşturma kapasitesine sahiptir. Bu enzimlerden doksohubisine en yüksek afiniteyi gösteren eNOS'tur. Doksohubisin eNOS'un redüktaz domainine bağlanmakta ve semikinon formuna indirgenmektedir. Semikinon radikal hızla oksijen ile reaksiyona girerek süperoksit oluşturur. Hipoksik durumda tüm NOS izoformları doksohubisini indirgeyerek süperoksit oluşturmaktadır (13,16). İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enzimi tarafından üretilen yüksek miktardaki NO, oluşan süper oksit anyonu ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturmaktadır. Oluşan peroksinitrit hücresel yapıları oksitler ve lipit peroksidasyonuna neden olarak miyokardiyal oksidatif hasara, apoptozise ve nekroza katkıda bulunmaktadır (14-16,80). Sonuç olarak oksijen radikalleri ve peroksinitrite bağlı olarak lipit peroksidasyon ürünlerinin miktarında artma saptanabilmektedir. Weinstein ve arkadaşları yaptıkları çalışmada farelere tek doz 25 mg/kg doksohubisin uygulandıktan beş

gün sonra sol ventrikül fonksiyonlarını ve kardiyak peroksinitrit oluşumunu değerlendirmişlerdir. Kontrol grubuna göre sol ventrikül kısalma fraksiyonunda ve kardiyak atımda belirgin azalma saptamışlardır. İmmunhistokimyasal analizle iNOS ve 3-nitrotirozin (peroksinitritin belirteci) oluşumunun doksorubisinle tedavi edilen fare grubunda anlamlı oranda artmış olduğunu ve bu artışın kısalma fraksiyonu ile anlamlı olarak korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir (73). Packer ve arkadaşları da doksorubisin verilen ve sol ventrikül fonksiyonlarında bozulma saptanan farelerde kardiyak dokuda lipit peroksidasyon ürünü olarak MDA'nın arttığını ve peroksinitrit dekompozisyon katalizatoru olan FP15 ile bu artışın engellendiğini göstermişlerdir (77). Fadıllıoğlu ve arkadaşlarının sıçanlara doksorubisinle beraber koruyucu olarak antioksidan etkili erdostein vererek yaptıkları çalışmada; plazma ve eritrositlerde lipit peroksidasyonunun tek başına doksorubisin alan grupta belirgin arttığı izlenmiştir. Doksorubisin tedavisi ile erdostein verilmesinin hücre içi ve hücre dışı lipit peroksidasyonunu engellediği ve bu şekilde koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (81). Ayrıca erdostein iNOS enzimini inhibe ederek NO üretimini önlediği ve böylece peroksinitrit oluşumunu engellediği yorumu yapılmıştır (76). Bizim çalışmamızda da lipit peroksidasyon ürünü olan MDA'nın doksorubisin alan sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir. L-NAME ve L-NIL gruplarında MDA düzeyinin doksorubisin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede az arttığı görülmüştür. Bu da NO sentezinin önlenmesinin doksorubisin kardiyotoksitesinden koruyucu olduğunu destekleyen diğer bir bulgudur.

Sonuç olarak bizim bulgularımızı ve literatürdeki bulguları birlikte değerlendirdiğimizde NO'nun hem peroksinitrit oluşumu yolu ile lipit peroksidasyonuna neden olarak hem de apoptozisi indükleyerek kardiyak toksisitede rol oynadığı düşünülmüştür.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1- Doksorubisin (Grup II) tedavisi alan sıçanlarda beraberinde L-NIL (Grup IV) ve L-NAME (Grup III) alan sıçanlara göre daha yüksek oranda kilo kaybı izlendi. Kilo kaybı grup II'de istatistiki olarak anlamlıyken grup III ve IV'te anlamlı değildi. Ayrıca grup II'deki sıçanların aktivitelerinde de belirgin azalma mevcuttu. Doksorubisin alan gruptaki kilo kaybı ve aktivite azalması toksisite bulgusu olarak değerlendirildi.

2- Doksorubisin uygulanan sıçanların kalbinin histopatolojik incelenmesinde belirgin kardiyak hasar tespit edildi. İntersitisiyel ödem ($p=0.02$), sarkoplazmik retikulum ödemi ($p=0.002$), miyosit vakuolizasyonu ($p=0.02$), mitokondrial hasar ($p=0.002$) kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek oranda pozitif bulundu.

3- Doksorubisin+L-NAME, Doksorubisin+L-NIL alan gruplarda da kardiyak toksisite bulguları izlenmekle beraber kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında fark istatistiki olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

4- Doksorubisin alan grupta lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak plazma MDA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede ($p=0.03$) yüksek bulunduğu saptandı.

5- L-NAME ve L-NIL gruplarında plazma MDA düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark izlenmedi. Ayrıca artışın doksorubisin grubuna göre daha az olduğu gözlemlendi.

6- İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enzim inhibitörü olan L-NIL ve nonspesifik NOS inhibitörü olan L-NAME'in doksorubisin kardiyak toksisitesine neden olan lipit peroksidasyonunda ve toksisiteye bağlı histopatolojik bulgularda azalma sağladığı gösterildi.

7- Nitrik oksit sentaz inhibitörlerinin kullanımı ile doksorubisin kardiyotoksitesinin şiddetinin azalmasının, dolaylı olarak doksorubisin verilmesi sırasında kalpte NO'nun arttığını gösterdiği düşünüldü. Sonuç olarak NO'nun doksorubisine bağlı kardiyotoksistide rol oynadığı düşünüldü.

8- Doksorubisinin kardiyotoksik etkisinde NO'nun rolünün belirlenmesinden sonra, NO sentezini önleyerek peroksinitrit oluşumunu azaltan ajanların doksorubisin tedavisi ile beraber uygulanması ile ilgili çalışmaların önü açılmıştır. Bizim çalışmamızda da NOS inhibitörlerinin doksorubisine bağlı kardiyak toksistide koruyucu olduğunun gösterilmesi gelecekte bu tür ajanların tedavide kullanılabileceği sonucunu ortaya çıkarmaktadır.

7. ÖZET

DOKORUBİSİN'İN KARDİYOTOKSİK ETKİSİ ÜZERİNDE NİTRİK OKSİTİN ROLÜ

Doksoşubisin çocukluk çağı kanserlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmakta olan bir antrasiklin antibiyotik olup en önemli yan etkisi kümülatif doza bağımlı kardiyotoksisite gelişimidir. Doksoşubisine bağlı gelişen kardiyotoksisite mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen en fazla kabul gören görüş serbest radikallerin miyokard hücrelerini hasara uğratmasıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda doksoşubisin kardiyotoksisitesinde nitrik oksitin (NO) rolü olduğuna dair bulgular elde edilmiştir. Bu çalışmada da doksoşubisine bağlı kardiyak toksisitede NO'nun rolünün araştırılması amaçlandı. Doksoşubisinin tek başına ve nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörleri ile birlikte kullanımında miyokardiyal hasarın derecesi ve lipit peroksidasyon ürünlerinin düzeyi belirlendi.

Çalışmada 12 haftalık 24 adet erkek "Sprague Dawley" sıçan (ortalama ağırlık 262±18 gr) rastgele dört gruba (n=6) dağıtıldı. Birinci grup kontrol olarak ayrıldı. İkinci gruba haftada bir kez 3 mg/kg, beş hafta (toplam 15 mg/kg) doksoşubisin (Carlo Erba, Türkiye) uygulandı. Üçüncü ve dördüncü gruba her doksoşubisin enjeksiyonundan 30 dakika önce sırası ile nonselektif NOS inhibitörü L-NAME (30 mg/kg) ve indüklenebilir NOS inhibitörü L-NIL (3 mg/kg) verildi. Çalışma süresince sıçanların sağlık durumu değerlendirildi ve haftada iki kez tartıldı. Altıncı haftada kalbin sol ventrikülünden alınan parçalar elektron ve ışık mikroskopik inceleme ve lipit proksidasyonu tayini için gerekli solüsyonların içine koyuldu. Ayrıca plazma lipit peroksidasyonunun belirlenmesi amacı ile sıçanlardan kan alındı. Myokardiyal toksisite bulguları ve malondialdehit (MDA) düzeyleri "Fisher", "Mann Whitney U" ve "Wilcoxon" testi kullanılarak karşılaştırıldı.

Kontrol grubunda %12'lik kilo artışı saptanırken, grup-II, grup-III ve grup-IV'te sırası ile %12, %7 ve %6 olmak üzere kilo kaybı izlendi. En fazla kilo kaybı tek başına doksoşubisin uygulanan grupta saptanmış olup ilk ve son tartı arasında istatistiki olarak anlamlı fark saptandı (p=0.02). Kontrol grubu ile doksoşubisin alan grup arasında miyokard hücresindeki vakuolizasyon, intersitisiyel ödem, miyofibril kaybı, sarkoplazmik retikulum şişmesi ve mitokondriyal zedelenme gibi toksisite bulguları açısından önemli farklılık saptandı (sırası ile p=0.015, p=0.015, p=0.06, p=0.002, p=0.002). Doksoşubisinle birlikte L-NAME ve L-NIL uygulanan sıçanlarda kardiyak toksisite bulguları saptanmakla birlikte kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiki olarak anlamlı değildi. Lipit peroksidasyonu tayini için ölçülen plazma MDA düzeyi Doksoşubisin grubunda (9.3± 3.4), diğer tüm gruplara göre daha yüksek olarak ölçülmüş olup bu değer hem kontrol grubundan hem de Doksoşubisin+L-NAME grubundan istatistiki olarak anlamlı derecede farklı idi (sırası ile p=0.03, p=0.03).

Sonuç olarak doksoşubisinle beraber NOS inhibitörleri uygulandığında kardiyak toksisite bulgularında anlamlı azalma olduğü gösterilmiştir. Bu sonuçlar doksoşubisine bağlı kardiyotoksisitede NO'nun katkısı olduğü görüşünü desteklemektedir.

8. SUMMARY

THE ROLE OF NITRIC OXIDE IN DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOTOXICITY

Doxorubicin is widely used in the treatment of malignant tumors. Its use is limited by cardiotoxicity which is related to generation of oxygen derived free radicals. In this study we aimed to investigate the possible role of nitric oxide (NO) on doxorubicin induced cardiotoxicity. We evaluated the myocardial damage in rats treated with doxorubicin alone and in combination with NO synthase (NOS) inhibitors. The level of lipid peroxidation product was also determined.

Twenty-four male "Sprague-Dawley" rats (12 weeks old, weighing 262 ± 18 gr) were randomly divided into four groups (n=6): Group-I, was assigned to control group. In group-II, rats were treated with weekly i.p. injections of 3 mg/kg doxorubicin (Carlo Erba, Türkiye) for five weeks. In group-III, rats received weekly i.p. injection of 30 mg/kg L-NAME (non-specific NOS inhibitor) 30 minutes before doxorubicin injection, for five weeks. In group-IV, rats received weekly i.p. injection of 3 mg/kg L-NIL (inducible NOS inhibitor) 30 minutes before doxorubicin injection, for five weeks. Rats were weighed two times a week. At six weeks animals were anesthetized and hearts were excised and then fixed for light and electron microscopy, and tissue lipid peroxidation. Moreover, blood samples were obtained for measuring plasma lipid peroxidation. The pathologic findings of myocardial toxicity and the levels of malonyldialdehyde (MDA) for each group were compared by using "Fisher", "Mann Whitney U" and "Wilcoxon" test.

Weight loss was observed in group-II, group-III and group-IV (12%, 7%, and 6% respectively), while 12% weight increase was obtained in control group. Weight loss was statistically significant in doxorubicin group ($p=0.02$). Findings of myocardial damage in animals treated with doxorubicin, (such as cytoplasmic vacuolization, interstitial edema, loss of myofibrils, dilatation of sarcoplasmic reticulum, mitochondrial damage) were significantly more than control group ($p=0.015$, $p=0.015$, $p=0.06$, $p=0.002$, $p=0.002$, respectively). Histopathological findings of cardiotoxicity in rats treated with doxorubicin in combination with L-NAME and L-NIL were not significant compared with control group. The level of plasma MDA in doxorubicin group (9.3 ± 3.4) was higher than those of all other groups. There is a statistically significant difference in MDA level between control group and doxorubicin group; and between doxorubicin and doxorubicin+L-NAME group ($p=0.03$, $p=0.03$, respectively).

In conclusion, our results showed that the findings of doxorubicin cardiotoxicity were meaningfully decreased, when doxorubicin was given with NO synthase inhibitors. These findings supported that NO and NO-related oxidative mechanism might be contributed to the doxorubicin cardiotoxicity.

9. KAYNAKLAR

1. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E et al: Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, 56:185-229, 2004.
2. **Paulides M, Kremers A, Stöhr W et al: Prospective longitudinal evaluation of doxorubicin-induced cardiomyopathy in sarcoma patients: A report of the late effects surveillance system(LESS). *Pediatr Blood Cancer*, 46:489-495, 2006.**
3. Kremer LC, van Dalen EC, Offringa M et al: Anthracycline-induced clinical heart failure in a cohort of 607 children: Long-term follow-up study. *J Clin Oncol*, 19:191-196, 2001.
4. Doroshow HJ: Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Research*, 43:460-472, 1983.
5. Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ et al: Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmac Ther* Vol, 47:219-231, 1990.
6. Iarussi D, Indolfi P, Casale F et al: Recent advances in the prevention of anthracycline cardiotoxicity in childhood. *Current Medicinal Chemistry*, 8:1649-1660, 2001.
7. Morishima I, Matsui H, Mukawa H et al: Melatonin, a pineal hormone with antioxidant property, protect against adriamycin cardiomyopathy in rats. *Life Sciences*, 63:511-521, 1998.
8. Villani F, Galimberti M, Monti E et al: Effect of glutathione and N-acetylcysteine on in vitro and in vivo cardiac toxicity of doxorubicin:. *Free Radic Res Commun*, 11:145-151, 1990.
9. Vallance P, Hingorani A: Endothelial nitric oxide in humans in health and disease. *Int J Exp Path*, 80:291-303, 1999.

10. Sayed-Ahmed M, Khattab MM, Gad MZ et al: Increased plasma endothelin-1 and cardiac nitric oxide during doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Pharmacology and Toxicology*, 89:140-144, 2001.
11. Guerra J, Jesus A, Santiago-Berraro P et al: Plasma nitric oxide levels used as indicator of doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *The Hematology Journal*, 5:584-588, 2005.
12. Aldieri E, Bergabdi L, Riganti C et al: Doxorubicin induces an increase of nitric oxide synthesis in rat cardiac cells that is inhibited by iron supplementation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 85:85-90, 2002.
13. Vasquez-Vivar J, Martasek P, Hogg N et al: Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin. *American Chemical Society*, 38:11293-11297, 1997.
14. Igarashi J, Nishida M, Hoshida S et al: Inducible nitric oxide synthase augments injury elicited by oxidative stress in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 274:245-252, 1998.
15. Radi R, Beckman JS, Bush KM et al: Peroxynitrite oxidation of Sulfhydryls, the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 266:4244-4250, 1991.
16. Garner AP, Paine MJI, Rodriguez-Crespo I et al: Nitric oxide synthases catalyze the activation of redox cycling and bioreductive anticancer agents. *Cancer Research*, 59:1929-1934, 1999.
17. Bleyer WA. The impact of childhood cancer on the United States and the world: *CA Cancer J Clin*, 40:355-367, 1990.
18. Caprino D, Wiley TJ, Massimo L: Childhood cancer survivors in the dark. *J Clin Oncol*, 22:2748-2750, 2004.
19. Birtle AJ: Anthracyclines and cardiotoxicity. *Clin Oncol*, 12:146-152, 2000.
20. Shan K, Lincoff AM, Young JB: Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Ann Intern Med*, 125:47-58, 1996.

21. Von Hoff DD, Layard MW, Basa P et al: Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med*, 91:710-717, 1979.
22. Goorin AM, Borow KM, Goldman A et al: Congestive heart failure due to adriamycin cardiotoxicity: Its natural history in children. *Cancer*, 47:2810-2816, 1981.
23. Sallan SE, Clavell LA: Cardiac effects of anthracyclines used in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia: A 10-year experience. *Semin Oncol*, 11:19-21, 1984.
24. Kremer LC, van der Pal HJH, Offringa M et al. Frequency and risk factors of subclinical cardiotoxicity after anthracycline therapy in children: A systematic review. *Ann Oncol*, 13:819-829, 2002.
25. Kremer LC, van Dalen EC, Offringa M et al: Frequency and risk factors of anthracycline-induced clinical heart failure in children: A systematic review. *Ann Oncol*, 13:503-512, 2002.
26. Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S et al: A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer*, 32:302-314, 1973.
27. Druck MN, Gulenchyn KY, Evans WK et al: Radionuclide angiography and endomyocardial biopsy in the assessment of doxorubicin cardiotoxicity. *Cancer*, 53:1667-1674, 1984.
28. Bu'lock FA, Mott MG, Oakhill A et al: Early identification of anthracycline cardiomyopathy: possibilities and implications. *Arch Dis Child*, 75:416-422, 1996.
29. Singal PK, Iliskovic N: Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 339:900-905, 1998.
30. Bristow MR, Mason JW, Billingham ME et al: Doxorubicin cardiomyopathy: evaluation by phonocardiography, endomyocardial biopsy, and cardiac catheterization. *Ann Intern Med*, 88:168-175, 1978.

31. Herman HE, Zhang J, Lipshultz SE et al: Correlation Between serum levels of cardiac troponin-t and the chronic cardiomyopathy induced by doxorubicin. *J Clin Oncol*, 17:2237-2243, 1999.
32. Bauch M, Ester A, Kimura B et al: Atrial natriuretic peptide as a marker for doxorubicin-induced cardiotoxic effects. *Cancer*, 69:1492-1497, 1992.
33. Billingham ME, Mason JW, Bristow MR et al: Anthracycline cardiomyopathy by morphologic changes. *Cancer Treat Rep*, 62:865-872, 1978.
34. Myers CE, McGuire WP, Liss RH et al: Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science*, 197:165-167, 1977.
35. De Beer EV, Bottone AE, Voest EE: Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review. *European Journal of Pharmacology*, 415:1-11, 2001.
36. Robison TW, Giri SN: Effects of chronic administration of doxorubicin on myocardial beta-adrenergic receptors. *Life Sci*, 39:731-736, 1986.
37. Singal PK, Pierce GN: Adriamycin stimulates low-affinity Ca^{2+} binding and lipid peroxidation but depresses myocardial function. *Am J Physiol*, 250:H419-425, 1986.
38. Ehrke MJ, Maccubbin D, Ryoyama K et al: Correlation between adriamycin-induced augmentation of interleukin 2 production and of cell-mediated cytotoxicity in mice. *Cancer Res*, 46:54-60, 1986.
39. Raziuddin S, Sheikha A, Abu-Eshy S et al: Circulation levels of cytokines and soluble cytokine receptors in various T-cell malignancies. *Cancer*, 73:2426-2431, 1994.
40. Kalyanaraman B, Joseph J, Kalivendi S et al: Doxorubicin-induced apoptosis: Implications in cardiotoxicity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 234/235:119-124, 2002.
41. Sonneveld P: Effect of alpha-tocopherol on the cardiotoxicity of adriamycin in the rat. *Cancer Treat Rep*, 62:1033-1036, 1978.

42. Shimpo K, Nagatsu T, Yamada K et al: Ascorbic acid and adramycin toxicity. *Am J Clin Nutr*, 54:1298-1301, 1991.
43. Herman HE, Ferrans VJ: Timing of treatment with ICRF-87 and its effect on chronic doxorubicin cardiotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol*, 32:445-449, 1993.
44. Mimnaugh EG, Trush MA, Bhatnagar M et al: Enhancement of reaktive oxygen-dependent mitochondrial membrabe lipid peroxidation by the anticancer drug adriamycin. *Biochem Pharmacol*, 34:847-856, 1985.
45. Sawyer DB, Fukozawa R, Arstall MA et al: Daunorubicin-induced apoptosis in rat cardiac myocytes is inhibited by dexrazoxone. *Circ Res*, 84:257-265, 1999.
46. Moncada S: Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med*, 92:164-169, 1999.
47. Pignatti C, Stefanelli C: Ischemia/reperfusion-induced apoptosis: connecting nitric oxide and cell cycle regulators. *Cardiovascular Research*, 59:268-270, 2003.
48. Habib FM, Springall DR, Davies GJ et al: Tumour necrosis factor and inducible nitric oxide synthase in dilated cardiomyopathy. *Lancet*, 347:1129-1130, 1996.
49. de Belder AJ, Radomski MW, Why HJ et al: Nitric oxide synthase activities in human myocardium. *Lancet*, 13:341-348, 1993.
50. Kalivendi SV, Kotamraju S, Zhao H et al: Doxorubicin-induced apoptosis is associated with increased transcription of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 50:47266-47276, 2001.
51. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288:373-376, 1980.
52. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS et al: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci*, 84:9265-9269, 1987.

53. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327:524-526, 1987.
54. Desai KM, Zembowicz A, Sessa WC et al: Nitroergic nerves mediate vagally induced relaxation in the isolated stomach of the guinea pig. *Proc Natl Acad Sci*, 88:11490-11494, 1991.
55. Whittle BJ: Nitric oxide-a mediator of inflammation or mucosal defence. *Eur J Gastroenterol hepatol*, 9:1026-1032, 1997.
56. Griffith OW, Kilbourn RG: Nitric oxide synthase inhibitors: amino acids. *Methods in enzymology*, 268:375-392, 1996.
57. Hare JM: Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35:719-729, 2003.
58. Knowles RG, Moncada S: Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 298:249-258, 1994.
59. Balligand J, Cannon PJ: Nitric oxide synthases and cardiac muscle, autocrine and paracrine influences. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17:1846-1858, 1997.
60. Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V: Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol*, 113:147-156, 1998.
61. Kirkeboen KA, Strand OA: The role of nitric oxide in sepsis-an overview. *Acta Anaesthesiol Scand*, 43:275-288, 1999.
62. Nonami Y: The role of nitric oxide in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Jpn Circ J*, 61:119-132, 1997.
63. Toutouzas PC, Tousoulis D, Davies GJ: Nitric oxide synthase in atherosclerosis. *European Heart Journal*, 19:1504-1511, 1998.
64. Araujo M, Welch WJ: Oxidative stress and nitric oxide in kidney function. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 15:72-77, 2006.

65. Prabhakar SS: Pathogenic role of nitric oxide alterations in diabetic nephropathy. *Curr Diab Rep*, 5:449-454, 2005.
66. Szabo C: Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. *Brain Res Bull*, 41:131-141, 1996.
67. Kubes P, Suzuki M, Granger DN: Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci*, 88:4651-4655, 1991.
68. Haywood GA, Tsao PS, Leyen HE et al: Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation*, 93:1087-1094, 1996.
69. Habib FM, Springall DR, Davies GJ et al: Tumour necrosis factor and inducible nitric oxide synthase in dilated cardiomyopathy. *Lancet*, 347:1151-1155, 1996.
70. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD et al: Negative inotropic effect of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science*, 257:387-389, 1992.
71. Johnson G, Tsao PS, Lefer AM: Cardioprotective effects of authentic nitric oxide in myocardial ischemia with reperfusion. *Crit Care Med*, 19:244-252, 1991.
72. Drummond GR, Cai H, Davis ME et al: Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res*, 86:347-354, 2000.
73. Weinstein DM, Mihm MJ, Bauer JA: Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *Pharmacology*, 294:396-401, 2000.
74. Hirano S, Wakazono K, Agata N et al: Comparison of cardiotoxicity of pirarubicin, epirubicin and doxorubicin in rat. *Drugs Exptl Clin Res*, 20:153-160, 1994.
75. Zhou S, Starkov A, Froberg MK et al: Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. *Cancer Research*, 61:771-777, 2001.

- 76.** Fadilloğlu E, Yılmaz HR, Erdoğan H et al: The activities of tissue xanthine oxidase and adenosine deaminase and the levels of hydroxyproline and nitric oxide in rat hearts subjected to doxorubicin: protective effect of erdosteine. *Toxicology*, 191:153-158, 2003.
- 77.** Pacher P, Liaudet L, Bai P et al: Potent metalloporphyrin peroxynitrite decomposition catalyst protects against the development of doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Circulation*, 107:896-910, 2003.
- 78.** Mostafa AM, Nagi MN, AL Rikabi AC et al: Protective effect of aminoguanidine against cardiovascular toxicity of chronic doxorubicin treatment in rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 106:193-202, 1999.
- 79.** Barnabe N, Marusak RA, Hasinoff BB: Prevention of doxorubicin-induced damage to rat heart myocytes by arginine analog nitric oxide synthase inhibitors and their enantiomers. *Nitric Oxide*, 9:211-216, 2003.
- 80.** Adams V, Jiang H, Yu J et al: Apoptosis in skeletal myocytes of patients with chronic heart failure is associated with exercise intolerance. *J Am Coll Cardiol*, 33:959-965, 1999.
- 81.** Fadilloğlu E, Erdoğan H: Effects of erdosteine treatment against doxorubicin-induced toxicity through erythrocyte and plasma oxidant/antioxidant status in rats. *Pharmacological Research*, 47:317-322, 2003.