



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KARDİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ERİŞKİN RATLARDA DOKSORUBİSİN İLE
OLUŞTURULAN KARDİYOTOKSİSİTENİN
KARVEDİLOL VE/VEYA İVABRADİN İLE
ÖNLENMESİ/AZALTILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. EVRİN DAĞTEKİN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ceyhun CEYHAN

AYDIN-2013

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KARDİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ERİŞKİN RATLARDA DOKSORUBİSİN İLE
OLUŞTURULAN KARDİYOTOKSİSİTENİN
KARVEDİLOL VE/VEYA İVABRADİN İLE
ÖNLENMESİ/AZALTILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. EVRİN DAĞTEKİN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ceyhun CEYHAN

**ADÜ Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TPF-13012 sayılı proje ile
desteklenmiştir**

AYDIN-2013

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sürecinde emeği geçen, mesleki bilgi ve birikimlerini bana aktaran, Kardiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden başta tez hocam Prof. Dr. Ceyhan Ceyhan olmak üzere, Prof. Dr. Tarkan Tekten, Prof. Dr. Alper Onbaşılı, Yrd. Doç. Dr. Ufuk Eryılmaz, Yrd. Doç. Dr. Çağdaş Akgüllü, Yrd. Doç. Dr. Hasan Güngör ve Yrd. Doç. Dr. Cemil Zencir'e teşekkür ederim.

Bu süreçte birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum Kardiyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlisi arkadaşlarıma, hemşire ve personeline en derin sevgilerimi, eğitimim süresince her zaman yanımda hissettiğim ve büyük desteklerini gördüğüm, sevgili eşime ve aileme minnet ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Evrin Dağtekin

Aydın 2013

İÇİNDEKİLER

Teşekkür	i
Kısaltmalar Dizini.....	iii
Tablolar Dizini.....	v
Şekiller Dizini.....	vi
Resimler Dizini.....	vii
1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	3
2.1. Doksorubisin.....	3
2.2. Karvedilol.....	11
2.3. İvabradin.....	13
2.4. Oksidatif denge.....	16
2.5. İnflamasyon ve kalp yetmezliği.....	26
3. Yöntem ve gereçler.....	28
4. Bulgular.....	35
5. Tartışma	45
6. Sonuç ve öneriler.....	52
Özet.....	53
Summary	55
Kaynaklar	57

KISALTMALAR DİZİNİ

- DOX: Doksorubisin
SOR: Serbest Oksijen Radikali
NO: Nitrik Oksid
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
ADMA: Asimetrik Dimetilarjinin
NYHA: “New York Heart Association”
KY: Kalp Yetmezliği
iv: İntravenöz
EF: Ejeksiyon Fraksiyonu
MDA: Malondialdehid
GSH: Glutasyon
SOD: Superoksid Dismutaz
GPx: Glutasyon Peroksidaz
GSSG: Okside Glutasyon
CAT: Katalaz
NOS: Nitrik Oksid Sentaz
MCP-1: Monosit Kemoatraktan Protein-1
OG: Orogastrik
MPO: Miyeloperoksidaz
TnI: Troponin I
If: İçe yönelik sodyum akımı
DNA: Deoksiribonükleik asid
ATPaz: Adenozin trifosfataz
NADH: nikotinamid adenin dinukleotid
pro-BNP: “pro-brain natriüretik peptid”
CYP: Sitokrom P450
HNE: Hidroksinonenal
(OH): Hidroksil radikali
GSH-R: Glutasyon Redüktaz
GST: Glutasyon Transferaz
Se: Selenyum

IL-1: İnterlökin-1

TNF: Tümör nekroz faktör

SF: Serum fizyolojik

DMSO: dimetil sülfür oksid

CK-MB: kreatin kinaz MB formu

PMSF: Fenilmetansulfonil florid

NBT: Nitroblue tetrazolium

NH₄SO₄: Amonyum sülfat

XOD: Ksantine oksidaz

TABLolar DİZİNİ

Tablo I Doksorubisinin yan etkileri

Tablo II. Doksorubisin kardiyotoksitesini geriye çevirmek için kullanılan ajanlar

Tablo III. Rat grupları ve uygulanan ilaçlar

Tablo IV. Grupların rat ağırlıklarına göre karşılaştırılması ve p değerleri

Tablo V. Grupların başlangıç ve bitiş TnI değerlerine göre karşılaştırılması ve p değerleri

Tablo VI. Grupların doku antioksidan enzim düzeyleri (SOD ve CAT) ve p değerleri

Tablo VII. Grupların doku antioksidan enzim düzeyleri (GSH ve GSH Px) ve p değerleri

Tablo VIII. Grupların doku lipid peroksidasyon enzim düzeyleri ve p değerleri

Tablo IX. Grupların doku inflamatuvar sitokin düzeyleri ve p değerleri

Tablo X. Grupların doku inflamatuvar kemokin düzeyleri, patolojik dejenerasyon skoru ve p değerleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Antrasiklin kardiyomiyopatisinde serbest radikallerin rolü

Şekil 2. Antrasiklin kardiyomiyopatisinin yaşa göre değişen hemodinamik evoluasyonu

Şekil 3. Antrasiklin kardiyomiyopatisinin patogenetik mekanizması

Şekil 4. Kümülatif doksorubisin dozu ile kalp yetersizliği gelişme riski arasındaki ilişki

Şekil 5. Karvedilol molekülünün kimyasal yapısı

Şekil 6. Kalp kası aksiyon potansiyeli

Şekil 7. If kanalları inhibisyonu ile ortaya çıkan kalp kası aksiyon potansiyeli eğrisi

Şekil 8. Oksidatif streste reaktif oksijen türlerinin oluşumu, lipid peroksidasyonu ve glutatyon (GSH) ve diğer antioksidanların rolü

Şekil 9. Redükte GSH'ın okside GSH'a dönüşümü

Şekil 10. NO sentezi

Şekil 11. Deney gruplarında Troponin değişim grafiği

Şekil 12. Deney gruplarında doku MDA düzeyleri grafiği

Şekil 13. Deney gruplarında doku inflamatuvar sitokin düzeyleri grafiği

Şekil 14. Deney gruplarında doku ADMA düzeyleri grafiği

Şekil 15. Deney gruplarında patolojik dejenerasyon skoru grafiği

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Kontrol grubuna ait myokard tabakası

Resim 2: Doksorubisin grubuna ait myokard tabakası.

Resim 3: Doksorubisin+karvedilol grubuna ait myokard tabakası.

Resim 4: Karvedilol grubuna ait myokard tabakası.

Resim 5: Doksorubisin+ivabradin grubuna ait myokard tabakası.

Resim 6: İvabradin grubuna ait myokard tabakası.

1- GİRİŞ VE AMAÇ

Doksorubisin (“doxorubisin”, DOX), antrasiklin türevi bir antibiyotik ve grubunun ilk bulunan antikanser üyesidir. Geniş spektrumlu antineoplastik etkisi sayesinde solid tümörler ve hematolojik malignitelerde yaygın olarak kullanılmaktadır (1-2). Doksorubisin ve diğer antrasiklinlerin kanser tedavisinde kullanımını sınırlayan en önemli ve olumsuz özellikleri, kardiyotoksik yan etkileridir (3-4). Doksorubisinin kardiyak toksisite oluşturma mekanizması ile ilgili fikir birliği yoktur. Günümüzde en fazla kabul gören görüş doksorubisin ve metabolitlerine bağlı oksidatif stres ve bunun hücrede oluşturduğu hasardır (5-8). Değişikliklerin ortak etkisi, serbest oksijen radikalleri (SOR)’nin oluşumu ve lipid peroksidasyonudur (9).

Doksorubisin kardiyotoksitesini dört klinik tabloda ortaya çıkar. Akut, subakut, kronik ve geç toksisitedir. Doksorubisin kardiyotoksitesini için en önemlisi risk faktörü, kümülatif dozun 550 mg/m² üzerine çıkmasıdır. Yaş, mediastinal radyasyon ve önceki kemoterapi öyküsü diğer önemli risk faktörleridir (10).

Deneyisel çalışmalarda doksorubisinin kardiyotoksitesini önlemek üzere birçok ajan denenmiş (antioksidan vitaminler, bitkisel antioksidanlar, desferroksamin, oabain, CAPE, bosentan, vb) ancak hiç birisi klinik kullanıma girememiştir (11-12).

Karvedilol, hipertansiyon, anjina ve kalp yetmezliği (KY) tedavisinde kullanılan non selektif beta reseptör blokajı yapan bir ajandır. Geniş kapsamlı adrenerjik blokajı (alfa, b1 ve b2) sayesinde selektif blokaj yapan ajanlara göre adrenerjik sistemin kalp üzerindeki etkilerine karşı daha etkilidir (13). Karvedilol ayrıca potansiyel antioksidan etkisi (alfa tokoferoldan 10 kat daha güçlü) sayesinde beta bloker ajanlar arasında tektir (14). Çeşitli biyokimyasal ve hücresel düzeyde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir ki karvedilol ve çeşitli metabolitleri SOR oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu inhibe eder, vitamin E ve glutatyon (GSH) gibi endojen antioksidanların tüketimini engeller (15,16). Benzer şekilde çeşitli hayvan deneylerinde doksorubisin kardiyotoksitesini önlemede de kematörepatic ajanla beraber verilen karvedilol ile kardiyotoksisite gelişiminin engellenebileceği biyokimyasal ve histolojik olarak gösterilmiştir (17-20).

İvabradin istirahat ve egzersiz kalp hızını azaltmak için geliştirilen selektif içe yönelik sodyum akımı (“funny channel”, If) kanal blokeridir. İvabradin sinüs nodu hücrelerinde HCN 4 kanalına bağlanmakta ve If akımını inhibe ederek kalp hızını

azaltmaktadır. Elektrofizyolojik parametrelere bir etkisi olmadan ivabradinin izole olarak kalp hızında bir azalma sağladığı kanıtlanmıştır (21,22).

SHİFT çalışması ve diğer analizleri ivabradin ile kalp hızı azaltılmasının kalp yetersizliği hastalarında klinik olayı azalttığını ve kalp hızının kalp yetersizliğinde bir risk faktörü olduğunu açıkça göstermektedir. BEATIFUL ve SHİFT çalışmaları net olarak ortaya koymuştur ki KY hastalarında yüksek kalp hızı prognozu olumsuz etkilemektedir (23,24). Öte yandan bu gibi çalışmaların subgrup analizlerinde ivabradin ile ortaya çıkan azalmış sol ventrikül diyastol ve sistol sonu volümleri ve artmış ejeksiyon fraksiyonu (EF) gibi parametrelerin sadece ivabradinin kalp hızını azaltıcı etkisi ile ortaya çıkmadığı; ivabradinin ateroskleroz ve kalp yetmezliğinde önemli rolü olan proinflamatuvar sitokinleri azalttığı, peroksidanları inhibe ettiği ve kollajen birikimini engellediği görülmüştür (25-26).

Bu çalışmada, DOX bağlı kardiyotoksisiteyi engellemede daha önce yapılan çeşitli deneylerde KY üzerine olumlu etkileri olduğu bildirilen ancak spesifik olarak DOX kardiyotoksisitesinde etkinliği araştırılmayan ivabradinin etkinliği etkinliğini araştırmak istedik. Ek olarak bu konuda daha önce yapılan hayvan deneylerinde etkili bulunan karvedilolle de etkilerini kıyaslamalı olarak değerlendirmeyi planladık.

2- GENEL BİLGİLER

2. 1. Doksorubisin

2.1.1. Genel bilgi

DOX; antrasiklin türevi, farklı kanser türlerine güçlü etki gösteren, geniş spektrumlu, antitümöral bir antibiyotiktir. Antrasiklinler 1963 yılında bir mantar türü olan “*Streptomyces peucetius variete caesiu*” kültüründen üretilmiştir (1,27,28). DOXO, 1967-1969’da, ilk tedaviye giren ve grubun en yaygın kullanılan üyesidir (29,30). Lösemi, lenfoma, yumuşak doku ve kemik sarkomları, Wilms tümörü, nöroblastom, hepatoblastom tedavisinde kullanılmaktadır (2).

2.1.1.a. Etki mekanizması

DOX’un anti tümör etkisi;

- Deoksiribonükleik asid (DNA) interkalasyonu yoluyla hücrede makromolekül sentezini engellenmesi
- SOR üretimine yol açarak lipid peroksidasyonuna sebep olması
- Topoizomeraz II inhibisyonu ile DNA’da hasarlanma ve apoptozisin indüklenmesi ile meydana gelir (31-33).

2.1.1.b. Metabolizma ve yan etkileri

İntravenöz (iv) uygulamıdan sonra hızla parçalanır, dokularda birikir (kalp, karaciğer, dalak, miyokard) ve plazmadan daha yüksek konsantrasyona ulaşır (5-10 kat). Tümör dokusu en yüksek doku konsantrasyonunu içerir (34). Atılımı karaciğer ve böbrekten gerçekleşir (35).

DOX’un iv enjeksiyonundan sonra vücuttaki dağılımı sırasında, DOX’u plazmadan en hızlı olarak alan dokulardan birisi kalp dokusudur (36).

DOX vücuttaki dağılımına paralel olarak birçok doku ve organda çeşitli yan etki ve toksisitelere yol açabilir. Radyosensitizasyon, anti-mitotik etki mekanizması nedeniyle saç dökülmesi, kemik iliği supresyonu, mukozit; serbest radikal aracılı hasarla nefrotoksisite, hepatotoksisite ve birden çok mekanizma ile kardiyotoksisiteye sebep olabilir (3,37-39)

Tablo I DOX'un yan etkileri

• Organ sistemi	• Yan etki	
• Hematolojik	• Anemi, lökopeni, trombositopeni	
• Gastrointestinal	• Anoreksi, bulantı, kusma, daire, ülserasyon, mukozit, kolon nekrozu	
• Dermatolojik	• Alopesi, ürtiker, hiperpigmentasyon, venöz skleroz, fasiyal eritem	
• Kardiyovasküler	• Akut	• Vazodilatasyon, hipotansiyon, taşikardi, aritmi
	• Subakut	• Miyokardit, perikardit
	• Kronik	• KY yol açan doz bağımlı kardiyomiyopati
	• Gecikmiş	• Tedaviden 10-15 yıl sonra kardiyomiyopati

2.1.2. Kardiyotoksisite

DOX'un en önemli ve doz kısıtlayıcı yan etkisi kardiyotoksisitedir. DOX'a bağlı kardiyotoksisitenin patogenezi tam olarak anlaşılammış olup bu konuda birçok teori üretilmiştir (4). DOX'a bağlı kardiyotoksisitenin patogenezi tam olarak bilinmemesine rağmen histopatolojik bulguların değişken olması farklı etki mekanizmaların aynı anda etkili olduğunu düşündürmüştür (40).

DOX kardiyotoksisitesinde en fazla sorumlu tutulan mekanizma reaktif oksijen radikalleri oluşumu ve lipid peroksidasyonuna bağlı artmış hücre içi oksidatif stres (31,41-43). Azalmış antioksidan ve sülfhidril grubu düzeyleri, (41,44-47) , nükleik asit ve protein sentezi inhibisyonu (48), vazoaktif aminlerin salınımı (49), adrenerjik fonksiyon artışı(50) ve kardiyak spesifik genlerin azalmış ekspresyonu sorumlu tutulan diğer mekanizmalardır (31). Birden çok mekanizmanın etkili olması daha olasıdır. Bu mekanizmaların birçoğunun önemi halen kuvvetli kanıtlara ihtiyaç duymaktadır.

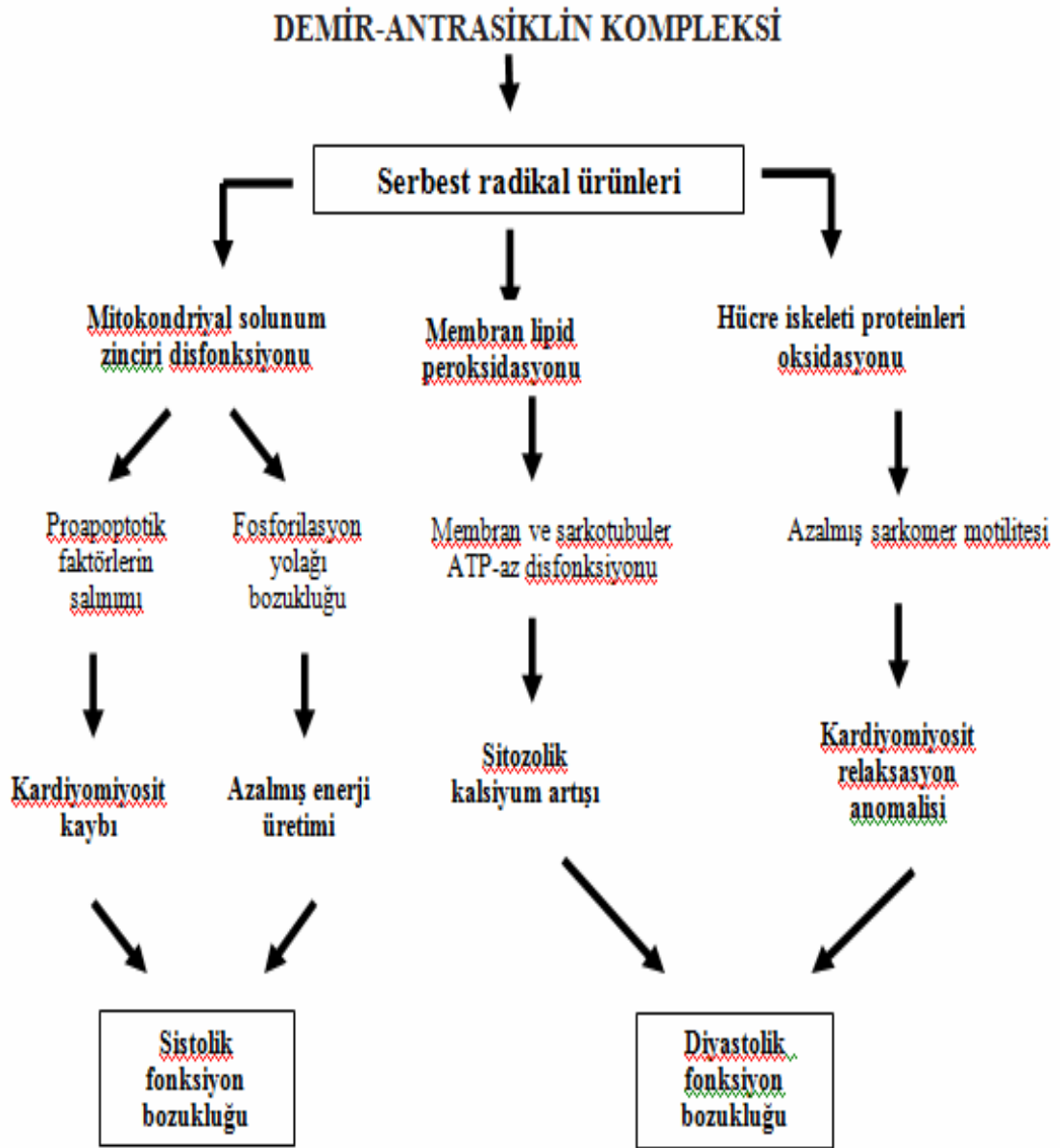
Hücre sel düzeydeki patogenetik değişiklikleri açıklamak için çok sayıda mekanizma öne sürülmüş olup, içlerinden üç tanesi en fazla kabul görmüştür: DOX'un hücre içi demire bağlanması sonucu ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri (şekil 1), nükleer ve mitokondriyal DNA ile etkileşimi (şekil 2) ve apoptozisi indükleyen biyokimyasal yolları aktifleyen gen aktivasyonu (şekil 3) (51,52).

DOX'un kardiyomiyosit mitokondrisinde toksik hasar oluşturduğu öngörülmektedir. Nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) dehidrogenaz, sitokrom p-450 redüktaz ve ksantin oksidaz gibi pek çok mitokondrial enzim serbest oksijen radikali

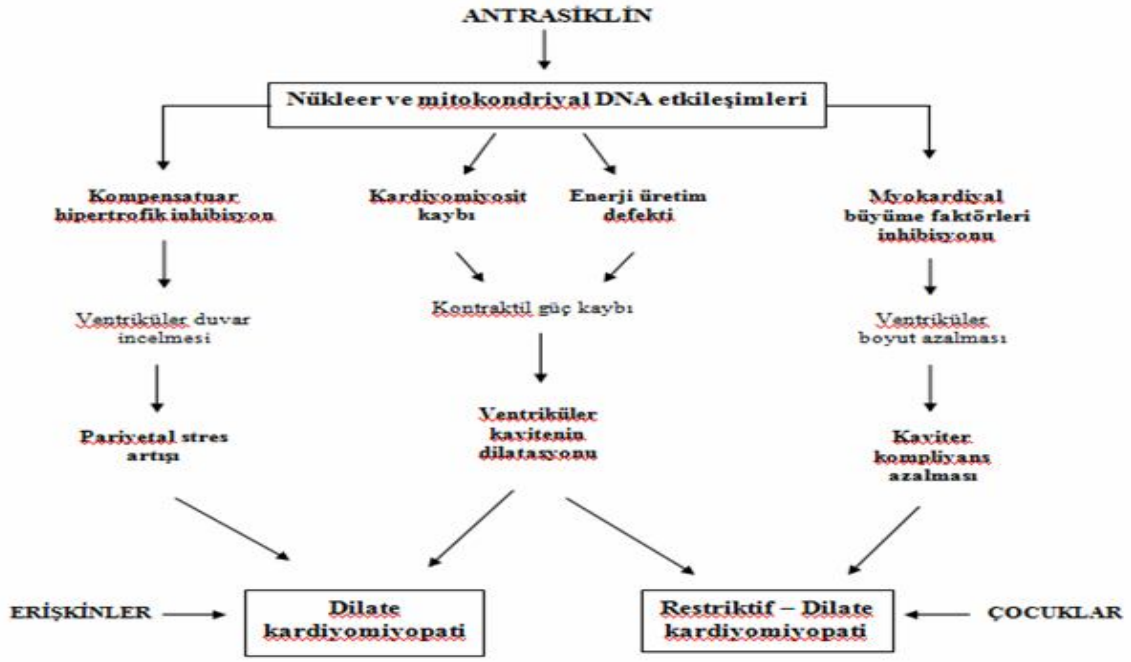
retiminde rol alır (31,53-55). DOX ayrıca hücre içi süper oksid düzeyini arttırır. Bunu da endojen nitrik oksid sentaz düzeyini arttırarak yapar (56,57). Böylelikle hücre içi hidrojen peroksid artar (58).

DOX'un sebep olduğu alfa aktin, miyozin hafif ve ağır zincirleri, Tn I ve desmin proteinlerinin downregulasyonu, kardiyotoksisitenin potensiyal mekanizmalarından biri olarak kabul görmüştür. Kontraktil proteinlerin bu azalmış ekspresyonu miyofibriler kayıp ve azalmış miyofibriler kontraktil fonksiyon ve bu da sistolik disfonksiyona sebep olur (59,60). Sarkoplazmik retiküler adenozin trifosfataz (ATPaz)ın downregulasyonu ve hücre membranın lipid peroksidasyonu sonucu artmış hücre içi kalsiyum iyonu anormal mitokondriyal diyastolik fonksiyona yol açar (31,59,60).

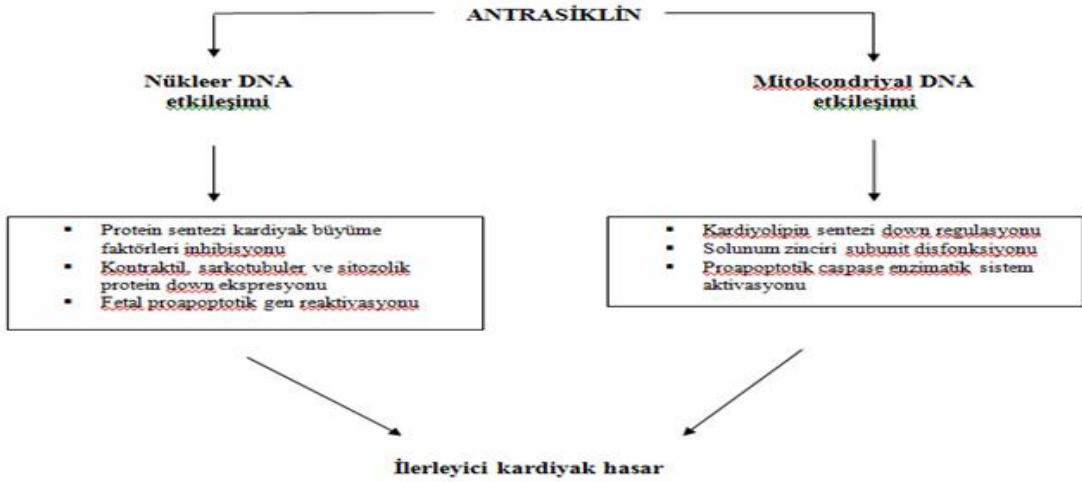
DOX'un kardiyomiyositlerde apoptozisi indüklediğine dair kanıtlar vardır (58,61,62). DOX'un indüklediği kardiyomiyosit toksisitesinde hidrojen peroksit ve superoksid formasyonları sorumludur (58,61). Bu hücre içi oksidanlar, bir programlı hücre ölümü stimülatörü olan p53 genini aktive ederler (63,64).



Şekil 1. Antrasiklin kardiyomiyopatisinde serbest radikallerin rolü



Şekil 2. Antrasiklin kardiyomiyopatisinin yaşa göre değişen hemodinamik evluasyonu



Şekil 3. Antrasiklin kardiyomiyopatisinin patogenetik mekanizması

Organizma SOR'ları temizleme yeteneğine sahiptir. Ama kalpte antioksidan enzimler daha az bulunduğundan SOR hasarlarına karşı kendini koruyamaz. Bu durum ise neden DOX verilmesi sonrası kalpte hasarın oluştuğunu açıklamaktadır (65).

Kardiyotoksisitenin tanısında biyokimyasal olarak birçok klasik yöntem kullanılabilir. Birlikte son dönemlerdeki çalışmalarda TNI ve "pro-brain natriüretik

peptid'' (pro-BNP) ön plana çıkmakta ve bu parametreler DOX uygulamasından sonra kardiyak yetersizlik gelişeceği hakkında bilgi vermektedir (66,67).

2.1.2.a. Kardiyotoksisitenin klinik formları

DOX kardiyotoksisitesi dört farklı klinik tipte gelişebilmektedir:

1. Akut Kardiyotoksisite: İlaç verildikten sonra ilk 24 saate kadar geçen süre zarfında ortaya çıkar. Klinik olarak kendini hiperkinetik aritmiler ve/veya geri dönüşümlü kalp yetmezliği (perikardit-miyokardit sendromu) ile belli eder. Sıklığı %0.4-41 arasında olup hayatı tehdit eden komplikasyonlar altta yatan kardiyak hastalığı olan ve elektrolit anormalliği olan hastalarda görülür (11,68).

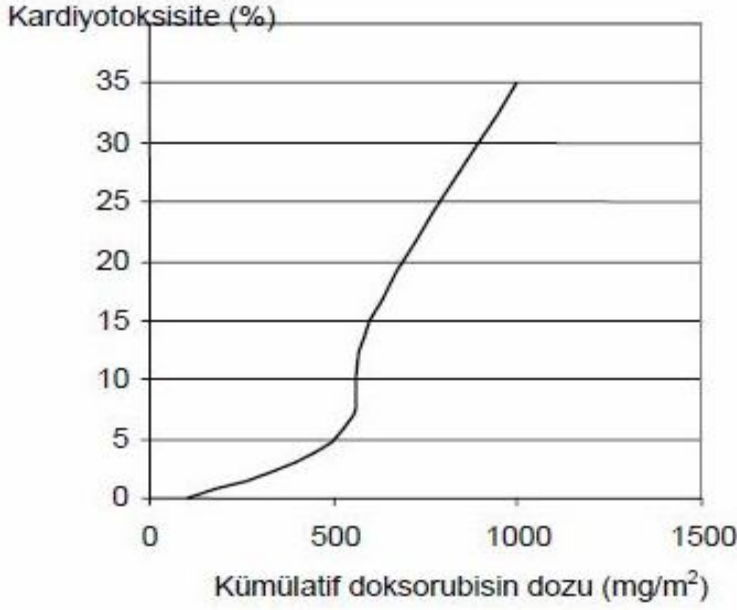
2. Subakut Kardiyotoksisite: Nadir görülmekle birlikte ilaç uygulanmasından haftalar-aylar sonra (30 haftaya kadar) ortaya çıkar ve hızla kalp yemeziğine ilerleyerek %60 mortaliteyle seyreder (68).

3. Kronik Kardiyotoksisite: 4-20 yıl sonra ortaya çıkar, progresif geri dönüşsüz kardiyak yetmezliğe sebep olur. Sıklığı %0.4-23 arasındadır. Genellikle sol ventrikülü, nadiren her iki ventrikülü etkiler. Kemoterapiden birkaç hafta veya birkaç ay sonra kalp yetersizliği veya kardiyojenik şok kliniği ve laboratuvarı ile ortaya çıkar. Kümülatif doza bağlıdır. Klinik kardiyotoksisitede 550 mg/m² üzerindeki dozlarda belirgin artış görülür (69,70).

4. Geç Kardiyotoksisite: Toksisitenin en sinsi formudur. Non spesifik elektrokardiyografik ve ekokardiyografik bulguların olduğu uzun bir asemptomatik dönemden sonra kronik kardiyomiyopati gelişir. Tedaviye dirençli kardiyomiyopati çocuklarda restriktif-dilate, erişkinlerde ise dilate tipte olur (71).

2.1.2.b. Kardiyotoksisite ve doz

DOX kardiyotoksisitesinin bir diğer kendine has özelliği ilaç kümülatif dozuna sıkı bir biçimde bağımlı olmasıdır (şekil 4). Öyle ki DOX kardiyomiyopatisi ve kalp yetmezliği, 550 mg/m² total dozda %7 oranında izlenirken, 600 mg/m² total dozda bu rakam %15 ve 700 mg/m² total dozda %30-40'lara çıkar (72). Kardiyotoksik doz için sınır son çalışmalarda 550 mg/m²'dir (73). DOXin doz modifikasyonu kardiyotoksisiteye engel olacak en önemli değişkendir (74).



Şekil 4. Kümülatif DOX dozu ile kalp yetersizliği gelişme riski arasındaki ilişki

2.1.2.c. Kardiyotoksisite ve risk faktörleri

En önemli risk faktörleri, kümülatif doz, mediastinal radyasyon maruziyeti, kalp hastalığı hikayesi, diğer kardiyotoksik kemoterapötiklerle birlikte kullanım ve yaştır.

Kümülatif doz: Kronik kardiyotoksisiteye bağlı KY gelişmesi ilacın kümülatif dozuna bağlıdır. Hastaların ilaca karşı tolerabiliteleri farklı olmasına rağmen klinik toksisitedeki çarpıcı artış nedeniyle 550 mg/m² kümülatif doz olarak kabul edilmiştir (73).

Mediastinal radyasyon: Daha önce veya eş zamanlı mediastinal radyasyon uygulanması sonucu kalbin radyasyona maruz kalması, kalbin sitotoksik ajanlara hassasiyetini artırır. Kalp bölgesine 2000 rad radyasyon uygulandığında 250 mg/m² kümülatif ilaç dozu 500 mg/m² kümülatif ilaç dozuna eşit kardiyotoksisiteye neden olmaktadır (75-77).

Kalp hastalığı hikayesi: Hastada daha önceden mevcut olan kapak, koroner veya miyokardiyal kalp hastalığı sitotoksik antibiyotik kardiyotoksisitesi için risk faktörüdür (75-77).

Bazı kemoterapötik ilaçlarla birlikte kullanma: Siklofosfamid ve metotreksat gibi ilaçlarla birlikte kullanım sonucu ilaçlar birbirlerinin kardiyotoksik etkilerini potansiyelize eder (75-77).

Yaş: 5 yaşın altındaki çocuklarda kardiyotoksisite riski daha fazladır. Bu yaş grubundaki çocuklarda daha düşük DOX kümülatif dozlarında bile kardiyotoksik etkiler görülebilir (75-77).

2.1.2.d. Yapısal değişiklikler

DOX, erken evrelerde sadece elektron mikroskobu ile tespit edilebilen, miyositlerde farklı tiplerde yapısal değişiklikler meydana getirir. Artmış fibrozis ve miyosit dejenerasyonuna ait diğer formlar genel olarak 250 mg/m²'nin altında ışık mikroskobu ile tespit edilemezler. Miyosit hasarına ait ilk bulgu, sarkoplazmik retikulumun dilatasyonudur. Bu ilerleyerek vakuolizasyon oluşturur. Daha sonra membran incilmesi ve yoğun inklüzyonlarla birlikte, mitokondride şişme gözlenir. Son olarak hücre nekrozuna nükleer değişiklikler eşlik eder. Işık mikroskopunda normal miyokardiyal doku ile birlikte, vakuolizasyon ve bazı miyositlerde dejenerasyon açığa çıkar. Daha sonraki evrede ise miyositlerde nekroz ve apoptoz sonucu fibrozis meydana gelir. Dolayısıyla geri dönüşsüz bir süreçtir (78-80). Miyofibrillerin parsiyel veya total kaybı ve miyosit vakuolar dejenerasyonu DOX kardiyomiyopatisinin temel karakteristiğidir. Nükleus-kromatin disorganizasyonu ve kromatinin yerini soluk filamanlara bırakması da DOX kardiyotoksisitesinde izlenen karakteristik değişikliklerdendir (31,81,82). Histolojik değişikliklerin şiddeti uygulanan kümülatif doz ile doğru orantılıdır (83).

2.1.2.e. Tedavide kullanılan ajanlar

Günümüzde çeşitli hematolojik malignitelerin ve solid tümörlerin tedavisinde etkili bir silah olarak görülen DOX'un kullanımında en önemli doz kısıtlayıcı yan etki olarak ortaya çıkan kardiyak toksisitenin önlenmesinde birçok ajan denenmiş olup bu konudaki yeni çalışmalar devam etmektedir. Ancak kardiyotoksisite oluşum mekanizması net olarak belli olmadığından çalışmalarda test edilen ajanların hiçbiri kardiyotoksisiteyi geri çevirememiştir (39). DOX kardiyotoksisitesini geriye çevirmek için kullanılan ajanlar ve kullanım nedenleri Tablo II'de gösterilmiştir.

Tablo II. DOX kardiyotoksitesini geriye çevirmek için kullanılan ajanlar (17,20,84-88)

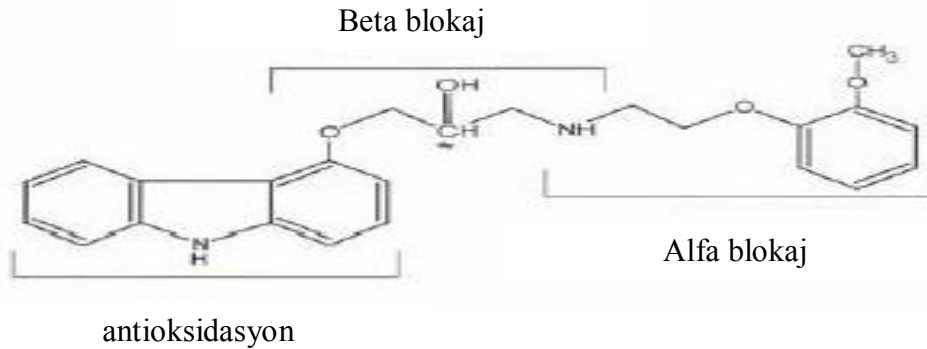
• Farmakolojik ajan	• Öngörülen etki mekanizması
• Antioksidan vitaminler	• SOR azaltarak
• Melatonin	• Antioksidan özelliği ile
• Bitkisel antioksidanlar	• Antioksidan özelliği ile
• N-asetil sistein	• Antioksidan özelliği ile
• Resveratrol	• Antioksidan özelliği ile
• Erdosteine	• Antiinflamatuvar özeliği ile
• Karvedilol	• SOR azaltarak
• Nebivolol	• NO aracılı

2.2. Karvedilol

2.2.1. Genel bilgi ve etki mekanizması

Karvedilol çift etkili bir üçüncü jenerasyon beta blokerdir: beta-1 ve beta-2 reseptörlerin S(-) enantiomerlerinin seçici olmayan antagonizması ve alfa-1 reseptörlerin R(+) ve S(-) enantiyomerlerinin vazodilatasyon aracılı selektif antagonizması (Şekil 5). İlave kan basıncı düşüşü ikinci etki kaynaklıdır (89,90). Kardiyoselektivite özelliği yoktur, intrinsik sempatomimetik aktivite göstermez. Mitokondriyal membranı SOR'dan koruyarak stabilize eder ve nöroprotektif, kardiyoprotektif , vaskuloprotektif ve antioksidan özellikleri olduğu gösterilmiştir (91-98).

Karvedilol oral alımdan sonra hızla emilir, 1-2 saat içinde pik plazma konsantrasyonuna erişir. Plazma yarı ömrü 7-10 saattir. Plazmada %98'i plazma proteinlerine bağlı bulunur (99). Neredeyse tamamı karaciğerde sitokrom enzimerince metabolize edilir. İleri yaşla birlikte metabolizması yavaşlar(100).



Şekil 5. Karvedilol molekülünün kimyasal yapısı

Antiadrenerjik etkisinin dışında sahip olduğu antioksidan etki sayesinde diğer beta bloker ilaçlarla kıyaslandığında ilave terapötik yararlılıkları saptanmıştır (97). Karvedilol potansiyel antioksidan etkisi (alfa tokoferoldan 10 kat daha güçlü) sayesinde beta bloker ajanlar arasında tektir (14). Bu özellikle serbest oksijen radikali üretiminin fazla olduğu ve hücrelerin antioksidan savunma sistemlerinin zayıfladığı; proteinler, DNA, hücre ve mitokondriyal membranın lipid komponentinde oksidatif strese yol açan iskemi-reperfüzyon gibi durumlarda önemli hale gelir (101).

Karvedilolün antioksidan etkisinin hangi yolla olduğuna dair çeşitli teoriler ortaya atılmıştır (97):

- Serbest oksijen radikallerinin sitotoksik etkisinin inhibisyonu
- İnflamatuvar süreçle ilgili genlerin transkripsiyon faktörlerinin serbest oksijen radikalleri tarafından aktivasyonunu önler
- Nitrik oksit aracılı vazodilatasyonu serbest oksijen radikallerinin bozucu etkisinden korur
- İskemi-reperfüzyon gibi patofizyolojik durumlarda ortaya çıkan ilgili organ disfonksiyonlarını, endojen antioksidan defans mekanizmasını güçlendirerek engeller

2.2.2. Karvedilolün kullanım alanları

Hipertansiyon, kronik kalp yetmezliği ve koroner arter hastalığında kullanım endikasyonu almıştır. Antioksidan özelliği ise çeşitli hayvan deneylerinde gösterilse de henüz klinik olarak bu endikasyonda kullanımı yoktur.

Karvedilolün kronik kalp yetmezliği hastalarında plaseboya kıyasla kardiyovasküler ve tüm nedenlere bağlı mortaliteyi anlamlı ölçüde azalttığı (102), egzersiz kapasitesini arttırarak hastaneye yatışları azalttığı gösterilmiştir (103). Koroner arter hastalığına bağlı kronik stabil kalp yetmezliği hastalarında karvedilol tedavisi ile sol ventrikül sistol ve diyastol sonu volümlerinde azalma ve dolayısıyla ejeksiyon fraksiyonunda artış olduğu saptanmıştır (104). Günümüzde kalp yetmezliği tedavisinde mutlak kontraendikasyon olmadığı takdirde her hastaya verilmesi gereken beta bloker grubu ilaçlardan karvedilol ile metoprololün kıyaslandığı büyük ölçekli randomize kontrollü bir çalışmada sağ kalım karvedilol kolunda daha yüksek bulunmuştur (105).

Karvedilol, antioksidan özelliği sebebiyle tıpta birçok hastalıkta etkinliği araştırılmıştır. Karvedilol deneysel bir modelde iskemi/reperfüzyon altındaki

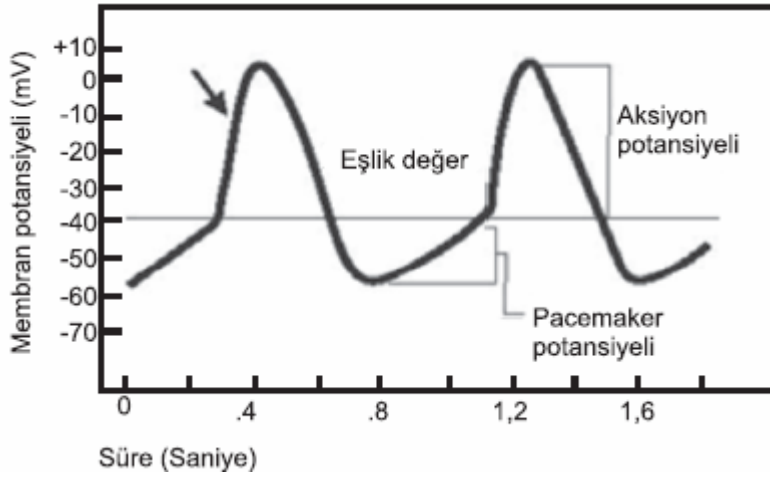
kardiyomiyositlerde apoptozisi engellemiştir (106). Karvedilol DOX ilişkili kardiyomiyopatide ventrikül fonksiyonlarının bozulmasını engelleyen, semptomları hafifleten ve prognozu iyileştiren etkileri olduğu bildirilmiştir (107). Benzer şekilde çeşitli hayvan deneylerinde DOX kardiyotoksitesini önlemede de kematörepatik ajanla beraber verilen karvedilol ile kardiyotoksite gelişiminin engellenebileceği biyokimyasal ve histolojik olarak gösterilmiştir (17-20).

2.3. İvabradin

2.3.1. Genel bilgi ve etki mekanizması

Kalpte spontan elektriksel aktivite sinoatrial nod, atriyoventriküler nod, His ve Purkinje demeti gibi birçok bölgede bulunmaktadır. Fizyolojik şartlarda intrinsik pacemaker aktivitesi sinoatriyal noddaki en hızlıdır ve kalp hızının belirleyicisidir. Kalpteki pacemaker hücreleri yavaş diyastolik depolarizasyon oluşturarak membran voltajının oluşmasına neden olur. Hiperpolarizasyon sınırı aşıldığında aksiyon potansiyeli oluşur. Ritmik aksiyon potansiyeli iletim sisteminde ilerleyerek miyokardiyal kasılmayı tetikler (Şekil 6) (108).

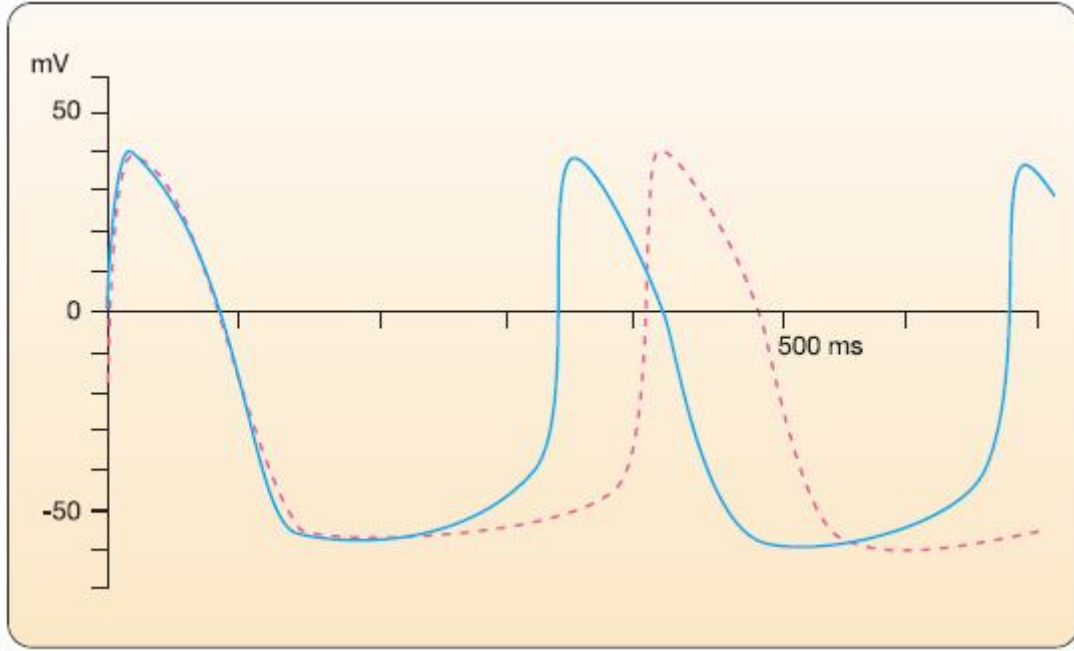
Pacemaker aktivitesi oluşmasında sinoatriyal noddaki bu spontan diyastolik depolarizasyona neden olan birçok kanal etkili olmaktadır. Bu kanallardan biri olan *If* kanalları pacemaker uyarısı oluşması için temel role sahiptir. Aksiyon potansiyeli sonunda oluşan *If* kanal aktivasyonu yavaş diyastolik depolarizasyon eğiminin belirleyicisi (aksiyon potansiyelinin IV. fazı) olup iki aksiyon potansiyeli arasındaki zamanın kontrol edilmesinde etkilidir (22).



Şekil 6. Kalp kası aksiyon potansiyeli

Kalp hızının kontrolü, ikinci-haberci olan Camp'nin aracılığıyla *I_f* kanalları üzerinden gerçekleşmektedir. cAMP sentezi beta-agonistler tarafından stimüle edilir ve muskarinik agonistler tarafından inhibe edilir (21). cAMP *I_f* kanallarına bağlanarak diyastolik depolarizasyon eğiminin hızlanmasına, aksiyon potansiyelleri arasındaki sürenin azalmasına ve dolayısıyla kalp hızının artmasına yol açar. Sinoatriyal noddaki pacemaker hücrelerinde bulunan *I_f* kanalları aktivitesi cAMP aracılı ilaçlar, hormonlar (özellikle tiroid hormonları) ve sempatik sinir sisteminden etkilenir (22).

İvabradin istirahat ve egzersiz kalp hızını azaltmak için geliştirilen selektif *I_f* kanal blokeridir. İvabradin sinüs nodu hücrelerinde *I_f* akımını inhibe ederek kalp hızını azaltmaktadır. Elektrofizyolojik parametrelere bir etkisi olmadan ivabradinin izole olarak kalp hızında bir azalma sağladığı kanıtlanmıştır. İvabradin ile atriyoventriküler ve intraventriküler iletide bir değişimin olmamaktadır. Selektif *I_f* akım inhibisyonu izole olarak kalp hızında azalmayla sonuçlanmakta, böylece konvansiyonel selektif olmayan ilaçlarla bağlantılı olan tipik yan etkilerden uzaklaşmakta, miyokard kontraktilitesi ve atriyoventriküler ileti korunmaktadır (Şekil 7). İvabradin aynı zamanda vizüel semptomlardan sorumlu retinadaki HCN izoformlarına bağlanmaktadır (21,22).



Şekil 7. If kanalları inhibisyonu ile ortaya çıkan kalp kası aksiyon potansiyeli eğrisi

2.3.2. Farmakokinetik

İvabradin oral alım sonrasında hızla % 40'ı emilir. Pik plazma konsantrasyonu 2 saat sonra ulaşılır. Büyük oranda plazma proteinlerine bağlı taşınır (%70) ve karaciğerde sitokrom P450 (CYP) 3A4 yolu metabolize edilir. Aktif maddenin yalnızca %10'u idrarla değişmeden atılır. Güçlü CYP 3A4 inhibitörleri (azol antifungallar, makrolidler, HIV proteaz inhibitörleri) ile kombinasyonları önerilmez. CYP 3A4 orta düzeyde inhibe eden diltiazem veya verapamil ile kombinasyonu, ivabradin düzeyini 2 ila 3 kat arttırmaktadır. Bu yüzden bu ilaçlarla kombinasyonları da önerilmemektedir. İvabradin etkisi doz bağımlı gelişmektedir. İvabradinin ortalama yarı ömrü 11 saattir (109).

2.3.3. İvabradin ve kalp yetmezliği

Artmış istirahat kalp hızı ile kardiyovasküler ve diğer nedenli ölümler arasında ilişkinin olduğu birçok epidemiyolojik çalışmada gösterilmiştir (110-112). ADHERE çalışmasında kalp yetersizliği hastalarında istirahat kalp hızı ile mortalite arasındaki ilişki değerlendirilmiş ve bağımsız bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır (113). CIBIS-II, COMET, MERIT-HF çalışmalarında kalp yetersizliği hastalarında β -bloker tedavi ile kalp

hızının azaltılması mortalitede belirgin bir iyileşmeyi beraberinde getirdiği görülmüştür (114-116).

SHiFT Çalışmasında; sistolik kalp yetersizliği hastalarında *I_f* akım inhibitörü ivabradin ile kalp hızını izole olarak azaltmanın kardiyovasküler sonuçlar üzerine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda ivabradin tedavisi, iskemik veya iskemik olmayan kalp yetersizliği hastalarında kardiyovasküler ölüm ve kötüleşen kalp yetersizliğine bağlı hastaneye yatış riskini %18, tek başına kalp yetersizliğine bağlı ölümü ise %26 oranında azaltmaktadır (23).

SHiFT çalışması ve diğer analizleri ivabradin ile kalp hızı azaltılmasının kalp yetersizliği hastalarında klinik olayı azalttığını ve kalp hızının kalp yetersizliğinde bir risk faktörü olduğunu açıkça göstermektedir. BEATIFUL ve *SHiFT* çalışmaları net olarak ortaya koymuştur ki kalp yetersizliği hastalarında yüksek kalp hızı prognozu olumsuz etkilemektedir (23,24).

Öte yandan bu gibi çalışmaların subgrup analizlerinde ivabradin ile ortaya çıkan azalmış sol ventrikül diyastol ve sistol sonu volümleri ve artmış EF gibi parametrelerin sadece ivabradinin kalp hızını azaltıcı etkisi ile ortaya çıkmadığı; ivabradinin ateroskleroz ve kalp yetmezliğinde önemli rolü olan proinflamatuvar sitokinleri azalttığı, peroksidanları inhibe ettiği ve kollajen birikimini engellediği görülmüştür (25,26).

2.4. Oksidatif denge

Aerobik metabolizmanın normal ürünü olarak serbest radikaller ve diğer oksidanlar açığa çıkar. Antioksidan savunma sistemleri, reaktif oksijen türlerinin ve diğer oksidan ajanların oluşumunu engeller, ortadan kaldırılmasını sağlar veya bunların meydana getireceği hasarı önler (117). Sağlıklı organizmalarda, oksidan etki ile antioksidan sistem arasında bir denge vardır. Bu denge oksidan etki lehine bozulduğunda oksidatif stres oluşmaktadır (118).

2.4.1. Serbest radikaller

Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Bu elektron, bir nokta ile (OH^\cdot) gösterilir. Diğer biyolojik

materyallerle reaksiyona girme eğilimindedirler. Serbest radikal denilince SOR, genel bir tabirle reaktif oksijen türleri (ROS) akla gelmektedir (119).

Serbest radikaller çözültide veya lipid ortamda bağımsız olarak bulunan radikallerdir (120). Aerobik organizmaların hücresel metabolik süreçlerinde oksijenin suya indirgenmesi sırasında canlı dokulara toksik özellikte serbest radikaller ortaya çıkmaktadır. Serbest radikaller esas olarak iki çeşittir: ROS ve reaktif nitrojen türleri. Serbest radikal türleri kararsızdır. Karbohidratlar, proteinler, lipidler, nükleik asitler veya benzeri moleküllerden elektron alarak kararlı hale gelirler (121).

2.4.2. Serbest radikallerin etkileri

Serbest oksijen radikalleri, mitokondrial solunum, trombosit aktivasyonu, lökosit fagositozu ve prostaglandin sentezi gibi süreçlerde etkilidir. Aynı zamanda lipidler başta olmak üzere, proteinler, DNA ve karbohidratlar üzerine toksik etkiye sahiptirler. Böylece hücrelerde yapısal ve fonksiyonel bozukluklara sebep olabilirler (117,122,123).

a) Membranların lipid peroksidasyonu: Serbest radikallerin lipidler üzerine etkisi ile lipid peroksidasyonu meydana gelir (118). Lipid peroksidasyonu, membran ve lipoproteinlerin yapısında yer alan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu meydana gelir (124). Bu peroksidasyon kendi zincir reaksiyonu olarak devam eder ve geri dönüşümsüz membran hasarına yol açar.

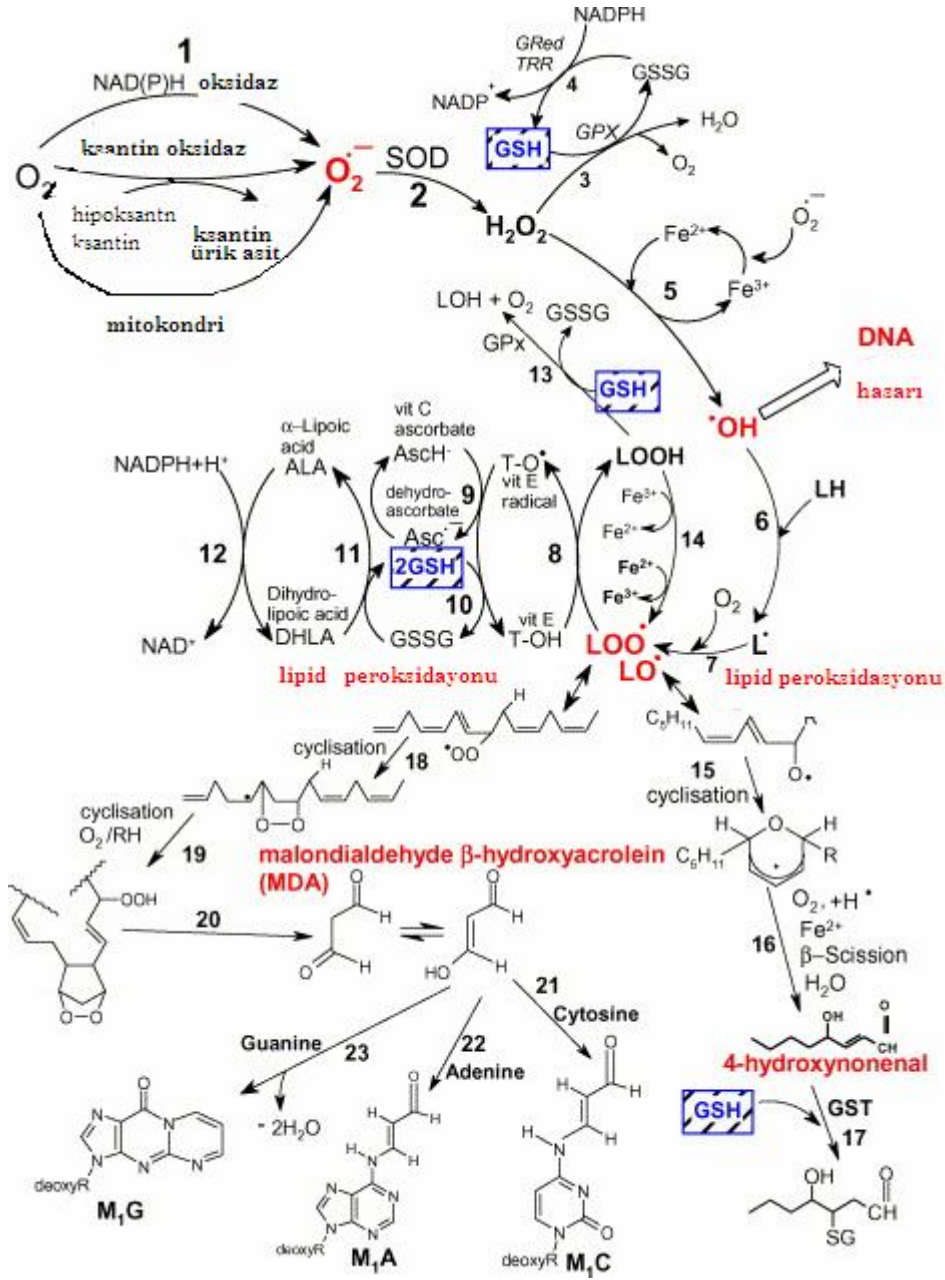
Lipid peroksidasyonu sonucunda malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (HNE), lipid hidroperoksitleri gibi oldukça toksik ve zararlı yan ürünler ortaya çıkar. MDA tiyobarbutirik asitle ölçülebilir. Bu metod lipid peroksit seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, ancak lipid peroksidasyonun derecesiyle bağlantı gösterir.

Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehytler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu yüzden iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir (125-127). Membranların yapıları bozulur, geçirgenlikleri değişir, iyon transportu ve enzimatik aktiviteler gibi fonksiyonlar etkilenir (128).

b) Proteinlerin oksidatif modifikasyonu: Serbest radikallerin proteinler üzerine etkileri, aminoasit bileşimlerine bağlıdır. Oksijen radikalleri, peptit bağlarının hidrolizi, disülfid bağı ve çapraz bağlanmalara yol açabilirler. Proteinler, proteolitik parçalanmaya karşı daha hassas olurlar. Protein yapısında olan enzimler, aktivite kaybına uğrayabilir. Na-KATPaz enziminin tiyol gruplarının oksidasyonu sonucu aktivite kaybı olur, hücre içi ve dışı iyon dağılımı bozulabilir (129,130).

c) DNA hasarı: Hidroksil radikali (OH^-) DNA'da deoksiriboz ve bazlarla reaksiyona girerek bazların modifikasyonuna ve zincir kılınmasına yol açar. DNA polimerazı inhibe eder, hücre ölümüne kadar giden süreçleri başlatır, hücre yaşlanmasını hızlandırır ve karsinogeneze yol açabilir (125,131).

Serbest radikaller hücrede enerji metabolizmasını da etkiler. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz enzimini inhibe ederek NADH_2 azalmasına ve glikolizle ATP sentezinde azalmaya sebep olurlar. Mitokondrilerde; radikallerin etkisi ile hem iç membran bütünlüğünün bozulması hem de ATP sentetaz aktivitesinde azalma sonucu ATP seviyesinde düşüş olur. Süperoksit radikali hiyaluronik asit parçalanmasına yol açarak inflamatuvar eklem hastalıklarının patolojik sürecinde rol oynar (123,132).



Şekil 8. Oksidatif streste reaktif oksijen türlerinin oluşumu, lipid peroksidasyonu ve GSH ve diğer antioksidanların rolü (108).

Reaksiyon 1: Süperoksit anion radikali NADPH oksidaz ve ksantin oksidaz ile moleküler oksijenin indirgenmesi sonucu veya enzimatik olmayan yoldan mitokondriyal elektron transport zincirinin, semi-ubikinon bileşeni gibi bileşenlerle meydana gelir.

Reaksiyon 2: Süperoksit radikali süperoksit dismutaz (SOD) ile hidrojen peroksit dönüşür.

Reaksiyon 3: Hidrojen peroksid en etkili şekilde glutatyon peroksidaz (GPx) enzimi ile süpürülür. GPx elektron donörü olarak GSH 'a ihtiyaç duyar.

Reaksiyon 4: GSSG, glutatyon reduktaz ile tekrar GSH'a indirgenir. glutatyon reduktaz elektron donörü olarak NADPH 'a ihtiyaç duyar.

Reaksiyon 5: Bazı transisyon metalleri (örneğin Fe^{2+} , Cu^{+}) hidrojen peroksidi reaktif hidroksil radikaline dönüştürür (fenton reaksiyonu).

Reaksiyon 6: Hidroksil radikali, karbon merkezli lipid radikali (L^*) için poliansature yağ asitinden (LH) bir elektron ayırır.

Reaksiyon 7: Lipid radikali (L^*) moleküler oksijenle etkileşerek lipid peroksil radikalini (LOO^*) oluşturur. Lipid peroksil radikali, antioksidanlarla indirgenmezse, lipid peroksidasyon işlemi oluşur (reaksiyon 18-23 ve 15-17).

Reaksiyon 8: Lipid peroksil radikali vitamin Enin indirgenmiş hali tarafından membran içinde indirgenir. Lipid peroksid ve vitamin E radikali ($T-O^*$) oluşumu ile sonuçlanır.

Reaksiyon 9: Vitamin E radikali ($T-O^*$) askorbik asit tarafından geride askorbik radikali ($Asc^{\bullet-}$) bırakarak tekrar Vitamin E ($T-OH$)'ye indirgenir. Askorbatın fizyolojik formu askorbat monoanyondur ($AscH^-$).

Reaksiyon 10: GSH tarafından vitamin E nin rejenerasyonu: okside vitaminE radikali ($T-O^*$) GSH tarafından indirgenir.

Reaksiyon 11: Okside glutatyon (GSSG) ve askorbil radikali ($Asc^{\bullet-}$) dihidrolipoyik asid (DHHLA) tarafından GSH a ve askorbat monoanyona ($AscH^-$)geri indirgenir. Dihidrolipoik asid lipoik aside (ALA) dönüşür.

Reaksiyon 12: NADPH kullanarak ALA'dan DHHLA'nın rejenerasyonu meydana gelir.

Reaksiyon 13: Lipid peroksidler GPx tarafından alkol ve dioksijene indirgenir. GPx elektron donörü olarak GSH kullanır (lipid peroksidasyon işlemi).

Reaksiyon 14: Lipid peroksidler Fe^{2+} ile hızlıca reaksiyona girerek lipid alkoksil radikallerini (LO^*) oluştururlar veya Fe^{3+} ile yavaşça reaksiyona girerek lipid peroksil radikallerini (LOO^*) oluştururlar.

Reaksiyon 15: Araşidonik asitten türeyen lipid alkoksil radikali (LO^*) , 6 halkalı hidroperoksid oluşturmak için siklik reaksiyona girer.

Reaksiyon 16: 6 halkalı hidroperoksid HNE oluşturmak amacıyla daha ileri reaksiyonlara girer.

Reaksiyon 17: HNE'ye glutatyon eklenir.

Reaksiyon 18: Yağ asidinin iç tarafında yer alan peroksil radikali siklik reaksiyona girerek karbon bazlı radikale bitişik siklik peroksidi oluşturur.

Reaksiyon 19: Bu radikal indirgenip hidroperoksid oluşturabilir veya ikinci siklik reaksiyondan geçerek bisiklik peroksid oluşturabilir.

Reaksiyon 20: Oluşan bileşik malondialdehit oluşturacak bir ara üründür.

Reaksiyon 21,22,23: MDA DNA bazlarıyla etkileşir.

2.4.3. Antioksidan savunma sistemleri

2.4.3.1. Genel Bilgi

Antioksidan savunma sistemi veya kısaca antioksidanlar olarak da bilinen bu mekanizmalar, reaktif oksijen türlerinin ve diğer oksidan moleküllerin oluşturdukları hasarı önlerler. Peroksidasyon zincir reaksiyonunu engeller, reaktif oksijen türlerini toksik olmayan bileşiklere çevirirler. Antioksidan sisteme ait moleküller hücrenin sitoplazmasında ve membranında bulunurlar (117).

Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirirler;

1. Süpürme etkisi: Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirme yoludur.
2. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi: Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlayarak inaktive eder.
3. Onarıcı etkisi: Oksidatif hasar görmüş biyomolekülleri onarırlar (133).
4. Söndürme etkisi: Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol gibi oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive ederler

Antioksidan sistemin başlıca elemanları:

1.Enzimler

SOD

GPx

Glutatyon Redüktaz (GSH-R)

Glutatyon Transferaz (GST)

Katalaz

2.Suda Çözünen Radikal Tutucuları

Glutatyon

Vitamin C

Ürik asit

Glukoz

Sistein

3. Metal İyonlarını Bağlayan Proteinler

Ferritin

Transferrin

Haptoglobin

Hemopeksin

Seruloplazmin

Albümin

4. Yağda Çözünen Radikal Tutucuları

Vitamin E

B- karoten

Bilirubin

Ubikinol

Flavanoidler

5. Diğer Antioksidanlar

Diğer Antioksidanlar:

Yukarıdaki antioksidanların dışında, çok sayıda endojen ve ekzojen molekülün antioksidan etkisi olduğu öne sürülmüştür (125,134).

Antioksidan etkili endojen ve ekzojen moleküller

1- Endojen moleküller:

-Sistein, histidin gibi amino asitler

-Safra asitleri

- Sitokinler

2- Ekzojen moleküller

- Lokal anestezikler,

- Kalsiyum kanal blokerleri: Verapamil, Nifedipin, Nitrendipin,

- Steroid yapıda olmayan antiienflamatuarlar: Ibuprofen

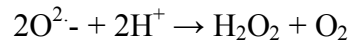
- Rekombinant antioksidan enzimler (r-SOD),

- GPx aktivitesini arttıran veya benzer etki gösteren moleküller: Asetil,Ebselen.

- Serbest radikal toplayıcıları: DMSO, Mannitol.
- Demir tutucuları: Deferroksamin, EDTA.
- Besinlere eklenen koruyucular: BHA, BHT, Sodyum Benzoat, Propil gallat.
- Nötrofil inhibitörleri: Siklosporin A, FK 506, İbuprofen, Steroidler.
- Nötrofile karşı monoklonal antikor: RP3
- Endotel reseptörlerine (ICAM-1, ICAM-2) karşı monoklonal antikor.

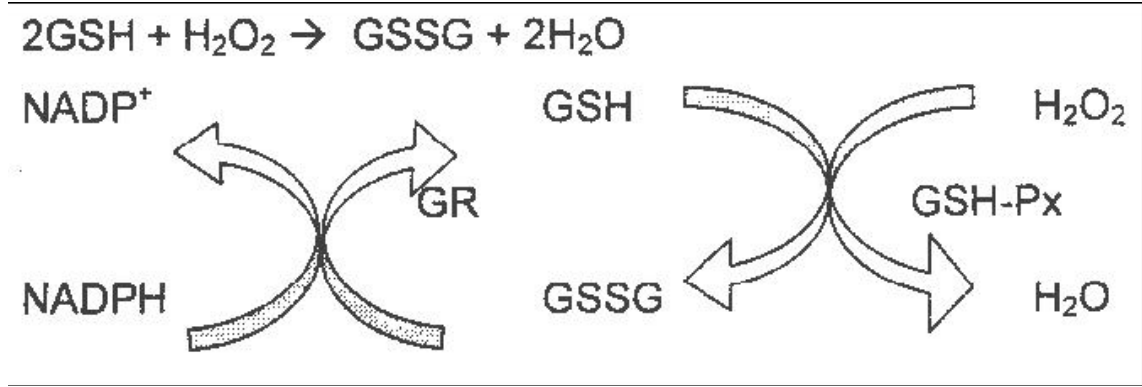
2.4.3.2. Antioksidan enzimler

2.4.3.2.a. Superoksit dismutaz: SOD enzimi, $O_2^{\cdot-}$ 'nin H_2O_2 ve O_2 dönüşümünü katalizlemektedir. SOD enzimi, süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli bir rol üstlenmektedir (135). Katalizlediği reaksiyon şu şekildedir:



Enzimin primer fonksiyonu, hücreleri süperoksit radikalinin zararlı etkilerinden korumaktır. Bu şekilde hücrelerdeki lipit peroksidasyonu da inhibe edilmiş olur (136). SOD, fagosite edilen bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynamaktadır. Bu nedenle, SOD granülosit fonksiyonu için çok önemlidir.

2.4.3.2.b. Glutasyon Peroksidaz: Glutasyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Tetramerik yapıdadır ve dört selenyum (Se) içerir. Diyetteki Se desteği enzim aktivitesini modüle eder. Enzim aktivitesi heksoz monofosfat yolunda üretilen NADPH'a bağımlıdır. Düşük konsantrasyonlardaki H_2O_2 , öncelikle GSH-Px tarafından temizlenir. Bu enzim, redükte GSH'm GSSG'ye çevrildiği ortamda hidrojen peroksidi yüksek spesifite ile detoksifiye etmektedir. Redükte GSH, GSSG haline dönüştüğü reaksiyonda GSH-Px enzimiyle hidrojen peroksit suya indirgenmiş olur. Daha sonra glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile NADPH harcanarak, okside glutasyon redükte hale dönüştürülür (Şekil 9).



Şekil 9. Redükte GSH'ın GSSG'ye dönüşümü

GSH-Px'in, fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller. GSH-Px aktivitesi düşük olan makrofajlarda başlatılan solunum patlamasını takiben, H_2O_2 salınımının arttığı gösterilmiştir (137). Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar (135).

2.4.3.2.c. Katalaz: Glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Enzimin molekül ağırlığı 240.000 daltondur. Her biri ferriprotoporfirin grubu içeren dört adet alt üniteden oluşmuştur. Ferriprotoporfirin, prostetik grubunda +3 değerlikli Fe atomu bulunan protoporfirin IX halkasıdır. Eritrositler yüksek oranda katalaz (CAT) içermekte olup, CAT aktivitesinin %98'den fazlasını sağlarlar (12). CAT enzim aktivitesinin en yüksek olduğu dokular karaciğer ve böbrek dokularıdır. Enzim dokularda başlıca mitokondri ve peroksizom partiküllerine bağlı olarak bulunmaktadır. Bundan başka endoplazmik retikulum ve sitoplazmada da aktivite göstermektedir. CAT, okside edici enzimlerin etkisiyle ortamda oluşan hidrojen peroksidi direkt olarak suya dönüştürür. Ortamdaki H_2O_2 konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda H_2O_2 'yi substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (GSH-Px) devreye girerek hidrojen peroksidi ortamdaki uzaklaştırırlar. Aynı etkileri gösteren CAT ve GSH-Px enzimleri, hücre içi yerleşimleri ve etki yerleri bakımından farklılıklar gösterirler. CAT enzimi peroksizomlarda daha etkin iken, GSH-Px enzimi başlıca sitozol ve mitokondride etkindir. Katalizlediği reaksiyon şu şekildedir:

kalp yetmezliği hastalarında ADMA düzeyleri de yüksektir (149,150). ADMA üretimi NO sentezinin azalmasına sebep olsa da kalp yetmezliği hastalarında plazma ADMA ve NO değerleri yüksek olup hastalığın şiddeti hakkında da bilgi verir (147). Yüksek plazma ADMA değerlerinin kalp yetmezliği ciddiyeti ve klinik sonlanımlar hakkında öngördürücü değere sahip olduğu anlaşılmıştır (151-154).

2.5. İnflamasyon ve kalp yetmezliği

2.5.1. Genel Bilgi

Kalp yetmezliği progresyonunda immunolojik ve inflamatuvar yanıtların patolojik rolüne ilişkin çok sayıda çalışmadan elde edilmiş kanıtlar vardır. Tümör nekroz faktör (TNF)-alfa ve interlökin-1 (IL-1) gibi proinflamatuvar sitokinlerin kardiyovasküler fonksiyonları çeşitli mekanizmalarla modüle ettikleri gösterilmiştir (155). Kalp yetmezliğindeki immunolojik cevapta, aktive olan lökositlerin inflame miyokarda migrasyonları önemli bir rol oynar (156).

İnflamatuvar mediyatörlerle ilgili yapılan çalışmalar bu hormon benzeri peptidlerin ateroskleroz, sepsis, viral miyokardit, kardiyojenik allogreft reaksiyonu gibi olayların yanı sıra kronik kalp yetmezliğinde de rolü olduğunu göstermiştir (155,157,158). Dahası proinflamatuvar sitokinler, çözülebilen adhezyon molekülleri ve kemoatraktan faktörlerin aşırı ekspresyonunu içeren anormal inflamatuvar yanıtın, kalp yetmezliği progresyonu ve klinik kötüleşmeden sorumlu olabileceği düşünölmektedir (158, 159).

Fonksiyonu bozuk kalpte, artmış sol ventriköl diyastol sonu duvar stresi sitokinlerinin miyokardiyal ekspresyonuna yol açar ve bu da direkt veya indirekt olarak sol ventriköl kontraktıl performansı ve remodelling üzerine etkilidir. Miyokardda haddinden fazla salgılanan proinflamatuvar sitokinler periferik dolaşıma çıkarak immun sistemi aktive ederler (157,160). Bir diğer hipoteze göre ise kalp yetmezliğindeki yüksek plazma sitokin değerlerinin periferik doku hipoksisi neticesinde ekstramiyokardiyal üretim kaynaklı olabileceği şeklindedir (158,160).

2.5.2. Sitokinler

Kalp yetmezliği ciddiyeti ile yükselmiş sitokin salınımı arasındaki ilişki birçok çalışmada gösterilmiştir (161-164). TNF-alfa düzeyleri ile kalp yetmezliğinde klinik

kötüleşme sınıflaması olan “New York Heart Association” (NYHA) fonksiyonel sınıfı arasında doğru orantı vardır (157). Dahası bu bilgiler ışığında serum TNF-alfa düzeylerinin kalp yetmezliği ciddiyeti ve NYHA sınıfını öngörmeye, kalp yetmezliği patogenezinde rol alan geleneksel nörohormonlar kadar etkili olduğu söylenebilir.

Çalışmalar arasında çelişkili sonuçlar olmakla beraber, çoğunda kalp yetmezliği başlangıcında yüksek IL-6 seviyeleri saptanmıştır (165). Kalp yetmezliğinde IL-6 seviyelerinin yükselme mekanizması bilinmemektedir. Ancak TNF-alfa IL-6 genini indükleyerek birçok hücre tipinde protein ekspresyonunu arttırmaktadır. Bu da kalp yetmezliği patogenezindeki sitokin kaskadı hipotezini doğrular niteliktedir (166). Ayrıca iki çalışma yüksek TNF-alfa ve IL-6 seviyeleri arasında korelasyon olduğunu göstermiştir (162,164).

Kalp yetmezliğinde IL-1, IL-2, IFN-gama gibi sitokinlerin oynadığı rolü kanıtlayan az sayıda çalışma vardır. Ancak bu sitokinlerin rolünü araştıran çalışma sayısı da diğerleri kadar fazla değildir. Dahası bilindiği üzere IL-1 kalpte otokrin, parakrin ve intrakrin salgılanır ve periferel dolaşıma salınmıyor olabilir (167)

2.5.3. Kemokinler

İnflamasyon ve hücrenin buna cevabı için şart olan lökositlerin dokuya göçü kalp yetmezliği patogenezinde de rol oynuyor olabilir (168,169). Kemokinler veya diğer adlarıyla kemotaktik sitokinler inflame dokuya lökosit invazyonun düzenleyen moleküllerdir (170). Kemokinler, yapılarındaki sistein rezidülerinin pozisyonuna göre alt gruplara ayrılan küçük proteinlerdir (171).

Kemokinler monositlerde esas olarak kemoatraktan olarak görev alsalar da bu hücrelerde sitokin üretimi ve serbest oksijen radikallerinin üretimi gibi fonksiyonları da vardır (171,172). Kalp yetmezliği patogenezindeki monosit ve proinflamatuvar sitokinlerin rolüne dair bilgilerimiz ışığında kemokinlerin monosit ve makrofajlar üzerine etkileriyle hastalık progresyonunda önemli rol oynadığı hipotezi ortaya konabilir. Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1)'in ateroskleroz ve kalp yetmezliği patogenezindeki rolünü ortaya koyan çalışmalar mevcuttur (168,173,174).

3- YÖNTEM VE GEREÇLER

3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması

4 Ekim 2012 tarihli ADÜ Hayvan Deneyleri Etik Kurul onayı alınmıştır. Ağırlıkları 250-400 gram arasında değişen erkek 42 adet Winstar-Albino cinsi rat kullanıldı. Ratlar çalışma boyunca oda ısısında ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$) ve penceresi olan odada, normal gün ışığı/karanlık ortamında tutulup, içbesleme yetiştirilip, standart pelet rat yemi ile beslendi, suya serbestçe ulaşabilmeleri sağlandı. Ratların çalışmadan çıkarılma gerekçeleri; sepsis, travma, ölüm olarak belirlendi. Toplam 42 adet rat, eşit sayıda ($n = 7$) ve rastgele olarak altı deney grubundan birine dahil edildi. Deney boyunca 8 adet rat çeşitli nedenlerle öldü ve çalışmadan çıkarıldı.

Tablo III. Rat grupları ve uygulanan ilaçlar

• Gruplar (n)	• İv enjeksiyon içeriği	• Gavaj içeriği
• Kontrol (n=7)	• Yapılmadı	• Serum Fizyolojik (her gün)
• DOX (n=7)	• DOX 18 mg/kg (6.gün)	• Serum Fizyolojik (her gün)
• DOX+karvedilol (n=7)	• DOX 18 mg/kg (6.gün)	• Karvedilol 12.5 mg/kg (her gün)
• Karvedilol (n=7)	• Yapılmadı	• Karvedilol 12.5 mg/kg (her gün)
• DOX+ivabradin (n=7)	• DOX 18 mg/kg (6.gün)	• İvabradin 10 mg/kg (her gün)
• İvabradin (n=7)	• Yapılmadı	• İvabradin 10 mg/kg (her gün)

1.Grup: Kontrol grubu: Bu gruba çalışma süresince her gün günde bir kez steril koşullarda orogastrik (OG) yolla 1 ml serum fizyolojik (SF) verildi.

2.Grup: DOX grubu: Bu gruba çalışma süresince her gün günde bir kez steril koşullarda OG yolla 1 ml SF ve çalışmanın 6.gününde kuyruk veni yoluyla DOX (18 mg/kg dozda, 1 ml distile su ile sulandırarak) verildi.

3.Grup: DOX+karvedilol grubu: Bu gruba çalışma süresince her gün günde bir kez steril koşullarda OG yolla karvedilol (12.5 mg/kg dozda, tablet formu dimetil sülfür oksid (DMSO) içinde çözülerek) ve çalışmanın 6.gününde kuyruk veni yoluyla DOX (18 mg/kg dozda, 1 ml distile su ile sulandırarak) verildi.

4.Grup: Karvedilol grubu: Bu gruba çalışma süresince her gün günde bir kez steril koşullarda OG yolla karvedilol (12.5 mg/kg dozda, tablet formu DMSO içinde çözülerek) verildi.

5.Grup: DOX+ivabradin grubu: Bu gruba çalışma süresince her gün günde bir kez steril koşullarda OG yolla ivabradin (10 mg/kg dozda, tablet formu çeşme suyu içinde çözülerek) ve çalışmanın 6.gününde kuyruk veni yoluyla DOX (18 mg/kg dozda, 1 ml distile su ile sulandırarak) verildi.

6.Grup: İvabradin grubu: Bu gruba çalışma süresince her gün günde bir kez steril koşullarda OG yolla ivabradin (10 mg/kg dozda, tablet formu çeşme suyu içinde çözülerek) verildi.

Çalışma başında kan örnekleri alınarak serum kreatin kinaz MB formu (CK-MB) ve TnI değerleri ölçüldü. DOX uygulaması deneyin ortasında (6.gün) kuyruk veni yoluyla 18 mg/kg dozda, karvedilol uygulaması tüm deney boyunca günlük tek seferde OG yolla 12.5 mg/kg dozda ve ivabradin uygulaması da aynı şekilde tüm deney boyunca günlük tek seferde orogastrik yolla 10 mg/kg dozda yapıldı. Deney sonunda (12.gün) tüm ratlar sakrifiye edilerek, kan ve doku örnekleri alındı.

3.2. Anestezi

Sakrifikasyon sevofuran ile gaz anestezisini takiben tam anestezi gerçekleştirildikten sonra gerçekleştirildi. Ratların göğüs kafesi açıldıktan sonra çevre dokulardan arındırılarak kalbe ulaşıldı. Apikal kesi ile kalp durdurularak serbestleştirildi ve yerinden çıkarıldı. Dokular biyokimyasal çalışma için fosfat tamponu konulmuş ependorf içinde -200C⁰'de derin dondurucuya yerleştirildi. Histopatolojik çalışma için de % 10'luk

nötral formole konuldu. Yirmi dört saat sonra biyokimyasal ve histopatolojik çalışmalar yapıldı.

3.3. Biyokimyasal Analizler

Serum CK-MB ve Tn I değerleri Adnan Menderes Üniversitesi Biyokimya laboratuvarında çalışıldı.

3.4. Doku Analizleri

3.4.1. Doku örneklerinin hazırlanması

Doku örnekleri, proteaz inhibitörü olan 0.2 mM fenilmetansulfonyl florid (PMSF), 1 mM Ethylenediamin tetra acetic acid (EDTA), 1 µM Leupeptin, pepstatin ve aprotinin içeren 50 mM fosfat tamponunda (pH 7.4) (1/10 g/ml) olacak şekilde 4°C'de homojenize edilecek. Homojenatlar, MPO için örnek ayrıldıktan sonra, 10.000 rpm 5 dakika santrifüj edilecek ve üstteki supernatant eşit olarak ependorflara ayrılarak diğer parametrelerin bakılabilmesi için -80 C°'de dondurulacak.

3.4.2. CAT Ölçüm Yöntemi

Doku örneklerinde CAT aktivitesi Aebi'nin yönteminine göre saptanacaktır (175). Fosfat tamponu (50 mM pH:7.4) olacak şekilde, potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄) ve disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄.2H₂O) ile hazırlandı. H₂O₂ (30 mM) olarak hazırlanacaktır.

Tampon ile dilüe edilmiş örneğe, H₂O₂'li tamponun eklenmesi ile başlayan absorbans değişimi, UV-160 Shimadzu spektrofotometresinde 240 nm'de izlenerek, 15 saniyedeki absorbans değişimi ölçülecek ve aşağıdaki formüle göre hesaplama yapılacaktır. Sonuçlar U/g yaş doku olarak verilecektir.

$$k = (2.3/Dt) \log (Abs1/Abs2) = 0.1175/Dt (sn-1)$$

3.4.3. MDA (lipid peroksidasyonu) Ölçüm Yöntemi

Dokuda MDA saptanması Ohkawa'nın yöntemine göre yapılacaktır (176). % 0,67'lik TBA (2-Thiobarbutiric acid) çözeltisi Tiyobarbitürik asid ile MDA'nın reaksiyona girmesinden sonra reaksiyon ürünü n-butanol ile ekstrakte edilecektir. MDA standardı

olarak, malonaldehit bis-(dimetil asetal) kullanılarak, 1-40 nmol'lük standartlar hazırlanacaktır.

Örneklerdeki absorbanslar UV-160 Shimadzu spektrofotometresinde 540 nm'de mikroplate okuyucusunda (EL-800) okunacak ve hesaplar otomatik olarak çizilen standart eğriden hesaplanacaktır. Sonuçlar $\mu\text{ol/g}$ yaş doku olarak verilecektir.

3.4.4. GSH Ölçüm Yöntemi

Dokuda GSH Beutler ve ark.'nın yöntemine göre ölçülecek olup, presipite edici solüsyon; metafosforik asit, disodyum EDTA ve sodyum klorür (NaCl) kullanılarak hazırlanacaktır (177). Disodyum fosfat solüsyonu; di sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) ile hazırlandı. DTNB solüsyonu; [5,5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)] ve sodyum sitrat] ile hazırlanacaktır.

GSH standardı olarak (reduced glutathione) kullanılacak olup, 1-60 mg/dl'lik standartlar olarak hazırlanacaktır. Standartlar ve örnekler UV-160 Shimadzu spektrofotometresinde 412 nm'de köre karşı okutulacaktır. Sonuçlar mg/ g yaş doku olarak verilecektir.

3.4.5. GSH-Px Ölçüm Yöntemi

Dokuda GPx aktivitesi, Kakkar ve ark.'nın yöntemine göre minör modifikasyonla saptanacaktır (178). GPx reaksiyon karışımı; 75 mmol fosfat tamponu (pH 7.0), 60 mmol GSH, 30U/ml GR, 15 mmol Na_2EDTA içermektedir. Küvet 37 °C'ye ayarlanan UV-160 Shimadzu sperofotometresine konacaktır. Küvetin içine reaksiyon karışımı konarak gerektiği kadar, dilüe edilmiş hemolizat eklenecektir. Reaksiyon H_2O_2 (%30) ile başlatılacak ve NADPH'daki absorbansın azalması 340 nm'de 3 dakika izlenecektir. Non enzimatik reaksiyon hızı kör çalışılarak hesaplanacak ve elde edilen sonuçlardan çıkartılacak, sonuçlar mU/g yaş doku olarak verilecektir.

3.4.6. GR Ölçüm Yöntemi

Dokuda GR aktivitesi, Racker ve ark.'nın yöntemine göre saptanacaktır (179). Reaksiyon karışımı; 50 mmol/L Tris tamponu, Ph 7.6, 100 $\mu\text{mol/L}$ EDTA, 4 mmol/L GSSG (oksitlenmiş glutatyon), 120 $\mu\text{mol/L}$ NADPH ile hazırlanacaktır. Reaksiyon karışımı küvetlere konacak ve uygun ortamda doku supernatantı konarak reaksiyon

başlatılacaktır.. 340 nm'de 37°C'de NADPH'ın oksidasyonunun izlenmesi yoluyla GR düzeyleri UV-160 Shimadzu spektrofotometresi kullanılarak saptanacaktır. Örnek yerine su kullanılarak, aynı şekilde kör çalışılarak elde edilen sonuç, örneklerden elde edilen sonuçtan çıkartılacaktır. Reaksiyon 3 dakika izlenecek ve sonuçlar U/g yaş doku olarak verilecektir.

3.4.7. Cu,Zn SOD Ölçüm Yöntemi

Dokuda SOD ölçümü, Sun ve ark'nın yöntemine göre saptanacaktır (180). Doku süpernatantı kloroform, etanol ile iyice çalkalanacak ve örnekler içindeki SOD 12.000 g'de 1 saat santrifüjlendikten sonra ekstrakte edilecektir. SOD deney çözeltisi; 0.3 mmol/L xantine, 0.6 mmol/L EDTA, 150 µmol/L nitroblue tetrazolium (NBT), amonyum sülfat (NH₄SO₄), 20167 U/L ksantine oksidaz (XOD) olarak hazırlanacaktır. Bu çalışma çözeltisine örnekler eklendikten sonra 25° C'de su banyosunda, XOD çözeltisi eklenecek ve reaksiyon bakır klorür (Cu₂Cl) eklenerek durdurulacaktır. Ayrıca kör çözeltisi hazırlanacak ve elde edilen absorbanlardan çıkartılacaktır. Deney sonunda oluşan renk 560 nm'de UV-160 Shimadzu spektrofotometresinde ölçülecektir.

SOD standardı (Cu,ZnSOD porcine erythrocytes) ile, 0-270 ng/tüp ve % inhibisyon değerleri karşılıklı gelecek şekilde oluşturulacaktır. İnhibisyon değerleri aşağıdaki formülden hesaplanacaktır. Her örnek için elde edilen inhibisyon değeri, grafik kullanılarak SOD değeri saptandı. SOD düzeyleri ng/g yaş doku olarak verilecektir.

(Absorbans Kör- Absorbans Örnek)

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{\text{Absorbans Örnek} - \text{Absorbans Kör}}{\text{Absorbans Örnek}} \times 100$$

3.4.8. NO₂ (nitrit+nitrat) Ölçüm Yöntemi

Dokuda NO₂ düzeyleri, Navarro-Gonzalves ve ark.'nın yöntemine göre saptanacaktır (181). Doku süpernatantı önce proteinlerinden ayrılacaktır. Glisin-NaOH tamponu; glisin ve sodyum hidroksit kullanılarak hazırlanacaktır. Glisin-NaOH tamponu içindeki CuSO₄ çözeltisi; glisin, NaOH ve bakır sülfat kullanılarak hazırlanacaktır. Bu çözelti Cd granüllerini aktiflemek için kullanılacaktır Sülfanilamid çözeltisi; hidroklorid asid %37 ve sülfanilamid ile hazırlanacak, NED çözeltisi [N-(1-Naphtyl) Ethyl-

Enediamine dihydrochloride] kullanılarak hazırlanacaktır. Standartlar, sodyum nitrit (NaNO₂) kullanılarak, 2-80 mg konsantrasyonlarda hazırlanacaktır.

Örneklerdeki NO[•] konsantrasyonu, Griess reaksiyonu sonucunda ölçülecek ve örnekler ve standartlar, ELISA mikroplate okuyucuda 540 nm'de okutulacaktır. Konsantrasyon hesapları otomatik olarak cihaz tarafından hesaplanacak olup, sonuçlar µM/g yaş doku olarak verilecektir.

3.4.9. MPO ölçümü

Dokuda MPO aktivitesi Suzuki ve ark.'nın yönteminine göre saptanacaktır (182). Yöntem sentetik bir substrat olan 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (TMB)'in MPO yoluyla yıkılımının ölçülmesine dayanmaktadır. Belli miktardaki doku homojenatı 7.000 rpm 5 dakika santrifüj edilecek ve üstteki kısım atılacak ve alttaki kalan doku kısmı deterjanlı tampon ile çözülecektir (160 mM potassium phosphate buffer, pH 5.4, 1% hexadecyltrimethylammonium bromide, HETAP). Reaksiyon H₂O₂'in 37 °C'de reaksiyon karışımına eklenmesi yoluyla başlatılacaktır. MPO'nun katalizlediği reaksiyonda TMB oksidasyona uğramakta olup, reaksiyon sırasında absorbans artışı 655 nm'de 15 saniye ölçülmekte ve 1 dakikadaki MPO aktivitesi hesaplanmaktadır. MPO aktivitesi U/g yaş doku olarak verilmektedir.

3.5. Patoloji

Patolojik inceleme için alınan kalp materyalleri %4'lük formalin solüsyonunda hemen tespit işlemine alındıktan sonra gerekli örnekler doku takip kasetine alınarak doku takip işlemi uygulandı. Bu işlem sonrası parafin bloklara gömülen doku örneklerinde 4 mikron kalınlığında kesitler alınarak hematoksilin eozin ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. İncelemede miyokarda dejenerasyon varlığı yanı sıra miyositlerin hücresel ve nükleer boyut farklılıkları değerlendirildi.

Histopatolojik kardiyotoksisiteyi değerlendirmede Billingham dejenerasyon skoru kullanıldı (183). Buna göre;

0: Dejenerasyon yok

1: Dejenere sahalar <%5

1.5: Dejenere sahalar %5-15

2: Dejenere sahalar %16-25

2.5: Dejenere sahalar %26-35

3: Dejenere sahalar>%35

3.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizinde Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 21 ve PAST programları kullanıldı. Tek değişkenli verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi, Shapiro-Wilk testi ve Değişkenlik katsayıları ile çok değişkenlinormal dağılıma uygunluğu için Mardia; Doornik&Omnibus testi dikkate alınarak incelenmiş olup; normal dağılım sahip değişkenlerin analizinde parametrik yöntemler, normal dağılıma sahip olmayan değişkenlerin analizinde nonparametric yöntemler kullanılmıştır. Bağımsız çoklu grupların bir biriyle karşılaştırılmasında One-Way Anova (Brown-Forsythe), Kruskal-Wallis H Testleri Post Hoc analizler için (nonparametrik posthoc test (Miller(1966)), LSD ve Games-Howell testleri kullanılmıştır. Bağımlı 2 grubun karşılaştırılmasında Paired-Samples T test çoklu grupların birbiriyle karşılaştırılmasında tekrarlı ölçümler için Repeated Anova (Huynh-Feldt), LSD testleri kullanılmıştır. Değişkenlerin ana faktörleri kontrol altına alındıktan sonra değişkenlerin birbiriyle olan korelasyonlarını incelemek için ise Partial Correlation test kullanılmıştır. Kantitatif veriler tablolarda ortalama \pm std.(standart sapma) ve medyan \pm IQR(Inter Quartile Range) değerleri şeklinde ifade edilmiştir. Kategorik veriler ise n(sayı) ve yüzdelerle(%) ifade edilmiştir. Veriler %95 güven düzeyinde incelenmiş olup p değeri 0,05 ten küçük anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelerde www.tibbiistatistikci.com & www.medicalstatistic.com un bilgi ve tecrübelerinden yararlanılmıştır.

4. BULGULAR

Ratların çalışma başlangıcında ve bitiminde ölçülen ortalama ağırlıkları ve p değerleri Tablo IV’de gösterildi. Çalışma başlangıcında kontrol grubuyla diğer gruplar arasında ağırlık yönünden anlamlı farklılık izlenirken, kilo değişimi açısından bakıldığında çalışma sonunda ikili olarak kıyaslandığında sadece kontrol ile karvedilol, kontrol ile ivabradin, DOX ile DOX+karvedilol, DOX ile DOX+ivabradin, DOX+karvedilol ile DOX+ivabradin grupları arasında anlamlı kilo değişimi saptanmadı. Diğer ikili grup kıyaslamalarının tümünde anlamlı kilo değişim izlendi ($p<0.05$).

Tablo IV. Grupların rat ağırlıklarına göre karşılaştırılması ve p değerleri

	kilo1, gr		kilo2, gr		DEĞİŞİM.KİLO.1_2		*P Değeri
Kontrol=A	307,86±20,00	P(A-B)=0,003 P(A-C)=0,007	359,29±26,18	P(A-B)=0,019 P(A-C)=0,021	-51,43±8,34	P(A-B)<0,001 P(A-C)<0,001	<0,001
DOX=B	344,33±14,72	P(A-D)=0,002 P(A-E)=0,021	312,17±11,91	P(A-D)=0,339 P(A-E)=0,022	32,17±5,78	P(A-D)=0,100 P(A-E)<0,001	<0,001
DOX+karvedilol=C	340,50±17,13	P(A-F)<0,001 P(B-C)=0,745	312,17±14,22	P(A-F)=0,108 P(B-C)=1	28,33±5,50	P(A-F)=0,268 P(B-C)=0,345	<0,001
karvedilol=D	343,86±24,39	P(B-D)=0,967 P(B-E)=0,849	389,00±26,27	P(B-D)=0,001 P(B-E)=1	-45,14±8,49	P(B-D)<0,001 P(B-E)=0,620	<0,001
DOX+ivabradin=E	347,50±3,54	P(B-F)=0,369 P(C-D)=0,768	312,50±3,54	P(B-F)=0,006 P(C-D)=0,001	35,00±0,00	P(C-D)<0,001 P(C-E)=0,248	-
ivabradin=F	355,00±24,29	P(C-E)=0,675 P(C-F)=0,225 P(D-E)=0,824 P(D-F)=0,331 P(E-F)=0,654	410,00±29,58	P(C-F)=0,005 P(D-E)=0,002 P(D-F)=0,793 P(E-F)=0,009	-56,00±5,48	P(C-F)<0,001 P(D-E)<0,001 P(D-F)=0,012 P(E-F)<0,001	<0,001
**P Değeri	0,002		<0,001		<0,001		

General Linear Model Repeated Anova (Wilks' Lambda) OneWay ANOVA Post Hoc Test: LSD - Games Howell Paired T Test - Independent T Test *P Değeri: Grup içi kilo Değişimi için **P Değeri: Gruplar arası kilo için

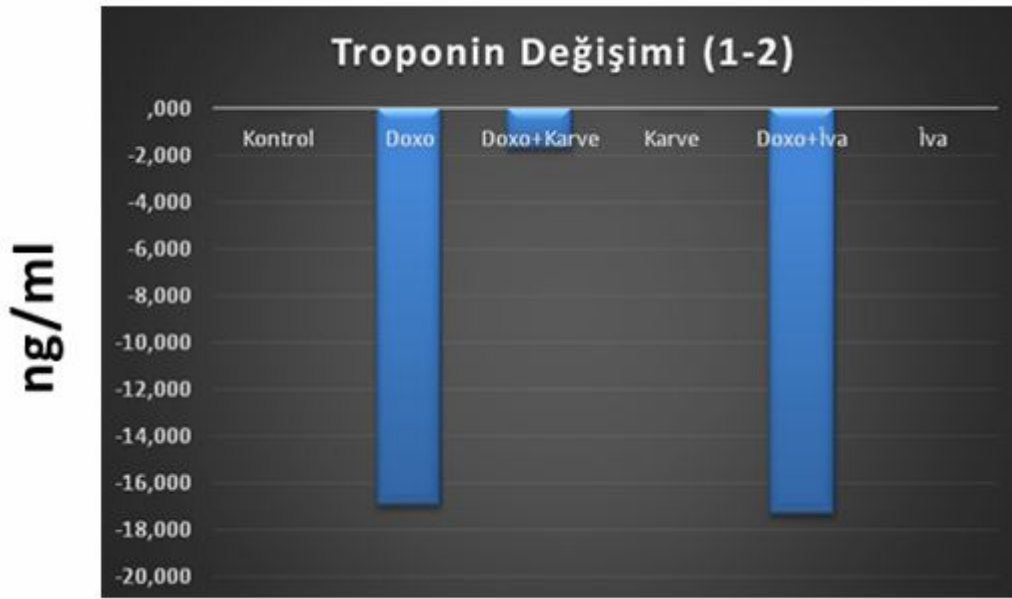
4.1.Kardiyak hasar göstergeleri

Çalışma başlangıcında ve bitiminde alınan kan örneklerinden yapılan analiz sonucunda grupların kardiyak hasar belirteçleri tablo V’de, gruplardaki TnI değişim değeri ise şekil 11’de gösterilmiştir. Kan CK-MB düzeyleri tüm örneklerde çalışma başlangıcında ve bitişinde normal seviyelerde saptanıp herhangi bir istatistiksel analize izin vermedi. Başlangıç TnI seviyelerinde gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu. Çalışma sonu TnI seviyeleri ise gruplar arasında anlamlı olarak farklıydı ($p<0.001$). TnI değişimi sadece DOX ve DOX+karvedilol grubunda anlamlı farklılık gösterdi ($p<0.05$). TnI değişimi ikili gruplar arasında kıyaslandığında çalışma başlangıcı ve bitimindeki TnI değişimi kontrol ile DOX, DOX ile DOX+karvedilol, DOX ile karvedilol, DOX ile ivabradin grupları arasında istatistiksel anlamlı sonuçlar saptandı ($p<0.05$).

Tablo V. Grupların başlangıç ve bitiş TnI değerlerine göre karşılaştırılması ve p değerleri

	troponin1, ng/ml	troponin2, ng/ml	DEĞİŞİM.TROPONİN.1_2	*P Değeri
Kontrol: A	0,004±0,005	0,007±0,005	-0,003±0,005	0,154
DOX: B	0,006±0,005	16,97±6,68	-16,97±6,67	0,002
DOX+karvedilol: C	0,004±0,004	1,71±1,54	-1,71±1,53	0,042
Karvedilol: D	0,004±0,004	0,007±0,006	-0,003±0,005	0,151
DOX+ivabradin: E	0,004±0,002	17,33±14,34	-17,32±14,34	0,337
İvabradin: F	0,004±0,004	0,007±0,005	-0,003±0,005	0,168
**P Değeri	0,879	<0,001	<0,001	

General Linear Model Repeated Anova (Wilks' Lambda) OneWay ANOVA Post Hoc Test: LSD - Games Howell
Paired T Test - Independent T Test *P Değeri: Grup içi troponin Değişimi için **P Değeri: Gruplar arası troponin için



Şekil 11. Deney gruplarında TnI değişim grafiği

4.2. Doku Antioksidan Enzim Düzeyleri

Alınan doku örneklerinden yapılan biyokimyasal analiz sonucunda antioksidan enzimler CAT, GSH Px, SOD ve doku GSH değerleri tüm gruplarda tablo VI ve VII'de gösterilmiştir. GSH ve GSHPx değerleri tüm gruplar arasında istatistiksel anlamlı oranda farklı bulunurken ($p<0.05$), katalaz ve superoksit dismutaz değerleri tüm gruplar içinde anlamlı farklı bulunmadı. Gruplar ikili olarak karşılaştırıldığında SOD ve CAT

değerlerinde herhangi iki grup arasında fark bulunmadı. Kontrol-doxo grupları arasında tüm antioksidan enzim düzeylerinde anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0.05$). GSH değerleri sadece kontrol ile karvedilol ve karvedilol ile ivabradin grupları arasında farklılık gösterdi ($p<0.05$). GSH Px değerleri ise kontrol ile DOX+karvedilol, DOX ile DOX+karvedilol, DOX+karvedilol ile karvedilol, DOX+karvedilol ile ivabradin grupları arasında anlamlı farklı tespit edildi ($p<0.05$). Diğer ikili grup kıyaslamalarında anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Tablo VI. Grupların doku antioksidan enzim düzeyleri (SOD ve CAT) ve p değerleri

	SOD*, ng/g yaş doku	CAT*, U/gr yaş doku
Kontrol=A	224,14±23,90	4,38±0,88
DOX=B	192,68±24,62	3,75±0,69
DOX+karvedilol=C	217,19±20,58	3,50±1,02
karvedilol=D	205,21±11,14	3,03±0,84
DOX+ivabradin=E	211,45±3,25	3,44±0,66
ivabradin=F	206,72±14,34	3,05±0,84
P Değeri	0,107	0,071

OneWay ANOVA (Brown-Forsythe) Post Hoc Test: LSD - Games Howell Kruskal Wallis Test Post Hoc Test: nonparametrik posthoc test (Miller(1966) * : Ortalama±Ss.(Standart Sapma) **Medyan±IQR(Inter Quartile Range)

Tablo VII. Grupların doku antioksidan enzim düzeyleri (GSH ve GSH Px) ve p değerleri

	GSH*, mg/g yaş doku	GSHPx*, mU/gr yaş doku
kontrol=A	3,37±0,67	221,30±22,50
DOX=B	2,53±0,35	185,82±22,91
DOX+karvedilol=C	2,91±0,72	145,12±35,31
karvedilol=D	2,34±0,30	203,32±49,39
DOX+ivabradin=E	2,71±0,33	191,17±12,21
ivabradin=F	2,91±0,28	188,29±29,34
P Değeri	0,015	0,007

OneWay ANOVA (Brown-Forsythe) Post Hoc Test: LSD - Games Howell Kruskal Wallis Test Post Hoc Test: nonparametrik posthoc test (Miller(1966) * : Ortalama±Ss.(Standart Sapma) **Medyan±IQR(Inter Quartile Range)

4.3. Lipid Peroksidasyon Göstergeleri

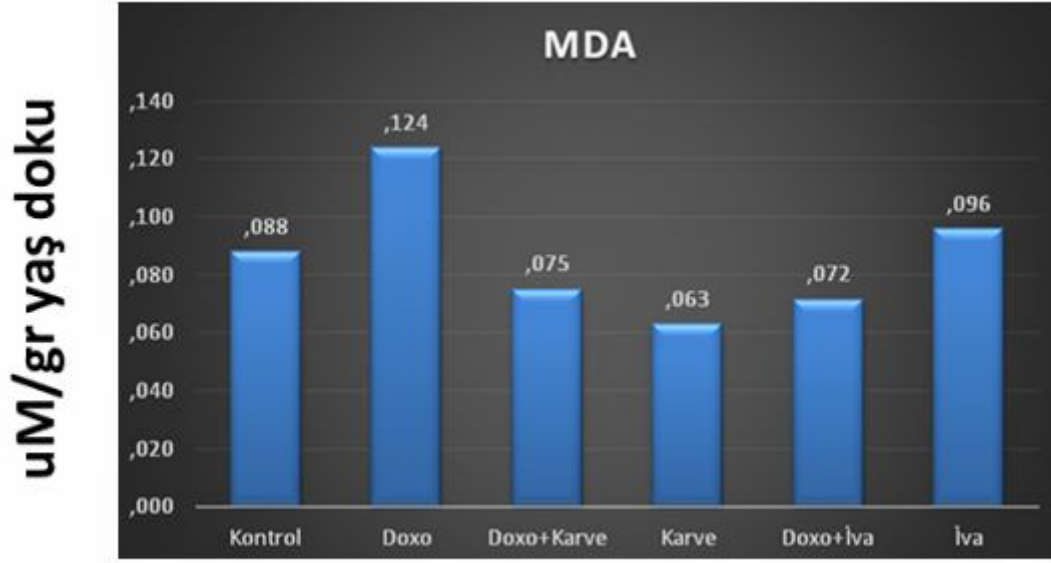
Alınan doku örneklerinden yapılan biyokimyasal analiz sonucunda dokularda lipid peroksidasyonun göstergesi olan malondialdehid, nitrik oksid ve myeloperoksidaz

değerleri tüm gruplarda tablo VIII'de gösterilmiştir. MDA ($P<0.001$), NO ($P=0.001$) ve MPO ($P<0.05$) değerleri tüm gruplar arasında istatistiksel anlamlı derecede farklı bulundu. Grupların ikili karşılaştırılmasında kontrol ile DOX grupları arasında MDA ve NO düzeyleri anlamlı farklı bulunurken MPO seviyeleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. DOX ile DOX+karvedilol kıyaslamasında ise MDA değerleri doxo grubunda anlamlı olarak daha yüksek saptandı ($p<0.001$), MPO ve NO seviyeleri arasındaki farklılık anlamlı kabul edilmedi ($p>0.05$). DOX ile DOX+ivabradin karşılaştırmasında sadece MDA değerleri anlamlı olarak DOX grubunda yüksek bulundu ($p<0.001$). DOX+karvedilol ile DOX+ivabradin kıyaslamasında ise her üç peroksidasyon göstergesinde de anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 12).

Tablo VIII. Grupların doku lipid peroksidasyon enzim düzeyleri ve p değerleri

	MDA*, uM/gr yaş doku	MPO*, U/gr yaş doku	NO**, uM/gr yaş doku
kontrol=A	0,09±0,01 P(A-B)<0,001 P(A-C)=0,163 P(A-D)=0,007 P(A-E)=0,217	87,50±20,15 P(A-B)=0,081 P(A-C)=0,996 P(A-D)=0,507 P(A-E)=0,961 P(A-F)=1	0,15±0,06 P(A-B)=0,003 P(A-C)=0,060 P(A-D)=1 P(A-E)=1 P(A-F)=1
DOX=B	0,12±0,02 P(B-C)<0,001 P(B-D)<0,001 P(B-E)<0,001 P(B-F)=0,005 P(C-D)=0,192	169,40±54,07 P(B-C)=0,188 P(B-D)=0,323 P(B-E)=0,110 P(B-F)=0,089 P(C-D)=0,960 P(C-E)=1 P(C-F)=0,999 P(D-E)=0,643 P(D-F)=0,654 P(E-F)=0,995	0,34±0,11 P(B-C)=1 P(B-D)=0,924 P(B-E)=0,699 P(B-F)=0,015 P(C-D)=1 P(C-E)=1 P(C-F)=0,181 P(D-E)=1 P(D-F)=1 P(E-F)=1
DOX+karvedilol=C	0,08±0,01	96,19±43,00	0,23±0,01
karvedilol=D	0,06±0,02	113,34±32,25	0,23±0,08
DOX+ivabradin=E	0,07±0,01	93,84±3,69	0,19±0,02
ivabradin=F	0,10±0,02	88,71±25,76	0,18±0,02
P Değeri	<0,001	0,004	0,001

OneWay ANOVA (Brown-Forsythe) Post Hoc Test: LSD - Games Howell Kruskal Wallis Test Post Hoc Test: nonparametrik posthoc test (Miller(1966) * : Ortalama±Ss.(Standart Sapma) **Medyan±IQR(Inter Quartile Range)



Şekil 12. Deney gruplarında doku MDA düzeyleri grafiği

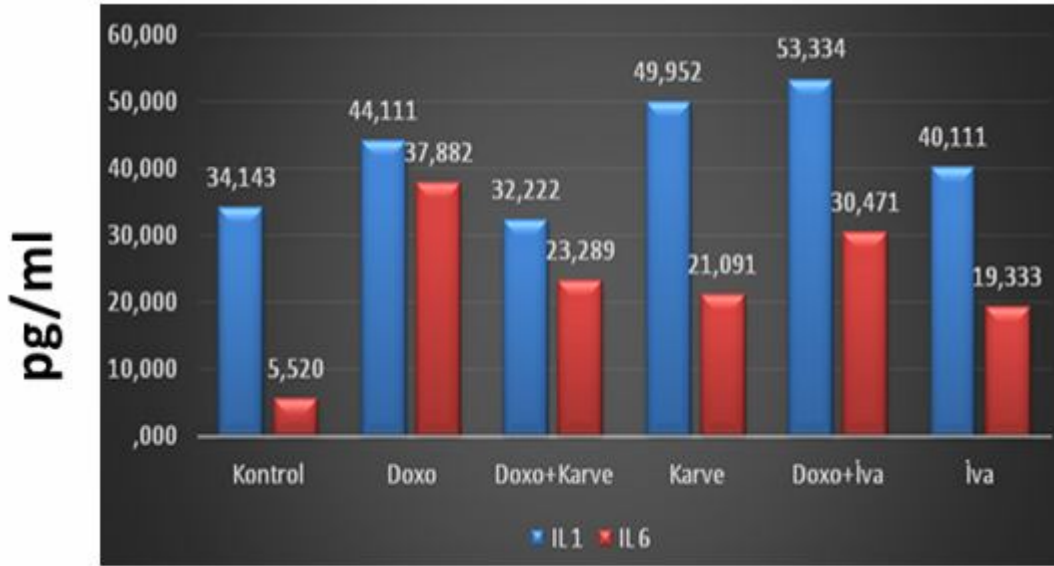
4.4. İnflamasyon Belirteçleri

Alınan serum örneklerinden yapılan biyokimyasal analiz sonucunda dokularda inflamatuvar sürecin göstergeleri olan ADMA, MCP, IL-1 ve IL-6 değerleri tüm gruplarda tablo IX ve X'da gösterilmiştir. Tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı oranda farklılıklar tespit edildi. Kontrol ile DOX grupları arasında sadece IL-1 düzeyi farklılıkları anlamlı değildi. Diğer markerlar DOX grubunda anlamlı olarak daha yüksek izlendi. DOX ile DOX+karvedilol grupları karşılaştırılmasında IL-6 ve ADMA düzeyleri anlamlı olarak doxo grubunda yüksek izlendi. DOX ile kıyaslandığında DOX+ivabradin grubunda ADMA düzeyi dışındaki değerler anlamlı fark göstermedi. DOX+karvedilol ile DOX+ivabradin kıyaslamasında ise anlamlı olarak sadece IL-1 düzeyleri DOX+karvedilol grubunda anlamlı daha düşüktü (Şekil 13 ve 14).

Tablo IX. Grupların serum inflamatuvar sitokin düzeyleri ve p değerleri

	IL1, pg/ml	IL6, pg/ml
kontrol=A	34,14±10,48	5,52±1,32
DOX=B	44,11±5,34	37,88±4,39
DOX+karvedilol=C	32,22±11,01	23,29±5,98
karvedilol=D	49,95±13,69	21,09±6,42
DOX+ivabradin=E	53,33±2,36	30,47±1,19
ivabradin=F	40,11±9,56	19,33±5,42
P Değeri	0,020	<0,001

OneWay ANOVA Post Hoc Test: LSD - Games Howell

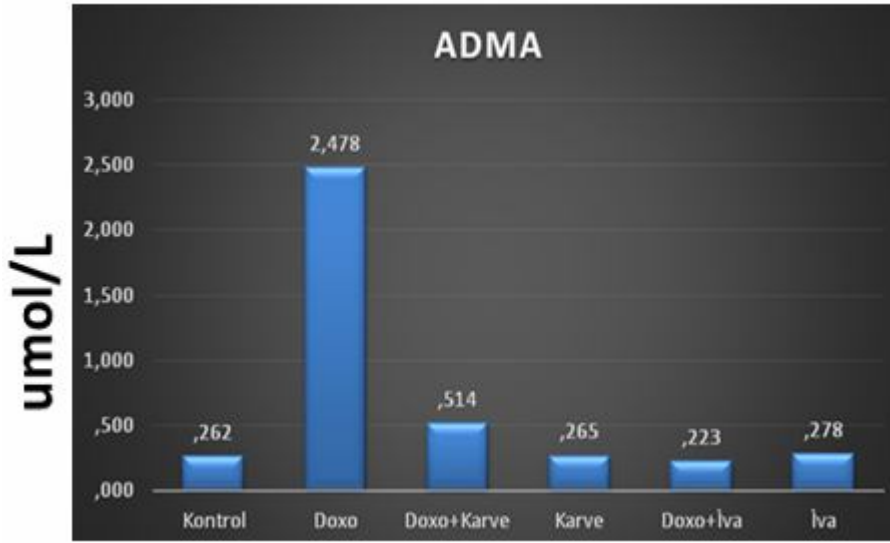


Şekil 13. Deney gruplarında doku inflamatuvar sitokin düzeyleri grafiği

Tablo X. Grupların serum inflamatuvar kemokin düzeyleri, patolojik dejenerasyon skoru ve p değerleri

	ADMA*, umol/L	MCP*, pg/ml	Patoloji skoru
kontrol=A	0,26±0,07	37,24±5,27	0±1
DOX=B	2,48±0,75	68,35±11,56	2,5±1
DOX+karvedilol=C	0,51±0,29	50,44±4,37	1±1
karvedilol=D	0,26±0,09	54,07±6,39	1±0
DOX+ivabradin=E	0,22±0,02	52,88±0,41	2,5±1
ivabradin=F	0,28±0,13	46,64±2,71	1±1
P Değeri	<0,001	<0,001	<0,001

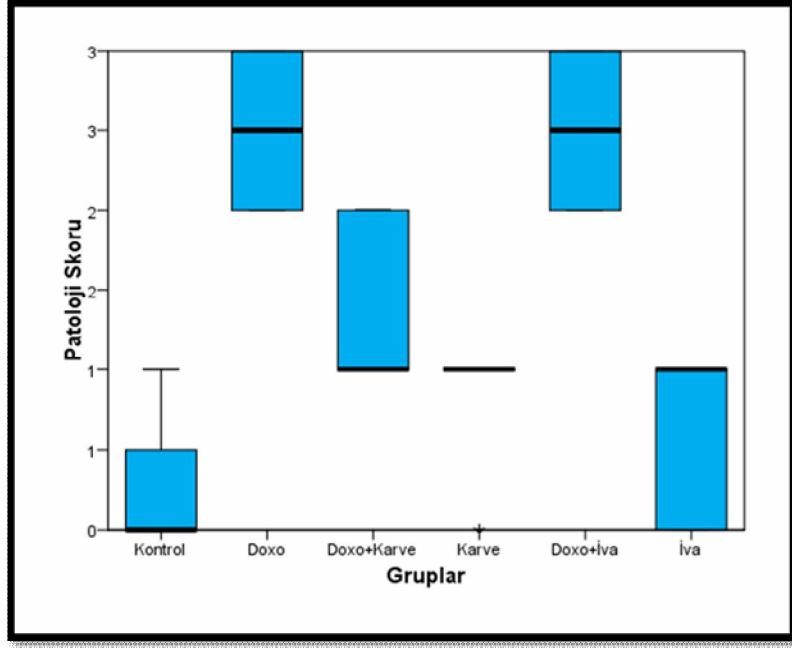
OneWay ANOVA (Brown-Forsythe) Post Hoc Test: LSD - Games Howell Kruskal Wallis Test Post Hoc Test: nonparametrik posthoc test (Miller(1966) * : Ortalama±Ss.(Standart Sapma) **Medyan±IQR(Inte Quartile Range)



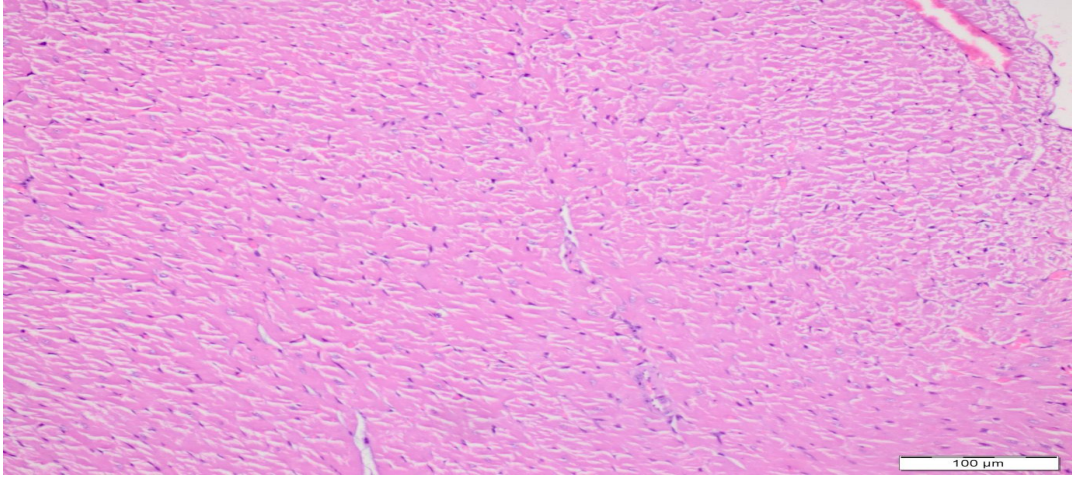
Şekil 14. Deney gruplarında doku ADMA düzeyleri grafiği

4.5. Histopatolojik Skorlama

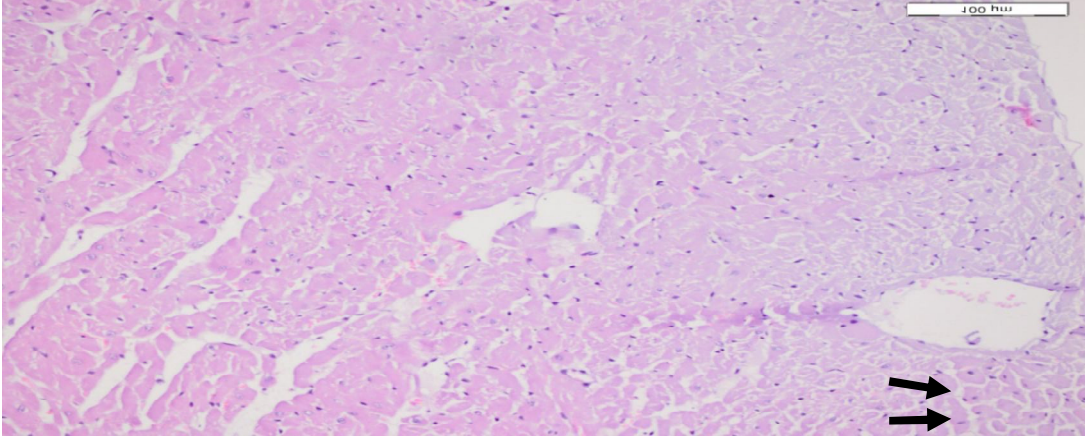
Gruplarda kalp dokusunun histolojik parametrelere göre yarı nitel olarak değerlendirilmesi ve p değerleri sonucunda tespit edilen bulgular tablo X ve şekil 15’de gösterildi. Miyokardiyal dejenerasyon skoru tüm gruplarda anlamlı olarak farklı bulundu ($p<0.001$). Kontrol ile DOX grubu arasında anlamlı istatistiksel farklılık bulunurken ($p<0.001$), DOX ile DOX+karvedilol, DOX ile DOX+ivabradin ve DOX+karvedilol ile DOX+ivabradin grupları arasında anlamlı fark izlenmedi ($p>0.05$).



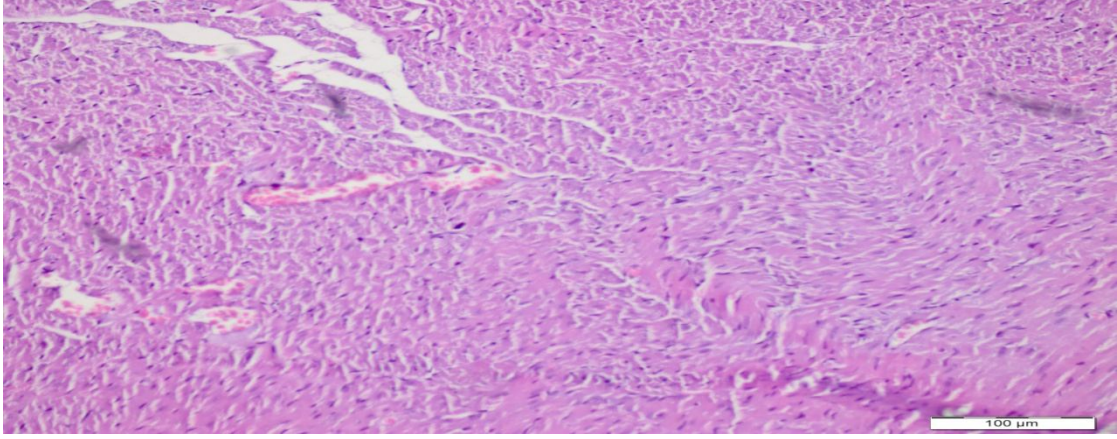
Şekil 15. Deney gruplarında patolojik dejenerasyon skoru grafiği



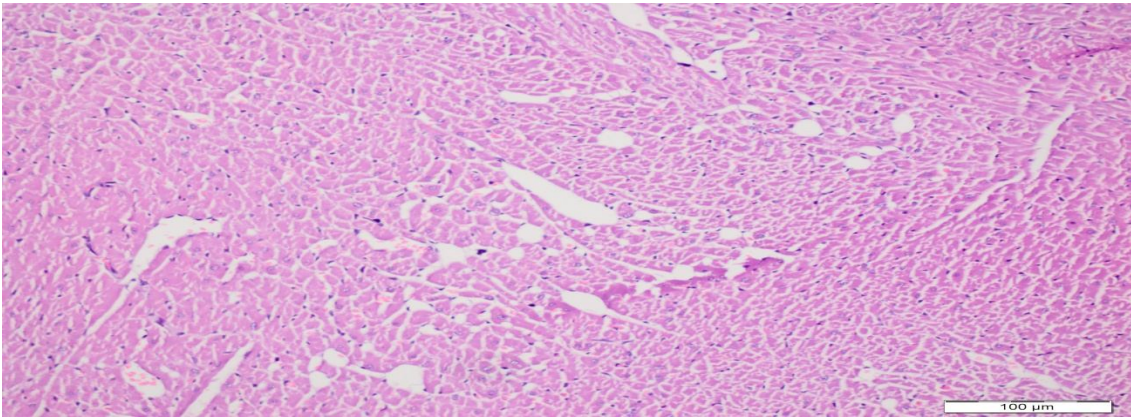
Resim 1: Kontrol grubuna ait miyokard tabakası (Normal histolojik bulgular) (HEx200)



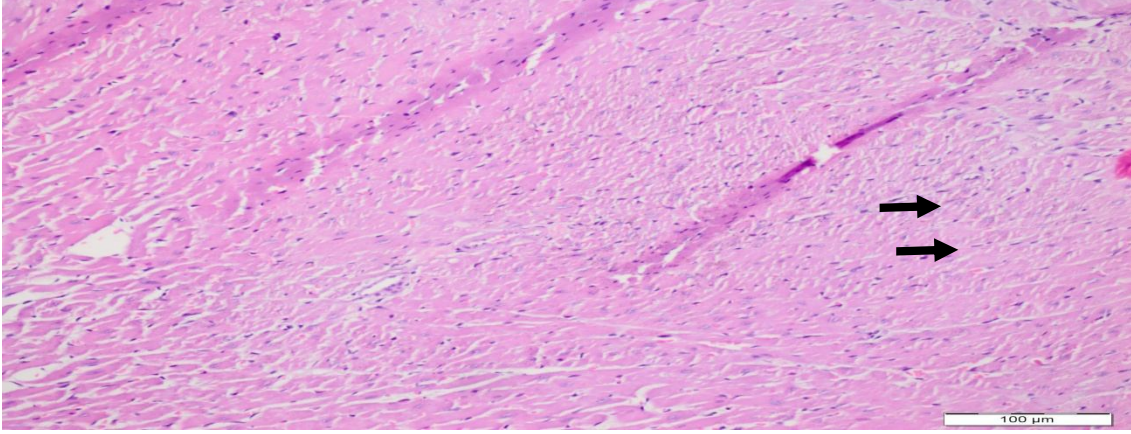
Resim 2: DOX grubuna ait miyokard tabakası. Miyokardial hücrelerde yaygın dejenerasyon, nükleus kaybı (ok) (HEx200)



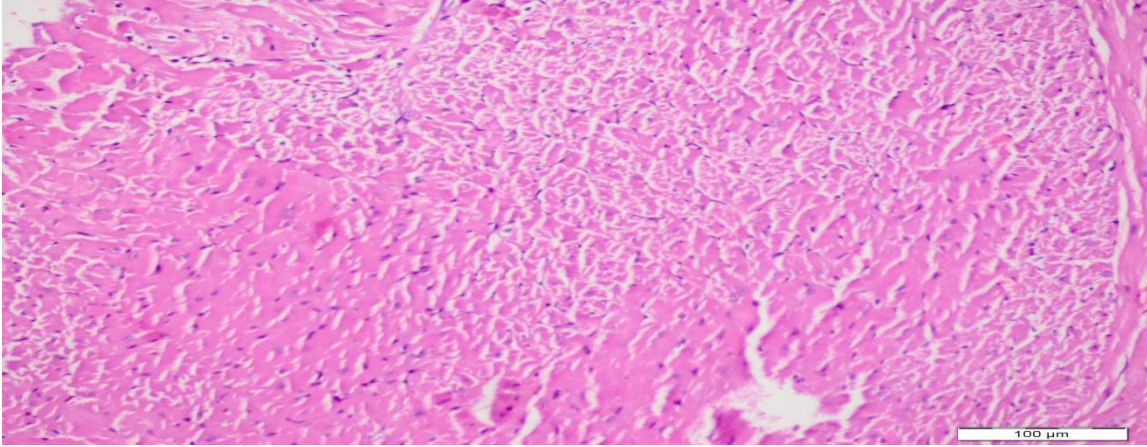
Resim 3: DOX+karvedilol grubuna ait miyokard tabakası. Miyokardiyal hücrelerde hafif dejenerasyon bulguları. Fokal nükleer kayıp (ok) (HEx200)



Resim 4: Karvedilol grubuna ait miyokard tabakası. Miyokardial hücrelerde olağan görünüm. (HEx200)



Resim 5: DOX+ivabradin grubuna ait miyokard tabakası. Miyokardiyal hücrelerde hafif dejenerasyon bulguları. Fokal nükleer kayıp (ok) (HEx200)



Resim 6: İvabradin grubuna ait miyokard tabakası. Miyokardiyal hücrelerde olağan görünüm. (HEx200)

5- TARTIŞMA

Bu çalışmada DOX ile oluşturulan kardiyotoksisteyi engellemede etkili olabileceğini düşündüğümüz karvedilol ve ivabradinden, karvedilol ile miyokard hücrelerinde nekrozun belirteci olan TnI artışının kanda, lipid peroksidasyon göstergesi olan MDA'nın kalp dokusunda ve inflamasyon markeri ADMA'nın kandaki düzeylerindeki yükselmelerin engellenebileceğini gösterdik. İvabradin ile de doku MDA ve kan ADMA düzeylerinin yükselişinin engellenebileceğini ortaya koyduk.

DOX hücre döngüsüne nonspesifik etki eden anti-tümör bir ilaçtır (184). Birçok kullanım alanı olmasına rağmen kardiyotoksik yan etkisi bu kullanımı kısıtlayan önemli ve en temel nedendir. Toksik yan etkilerinden serbest oksijen radikalleri sorumludur (185,186). DOX'a bağlı olarak meydana gelen kardiyotoksistenin patogenezi tam açıklanamamakla birlikte, oluşan SOR'lar eğer temizlenemezse hücrede hasara yol açtığı bilinmektedir (187,188). Kardiyotoksiste gelişmesinde serbest radikallerin açığa çıkmasının ve antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimin temel rol oynadığı ortaya konulmuştur (189). Deneysel çalışmalarda DOX'un kardiyotoksitesini önlemek üzere birçok ajan denenmiş ancak hiç birisi klinik kullanıma girememiştir. DOX'un 550 mg/m² kümülatif dozunda insanda akut kardiyotoksiste geliştiği bilinmektedir (190).

Çalışma başlangıcı ve sonundaki CK-MB değerleri tüm örneklerde normal değerlerde saptandı. Bu, CK-MB'nin akut kardiyak hasarda kanda hızla yükselip kısa sürede normale dönmesiyle açıklanabilir. Yani başlangıçta tamamen sağlıklı olan ratlarda normal saptanan CK-MB değeri kardiyotoksik olduğu bilinen DOX verildikten 6 gün sonraya kadar da normale dönmüş olabilir. Çalışma başlangıcında aynı şekilde TnI değerleri gruplar arasında farklılık göstermezken çalışma sonunda bakılan TnI değerleri ve başlangıç ve bitiş troponin değişimi anlamlı olarak farklı saptandı. Troponin değişimi çalışmamızın amacı açısından önemli görülen kontrol ile DOX ve DOX ile DOX+karvedilol grupları arasında anlamlı farklılık saptandı ki bu bulgular DOX ile hedeflediğimiz kardiyotoksistenin sağlandığı ve DOX'a eklenen karvedilol ile bu toksistenin azaltıldığı şeklinde yorumlanabilir. Yine çalışma sonu TnI değerlerinin ve troponin değişiminin kontrol grubu ile DOX+karvedilol grubu arasında anlamlı farklı bulunmaması da bu yorumu desteklemektedir. Ancak DOX grubu ile DOX+ivabradin grubu arasında çalışma sonu TnI değerleri ve troponin değişimi açısından istatistiksel

anlamli fark bulunmadı. Bu da ivabradin ile görmeyi umduğumuz kardiyoprotektif etkinin serum kardiyak hasar belirteçleri baz alındığında ortaya çıkmadığını gösterir.

Literatürdeki örnekleri ve yapılan çalışmalar plazma antioksidan enzim aktivitelerinin doku enzim aktiviteleri ile paralellik göstermediği, bu bulgunun antioksidan kapasitenin organlara göre farklılık göstermesine bağlı olabileceği ortaya konmuş ve bu tür çalışmalarda doku enzim aktivitesinin çalışılmasının daha güvenli olacağı savunulmuştur (191). Aynı yaklaşımla literatürdeki bazı çalışmalar doku antioksidan ve lipid peroksidasyon kapasitesine bakmışlardır (191-195). Bundan hareketle çalışmamızda plazma düzeyleri yerine, kalp dokusunda antioksidan enzimler GSH, GSH-Px, SOD ve CAT ile lipid peroksidasyon göstergesi enzimler MDA, NO ve MPO düzeylerini belirlemeyi tercih ettik.

Disli ve ark. ratlarda 20 mg/kg DOX ile oluşturulan kardiyotoksositeye karşı molsidomine'nin protektif etkisini araştırdıkları çalışmalarında DOX alan grupta azalmış SOD ve GSH değerleri bulmuşlar, CAT düzeyleri açısından farklılık saptamamışlardır (196). Yu ve ark. ratlara 2.5 mg/kg dozunda DOXle kardiyotoksosite oluşturdukları çalışmalarında DOX grubunda antioksidan SOD, CAT ve GSH Px enzim düzeylerinin azaldığını, lipid peroksidasyonu göstergesi MDA'nın ise arttığını tespit etmişlerdir (197). Narin ve ark. genç tavşanlarda yaptıkları çalışmada kümülatif total doz 15 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal DOX vermişler, DOXe bağlı kardiyotoksitenin patogenezinde miyokardiyal antioksidan enzimlerde azalma, serbest radikallerde ve lipid peroksidasyon ürünlerinde artmanın rol oynayabileceğini tespit etmişlerdir (198). Zhou ve ark. DOX verilen ratlarda doku MDA düzeylerinin artıp, SOD düzeylerinin düştüğünü, protektif etkisini araştırmak için verdikleri nilotinib ile bu etkilerin önlenilebileceğini göstermişler ve DOXe bağlı kardiyotoksitenin patogenezinde miyokardiyal lipid peroksidasyonunda artış ve antioksidan sistemlerdeki azalmanın rol oynayabileceğini göstermişlerdir (199). Wawaimuli ve ark. daunorubisin ile oluşturulan toksisiteye karşı karvedilolün etkinliğini kardiyak ve renal hücrelerde araştırdıkları çalışmalarında kalp ve böbrek dokularında toksisiteye bağlı artan MDA ve azalan GSH Px değerlerinin tedaviye karvedilol eklenmesiyle azaldığını göstermişler ve karvedilolün antioksidan etkisinin olduğunu belirtmişlerdir (18). Chularojmontri ve ark. rat kardiyak hücre kültüründe yaptıkları biyokimyasal çalışmada DOXin verdiği hasarda hücrelerin antioksidan kapasitesini ve bunun vit-E ve vit-C ile değişimini araştırmışlar, DOX verilen grupta SOD, CAT, GSH

aktivitelerini kontrol grubuna göre düşük, vit-C ve vit-E gruplarında yüksek olarak bulmuşlardır (200). Bolaman ve ark. tek seferde 10 mg/kg DOX verilerek akut kardiyotoksisite meydana getirilen erkek Wistar cinsi ratlarda amifostinin koruyucu etkilerini araştırmışlar, DOX uygulaması sonrası kalp dokusunda MDA düzeyinin arttığını, diğer antioksidan enzim düzeylerinin ise anlamlı olarak düştüğünü tespit ederek amifostinin DOX kardiyotoksisitesini azaltabileceği sonucuna varmışlardır (187).

Bizim çalışmamızda DOX uygulaması sonrası rat miyokard dokusu antioksidan enzim düzeyleri açısından kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmadı. Lipid peroksidasyon göstergesi enzimlerin dokudaki seviyelerine bakıldığında ise MPO açısından kontrol ile DOX grupları anlamlı farklılık göstermezken NO ve MDA düzeyleri DOX verilen grupta çok daha yüksek seviyelerde saptandı. Protpektif amaçlı karvedilol verilmesiyle MDA düzeyleri anlamlı oranda azalırken, NO seviyelerinde bu düşüş izlenmedi. Koruyucu olarak ivabradin verilen grupta da aynı şekilde MDA seviyeleri azalmış bulundu. Karvedilol alan grupta ivabradin alan grup kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu. Çalışmamızın bulguları literatür bilgisi ışığında değerlendirildiğinde doku antioksidan düzeylerindeki gruplar arasındaki benzer sonuçlar birçok çalışmayla tezat oluşturmakla birlikte DOXe bağlı kardiyotoksisitenin patofizyolojisinde kalp dokusundaki MDA düzeylerinin sorumlu tutulduğunu gösteren pek çok çalışmaya paralel bir şekilde DOX ile artmış MDA düzeyleri tespit edildi (194-196). Karvedilol ve ivabradinin her ikisi de kalp dokusu MDA düzeylerinde azalma sağlamış olup bu konuda birbirlerine üstünlükleri yoktu. Antioksidan özelliği daha önce birçok çalışmada gösterilen karvedilolün bu etkisini lipid peroksidasyonunu engelleyerek yaptığını göstermiş olduk. Ayrıca daha önce antioksidan mekanizmalar üzerinde etkili olduğu konusunda herhangi bir bulgu olmayan ivabradinle de lipid peroksidasyonunun azaltılması bu konuda yapılacak daha ileri çalışmalar için araştırmacıları yöreklendirmelidir.

Kalp yetmezliği ciddiyeti ile yükselmiş sitokin salınımı arasındaki ilişki birçok çalışmada gösterilmiştir (161-164). Çalışmalar arasında çelişkili sonuçlar olmakla beraber, çoğunda kalp yetmezliği başlangıcında yüksek IL-6 seviyeleri saptanmıştır (165). DOX kardiyotoksisitesinde şu ana kadar pek çok mekanizma ortaya atılmış ve en çok rağbet gören yaklaşım antioksidan sistemlerin etkisiz hale getirilmesi ve lipid peroksidasyonunun indüklenmesi olmakla birlikte inflamatuvar yolakların aktivasyonunun da bu süreçte

sorumlu olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (201-204). Zhu ve ark. ratlarda DOX ile beraber verilen IL-1 reseptör antagonisti ile kardiyotoksisitenin azaldığını göstermişlerdir (205). Çalışmamızda sakrifikasyon sonrası alınan kalp dokusunda çalışılan inflamasyon göstergelerinden IL-1 düzeyi kontrol ile DOX grupları arasında farklılık göstermezken, IL-6 seviyeleri DOX grupta anlamlı olarak daha yüksek saptandı. DOX'a kıyasla DOX+karvedilol grubunda ise anlamlı olarak azalmış IL-6 seviyeleri görülürken, DOX ile DOX+ivabradin grupları kıyaslandığında anlamlı bir farklılık görülmedi. Bir inflamasyon belirteci olan IL-6 seviyelerinde DOX ile olan artış DOX'un tetiklediği inflamatuvar sürecin bir göstergesi olarak kabul edersek karvedilol ile bu etkinin geriye döndüğünü ancak ivabradinin bu konuda etkisiz kaldığını söyleyebiliriz.

İnflamasyon ve hücrenin buna cevabı için şart olan lökositlerin dokuya göçü kalp yetmezliği patogenezinde de rol oynuyor olabilir (168,169). Kemokinler veya diğer adlarıyla kemotaktik sitokinler inflamasyon dokuya lökosit invazyonunun düzenleyen moleküllerdir (170). Kalp yetmezliği patogenezindeki monosit ve proinflamatuvar sitokinlerin rolüne dair bilgilerimiz ışığında kemokinlerin monosit ve makrofajlar üzerine etkileriyle hastalık progresyonunda önemli rol oynadığı hipotezi ortaya konabilir. MCP-1'in ateroskleroz ve kalp yetmezliği patogenezindeki rolünü ortaya koyan çalışmalar mevcuttur (168,173,174). Ingebjorg ve ark. 80 kalp yetmezliği hastasının serum ADMA değerlerini ölçtüklerinde NYHA class III semptomatik grupta class II semptomatik gruba göre daha yüksek değerler saptamışlar ve kalp yetmezliği ciddiyeti tayininde serum ADMA değerinin prognostik olabileceğini belirtmişlerdir (206). Masayuki ve ark. yaptığı çalışmada kalp yetmezliği tablosu akut olarak kötüleşen hastalarda stabil seyirli hastalara göre yüksek bulunan serum ADMA değerlerinin akut kötüleşmenin de biyokimyasal indikatörü olabileceği şeklinde yorumlamışlardır (207). Alfieri ve ark. kalp yetmezliği hastalarında uzun dönem karvedilol tedavisi ile sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ve serum inflamatuvar markerları arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmada, tedaviye karvedilol eklenmesiyle ADMA düzeyindeki azalmaların ejeksiyon fraksiyonu iyileşen hastalarda ortaya çıktığını dahası bazal serum ADMA düzeyi ile tedavi sonrası ejeksiyon fraksiyonundaki değişiklik arasında ters orantı olduğunu tespit ederek serum ADMA düzeyinin prognostik önemini vurgulamışlardır (208). ADMA düzeylerinin DOX kardiyomyopatisindeki rolü ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma yoktur. Najah ve ark. intraperitoneal yolla 20 mg/kg tek doz DOX vererek yaptıkları deneyde DOX ile MCP-1

düzeıı artışı olduğunu göstermişler ve vitamin E verilmesi ile bu artışın önüne geçebilmişlerdir (209). Richard ve ark. ratlarda perindoprilin DOX ilişkili kardiyomiyopatııı önlemede etkisini test ettikleri çalışmada DOX grubu ratlarda artmış miyokard MCP-1 ekspresyonu olduğunu ortaya koymuşlardır (210).

Bizim çalışmamızda rat serum örneklerinde bakılan ADMA ve MCP-1 seviyeleri DOX grubunda kontrol grubuna kıyasla yüksek bulundu. Bu da DOX ile ortaya çıkan kardiyotoksisitede inflamatuvar kemokinlerin rolü olduğunu doğrulamış oldu. DOX'a eklenen karvedilol ve ivabradin ile ADMA seviyeleri düşüş gösterirken MCP-1 seviyelerinde anlamlı düşme izlenmedi. Karvedilol ile ivabradin arasında da etkinlik açısından bir fark bulunmadı. Kalp yetmezliği akut dekompenzasyonu ve uzun dönem prognozunda önemli bir belirteç olduğu artan çalışma sayıları ile gösterilen ADMA seviyesinin karvedilol ve ivabradin ile azalması test ettiğimiz ajanların anti inflamatuvar yolaktaki kemokinler üzerindeki baskılayıcı etkileri ile kardiyotoksisiteyi önleyebileceğini düşündürdü. ADMA düzeylerinde her iki ajanla görülen azalmanın MCP-1 düzeylerine yansımaması hakkında yorum yapmak güç olup bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu açıktır.

DOX'un hasarladığı kalp kasının ışık mikroskopu ile tespit edilebilen morfolojik bulguları miyokardiyal fibrillerde hipertrofi, ödem, vakuolizasyon, interstisyel ödem, hemoraji, dağılıma ve nekrozdur (211). Pek çok çalışmada DOX kullanımı ile miyofibrillerde harabiyet ve kayıp olduğu gösterilmiştir. DOX'un antitümör aktivitesinin protein ve nükleik asit sentezini inhibe etmesine bağlı olarak olduğu bilinmektedir. DOX ile tedavi sonrası oluşan etkileri ışık mikroskopunda inceleyen çalışmalarda da kardiyomiyositlerde atrofi, dejenerasyon, sitoplazmik vakuolizasyon ile miyofibrillerde düzensizlik bildirilmiştir (212-214). Bizim çalışmamızda kardiyomiyositlerde DOX'un oluşturduğu hasarı mikroskopik olarak tespit etmede Billingham dejenerasyon skoru kullanıldı (183). Buna göre 0 puan dejenerasyon yokluğunu, 1 puan dejenere sahaların %5'ten az olduğunu, 1.5 puan dejenere sahalar %5-15 arasında olduğunu, 2 puan dejenere sahaların %16-25 arasında olduğunu, 2.5 puan dejenere sahaların %26-35 arasında olduğunu ve 3 puan dejenere sahaların %35'ten fazla olduğunu göstermektedir. Ballı'nın çalışmasında Wistar-albino cinsi ratlara 15 mg/kg kümülatif dozda DOX verilerek miyokard dokusunda hem ışık hem de elektron mikroskopik inceleme yapılmış, ışık mikroskopisinde kalp kası hücrelerinde yer yer dejeneratif değişikliklerin olduğu,

miyofibrillerin düzenli diziliminin bozulduğu ve yer yer miyofibrillerin parçalandığını tespit edilmiştir (215).

Lai ve ark. tavşanlarda DOX kardiyotoksitesini belirlemede heart fatty acid-binding protein (H-FABP) değerinin erken bir belirteç olup olmadığını araştırdıkları çalışmada tavşanlara verilen DOX dozu arttıkça Billingham dejenerasyon skorunun arttığını saptamışlardır (216). Kadıköylü ve ark bir antrasiklin türevi olan mitoksantron kardiyotoksitesine karşı amifostinin etkinliğini değerlendirdikleri çalışmalarında mitoksantron ile yüksek dejenerasyon skorları saptanmış ve amifostinin tedaviye eklenmesi sadece yüksek doz mitoksantron alan grupta dejenerasyonu azaltmıştır (217).

Bizim çalışmamızda DOX uygulaması sonrası kalp kası histomorfolojisinden elde ettiğimiz ışık mikroskopisi bulguları Billingham dejenerasyon skoru kullanılarak yorumlandığında literatürdeki çalışmalarla uyumlu bir şekilde DOX alan grupta kontrol grubuna göre anlamlı dejeneratif farklılıklar saptandı. DOX ile beraber karvedilol ve ivabradin verilen gruplarda ise dejenerasyon skoru DOX grubuna göre anlamlı farklılık göstermedi. Bu bulgular karvedilol ve ivabradinin histopatolojik olarak dejenerasyonu engellemediği sonucuna yol açtı.

Bu çalışmada hasarlanan kalp dokusundaki hasar mekanizmalarını çok yönlü olarak tespit edip protektif olarak düşündüğümüz karvedilol ve ivabradinle de bu mekanizmaların hangi oranda geriye döndürülebileceğini kıyaslamalı olarak değerlendirmeyi planladık. Ancak elde ettiğimiz biyokimyasal ve histopatolojik sonuçlar global olarak değerlendirildiğinde DOX ile kardiyak nekroz oluşumu sonucu yükselmiş kardiyak enzim seviyeleri saptadık ve bu nekrozun sadece karvedilol ile azaldığını tespit ettik. Bu anlamda ivabradinin anlamlı bir etkinliğini bulamadık. Doku antioksidan düzeyleri açısından çalışmamız herhangi anlamlı bir sonuç vermezken, lipid peroksidasyonun güçlü göstergesi olan doku MDA düzeyi DOX grubunda artmış bulundu. Bu artış hem karvedilol hem de ivabradin ile anlamlı olarak önlenirken iki ajanın birbiriyle kıyaslamasında birbirlerine üstünlükleri yoktu. İnflamatuar sitokin ve kemokinlerden DOX ile doku düzeyleri artan IL-6, ADMA ve MCP-1 değerlerinden IL-6 ve ADMA artışı karvedilolle azaltılmış olup, ivabradin ile de sadece doku ADMA seviyeleri azalmış bulundu. DOX kardiyotoksitesinde inflamasyon mekanizmasının miyokard hücrelerinde de aktif bir şekilde meydana geldiğini ve tedaviye karvedilol eklenmesi ile bunun da azaltılabileceğini göstermesi açısından önemli bir bulgu olduğunu düşünüyoruz.

İvabradinin bu konudaki etkinliği karvedilol kadar fazla bulunmadı. Son olarak deney sonunda sakrifiye edilen ratların miyokard kesitlerinin ışık mikroskopisi altında Billingham dejenerasyon skoru kullanılarak değerlendirildiği çalışmanın histopatolojik ayağında ise DOX ile ortaya çıkan dejenerasyonu ortaya koymamıza rağmen karvedilol veya ivabradin ile herhangi bir protektif etki saptayamadık. Bu bulgularla DOX ile oluşan kardiyotoksisitenin patofizyolojisinde miyokardiyal nekroz, nükleer dejenerasyon, lipid peroksidasyonu ve inflamasyonun rolünü ortaya koymuş olduk. Yine bu yolakların birçoğuna etkili olan karvedilolün kemoterapötik ajana eklenmesiyle bu etkilerin azaltılabileceğini gösterdik. Bu alanda ilk kez denenen ajan olan ivabradin ile ise beklediğimiz etkiyi birçok alanda göremedik. Çalışma boyunca DOX ratlara tek doz olarak kuyruk veni yoluyla verildi ve ratların istisnasız hepsinde çalışma süresince kilo kaybı, iştahsızlık, kanlı ishal gibi sistemik yan etkiler izlendi. Dahası DOX+ivabradin alan grupta 7 rat ile başlayan çalışmamız önlenemeyen rat kayıpları nedeniyle çalışma sonunda 2'ye düştü ve bu da istatistiksel olarak bu grubu değerlendirmede çeşitli zorluklara yol açtı. Aynı şekilde DOX alan grupta görülen iştahsızlık ve ishal gibi bulgular barsaklarda oluşması muhtemel villus kaybı gibi sebeplere yol aabilmiş olacağından protektif amaçla orogastrik yolla verilen ajanların ne kadarının barsaklardan emilebildiği de bilinmemektedir. Çalışmamız esnasında yaşadığımız bu tip zorluklar da çalışma sonuçlarını mutlaka etkilemiş olduğunu düşünmekteyiz. Yine de bu çalışma sonuçları işığında DOX kardiyotoksisitesini önlemede karvedilolün pek çok etki mekanizması yoluyla etkili olabileceği fikrindeyiz ve bu konuda yapılacak benzer çalışmalara da örnek olabileceğini düşünüyoruz.

6- SONUÇ VE ÖNERİLER

Halen birçok solid tümör tedavisinde etkin bir şekilde kullanılan DOX'un yol açtığı kardiyak hasara karşı etkinliği kanıtlanmış bir ajan olmayıp bu konuda çalışmalar devam etmektedir. Birden çok hasar mekanizmasının ortak sonucu olarak ortaya çıkan kardiyotoksisiteye karşı denenilen ajanların faydaları gösterilmiş olup klinik kullanımda onay almış bir ilaç yoktur. Çalışmamızın sonuçları gösterdiği üzere karvedilol, DOX ile meydana gelen kardiyak toksisitenin hem peroksidasyon yolağını inhibe etmede hem de inflamatuvar zararlarını önleyebilmektedir. Önceki hayvan deneylerinde de özellikle antioksidan etkisi sayesinde bu endikasyonda protektif sonuçlarla karşılaşılan karvedilolün anti inflamatuvar özelliğini de gösterdiğimizi düşünmekteyiz ve DOX ihtiyacı olan malignite hastalarında tedaviye eklenmesinin kardiyotoksisite gelişimini engelleyebileceği kanaatindeyiz. Karvedilolün bu çok yönlü etkisinin aksine ivabradin ise yaptığımız çalışmada anti inflamatuvar olarak etkili bulunsa da antioksidan parametrelerde bir değişiklik yaratamamış olup bu ilaçla ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

ÖZET

Giriş ve amaç: DOX, antrasiklin türevi bir antibiyotik ve grubunun ilk bulunan anti kanser üyesidir. Geniş spektrumlu antineoplastik etkisi sayesinde solid tümörler ve hematolojik malignitelere yaygın olarak kullanılmaktadır. DOX ve diğer antrasiklinlerin kanser tedavisinde kullanımını sınırlayan en önemli ve olumsuz özellikleri, kardiyotoksik yan etkileridir. Kardiyotoksisiteyi önlemek için birçok ajan denenmiş, ancak etkin ve güvenilir bir ajan bulunamamıştır.

Bu çalışmada DOX'un kalp dokusunda oluşturduğu toksisiteye karşı antioksidan bir ajan olan karvedilol ile kalp yetmezliği tedavisinde yeni bir ajan olan ivabradinin koruyucu etkileri araştırıldı.

Yöntem ve gereçler: Çalışmaya 6 gruba ayrılmış 42 fare ile başlandı. Her grupta 7 fare olmak üzere gruplar kontrol, DOX, DOX + karvedilol, karvedilol, DOX + ivabradin, ivabradin şeklindeydi. Kontrol grubuna çalışma boyunca her gün gavajla serum fizyolojik verildi. DOX grubuna her gün gavajla serum fizyolojik ve 6.gün kuyruk veni yoluyla 18 mg/kg dozda tek seferde DOX verildi. DOX + karvedilol grubuna her gün gavajla 12.5 mg/kg dozda karvedilol ve 6.gün kuyruk veni yoluyla 18 mg/kg dozda tek seferde DOX verildi. Karvedilol grubuna her gün gavajla 12.5 mg/kg dozda karvedilol verildi. DOX + ivabradin grubuna her gün gavajla 10 mg/kg dozda ivabradin ve 6.gün kuyruk veni yoluyla 18 mg/kg dozda tek seferde DOX verildi. İvabradin grubuna her gün gavajla 10 mg/kg dozda ivabradin verildi. Çalışma başında kardiyak enzim tayini için kan örnekleri alındı. 12 günlük deney sonucunda kan örnekleri ve kalp dokuları biyokimyasal ve histopatolojik değerlendirmeler için kullanıldı.

Bulgular: Kontrol grubuyla kıyaslandığında DOX grubunda troponin değişimi, malondialdehid, nitrik oksid, interlökin-6, monosit kemoatraktan protein-1 ve asimetric dimetilarjinin değerleri yüksek saptandı ($p<0.05$). DOX + karvedilol grubunda troponin değişimi, malondialdehid ve asimetric dimetilarjinin değerleri DOX grubundan daha düşük bulundu ($p<0.05$). Malondialdehid ve asimetric dimetilarjinin değerleri DOX + ivabradin grubunda da DOX grubuna göre daha düşüktü ($p<0.05$). DOX grubunda kontrol grubundan farklı olarak kalp dokusunda mikroskopik dejeneratif değişiklikler izlenirken karvedilol veya ivabradin ile dejenerasyonu engellemede anlamlı bir farklılık izlenmedi ($p>0.05$).

Sonuç: DOX ile verilen karvedilolün DOX kardiyomiyopatisi oluşumunu farklı yollar üzerinden engelleyebileceği söylenebilir. İvabradin ile bu etki oluşacağı konusunda umutlu olmak için erken olduğunu düşünüyoruz. Çalışmamız az sayılabilecek rat sayısı ile yapıldı ve deney süresince DOX alan gruplarda rat kayıpları yaşandı. Özellikle ivabradinin bu endikasyondaki etkinliğini ölçmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Dokсорubisin, Dokсорubisin kardiyomiyopatisi, Karvedilol, İvabradin, MDA, ADMA

SUMMARY

Objective: The *first* generation *anthracycline doxorubicin* has been in clinical use for the treatment of solid tumors and haematological malignancies since 50 years. *Cardiotoxicity* is the *most important* dose-limiting toxicity of *doxorubicin*. *Although many agents* are employed to prevent *cardiotoxicity*, an *efficient* and a *safe agent* has not been found. In this study, we aimed to investigate the protective effect of carvedilol and ivabradine for doxorubicin-induced cardiotoxicity on the heart tissue.

Methods: The *study* design involved 42 Wistar rats weighing which were divided into 6 groups as control (n:7), doxorubicin (n:7), doxorubicin + carvedilol (n:7), carvedilol only (n:7), doxorubicin + ivabradine (n:7) and ivabradine only. The control group was administered normal saline by gavage every day. The doxorubicin group was administered physiological saline by gavage every day and doxorubicin (18 mg/kg) single dose at the day 6 by tail vein. The doxorubicin and carvedilol group was administered carvedilol (12.5 mg/kg) by gavage every day and doxorubicin (18 mg/kg) single dose at the day 6 by tail vein. The carvedilol group was administered carvedilol (12.5 mg/kg) by gavage every day. The doxorubicin and ivabradine group was administered ivabradine (10 mg/kg) by gavage every day and doxorubicin (18 mg/kg) single dose at the day 6 by tail vein. The ivabradine group was administered ivabradine (10 mg/kg) by gavage every day. Blood samples for cardiac enzymes were taken at the beginning of the study. Wistar rats were followed twelve days and then blood samples were taken and heart was excised for biochemical and histopathologic analyse.

Results: Compared to control group troponin, malonyl dialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), interleukin-6 (IL-6), Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels were significantly elevated in doxorubicin group ($p < 0.05$). In doxorubicin + carvedilol group troponin, MDA and ADMA levels were significantly lower than doxorubicin group ($p < 0.05$). In doxorubicin+ivabradine group MDA and ADMA levels were significantly lower than doxorubicin group. In doxorubicin group degenerative changes were observed in the heart tissue of rats. Addition of carvedilol or ivabradine in doxorubicin treatment did not prevent the degenerative changes.

Conclusion: Addition of carvedilol in doxorubicin treatment can prevent the cardiotoxicity by different pathways. Further prospective, randomized, controlled trials are necessary to

make healthier interpretations on the effect of carvedilol and ivabradin in doxorubicin induced cardiotoxicity treatment.

Key words: carvedilol; doxorubicin; doxorubicin cardiotoxicity; ivabradine; MDA; ADMA

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. Hideg K, Kálai T. Novel antioxidants in anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol.* 2007;7:160-4.
3. 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.
4. Ferrans VJ. Anthracycline cardiotoxicity. *Adv Exp Med Biol.* 1983;161:519-32.
5. 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.
6. Aubel-Sadron G, Londos-Gagliardi D. Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie.* 1984;66:333-52.
7. Lipshultz SE, Alvarez JA, Scully RE. Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Heart.* 2008;94:525-33.
8. Berg SL, Balu FM, Poplack DG. Cancer chemotherapy. Nathan DG, Oski SH. Hematology of infancy and childhood. 5th edition, W.B. Saunders Company 1998:1218-9.
9. Menna P, Salvatorelli E, Minotti G. Cardiotoxicity of antitumor drugs. *Chem Res Toxicol.* 2008;21:978-89.
10. Berg SL, Balu FM, Poplack DG. Cancer chemotherapy. Nathan DG, Oski SH. Hematology of infancy and childhood. 5th edition, W.B. Saunders Company 1998:1218-9.
11. Larsen RL, Jakacki RI, Vetter VL, Meadows AT, Silber JH, Barber G. Electrocardiographic changes and arrhythmias after cancer therapy in children and young adults. *Am J Cardiol.* 1992;70:73-4.
12. Steinherz LJ, Steinherz PG, Tan C. Cardiac failure and dysrhythmias 6-19 years after anthracycline therapy: a series of 15 patients. *Med Pediatr Oncol.* 1995;24:352-61.
13. Frishman WH. Carvedilol. *New Engl J Med* 1998;339:1759-65.

14. Feuerstein G, Ruffolo Jr RR. Beta-blockers in congestive heartfailure: the pharmacology of carvedilol, a vasodilating beta-blocker and antioxidant, and its therapeutic utility in congestive heart failure. *Adv Pharmacol* 1998;42:611–5.
15. Feuerstein GZ, Ruffolo Jr RR. Carvedilol, a novel multiple action antihypertensive agent with antioxidant activity and the potential for myocardial and vascular protection. *Eur Heart J* 1995;16(Suppl F):38–42.
16. Noguchi N, Nishino K, Niki E. Antioxidant action of the antihypertensive drug, carvedilol, against lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 2000;59:1069–76.
17. Paolo Spallarossa, Silvano Garibaldi, Paola Altieri, Patrizia Fabbi, Valeria Manca, Sabina Nasti et al. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 37 (2004) 837–846
18. Wawaimuli Arozala, Kenichi Watanabe, Punniyakoti T. Veeraveedu, Meilei Ma, Rajarajan A. Thandavarayan, Vijayakumar Sukumaran et al. Protective effect of carvedilol on daunorubicin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Toxicology* 274 (2010) 18–26
19. Paulo J. Oliveira, James A. Bjork, Maria S. Santos, Richard L. Leino, M. Kent Froberg, Ant6nio J. Moreno et al. Carvedilol mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 200 (2004) 159–168
20. Filomena de Nigris, Monica Rienzo, Concetta Schiano, Carmela Fiorito, Amelia Casamassimi, Claudio Napoli. Prominent cardioprotective effects of third generation beta blocker nebivolol against anthracycline-induced cardiotoxicity using the model of isolated perfused rat heart. *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER* 2008;44: 334–40
21. DiFrancesco D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol* 1993; 55: 455-72.
22. Accili EA, Proenza C, Baruscotti M, DiFrancesco D. From funny current to HCN channels: 20 years of excitement. *News Physiol Sci* 2002; 17: 32-7.
23. Swedberg K, Komajda M, Böhm Borer J.S, Ford I, Tavazzi L. Beneficial effects of ivabradin on outcomes in chronic heart failure: The Systolic Heart Failure Treatment with if inhibitor Ivabradine Trial (SHIFT). *European Journal of Heart Failure* 2010; 12: 75-81.

24. Fox K, Ford I, Steg PG, Tendera M, Robertson M, Ferrari R et al. Heart rate as a prognostic risk factor in patients with coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): a subgroup analysis of a randomised controlled trial. *The Lancet* 2008; 372: 817-21
25. Custodis F, Baumhakel M, Schlimmer N, List F, Gensch C, Böhm M et al. Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2008; 117: 2377–87.
26. Drouin A, Gendron ME, Thorin E, Gillis MA, Mahlberg-Gaudin F, Tardif JC. Chronic heart rate reduction by ivabradine prevents endothelial dysfunction in dyslipidaemic mice. *Br J Pharmacol* 2008;154: 749–57.
27. Kayaalp SO, Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar, Kayaalp SO, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Cilt I, IX. Baskı, Hacettepe-TAŞ, 2002:394-5.
28. Küçükhüseyin C. Kanser kemoterapisi. Özüner Z. Temel ve Klinik Farmakoloji. 3. Baskı Barış Kitabevi, İstanbul 1995; 116-7
29. Cottin Y, Ribouot C, Maupoil V, Godin D, Arnold L, Brunotte F, Rochette L. Early incidence of adriamycin treatment on cardiac parameters in the rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 1994; 72: 140-5
30. *J Physiol Pharmacol.* 1994;72:140-5. 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.
31. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007;49:330-52.
32. Gewirtz DA: A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics Adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 1999; 57: 727–741.
33. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L: Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 185–229.
34. Robert J, Gianni L,. Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. *Cancer Surveys.* 1993;17:219-52.

35. Woo MH, Evans WE, Relling MV. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. In: Pui C-H (ed), *Childhood Leukemias*, Cambridge University 1999:275-6.
36. Ergül PB. Erken antrasiklin kardiotoxisitesinin renkli doppler ekokardiografi ile izlemi ve karnitinin kardioprotektif etkisinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanlık Tezi. İstanbul-2001.
37. Schimmel KJM, Richel DJ, van den Brink RBA, Guchelaa HJ. Complications of treatment cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev.* 2004;30:181-191.
38. Venkatesan N, Punithavathi D, Arumugam V. Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats. *Br J Pharmacol.* 2000;129:231-4.
39. 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.
40. Olson RD, Mushlin PS: Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypothesis. *FASEB J* 4: 3076-3086,1990
41. Singal PK, Deally CM, Weinberg LE: Subcellular effects of Adriamycin in the heart: a concise review. *J Mol Cell Cardiol* 1987; 19:817–828.
42. Kalyanaraman B, Perez-Reyes E, Mason RP: Spin-trapping and direct electron spin resonance investigations of the redox metabolism of quinone anticancer drugs. *Biochim Biophys Acta* 1980; 630: 119–130.
43. Doroshow JH: Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res* 1983; 43: 460–472.
44. Singal PK, Segstro RJ, Singh RP, Kutryk MJ: Changes in lysosomal morphology and enzyme activities during the development of Adriamycin-induced cardiomyopathy. *Can J Cardiol* 1985; 1: 139–147.
45. Doroshow JH, Locker GY, Baldinger J, Myers CE: The effect of doxorubicin on hepatic and cardiac glutathione. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1979; 26: 285–295.
46. Olson RD, MacDonald JS, van Boxtel CJ, Boerth RC, Harbison RD, Slonim AE, Freeman RW, Oates JA: Regulatory role of glutathione and soluble sulfhydryl groups in the toxicity of Adriamycin. *J Exp Ther* 1980; 215: 450–454.

47. Odom AL, Hatwig CA, Stanley JS, Benson AM: Biochemical determinants of Adriamycin toxicity in mouse liver, heart and intestine. *Biochem Pharmacol* 1992;43: 831–836.
48. Monti E, Prosperi E, Supino R, Bottiroli G: Free radical-dependent DNA lesions are involved in the delayed cardiotoxicity induced by Adriamycin in the rat. *Anticancer Res* 1995; 15: 193–197.
49. Bristow MR, Sageman WS, Scott RH, Billingham ME, Bowden RE, Kernoff RS, Snidow GH, Daniels JR: Acute and chronic cardiovascular effects of doxorubicin in the dog: the cardiovascular pharmacology of drug-induced histamine release. *J Cardiovasc Pharmacol* 1980; 2: 487–515.
50. Tong J, Ganguly PK, Singal PK: Myocardial adrenergic changes at two stages of heart failure due to Adriamycin treatment in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1991; 260: H909–H916.
51. Kremer LC, Caron HN: Anthracycline cardiotoxicity in children. *N Engl J Med* 2004, 351:120-121.
52. Kalyanaraman B, Joseph J, Kalivendi S, Wang S, Konorev E, Kotamraju S: Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. *Mol Cell Biochem* 2002, 234/235:119-124
53. Davies KJ, Doroshov JH: Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. 1. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *J Biol Chem* 1986; 261: 3060– 3067.
54. Berlin V, Haseltine WA: Reduction of Adriamycin to a semiquinone-free radical by NADPH cytochrome P-450 reductase produces DNA cleavage in a reaction mediated by molecular oxygen. *J Biol Chem* 1981; 256: 4747–4756.
55. Bachur NR, Gordon SL, Gee MV: NADPH cytochrome P-450 reductase activation of quinine anticancer agents to free radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 954–957.
56. Vasquez-Vivar J, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Pritchard KA Jr, Kalyanaraman B: Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from Adriamycin. *Biochemistry* 1997; 36: 11293–11297.
57. Kalivendi SV, Kotamraju S, Zhao H, Joseph J, Kalyanaraman B: Doxorubicin-induced apoptosis is associated with increased transcription of endothelial nitric-

- oxide synthase. Effect of antiapoptotic antioxidants and calcium. *J Biol Chem* 2001; 276: 47266–47276.
58. Kotamraju S, Konorev EA, Joseph J, Kalyanaraman B: Doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and cardiomyocytes is ameliorated by nitron spin traps and ebselen. Role of reactive oxygen and nitrogen species. *J Biol Chem* 2000; 275: 33585–33592.
59. Kim Y, Ma A, Kitta K, Fitch SN, Ikeda T, Ihara Y, Simon AR, Evans T, Suzuki YJ: Anthracycline- induced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 368–377.
60. Aries P, Paradis P, Lefevre C, Schwartz RJ, Nemer M: Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 6975– 6980.
61. Wang L, Ma W, Markovich R, Chen JW, Wang PH: Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I. *Circ Res* 1998; 83: 516–522.
62. Arola QJ, Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM: Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Res* 2000; 60: 1789–1792.
63. Wang S, Leonard SS, Ye J, Ding M, Shi X: The role of hydroxyl radical as a messenger in Cr(VI)-induced p53 activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279:C868–C875.
64. Huang C, Zhang Z, Ding M, Li J, Ye J, Leonard SS et al. Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *J Biol Chem* 2000; 275: 32516–32522.
65. Bassar RL, Green MD. Strategies for prevention of anthracycline cardiotoxicity. *Cancer Treat Rev.* 1993;19:57-77.
66. Biner B. Çocukluk çağı akut lösemilerinde erken ve geç dönem antrasiklin kardiyotoksitesinin tanısında kardiyak troponin T ve ekokardiyografi. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Yandal Uzmanlık Tezi. İstanbul-2000.
67. Broeyer FJ, Osanto S, Ritsema van Eck HJ, van Steijn AQ, Ballieux BE, Schoemaker RC et al. Evaluation of biomarkers for cardiotoxicity of anthracyclin-based chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008; 134: 961-8

68. Distefano G: molecular pathogenetic mechanisms and new therapeutic perspectives in anthracycline-induced cardiomyopathy. *Italian Journal of Pediatrics* 2009, 35:37
69. Outomuro D, Grana DR, Azzato F, Milei J: Adriamycin-induced myocardial toxicity: new solutions for an old problem? *Int J Cardiol* 2007, 117:6-15.
70. Marklund SL. Analysis of extracellular superoxide dismutase in tissue homogenates and extracellular fluids. *Methods Enzymol.* 1990;186:260-5.
71. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L: Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004, 56:185-229
72. Iarussi D, Indolfi P, Casale F, Martino V, Di Tullio MT, Calabrò R: Anthracycline-induced cardiotoxicity in children with cancer. Strategies for prevention and management. *Pediatr Drugs* 2005, 7:67-76.
73. Gutteridge JM. Anthracycline toxicity, iron and oxygen radicals and chelation therapy. *J Lab Clin Med.* 1993;122:228-9.
74. Leondro J, Dyck J, Poppe D, Shore R, Airhart C, Greenberg M et al. Cardiac dysfunction late after cardiotoxic therapy for childhood cancer. *The Am J Cardiol.* 1994;74:1152-6.
75. Lipshultz SE. Exposure to anthracyclines during childhood causes cardiac injury. *Semin Oncol.* 2006;33:S8-14.
76. Iarussi D, Indolfi P, Casale F, Martino V, Di Tullio MT, Calabrò R. Anthracycline-induced cardiotoxicity in children with cancer: strategies for prevention and management. *Paediatr Drugs.* 2005;7:67-76.
77. Evans WE, Petros WP, Relling MV, Crom WR, Madden T, Rodman JH et al. Clinical pharmacology of cancer chemotherapy in children. *Pediatr Clin North Am.* 1989;36:1199-230.
78. Pihkolo J, Sariola H, Saarinen UM. Myocardial function and postmortem myocardial histology in children given anthracycline therapy for cancer. *Pediatr Hematol Oncol.* 1994;11:259-69.
79. Sawyer DB, Peng X, Chen B, Pentassuglia L, Lim CC. Mechanisms of anthracycline cardiac injury: can we identify strategies for cardioprotection? *Prog Cardiovasc Dis* 2010;53:105-13.

80. Chung WB, Youn HJ, Choi YS, Park CS, Oh YS, Chung WS, et al. The expression of cardiac ankyrin repeat protein in an animal model of adriamycin-induced cardiomyopathy. *Korean Circ J* 2008;38:455-61.
81. Billingham ME, Mason JW, Bristow MR, Daniels JR: Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep* 1978; 62: 865–872.
82. Buja LM, Ferrans VJ, Mayer RJ, Roberts WC, Henderson ES: Cardiac ultrastructural changes induced by daunorubicin therapy. *Cancer* 1973; 32: 771–788.
83. Hortobagyi GN. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs*. 1997;54:1-7.
84. Demirkaya E. Doksorubisine bağlı kardiyak toksisitenin önlenmesinde bitkisel antioksidanların etkinliklerinin in-vivo araştırılması. Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi. Askeri Tıp Fakültesi. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD Uzmanlık Tezi. Ankara-2003.
85. Demir F. Doksorubisin ile oluşturulmuş deneysel kardiyotoksisite üzerine melatonin, L-triptofan ve pentoksifilin etkileri. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Uzmanlık Tezi. Kayseri-2004.
86. Tola H. Doksorubisin ile oluşturulan deneysel kardiyotoksisite üzerine N-asetil sisteinin biyokimyasal ve histopatolojik düzeylerdeki koruyucu etkilerinin araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Uzmanlık Tezi. Isparta-2008
87. Tatlıdede E. Sıçanlarda doksorubisinin neden olduğu kardiyak toksisite ve hemodinamik değişikliklere karşı resveratrolün koruyucu etkilerinin araştırılması. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji AD Yüksek Lisans Tezi. İstanbul-2008
88. Yagmurca M, Fadıllıoğlu E, Erdogan H, Uçar M, Söğüt S, Irmak MK. Erdosteine prevents doxorubicin – induced cardiotoxicity in rats. *Pharmacol Res* 2003; 48(4):377-82.
89. Sponer G, Feuerstein GZ. The adrenergic pharmacology of carvedilol. *Heart Fail Rev* 1999;4:21-7.
90. Tenero D, Boike S, Boyle D, et al. Steady-state pharmacokinetics of carvedilol and its enantiomers in patients with congestive heart failure. *J Clin Pharmacol* 2000;40:844-53.

91. Oliveira PJ, Coxito PM, Rolo AP, Santos DL, Palmeira CM, Moreno AJ. Inhibitory effect of carvedilol in the high-conductance state of the mitochondrial permeability transition pore. *Eur J Pharmacol* 2001;412:231-237.
92. Lysko PG, Lysko KA, Webb CL, Feuerstein GZ. Neuroprotective effects of carvedilol, a new antihypertensive, at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neurosci Lett* 1992;148:34-38.
93. Feuerstein GZ, Yue TL, Cheng HY, Ruffolo RR Jr. Myocardial protection by the novel vasodilating beta-blocker, carvedilol: Potential relevance of antioxidant activity. *J Hypertens* 1993;11:41-8.
94. Sugawara H, Tobise K, Kikuchi K. Antioxidant effects of calcium antagonists on rat myocardial membrane lipid peroxidation. *Hypertens Res* 1996;19:223-8.
95. Yue TL, McKenna PJ, Gu JL, Cheng HY, Ruffolo RR Jr, Feuerstein GZ. Carvedilol, a new antihypertensive agent, prevents lipid peroxidation and oxidative injury to endothelial cells. *Hypertension* 1993;22:922-8.
96. Yue TL, McKenna PJ, Gu JL, Cheng HY, Ruffolo RR Jr, Feuerstein GZ. Carvedilol, a new vasodilating alfa-adrenoceptor blocker antihypertensive drug, protects endothelial cells from damage initiated by xanthine-oxidase and neutrophils. *Cardiovasc Res* 1994;28:400-6.
97. Feuerstein G, Yue TL, Ma X, Ruffolo RR. Novel mechanisms in the treatment of heart failure: inhibition of oxygen radicals and apoptosis by carvedilol. *Prog Cardiovasc Dis* 1998;41:17-24.
98. Feuerstein G, Poste G, Ruffolo RR Jr. Carvedilol update III: Rationale for use in congestive heart failure. *Drugs Today* 1995;31:307-326.
99. Morgan T. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of carvedilol. *Clin Pharmacokinet* 1994; 26:335-46.
100. Frishman WH. 1998. Carvedilol. *N Engl J Med*, 339:1759-65.
101. Ferrari R. The role of mitochondria in ischemic heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;28:1-10.
102. Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM et al. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. *N Engl J Med* 1996;334:1349-55.

103. Packer M, Fowler MB, Roecker EB, Coats AJ, Katus HA, Krum H et al. Effect of carvedilol on the morbidity of patients with severe chronic heart failure: results of the carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) study. *Circulation* 2002;106:2194–9.
104. Bellenger NG, Rajappan K, Rahman SL, Lahiri A, Raval U, Webster J et al. Effects of carvedilol on left ventricular remodelling in chronic stable heart failure: a cardiovascular magnetic resonance study. *Heart* 2004;90:760-4.
105. Poole-Wilson PA, Swedberg K, Cleland JG, Di Lenarda A, Hanrath P, Komajda M et al. Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET): randomised controlled trial. *Lancet* 2003;362:7–13.
106. Yue TL, Ma XL, Wang X, Romanic AM, Liu GL, Louden C, et al. Possible involvement of stress-activated protein kinase signaling pathway and Fas receptor expression in prevention of ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis by carvedilol. *Circ Res* 1998;82:166–74.
107. Fazio S, Palmieri EA, Ferravante B, Bone F, Biondi B, Sacca L. Doxorubicin-induced cardiomyopathy treated with carvedilol. *ClinCardiol* 1998;21:777–9.
108. Dario DiFrancesco, John A. Camm, Heart Rate Lowering by Specific and Selective If Current Inhibition with Ivabradine A New Therapeutic Perspective in *Cardiovascular Disease Drugs* 2004; 64 (16): 1757-65.
109. Tardiff, J.-C. Ivabradine: If inhibition in the management of stable angina pectoris and other cardiovascular diseases. *Drugs Today* 2008, 44(3): 171.
110. Dyer AR, Persky V, Stamler J, Paul O, Shekelle RB, Berkson DM et al. Heart rate as a prognostic factor for coronary heart disease and mortality: findings in three Chicago epidemiologic studies. *Am J Epidemiol* 1980; 112: 736-49.
111. Kannel WB, Kannel C, Paffenbarger RS, Cupples LA. Heart rate and cardiovascular mortality: the Framingham Study. *Am Heart J* 1987; 113: 1489-94.
112. Gillum RF, Makuc DM, Feldman JJ. Pulse rate, coronary heart disease, and death: the NHANES I Epidemiologic Follow-up Study. *Am Heart J* 1991; 121: 172-7
113. Yancy CW, Lopatin M, Stevenson LW, De Marco T, Fonarow GC. Clinical presentation, management, and in-hospital outcomes of patients admitted with acute decompensated heart failure with preserved systolic function: a report from the Acute

- Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE) database. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:76–84.
114. Gullestad L, Wikstrand J, Deedwania P, Hjalmarsen A, Egstrup K, Elkayam U et al. What resting heart rate should one aim for when treating patients with heart failure with a beta-blocker? Experiences from the Metoprolol Controlled Release/Extended Release Randomized Intervention Trial in Chronic Heart Failure (MERIT-HF). *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 252-9.
115. Metra M, Torp-Pedersen C, Swedberg K, Cleland JG, Di Lenarda A, Komajda M et al. Influence of heart rate, blood pressure and beta blocker dose on outcome and the differences in outcome between carvedilol and metoprolol tartrate in patients with chronic heart failure: results from COMET trial. *Eur Heart J* 2005; 26: 2259-68.
116. McAlister FA, Wiebe N, Ezekowitz JA, Leung AA, Armstrong PW. Meta-analysis: beta-blocker dose, heart rate reduction, and death in patients with heart failure. *Ann Intern Med* 2009; 150: 784-94.
117. Gate L, Paul J, Nguye BG, Tew KD, Tagiero H. Oxidative stress induced in pathologies: The role of antioxidants. *Biomed & Pharmacother* 1999; 53:169-80.
118. Nordberg J, Arner SJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*,2001; 31(11):1287- 312.
119. Akyol Ö. Sizofrende Oksidatif Stres. *Kocatepe tıp Dergisi* 2004; 5:15-25
120. Agarwal A, Gupta S, Sharma R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2005; 3:28.
121. Knight JA. Free radicals, antioxidants aging and disease. AACC Press, Washington D C 1999;1-61.
122. Sinatra ST, De Marco J : Free radicals, oxidative stress, oxidized low density lipoprotein (LDL), and the heart: Antioxidants and other strategies to limit cardiovascular damage. *Connecticut Medicine* 1995; 59(10):579-87.
123. Knight JA : Free radicals, antioxidants aging and disease. AACC Press, Washington D C, 1999, p.1-61
124. Sevanian A, Ursini F : Lipid peroxidation in membrane and low density lipoproteins: similarities and differences. *Free Radical Biology and Medicine* 2000; 29:306-11
125. Akkus İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri. I.Baskı. Konya, Mimoza Yayınları, 1995

126. Duthie GG, Arthur JR, James WP. Effects of smoking and vitamin E on blood antioxidant status. *Am J Klin Nu.tr* 1991; 53(4): 1 061 -1 063.
127. Akyol Ö, İşçi N, Temel İ, et al. The relationship between plasma and erythrocyte antioxidant enzymes and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2001; 68:31 1-7.
128. Aviram M: Malondialdehit affects the physico-chemical and biological charesteristics of oxidized low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 1990; 34:141-3.
129. Halliwell B and Gutteridge JMC : The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Molecular Aspects of Medicine* 1985; 8: 89-93.
130. Faber JL , Kyle ME , Coleman JB. Biology of disease. Mechanism of cell injury by activated oxygen species. *Laboratory Investigation* 1990; 62:670-9.
131. Knight JA. Review: Free radicals, antioxidants and the immune system. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 2000; 30:145-58.
132. Marian Valko, Dieter Leibfritz, Jan Moncola. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007;39:44–84
133. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Cellular injury and cellular death. In: Schoen FJ, ed. *Pathologic basis of disease*, 5 th ed. London ; WB Saunders, p. 1-34, 1994.
134. Billingham ME, Mason JW, Bristow MR, Daniels JR. Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphological changes. *Cancer Treat Rep* 1978;62:865-72.
135. Forslid J, Björkstén B, Hagersten K, Hed J. Erythrocyte mediated scavenging of reactive oxygen metabolites generated by human polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. *Inflammation*. 1989;13:543-51.
136. Niwa Y, Ishimoto K, Kanoh T. Induction of superoxide dismutase in leukocytes by paraquat: correlation with age and possible predictor of longevity. *Blood*. 1990;76:835-41.
137. Spallholz JE. Selenium and glutathione peroxidase: Essential nutrient and antioxidant component of the immune system. *Adv Exp Med Biol*. 1990;262:145-58.
138. Cooke JP, Rossitch E, Jr., Andon NA, Loscalzo J, Dzau VJ. Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest* 1991; 88: 1663-71.

139. Wolf A, Zalpour C, Theilmeier G, Wang BY, Ma A, Anderson B et al. Dietary L-arginine supplementation normalizes platelet aggregation in hypercholesterolemic humans. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29: 479-85.
140. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4651-5.
141. Boger RH, Bode-Boger SM, Kienke S, Stan AC, Nafe R, Frolich JC. Dietary L-arginine decreases myointimal cell proliferation and vascular monocyte accumulation in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1998; 136: 67-77.
142. Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, Parthasarathy S. Inhibition of low density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett* 1993; 334: 170-74.
143. Tsao PS, Buitrago R, Chan JR, Cooke JP. Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation* 1996; 94: 1682-9.
144. Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ Res* 2000;87:241-7
145. Balligand JL, Ungureanu D, Kelly RA, Kobzik L, Pimental D, Michel T et al. Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium. *J Clin Invest* 1993; 91:2314-9
146. Brady AJ, Poole-Wilson PA, Harding SE, Warren JB. Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. *Am J Physiol* 1992; 263:1963-6
147. Winlaw DS, Smythe GA, Keogh AM, Schyvens CG, Spratt PM, Macdonald PS. Nitric oxide production and heart failure. *Lancet* 1995; 345:390-1
148. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999; 99:3092-5
149. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 1990; 323:236-41
150. Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T et al. Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. *Life Sci* 1998; 62:2425-30

151. Kielstein JT, Bode-Boger SM, Klein G, Graf S, Haller H, Fliser D. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors and renal perfusion in patients with heart failure. *Eur J Clin Invest* 2003; 33: 370–5.
152. Visser M, Paulus WJ, Vermeulen MA, Richir MC, Davids M, Wisselink W et al. The role of asymmetric dimethylarginine and arginine in the failing heart and its vasculature. *Eur J Heart Fail* 2010; 12: 1274–81.
153. Von Haehling S, Bode-Boger SM, Martens-Lobenhoffer J, Rauchhaus M, Schefold JC, Genth-Zotz S et al. Elevated levels of asymmetric dimethylarginine in chronic heart failure: a pathophysiologic link between oxygen radical load and impaired vasodilator capacity and the therapeutic effect of allopurinol. *Clin Pharmacol Ther* 2010; 88: 506–12.
154. Wilson Tang WH, Tong W, Shrestha K, Wang Z, Levison BS, Delfraino B et al. Differential effects of arginine methylation on diastolic dysfunction and disease progression in patients with chronic systolic heart failure. *Eur Heart J* 2008; 29: 2506–13.
155. Mann DL, Young JB. Basic mechanisms in congestive heart failure: recognizing the role of proinflammatory cytokines. *Chest*. 1994;105:897–904.
156. Devaux B, Scholz D, Hirche A, Klovekorn WP, Schaper J. Upregulation of cell adhesion molecules and the presence of low grade inflammation in human chronic heart failure. *Eur Heart J*. 1997;18:470–9.
157. Seta Y, Shan K, Bozkurt B, Oral H, Mann OL. Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. *J Cardiac Failure* 1996;2:243-9.
158. Paulus WJ. How are cytokines activated in heart failure? *Eur J Heart Fail*. 1999;1:309-12.
159. Mann DL. Mechanisms and models in heart failure: a combinatorial approach. *Circulation* 1999;100:999-1008.
160. Kapadia S, Dibbs Z, Kurrelmeyer K, Kalra D, Seta Y, Wang F et al. The role of cytokines in the failing human heart. *Cardiol Clin* 1998;164(4):645-56.
161. Testa M, Yeh M, Lee P, Fanelli R, Loperfido F, Berman JW, LeJemtel T: Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 964–71.

162. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL: Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 1201–6.
163. Ferrari R, Bachetti T, Confortini R, Opasich C, Febo O, Corti A et al. Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degrees of congestive failure. *Circulation* 1995;92:1479-86.
164. MacGowan GA, Mann DL, Kormos RL, Feldman AM, Murali S. Circulating interleukin-6 in severe heart failure. *Am J Cardiol.* 1997;79:1128-31.
165. Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, Sasayama S. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J.* 1994;72:561-6.
166. Hirano T. Interleukin-6. In: Thompson A, ed. *The cytokine Handbook*. Boston, Mass: Academic Press; 1991:169-90.
167. Mann DL, Knueferman P, Baumgarten G. Cytokines in ischemic heart disease and heart failure. *Dialogues in Cardiovascular Medicine* 2000 - Vol 5 . No. 3 .
168. Aukrust P, Ueland T, Muller F, Andreassen AK, Aass H, Kjekshus J et al. Elevated circulating levels of C-C chemokines in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1998; 97: 1136–43
169. Devaux B, Scholz D, Hirche A, Klovekorn WP, Schaper J. Upregulation of cell adhesion molecules and the presence of low grade inflammation in human chronic heart failure. *Eur Heart J* 1997;18:470–9.
170. Taub DD, Oppenheim JJ. Chemokines, inflammation and the immune system. *Ther Immunol* 1994;1:229–46.
171. Bagglioni M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines: CXC and CC-chemokines. *Adv Immunol* 1994;55:97–179.
172. Rollins BJ, Walz A, Baggiolini M. Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood.* 1991;78:1112–6.
173. Libby P. Atheroma: more than mush. *Lancet.* 1996;348:4 –7.
174. Nelken N, Coughlin S, Gordon D, Wilcox J. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest.* 1991;88:1121–7.
175. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 1984; 105: 121-5.

176. Ohkawa, H. N. Ohishi, and K. Yagi. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem* 1979; 95, 351-8.
177. Beutler E, Durgun O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 51:882-8.
178. Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K. Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci* 1998; 94: 623-32.
179. Racker E. Glutathione reductase (liver and yeast). *Methods in Enzymology* 1955;2: 722-9.
180. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
181. Navarro-Gonzalves, J. A., C. Garcia-Benayas, and J. Arenas. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin. Chem.* 1998;44: 679-81.
182. Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem* 1983;132(2):345-52
183. Billingham ME, Mason JW, Bristow MR, Daniels JR. Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphological changes. *Cancer Treat Rep* 1978;62:865-72.
184. Havelka AM, Berndtsson M, Olofsson MH, Shoshan MC, Linder S. Mechanisms of action of DNA-damaging anticancer drugs in treatment of carcinomas: is acute apoptosis an "off-target" effect? *Mini Rev Med Chem.* 2007;7:1035-9.
185. Deng S, Wojnowski L. Genotyping the risk of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol.* 2007;7:129-34.
186. Green PS, Leeuwenburgh C. Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1588:94-101.
187. Bolaman Z, Cicek C, Kadikoylu G, Barutca S, Serter M, Yenisey C, Alper G. The protective effects of amifostine on adriamycin-induced acute cardiotoxicity in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2005;207:249-53.
188. Berthiaume JM, Wallace KB. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. Cell Biol Toxicol.* 2007;23:15-25.

189. Ferreira AL, Yeum KJ, Matsubara LS, Matsubara BB, Correa CR, Pereira EJ, Russell RM, Krinsky NI, Tang G. Doxorubicin as an antioxidant: maintenance of myocardial levels of lycopene under doxorubicin treatment. *Free Radic Biol Med.* 2007;43:740-51.
190. Ferrans VJ. Overview of cardiac pathology in relation to anthracycline cardiotoxicity. *Cancer Treat Rep.* 1978;62:955-61.
191. Venditti P, Balestrieri M, De Leo T, Di Meo S. Free radical involvement in doxorubicin induced electrophysiological alterations in rat papillary muscle fibres. *Cardiovasc Res.* 1998;38:695-702.
192. Park ES, Kim SD, Lee MH, Lee HS, Lee IS, Sung JK, Yoon YS. Protective effects of N-acetylcysteine and selenium against doxorubicin toxicity in rats. *J Vet Sci.* 2003;4:129-36.
193. Iliskovic N, Hasinoff BB, Malisza KL, Li T, Danelisen I, Singal PK. Mechanisms of beneficial effects of probucol in adriamycin cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem.* 1999;196:43-49.
194. Siveski-Iliskovic N, Kaul N, Singal PK. Probuco promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Circulation.* 1994;89:2829-35.
195. Demir F, Narin F, Akgün H, Üzüm K, Saraymen R, Baykan A, Köklü E. Doksorubisin ile oluşturulmuş deneysel kardiyotoksiste üzerine melatoninin etkisi. *Çocuk Sağ Hast Derg.* 2004;47:260-8.
196. Disli O.M, Sarihan E, Colak M.C, Vardi N, Polat A, Yagmur J et al. Effects of Molsidomine against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats. *Eur Surg Res* 2013;51:79-90
197. Yu X, Cui L, Zhang Z, Zhao Q, Li S: α -Linolenic acid attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats through suppression of oxidative stress and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2013 Oct;45(10):817-26.
198. Narin F, Demir F, Akgün H, Baykan A, Üzüm K, Kuzugüden S et al. Doxorubicin-induced experimental cardiotoxicity and effect of pentoxphylline on cardiotoxicity. *Türk Kardiyol Dern Arş.* 2004;32:279-87.

199. Zhou ZY, Wan LL, Yang QJ, Han YL, Li Y, Yu Q et al. Evaluation of the pharmacokinetics and cardiotoxicity of doxorubicin and cardiotoxicin in rat receiving nilotinib. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013 Oct 1;272(1):238-44.
200. Chularojmontri L, Wattanapitayakul SK, Herunsalee A, Charuchongkolwongse S, Niumsakul S, Srichairat S. Antioxidative and cardioprotective effects of *Phyllanthus urinaria* L. on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biol Pharm Bull*. 2005;28:1165-71.
201. Bruynzeel AM, Abou El Hassan MA, Schalkwijk C, Berkhof J, Bast A, Niessen HW, et al. Anti-inflammatory agents and monoHER protect against DOX-induced cardiotoxicity and accumulation of CML in mice. *Br J Cancer* 2007; 96:937-43;
202. Mann DL, Young JB. Basic mechanisms in congestive heart failure. Recognizing the role of proinflammatory cytokines. *Chest* 1994; 105:897-904
203. Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, Sasayama S. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J* 1994; 72: 561-6
204. Zhu J, Zhang J, Zhang L, Du R, Xiang D, Wu M, et al. Interleukin-1 signaling mediates acute doxorubicin- induced cardiotoxicity. *Biomed Pharmacother* 2011; 65:481-5.
205. Zhu J, Zhang J, Xiang D, Zhang Z, Zhang L, Wu M, et al. Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist protects mice against acute doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Eur J Pharmacol* 2010; 643:247-53
206. Ingebjørg S, Birgitta B, Arne S, Westheim M, Vibeke B, Harald A. The L Arginine/Asymmetric Dimethylarginine Ratio Is Strongly Related to the Severity of Chronic Heart Failure. No Effects of Exercise Training. *Journal of Cardiac Failure* 2011;17: 135-42
207. Masayuki S, Tomohiro O, Takaatsu K, Toshiro M, Hiroshi I, Hiroyuki H et al. High plasma level of asymmetric dimethylarginine in patients with acutely exacerbated congestive heart failure: role in reduction of plasma nitricoxide level. *Heart Vessels* 2003;18:177–82
208. Alfieri AB, Briceno L, Fragasso G, Spoladore R, Palloshi A, Bassanelli G et al. Differential long-term effects of carvedilol on proinflammatory and antiinflammatory cytokines, asymmetric dimethylarginine, and left ventricular function in patients with heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008;52(1):49-54.

209. Najah H, Nasser G, Fadhil G, Nadhem K, Bassim I, Sadiq J. Vitamin and telmisartan attenuates doxorubicin induced cardiac injury in rat through down regulation of inflammatory response. *BMC Cardiovascular Disorders* 2012, 12:63
210. Richard C, Lauzier B, Delemasure S, Talbot S, Ghibu S, Collin B et al. Effects of angiotensin-1 converting enzyme inhibition on oxidative stress and bradykinin receptor expression during doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008 Sep;52(3):278-85.
211. Niwa Y, Ishimoto K, Kanoh T. Induction of superoxide dismutase in leukocytes by paraquat: correlation with age and possible predictor of longevity. *Blood.* 1990;76:835-41.
212. Xu MF, Ho S, Qian ZM, Tang PL. Melatonin protects against cardiac toxicity of doxorubicin in rat. *J Pineal Res.* 2001;31:301-7.
213. Hirano S, Wakazono K, Agata N, Iguchi H, Tone H. Comparison of cardiotoxicity of pirarubicin, epirubicin and doxorubicin in the rat. *Drugs Exp Clin Res.* 1994;20:153-60.
214. Li ZR, Reiter RJ, Fujimori O, Oh CS, Duan YP. Cataractogenesis and lipid peroxidation in newborn rats treated with buthionine sulfoximine: Preventive actions of melatonin. *J Pineal Res.* 1997;22:117-23.
215. Ballı E. Doksorubisinin oluşturduğu karditotoksisitede melatoninin etkisi. Çukurova Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi. Adana-2003.
216. Lai RC, Wang XD, Zhang X, Lin WQ, Rong TH: Heart fatty acid-binding protein may not be an early biomarker for anthracycline-induced cardiotoxicity in rabbits. *Med Oncol.* 2012 Sep;29(3):2303-8.
217. Kadıköylü G, Meteoğlu I, Demir S, Aybek H, Kalak M, Balkaya M, Yenisey C, Bolaman Z: The protection of the myocardium by amifostine against mitoxantrone-induced acute cardiotoxicity in rats. *Turk J Hematol* 2010; 27: 62-9