



T.C.

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIÇAN MİYOKARDİT MODELİNDE ANG-(1-7)' NİN
KARDİYOPROTEKTİF ETKİLERİ

Bahar ŞENOL

OCAK 2023

DENİZLİ

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇAN MİYOKARDİT MODELİNDE ANG-(1-7)' NİN
KARDİYOPROTEKTİF ETKİLERİ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bahar ŞENOL

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Funda F. BÖLÜKBAŞI HATİP

Denizli, 2023

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı: Bahar ŞENOL

İmza :

ÖZET

SIÇAN MİYOKARDİT MODELİNDE ANG-(1-7)' NİN KARDİYOPROTEKTİF ETKİLERİ

Bahar ŞENOL

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Farmakoloji AD

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Funda F. BÖLÜKBAŞI HATİP

Ocak 2023, 80 Sayfa

Gençlerde daha sık görülmekle birlikte her yaştan bireyi etkileyebilen miyokarditin klinik bulgularının değişkenlik göstermesi nedeni ile görülme sıklığı %0.12-12 arasındadır. Etiyolojik faktörler enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan nedenler olarak ikiye ayrılabilir. Miyokarditin patofizyolojisi çok açık olmamakla birlikte temel olarak yangısal bir hastalıktır. Miyokard kasının tutulumu ile birlikte kardiyomiyositlerin hücre iskeleti proteinlerinin bozulması ve sonuç olarak miyokardiyal hasar ortaya çıkışı söz konusudur. Sitokin aktivasyonu sonrası kardiyak proteinlere karşı ortaya çıkan antikolar hasarı daha da şiddetlendirebilir. Doksorubisin gibi en yaygın kullanılan antirasiklin grubu antikanser ajanlarının neden olduğu kardiyotoksisite mekanizmaları arasında DNA hasarı, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, otofaji ve metabolik inflamasyon yer alır. Otofaji, besin açlığı, metabolizmadaki değişiklikler, reaktif oksijen türleri (ROS) birikimi, enerji ve oksijen durumları için normal şartların yanında metabolik stres altındaki durumlarda da hücre ve doku homeostazını sağlamayı amaçlayan bir süreçtir. Farklı alt bölümleri içeren otofajide yer alan proteinler ve sitozolik bileşenler bu sürece katkıda bulunur.

Renin Anjiyotensin Sistemi (RAS)' nin aktif bir bileşeni olan Anjiyotensin (1-7) [Ang-(1-7)], Anjiyotensin II (Ang II)' den anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE2) tarafından sentezlenir. Hücre membranında yerleşik G protein kenetli reseptörlerden biri olan Mas reseptörü ile etkileşerek etkisini gösterir. Yapılan çalışmalarda Ang-(1-7)' nin vazodilatör, anti-inflamatuar, antifibrotik, natriüretik etkileri gösterilmiştir. Bu çalışmada tek doz Doksorubisin ile oluşturulan sıçan miyokardit modelinde Ang-(1-7)' nin etkileri gerçek zamanlı PCR ve ELİSA analizlerinde elde edilen kalp ve serum örneklerinde araştırılmıştır. Çalışma sonunda Ang-(1-7) seviyelerinin yalnızca Doksorubisin verilen sıçanların kalp dokularında düşük ancak serumda yüksek olduğu, ACE2 seviyelerinin ise yalnızca Doksorubisin alan grupta kalp dokusunda anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Otofajik belirteçlerde gruplar arasında fark bulunmazken, Mas reseptör ekspresyonunun miyokardit oluşturulan gruplarda anlamlı olarak arttığı, AT1 reseptör ekspresyonunun ise Ang-(1-7) alan grupta anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Sonuç olarak Ang-(1-7) miyokardit modeli oluşturulan sıçanlarda etkisini otofaji bağımsız mekanizmalar üzerinden göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Doksorubisin, Anjiyotensin-(1-7), Miyokardit, Kardiyoprotektif Etki, MasR

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2021SABE004).

ABSTRACT**CARDIOPROTECTIVE EFFECTS OF ANG-(1-7) ON THE RAT****MYOCARDİTİS MODEL**

ŞENOL, Bahar

Postgraduate MSc. Thesis in Pharmacology

Supervisor: Prof. Dr. Funda F. BÖLÜKBAŞI HATİP

January 2023, 80 Pages

Although it is more common in young people, myocarditis can effect people of all ages, with an incidence of 0.12-12 % due to the variability of its clinical findings. There are two types of etiological factors: infectious and non infectious. Myocarditis has an unclear pathophysiology; it is essentially an inflammatory disease. When myocardial muscle is involved, the cytoskeletal proteins of cardiomyocytes are disrupted, resulting in myocardial damage. DNA damage, mitochondrial dysfunction, oxidative stress, autophagy and metabolic inflammation are all mechanisms of cardiotoxicity caused by the most commonly used anthracycline anticancer agents, such as doxorubicin. Autophagy is a process that aims to provide cell and tissue homeostasis under metabolic stress as well as under normal conditions for nutrient starvation, changes in metabolism, ROS accumulation, energy and oxygen status. This process is aided by proteins and cytosolic components involved in autophagy, which include various subdivisions.

Angiotensin (1-7) [Ang-(1-7)], an active component of the Renin Angiotensin System (RAS), is produced by the action of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) from Angiotensin II (Ang II). It exerts its action by interacting with the Mas receptor, one of the G protein- coupled receptors found on the cell membrane. Ang-(1-7) has been shown in studies to have vasodilator, anti- inflammatory, antifibrotic and natriuretic properties. The effects of Ang-(1-7) in the rat myocarditis model induced by a single dose of Doxorubicin in heart and serum samples obtained in real time PCR and ELISA studies were investigated in this study. At the conclusion of the study, it was discovered that Ang-(1-7) levels were low in the heart tissues of rats given only Doxorubicin, but high in the serum, whereas ACE2 levels were significantly lower in the heart tissue of the group that only received Doxorubicin. AT1 receptor expression was found to be significantly lower in the Ang-(1-7) treated group. As a result, the Ang-(1-7) myocarditis model in rats exhibits its effect via autophagy-independent mechanisms.

Keywords: Doxorubicin, Angiotensin-(1-7), Myocarditis, Cardioprotective effect, MasR

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through project number 2021SABE004.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren değerli tez danışmanım, sayın hocam Prof. Dr. Funda Fatma BÖLÜKBAŞI HATİP' e,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca üstün bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, tezimin yardımcı tez danışmanlığını yapan değerli ve sayın hocam Prof. Dr. İzzettin HATİP' e,

Çalışmam sırasında değerli yardımlarını esirgemeyen Doktora Öğr. Zeynep M. ALTUNAY, Doktora Araş. Gör. Fatih ALTINTAŐ, Yüksek Lisans öğrencisi Manar Mustafa AMİN ve yardımcı olan tüm asistan doktorlara,

Beni bugünlere getiren, eğitim sürem boyunca destek, sabır ve sevgilerini hiç esirgemeyen canım aileme tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç.....	2
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1. Kalp Kası.....	3
2.1.1. Kalp kası yapısı ve fonksiyonu.....	3
2.1.2. Kalp kasının kasılma işlevi.....	5
2.2. Sarko/Endoplazmik Retikulum Kalsiyum Pompası.....	7
2.3. Kan Basıncı.....	10
2.4. Renin-Anjiyotensin Sistemi.....	11
2.4.1. Kardiyak hücre içi renin- anjiyotensin sistemi.....	13
2.4.2. Anjiyotensin-(1-7).....	13
2.5. Miyokardit.....	15

2.5.1. Epidemiyoloji	15
2.5.2. Etiyoloji	16
2.5.3. Klinik	17
2.5.4. Tedavi	17
2.5.5. Patofizyoloji.....	18
2.6. Otofaji Mekanizması	20
2.6.1. Mitofaji	22
2.7. Deney Hayvanlarında Miyokardit Modeli	24
2.7.1. Doksorubisin ile indüklenen deney hayvanlarında miyokardit modeli	25
2.8. Doksorubisin	26
2.8.1. Doksorubisine bağlı kardiyotoksisite mekanizması	28
2.9. Hipotez	31
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	32
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	32
3.2. Çalışma Grupları	33
3.3. Çalışma Protokolü	34
3.4. Deney Hayvanı Miyokardit Modeli	34
3.5. Deney Hayvanlarının İn Vivo Ölçümleri	35
3.5.1. Kilo ve kalp ağırlığı ölçümleri	35
3.5.2. Kuyruk kan basıncının ölçümü	36
3.6. Sakrifikasyon	37
3.7. Deney Hayvanlarının İn Vitro Ölçümleri	38
3.7.1. Doku homojenizasyonu	38

3.7.2. RNA izolasyonu.....	39
3.7.3. RNA konsantrasyonu ve saflığının belirlenmesi.....	39
3.7.4. cDNA sentezi.....	40
3.7.5. RT-PCR reaksiyonları.....	40
3.7.6. mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi.....	43
3.8. Elisa Yöntemi.....	44
3.8.1. Ang-(1-7) ölçümü.....	44
3.8.2. ACE2 ölçümü.....	45
3.9. İstatiksel Analiz.....	47
4. BULGULAR.....	48
4.1. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlığı Değişim Grafikleri.....	48
4.2. Deney Hayvanlarının Kalp Ağırlığı Değişimi.....	49
4.3. Kuyruk Kan Basıncı Ölçümleri.....	50
4.4. Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları.....	52
4.5. Elisa Kitleri ile Anjiyotensin-(1-7) ve Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2 Ekspresyon Ölçümleri.....	54
4.5.1. Ang-(1-7) ekspresyon ölçümü.....	54
4.5.2. ACE2 ekspresyon ölçümü.....	56
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇLAR	65
7. KAYNAKLAR	67
8. ÖZGEÇMİŞ	79

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Kardiyak sarkomerin iskelet yapısı, T- tübüller ile birlikte	4
Şekil 2.2 Uyarılma-kasılma esnasında kalp kasının şematik diyagramı	6
Şekil 2.3 Kardiyomiyosit Ca^{2+} homeostazı	7
Şekil 2.4 Kardiyomiyosit içerisinde SERCA2a fonksiyonunun şematik anlatımı	9
Şekil 2.5 Kardiyovasküler- renal ve beyin RAS sistemleri	14
Şekil 2.6 Atg5/Atg7 gerektiren LC3' e bağlı geleneksel otofaji	22
Şekil 2.7 Başlıca mitofaji yollarının özeti	23
Şekil 2.8 Doksorubisin ve metaboliti olan doksorubisinolun kimyasal yapısı	27
Şekil 3.1 RT-PCR gen ekspresyon grafiği	43
Şekil 4.1 Deney hayvanlarında vücut ağırlığı değişimi	49
Şekil 4.2 Sıçan kalp ağırlığı ortalaması	50
Şekil 4.3 Deney hayvanlarının kuyruk kan basıncı ölçümü	51
Şekil 4.4 Sıçan gruplarında kalp atım hızı grafiği	52
Şekil 4.5 RT-PCR ile hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri	53
Şekil 4.6 Kalp dokusundaki Ang-(1-7)' nin ölçümü	54
Şekil 4.7 Serumdaki Ang-(1-7)' nin ölçümü.....	55
Şekil 4.8 Sıçan kalp dokusunda ACE2 ekspresyonları.....	56
Şekil 4.9 Sıçan serumunda ACE2 ekspresyonları.....	57
Resim 3.1 İntraperitoneal Ang-(1-7) ve Doksorubisin enjeksiyonu.....	35
Resim 3.2 Sıçan kalp ağırlığı ve vücut ağırlığı ölçümü.....	36
Resim 3.3 Sıçan kuyruk kan basıncı ölçüm	37
Resim 3.4 Sakrifiyon	38
Resim 3.5 RT-PCR cihazı ve reaksiyon için hazırlanan pikoplate	42
Resim 3.6 Sıçan Ang 1-7 Elisa kit	45
Resim 3.7 Elisa kit pleyt örneği	46

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1 Anjiyotensin reseptör sınıflandırılması.....	11
Tablo 3.1 cDNA sentezi için gerekli bileşenler ve miktarları	40
Tablo 3.2 RT-PCR reaksiyonunda kullanılan primerler.....	41
Tablo 3.3 qPCR reaksiyonunun bileşenleri ve hacimleri.....	41
Tablo 3.4 Primerler için kullanılan qRT – PCR programı.....	42
Tablo 4.1 Deney hayvanlarının vücut ağırlığı ortalamaları ölçümü.....	48

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACE.....	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ACE2.....	Anjiotensin dönüştürücü enzim 2
AMPK.....	AMP ile aktive olan protein kinaz
Ang I.....	Anjiyotensin I
Ang II.....	Anjiyotensin II
Ang-(1-7).....	Anjiyotensin 1-7
AT1R.....	Anjiyotensin II tip 1 reseptörü
Ca ²⁺	Kalsiyum
CaMKII.....	Kalmodulin bağımlı protein kinaz II
DOX.....	Doksorubisin
ECC.....	Uyarma-kasılma eşleşmesi
ELİSA.....	Enzim bağı immunosorbent deneyi
eNOS	Endotelyal nitrik oksit
GPRC.....	G protein bağı reseptör
IL-1.....	İnterlökin 1
i.p.	İntraperitoneal
kDa.....	Kilodalton
LC3.....	Protein 1 hafif zincir 3

LTCC.....	L-tipi kalsiyum kanalları
LVEF.....	Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu
MasR.....	Mas reseptörü
NADPH.....	Nikotinamid adenzin dinükleotid fosfat
NCX.....	Sodyum kalsiyum değişimi
NLRP3.....	Nod benzeri reseptör proteini 3
NO.....	Nitrik oksit
PI3K.....	Sınıf III fosfoinositid 3-kinaz
PKC.....	Protein kinaz C
PLN.....	Fosfolamban
RAS.....	Renin- anjiyotensin sistemi
ROS.....	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR.....	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RyR.....	Ryanodin reseptörü
SERCA.....	Sarko- endoplazmik retikulum kalsiyum pompası
SR.....	Sarkoplazmik retikulum
TnC.....	Troponin I
TNF- α	Tümör nekroz faktör alfa
TnT.....	Troponin C
TnT.....	Troponin T
ULK.....	Unc- 51 benzeri kinaz

1.GİRİŞ

Doksorubisin (DOX), çok sayıda kansere karşı oldukça etkili olmasına rağmen, diğer kanser ilaçları gibi yan etkileri bulunmaktadır. Bu yan etkiler arasında hayati tehdit etmesi bakımından en önemlisi kardiyotoksik yan etkidir. Etkin bir antitümör ajan olmasına rağmen kardiyotoksik yan etkisi ilacın terapötik kullanımını kısıtlamaktadır ve kardiyotoksitenin önlenmesi bu nedenle önem taşımaktadır. Kardiyotoksitenin patogenezinde serbest radikallerde ve lipid peroksidasyon ürünlerinde artışın yanı sıra miyokardiyal antioksidan enzim seviyelerindeki azalma sorumlu tutulmaktadır.

Renin- anjiyotensin sistemi (RAS) klasik olarak su tuz tutulumu, kan basıncı ve kan hacmini kontrol eden hormonal bir sistem olarak bilinir. RAS; hormonal, yerel doku ve hücre içi RAS olmak üzere sınıflandırılabilir. Anjiyotensin (1-7), RAS' ın etkili yeni bir metabolitidir. Kalp, Ang-(1-7) için önemli bir hedeftir ve Ang-(1-7) etkilerini direkt olarak kardiyomiyositlerde gösterir. Kardiyoprotektif etkileri son yıllarda gündeme gelen Ang-(1-7)' nin bu etkilerinden sorumlu mekanizmalarının aydınlatılması kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde önemli bir terapötik hedeftir. 2016 yılında yapılan hücre kültürü çalışmasında Ang-(1-7)' nin etkisine aracılık eden MasR' nin, Ang II ile indüklenen kardiyomiyosit otofajisinde ve kardiyak yeniden şekillenmede oksidatif stres inhibisyonu yolu ile etkili olabileceği bildirilmiştir.

Yapılacak olan tez çalışmasında, Wistar albino (2-3 aylık) erkek sıçanlarda DOX ile indüklenen miyokardit modelinde kardiyoprotektif etkileri olduğu bildirilen Ang-(1-7)' nin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması ve kardiyak iyileşme sürecindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu nedenle otofajik markerlar (LC3II, LCI, Beclin 1, Atg5, Atg7), Ca⁺⁺ iyonlarını SR içine alan SERCA ekspresyonu, MasR, AT1R

ve eNOS ekspresyonlarını kit üreticisi firma tarafından sağlanan protokollere uygun olarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile bakılacaktır. Gerek kanda gerek dokuda ACE2 ve Ang-(1-7) ekspresyonları uygun kitler aracılığı ile ELİSA yöntemi ile analiz edilecektir.

1.1. Amaç

Sıçanlarda Doksorubisin (DOX) ile indüklenen miyokardit modelinde kardiyoprotektif etkileri olduğu bildirilen RAS bileşenlerinden biri olan Ang-(1-7)' nin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması ve kardiyak iyileşme sürecindeki etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Kalp Kası

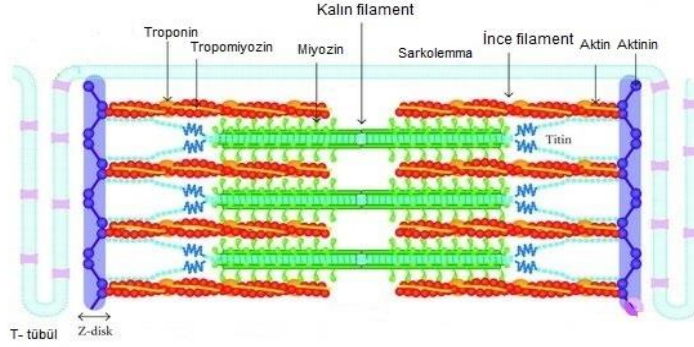
Kalp, insan vücudunda çeşitli bölgelere kan pompalayan, kaslı, bir dolaşım sistemi organıdır. Ritmik kasılmalar ile kanın hareket etmesini sağlar. Kalbin duvar yapısı üç katmandan oluşmaktadır. Bunlar; en dışta epikardiyum, ortada miyokard, en içte de endokarddır. Miyokard olarak adlandırılan kalp kasları, kalp duvarının orta ve en kalın tabakasını oluşturur. Kalbin içerdiği hücre tipleri kardiyomiyositler, endotel hücreleri ve fibroblastlardır. Yaş ve cinsiyete göre bu hücrelerin sayıları değişmektedir (Talman ve Ruskoaho 2016).

2.1.1 Kalp kası yapısı ve fonksiyonu

Kalp kasında kasılma mekanizması aktin ve miyozin filamentlerinin etkileşimine dayanmaktadır. Kaslarda, miyozin başları veya çapraz köprüler olarak adlandırılan miyozin filamentleri üzerindeki çıkıntılar, yakındaki aktin filamentleriyle etkileşime girer ve ATP hidrolizi vasıtasıyla birbirlerinin yanından kayarlar (Squire 2019). Sarkomer, sırasıyla miyozin ve aktinden yapılmış birkaç kalın ve ince filamentten oluşur. İnce filamentler uçlarından sadece birinde bir Z diskinde sabitlenir ve sarkomer merkezine doğru kalın filamentle paralel uzanır. Kalın filamentler, özel elastik özelliklere (% 170' e kadar uzama) sahip olan protein titin tarafından her iki uçta komşu Z disklerine sabitlenir (Avazmohammadi vd 2019).

Kalp kasında kasılmanın düzenlenmesi, kalsiyum düzenleyici troponin-tropomiyozin sistemi tarafından ince filamentin aktivasyon/inaktivasyon sürecidir ve sitozoldeki kalsiyum konsantrasyonundaki değişiklikler tarafından belirlenir (Nikitina vd 2015). Tropomiyozin, ince aktin filamentinin yüzeyine bağlanan uzun, sarmal bir

moleküldür. Troponin üç alt birimden oluşur: tropomyosine bağlanan troponin T (TnT); hem aktin hem de tropomyosine bağlanan troponin I (TnI) ve Ca^{++} un troponin kompleks tarafından bağlanmasından sorumlu troponin C (TnC) (Sweeney ve Hammers 2018). Kalp kasının fonksiyonel durumunu karakterize eden temel bileşenleri sarkomerdeki kontraktil ve düzenleyici proteinler tarafından sağlanır (Nikitina vd 2015).



Şekil 2.1 Kardiyak sarkomerin iskelet yapısı, T- tübüller ile birlikte (Kobirumaki-Shimozawa vd 2012' den modifiye edilmiştir).

Miyokard, hücre dışı matris, kardiyomiyositler ve fibroblastlardan oluşan karmaşık bir dokudur. Kas yapısının hücresi olan miyositler, hücrenin kasılmasını sağlayan mekanik kuvvet oluşturmak için kimyasal enerjiyi kullanan özel proteinler içerirler. Temel kasılma birimi olan sarkomer de çok sayıda yapısal ve düzenleyici proteinden oluşmaktadır. Ara filamentler, hücresel bütünlüğü korumak ve sarkomeri diğer organellere (mitokondri veya çekirdek gibi) bağlayan bir iskele görevi görür. Sarkomer, miyofibrilli çevreleyen zar olan sarkolemmaya, başka bir hücre iskeleti düzeneği olan kostamer tarafından bağlanır. Kostamerler, sarkomeri Z diski ve M bandı aracılığıyla sarkolemmaya bağlar. Kalp hücreleri, kas kasılmasını senkronize eden interkalasyonlu disklerle birbirine bağlanır (Henderson vd 2017).

Hücreler arası bağlantı olan interkalasyonlu disk, çok sayıda kardiyomiyosite mekanik bağlantı sağlamaktadır. Kardiyomiyositler, iyonik ortamı kontrol etmek ve kas kasılmasını gerçekleştirmek için aksiyon potansiyelinin yayılmasını sağlayan boşluk bağlantı kanalları ile bağlanırlar. Araya eklenen diskler, kuvvet ve aksiyon potansiyelinin uçtan uca iletimi için farklı kardiyomiyositler arasında senkronize kasılmayı kolaylaştırırlar. Birbirine bağlı disklerde bağlı olan, dallanan ve birbiriyle

birleşen kardiyomiyositler, kalp dokusunda demiryolu benzeri bir miyofiber ağı oluşturur (Avazmohammadi vd 2019).

Kardiyak fibroblastlar, kalp kası lifleri arasında şeritler ve tabakalar halinde dağılır. Tüm kalp hücreleri için bir yapı iskelesi sağlayan hücre dışı matrisin (ECM) homeostazını koruyarak kalbin yapısal bütünlüğünü korumaya yardımcı olur. Ayrıca çeşitli mekanik, elektriksel ve biyokimyasal uyarılara yanıt verirler ve bu nedenle normal kalp fonksiyonu için önem taşırlar. Ek olarak kardiyak fibroblastlar, kardiyomiyositlerin, endotel hücrelerinin ve bağışıklık hücrelerinin işlevlerini düzenleyen çeşitli parakrin faktörleri salgılar (Talman ve Ruskoaho 2016).

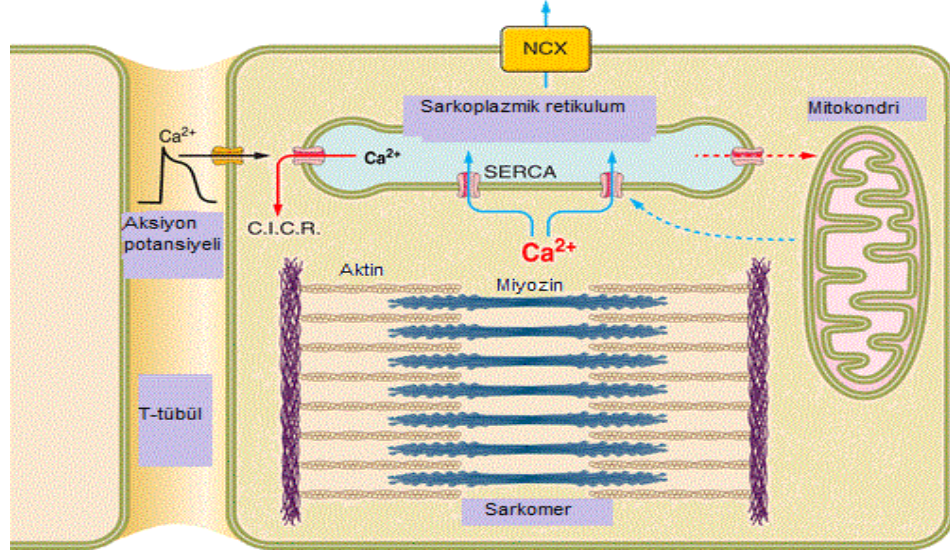
2.1.2. Kalp kasının kasılma işlevi

Kardiyak hücreler, interkalasyonlu disklerin uçlarındaki özel mekanik bağlantıların yanındaki boşluk bağlantılarıyla elektriksel olarak birleşerek elektriksel sinsityum oluştururlar (Sweeney ve Hammers 2018). Sinoatriyal düğümünden gelen elektriksel uyarı mekanik bir kasılmaya dönüştürülür ve böylece kalbin kanı pompalaması sağlanır. Kalpte uyarma-kasılma eşleşmesi (ECC), elektriksel aktivasyonu kardiyak kasılmaya bağlayan süreci ifade eder (Blatter vd 2021).

Kardiyak enine T-tübüller, uyarma-kasılma eşleşmesi, istirahat membran potansiyelinin korunması, aksiyon potansiyeli başlatma, düzenleme ve sinyal iletimi için gerekli olan iyon kanallarından zengin kardiyomiyosit sarkolemmasının çok dallı invajinasyonlarıdır. Enine tübüller, kostamerler yoluyla sarkomerik Z disklerine bağlanan miyofilamentlerin etrafında oluşur. T-tübülleri, voltaj kapılı L-tipi kalsiyum kanallarını (LTCC) bir araya getirerek ve bunları kavşak membranında kalsiyum alım ve salıverme kanallarına, ryanodin reseptörlerine (RyR) yakın bir yere konumlandırarak kardiyak EC eşleşmesini düzenler (Hong ve Shaw 2017).

Kalp kasında Ca^{2+} , elektriksel stimülasyonu mekanik kasılmaya bağlayan uyarma-kasılma eşleşmesinde önemli bir role sahiptir (Kiess ve Kockskämper 2019). Ventriküler miyositlerde, hücre zarı boyunca yayılan aksiyon potansiyeli, voltaja duyarlı L-tipi Ca^{2+} kanallarını aktive ederek içeriye doğru olan Ca^{2+} akışı ile hücre depolarizasyonu oluşturur. Böylece uyarma-kasılma eşleşmesi başlatılır (Parks ve Howlett 2013). Hücre içi Ca^{2+} döngüsünde özellikle sarkoplazmik retikulum önemli bir

rol oynar. Kardiyak sarkoplazmik retikulum (SR), Ca^{2+} döngüsünün iki temel basamağı olan Ca^{2+} saliverilmesi ve alımını, tüm yaşam süresi boyunca sağlamaktadır (Zima vd 2014). SR sitozoldeki Ca^{2+} iyon konsantrasyonunu düzenleyerek hücre içindeki Ca^{2+} için depo ve kaynak olarak hizmet eder. Ca^{2+} iyonu RyR, IP3 reseptörü ve sızıntı kanalları gibi çeşitli reseptör veya kanallar yoluyla SR' den sitozole salınır (Espinoza-Fonseca 2017).

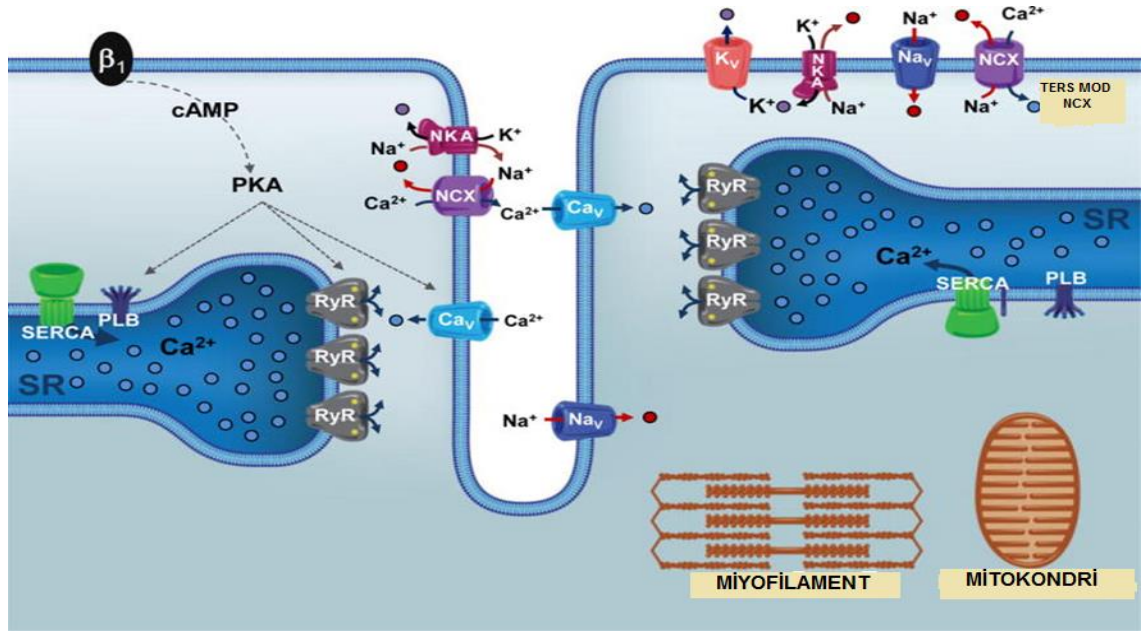


Şekil 2.2 Uyarılma-kasılma esnasında kalp kasının şematik diyagramı (Van der Velden ve Stienen 2019' dan modifiye edilmiştir).

NCX: sodyum-kalsiyum değiştiricisi, C.I.C.R: Ca^{2+} ile indüklenen Ca^{2+} salınımı mekanizması.

Plazma zarı depolarizasyonunu kardiyomiyosit kasılmasına bağlayan kardiyak uyarılma-kasılma eşleşmesi, enine T-tübüllerin ve kavşak sarkoplazmik retikulumun birleşmesi ile oluşturulan dyad adı verilen mikro alanlarda meydana gelir. Bu bölgede, EC eşleşmesi, Ca^{2+} ile indüklenen Ca^{2+} saliverilmesi yoluyla gerçekleşir. Membran depolarizasyonu, T-tübülünde voltaj kapılı L-tipi Ca^{2+} kanalları (LTCC' ler) açar (Lu ve Pu 2020). Sitoplazmik kalsiyum konsantrasyonunun artışı, SR Ca^{2+} salıverme kanallarının RyR açılmasını sağlayarak, kalsiyum kaynaklı kalsiyum salınım olarak adlandırılan bir işlemde SR' den büyük miktarda Ca^{2+} serbest bırakılır. Kalsiyum kaynaklı kalsiyum salınımı, SR' den salınan Ca^{2+} ' nın, SR boşalana kadar Ca^{2+} ' nın daha fazla salınımını tetiklenmesini sağlayan pozitif geri besleme sistemidir. Sitoplazmik kalsiyum konsantrasyonundaki artış aynı zamanda Ca^{2+} ' nın tamponlara

bağlanmasına ve mitokondri gibi organellere alınmasına da bağlıdır. Gevşemenin gerçekleşmesi için Ca^{2+} sitoplazmadan uzaklaştırılması gerekir. Bunun için RyR'lerin kapanırken Ca iyonu SERCA (SR Ca^{2+} -ATPaz) tarafından SR'ye geri pompalanır. Ayrıca Ca^{2+} , sodyum-kalsiyum değişimi (NCX) tarafından hücrenin dışına pompalanması sağlanır (Eisner vd 2017). RyR ve inositol 1,4,5-trifosfat reseptörleri endoplazmik retikulum/sarkoplazmik retikulumdan bulunan Ca^{2+} salıverme kanalları olarak bilinir. Üç RyR izoformu tanımlanmıştır ve kalpte RyR2 izoformu bulunmaktadır (Laver 2018, ZhuGe vd 2000).



Şekil 2.3 Kardiyomiyosit homeostazı (Peano ve Domeier 2017' den modifiye edilmiştir).

NCX: sodyum-kalsiyum değiştiricisi, RyR: ryanodin reseptörleri, SR: sarkoplazmik retikulum, PLB: protein fosfolamban, PKA: protein kinaz A.

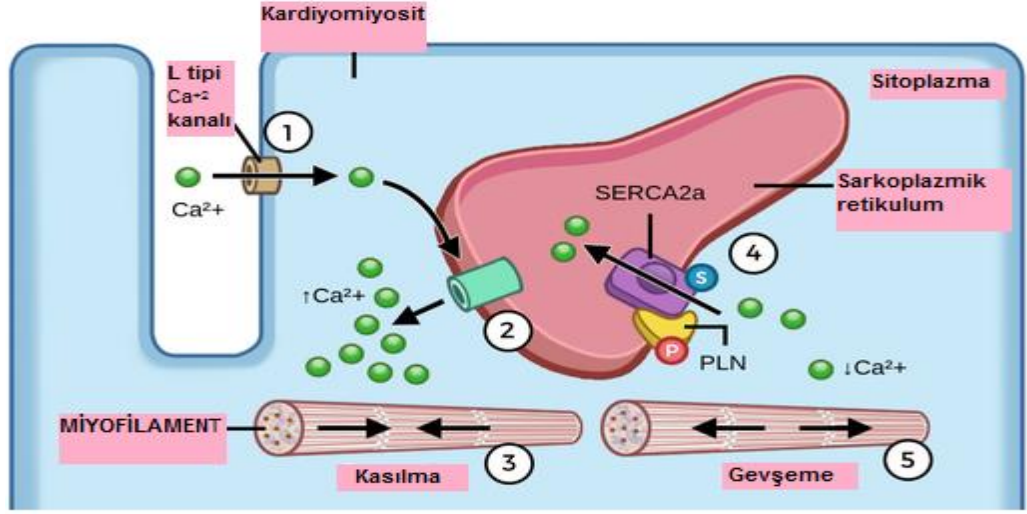
2.2. Sarko/ Endoplazmik Retikulum Kalsiyum Pompası

Sarko/endoplazmik retikulum kalsiyum pompası, (Ca^{2+} -ATPaz veya SERCA) H^+/K^+ ATPaz, Na^+/K^+ ATPaz ve plazma membranı Ca^{2+} ATPaz'ı içeren P-tipi ATPaz ailesinin üyelerinden olup, SERCA pompaları, ATP hidrolizinden elde edilen enerjiyi kullanarak membran boyunca Ca^{2+} taşınmasını katalize eder. Bilinen 10' dan fazla

SERCA izoformu arasında 110-kDa monomerik SERCA2a, toplam SR proteinlerinin yaklaşık %40' ını oluşturan yetişkin miyokardında eksprese edilen baskın izoformdur. SERCA2a iki ana işlevi yerine getirir: kas gevşemesini başlatmak için sitozoldeki Ca^{2+} seviyelerini azaltır ve kas kasılması için gerekli olan Ca^{2+} 'yi SR' ye yeniden yükler (Marín- García 2014).

P tipi ATPazlar, hücre zarlarındaki elektrokimyasal potansiyelleri korumak için katyonları hücre zarları boyunca pompalayan taşıyıcılardır. Taşıma mekanizmalarındaki enerji, fosfoenzim ara maddesinin otokatalize edilip parçalanması ile ATP hidrolizi tarafından desteklenir (Dyla vd 2017). En çok bilinen transmembran taşıyıcılar sarko/endoplazmik retikulum Ca^{2+} -ATPaz (SERCA) ve Na^{+}/K^{+} -ATPaz' dır (Bublitz vd 2013).

Sarko/endoplazmik retikulum kalsiyum pompası (Ca^{2+} -ATPaz veya SERCA), kalsiyum homeostazını sağlamaktadır. SERCA, kalsiyumu yüksek kalsiyum konsantrasyonuna karşı sarko/endoplazmik retikuluma (SR/ER) Ca^{2+} taşıyarak sitozoldeki (hücre içi sıvı) dinlenme durumundaki kalsiyum konsantrasyonunu korur. Sitozolik kalsiyum konsantrasyonu, çeşitli hücrel sinyal yollarının aktivasyonu için bir tetikleyicidir. SERCA aracılı kalsiyum taşınması, bu sinyal olaylarını sonlandırmak için bir tetikleyici olarak sitozolik kalsiyum konsantrasyonunu azaltır (Rathod vd 2021). Sarko/endoplazmik retikulum Ca^{2+} pompalarının SERCA2a izoformu özellikle kalpte bulunurken SERCA2b her yerde bulunan bir varyanttır. Sarkoplazmik retikulumdan Ca^{2+} 'nın geçici salıverilmesi kalp kasındaki kasılmayı sağlar. Sarkoplazmik retikulumun Ca^{2+} ile doldurulması kasılma gücünün belirlenmesinde önemli bir faktördür (Raeymaekers vd 2011). Sistol sırasında, RyR kalsiyum kanallarının açılması ve SR kalsiyum depolarından Ca^{2+} çıkışı nedeniyle sitozolik kalsiyum konsantrasyonu artar. Diyastol sırasında, SERCA kalsiyum pompasının aktivitesi aracılığıyla sitozolik kalsiyum konsantrasyonu azalır. Kalp kaslarındaki SERCA2a regulin olarak bilinen fosfolamban (PLB) denilen transmembran peptit tarafından düzenlenir. PLB, 52 amino asitlik bir transmembran peptittir ve daha çok kalbin atrium ve ventrikül kaslarında bulunur. Kalp kasındaki SERCA aktivitesininin Ca^{2+} 'a afinitesini azaltarak SERCA' 'yı inhibe eder. Kalp kaslarında PLB kardiyak kasılmayı düzenleyerek SERCA' 'nın kalsiyuma bağımlı geri dönüşümlü bir inhibitörü olarak görev yapmaktadır. PLB, protein kinaz C (PKC) proteini ve cAMP' e bağımlı PK veya Ca^{2+} - CaM' ye bağımlı PK tarafından fosforile edilebilir (Kranias ve Hajjar 2012, Rathod vd 2021).



Şekil 2.4 Kardiyomiyosit içerisinde SERCA2a fonksiyonunun şematik anlatımı (<https://theory.labster.com> 2018' den değiştirilerek).

(1) Diyastol sürecinde Ca²⁺ hücre içine girer, (2) sarkoplazmik retikulumdan büyük miktarda Ca²⁺ çıkışı tetikler (3) Bu da mikrofilamentte kasılmaya neden olur. (4) Aynı zamanda SERCA2a' dan inhibitör olan PLN salınır ve [Ca²⁺]i akışını değiştirilerek SR geri alınması sağlanır (5) Bu da mikrofilamentin gevşemesine neden olur.

Kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CaMKII), miyokarda bol miktarda bulunan hücre içi artan Ca²⁺ ve ROS ile aktive olan bir serin treonin kinazdır. Kinaz on iki alt birimden oluşan bir multimerik proteindir. Her alt birim holoenzim düzenliğini yönlendiren ilişki alanı, düzenleyici alan ve substrat ile birleşen katalitik alan olarak üç farklı alan içerir. Başlangıçta CaMKII, kalsiyum protein kalmodulin (Ca²⁺/CaM) bağlanarak aktive edilir. Oksidasyon ve otofosforilasyon CaMKII' yi Ca²⁺/CaM' den bağımsız bir enzime dönüştürür. RyR2 ve PLN CaMKII için hedefler (Swaminathan vd 2012, Erickson vd 2011).

Kalsiyum kalmodulin, tüm NOS izoformlarından nitrik oksit (NO) üretimi için temel bir ihtiyaçtır. NO sentezini katalize eden üç farklı enzim vardır. Bunlar; indüklenebilir iNOS, endotelial nitrik oksit sentazı eNOS ve nöronal nNOS'tur. Kalsiyuma bağlı izoformlar eNOS ve nNOS iken kalsiyumdan bağımsız olan iNOS 'tur. Endotelial NOS, vasküler endotelial hücrelerde yüksek miktarda eksprese edilir. eNOS enzimi vasodilatör yanıt için temel bir bileşiktir ve kardiyovasküler homeostaz için kritik bir düzenleyici olan nitrik oksit (NO) üretiminden sorumludur. Kardiyovasküler sistemde eNOS NO üretimi ile vasodilatasyona aracılık eder. Hücre içi kalsiyum

yükselmesi ve sonrasında transmembran kalsiyum akışlarına yanıt olarak eNOS aktif bir enzim üretir (Jagnandan vd 2005, Sarmah vd 2022).

2.3. Kan Basıncı

Kanın damar duvarında birim alana uyguladığı basınca kan basıncı denir. Bu damarlar arter, ven veya kılcal damar olarak arteryel, venöz veya kılcal damar basıncı olarak tanımlanır (Köylü 2016). Arter basıncı, kalbin atardamarlara attığı hacim, atardamar duvarlarının esnekliği ve kanın atardamarlardan dışarı akma hızı ile belirlenir. Basınç kavramını belirleyen kuvvetler elastik, kinetik ve yerçekim enerjisidir. Kanın akış hızı kinetik enerjiyi oluşturur (Magder 2018).

Nabız basıncı, kalp döngüsü sırasında maksimum ve minimum dolaşım basınçlarını ifade eden sistolik kan basıncı ile diyastolik kan basıncı arasındaki fark olarak tanımlanır. Sistolik kan basıncı ve diastolik kan basıncı için normal değerler 120 mm Hg ve 80 mm Hg olduğu tahmin edilir ve ortalama nabız basıncı için yaklaşık 40 mm Hg değer kabul edilir (Tang vd 2020). Nabız basıncı her sistolde aorta kanın fırlatılması ile meydana gelir. Ortalama arter basıncı sistolik ve diyastolik basınçların ortalaması değil, kanı sistemik dolaşıma iten basıncın ortalama değeridir (Köylü 2016).

Kalp atım hızı, atım hacmi ve periferik damar direncindeki değişiklikler kan basıncında değişikliklere yol açar. Kan basıncının kontrol sistemleri hızlı etkili basınç kontrol sistemleri ve uzun süreli kontrol sistemidir. Hormonal kontrol mekanizmaları, norepinefrin-epinefrin vazokonstriktör mekanizması, vazopressin vazokonstriktör mekanizması ve renin-anjiyotensin vazokonstriktör mekanizmasını içerir. Kan basıncının uzun süreli kontrolü böbrek-vücut sıvısı mekanizması ile sağlanır (Köylü 2016).

2.4. Renin- Anjiyotensin Sistemi

Renin-anjiyotensin sistemi (RAS) kan basıncının fizyolojik düzenlenmesinde, böbrek fonksiyonları, kardiyovasküler ve sinir sistemi için en önemli endokrin (dokudan dokuya), parakrin (hücreden hücreye) ve intrakrin (hücre içi, mitokondriyal, nükleer) vazoaktif hormonal sistemlerden biridir (Li vd 2017, Li vd 2018).

RAS, kardiyovasküler fonksiyonun fizyolojik ve patofizyolojik düzenlenmesi için önemli peptid hormonlarını üreten çok sayıda enzim-substrat etkileşiminden oluşan bir sistemdir. Renin enzimi, artan sempatik sinir sistemi aktivitesi, renal afferent arteriyollerde azalmış perfüzyon basıncı, makulada azalmış sodyum klorür içeriği, nitrik oksit ve prostanooidlerin lokal etkileri gibi çeşitli uyarılara yanıt olarak böbreklerin jukstaglomerüler hücrelerinden sentezlenir ve salgınır. Renin, anjiyotensinojenin, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) tarafından oktapeptid anjiyotensin II (Ang II) oluşturmak için parçalanmış dekapeptid anjiyotensin I (Ang I)' e dönüşümünü katalize eder (Miller ve Arnold 2019). RAS sisteminde görev alan peptidlerin etkilerinde görev alan tüm anjiyotensin reseptörlerinin sınıflandırma verileri tablo 2.1' de gösterilmektedir.

Tablo 2.1 Anjiyotensin reseptör sınıflandırılması (Kasapoğlu S ve Demirel Yılmaz E 2021' den modifiye edilmiştir).

Anjiyotensin Reseptörleri	
Reseptörler	Ligandlar
AT ₁ R	Ang II, Ang III, Ang IV, AngA
AT ₂ R	Ang II, Ang III, Ang-(1-7), Ang(1-9), AngA
AT ₄ R	Ang IV, Ang(3-7)
MasR	Ang-(1-7), Ang(1-5)
MrgDR	Ang-(1-7), Alamandin
PRR	Prorenin, renin

Ang II, fizyolojik ve patofizyolojik etkilerini uygulamak için G-proteinine bağlı reseptörlerine etki eder. İnsanlarda bulunan anjiyotensin reseptörleri tipleri AT₁R ve AT₂R. Bunların her ikisinde G-proteinine bağlı reseptörlerdir (GPCR) ve aktivasyonları ile birçok sayıda hücre içi sinyalleşme yollarını harekete geçirirler. Bu sinyalleşme

basamakları G-protein aracılı, JAK/STAT, MAPK veya ERK hücre içi sinyalleşme kaskadlarıdır (Bruce ve Kloet 2017). Ang II, anjiyotensin reseptörü tip I (AT1R) bağlanması yoluyla vazokonstriksiyon, hipertrofik ve fibrotik hedef organ yeniden şekillenmesi, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi, bağışıklık tepkisi, inflamasyon düzenlenmesinde yer alır. Ang II, endotel hücrelerindeki G proteinlerini aktive etmesiyle kan damarlarının daralması sonucu kan basıncının yükselmesi meydana gelir (Adamcova vd 2021, Miller ve Arnold 2019, Su vd 2021).

Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE), renin-anjiyotensin sisteminin önemli bir düzenleyicisidir. ACE, en çok akciğerler, bağırsaklar, böbrekler, beyin, aort ve adrenal medullada bol miktarda bulunan tip 1 transmembran monomerik glikoproteindir (Gaddam vd 2014). ACE, aktif olmayan decapeptit Ang I' i Ang II' ye dönüştürürken aynı zamanda hipotansif peptid bradikininini metabolize eden bir metalloproteinazdır (Lambert vd 2008).

Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) bağırsakta, akciğerlerde, kalpte, böbreklerde ve plasentada bulunan çinko metalopeptidazların M2 ailesine ait olan diğer tip I transmembran glikoproteindir (Gaddam vd 2014). ACE2, Mas reseptörüne (MasR) bağlanan, Ang I' i ve Ang II' yi inaktif Anjiyotensin (1-9)' a ayıran yeni bir ACE homologudur (Zhou vd 2020). Anjiyotensin II ise ACE2 tarafından vazodilatör peptit anjiyotensin-(1-7)' ye hidrolize edilir (Lambert vd 2008). Kalpte ACE2, kardiyomyosit, kardiyofibrolast ve koroner endotel hücrelerde eksprese edilirken, Ang II' yi yararlı peptit Ang-(1-7)' ye metabolize ederek RAS' ın negatif düzenlenmesi için önemli mekanizma olarak görev yapmaktadır (Patel vd 2016).

Karaciğerde üretilen anjiotensinojen, renin, ACE, kimaz, kallikrein, katepsin G ve esteraz 2 enzimlerinin proteolitik etkileriyle Ang I ve Ang II' ye aktive edilir. Ang II, RAS' ın etkisini başlatmak için AT1R ve AT2R' ye bağlanabilir veya daha fazla bölünebilir. Ayrıca kardiyoprotektif peptidler olan Anjiyotensin IV, Ang-(1-7) ve Alamandine dönüşebilir. Bu peptidler de etkilerini sırasıyla AT4R, MasR ve MrgD ile gösterir (Adamcova vd 2021).

2.4.1. Kardiyak hücre içi renin- anjiyotensin sistemi

Kardiyak hücreler renin dışında RAS' ın birçok bileşenini eksprese etmektedirler. Hücre içi Ang II, kardiyak miyositlerde hücreler arası iletişim üzerinde etkilere sahiptir. Kalpte sinyal mekanizmaları ve hücreler arası etkiler dahil olmak üzere Ang II sentezi ve eylemleri için bir hücre içi sistem tanımlanmıştır (Kumar vd 2012). Renin içermeyen yollar, kalp gibi dokularda Ang II' nin oluşumunda daha aktif olarak yer alabilir. Anjiyotensin (1-25) ya da Anjiyotensin (1-12)' den doku Ang II oluşumu, birincil olarak, proteinazların serin ailesinin bir üyesi olan kimazdan kaynaklandığı görülmektedir (Ferrario ve Mullick 2017).

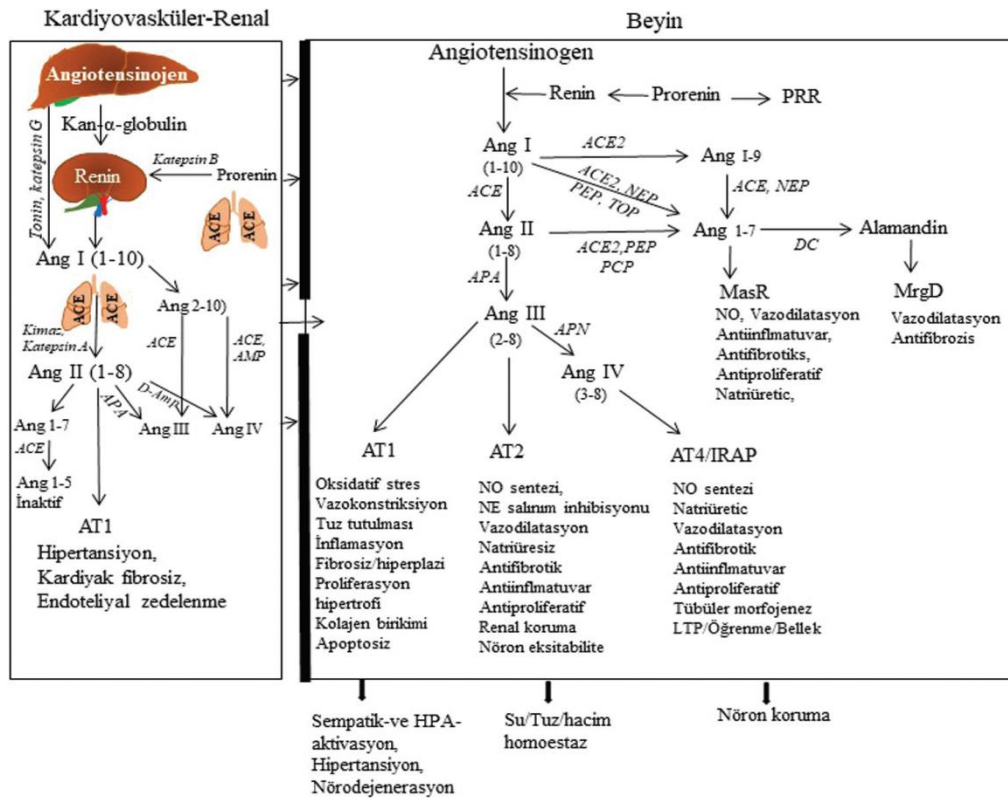
2.4.2. Anjiyotensin-(1-7)

RAS' ın vazodilatör kolu, Ang II' nin zararlı kardiyovasküler etkilerine karşı çıkan heptapeptid Ang-(1-7) ile karakterize edilir. Ang-(1-7), Ang II' nin biyolojik etkilerini düzenlemektedir. G-proteine bağlı Mas reseptörü ile vazodilatasyon, anti-inflamatuar, antihipertansif etkiler ve kardiyoproteksiyon sağlar, anjiyogenezi ve hücre büyümesini inhibe eder. Ang II' nin aracılık ettiği baskılayıcı, proliferatif, profibrotik ve protrombotik etkilere karşı çıkar (Gironacci 2015, Simoes e Silva vd 2013).

Ang-(1-7) miyokardın içerisinde doğrudan üretilebilmektedir. ACE2 ve Ang-(1-7) Mas reseptörü kardiyomiyositlerde bir arada bulunmaktadır. Ang-(1-7) oluşumu substrat olarak Ang II' ye bağlıdır. Ang I önce ACE2 tarafından herhangi bir biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilinmeyen bir peptid olan Ang (1-9)' u oluşturmak üzere hidroliz edilir ve daha sonra ACE tarafından Ang-(1-7)' ye dönüştürülür. Ang II oluşumu dışında Ang-(1-7) üretimini sağlayan yollar olarak açıklanabilir (Zhang vd 2017, Keidar vd 2007).

Ang-(1-7) peptidi, kısa yarı ömür ve peptidazlar tarafından hızlı enzimatik metabolizmadan kaynaklı düşük biyoyararlanıma sahiptir. Ang-(1-7) dolaşımında ACE tarafından parçalanarak Anjiotensin (1-5) dönüştüğü ve bunun da 29 dakikalık kısa bir yarı ömürle sonuçlandığı bildirilmiştir (Wester vd 2017).

NO, kardiyomiyositler dahil olmak üzere farklı hücre tipleri üzerindeki Ang-(1-7) etkilerinin önemli bir aracısı olarak kabul edilmiştir. Ayrıca Ca^{2+} kullanımında yer alan proteinlerle etkileşime girdiği ve kardiyak kontraktileti düzenlediği bilinmektedir. Ang-(1-7) kardiyoprotektif etkilerini G-proteinine bağlı Mas reseptörü ile NO sentezinin aktivasyonunu içeren sinyal yolu aracılığıyla düzenler (Gomes vd 2012, Abwainy vd 2016).



Şekil 2.5 Kardiyovasküler- renal ve beyin RAS sistemleri (Hatip-AI-Khatib 2021).

ACE: anjiyotensin dönüştürücü enzim, AMP: aminopeptidaz, Ang: anjiyotensin, APA ve APN: aminopeptidaz A ve N, AT1R, AT2R, AT3R: anjiyotensin I, II ve III tip reseptörler, AT4/IRAP: Ang IV/İnsülin- regüle membran aminopeptidaz, D-Amp: dipeptidil- aminopeptidaz, HPA: hipotalamus- pitüiter- adrenal aks, MasR: Mas reseptör, MrgD: Mas related G- protein coupled reseptör type D, NEP: nötr endopeptidaz, PCP: protil karboksipeptidaz, PEP: protil endopeptidaz, PRR: prorenin reseptörü

2.5. Miyokardit

Kalbin orta tabakası olan miyokard, kalbin kasılmasını sağlayan kalp kası hücrelerini içerir. Miyokard, içten endokardiyum, dıştan ise epikardiyum ile kaplıdır. Miyokardit, bir enfeksiyona sekonder olarak ortaya çıkabilen, immün aracılı olabilen veya toksisite oluşturan ajanlara maruz kalma nedeniyle oluşabilen miyokardın inflamatuvar bir durumudur (Lampejo vd 2021). Miyokardit, kalpteki çeşitli patolojik bağışıklık süreçlerinin klinik ve histolojik belirtilerini ifade eder. Kalpteki bağışıklık reaksiyonu, kardiyomiyositlerde yapısal ve işlevsel anormalliklere neden olarak kasılma bozukluğuna ve kalpte ileti sisteminde sorunlara yol açar (Dominguez vd 2016, Sagar vd 2012).

2.5.1. Epidemiyoloji

Miyokarditin insidansını klinik belirtileri oldukça değişken olduğu için belirlemek zor olmuştur. Otopsi raporları, incelenen popülasyona göre miyokardit insidansına ilişkin değişken tahminler ortaya koymuştur ve tahminler %0,12 ile %12 arasında değişmektedir (Blauwet ve Cooper 2010). Miyokarditten etkilenen hastalar çoğunlukla erkekler ve genç yetişkinlerden oluşmaktadır.

Golpour ve ark.'larının (2021) yaptıkları çalışmada miyokardit kaynaklı ölüm oranı en yüksek Okyanusya coğrafi bölgesinde 100.000 kişi başına 2.6 olarak bulunmuştur. Bunun büyük olasılıkla yetersiz sağlık kaynakları nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Asya-Pasifik bölgesinde yaşa göre standartize edilmiş en yüksek miyokardit prevalansı gözlenmektedir. Miyokardit prevalans oranları Şili' de 100.000 kişi başına 10,2 ile Arnavutluk' ta 100.000 kişi başına 105,6 arasında değişmektedir. Batı Avrupa ve Kuzey Amerika' da yapılan gözlemler, akut dilate kardiyomiyopati vakalarının %10 ila %50' sinin miyokardit ile ilişkili olduğunu göstermektedir. 1990 ve 2017 yılları arasında, miyokardit için yaşa göre standardize edilmiş oranlar düşerken, küresel prevalans ve ölüm oranları önemli ölçüde artmıştır.

Cooper ve ark.'ları (2014) tarafından bildirildiğine göre; Japonya' da ve Asya bölgesinin geri kalanında akut miyokarditin ani ölüm ve kronik dilate kardiyomiyopatinin

önemli bir nedeni olduğu gösterilmiştir. Avustralya ve Yeni Zelanda' da elde edilen veri ve otopsi sonuçlarında Japonya' da bildirilenler ile benzerlik gösterip miyokardit bu bölgede akut kardiyovasküler ölüm nedeni olduğu desteklenmektedir. Meksika ve Orta-Güney Amerika bölgesel miyokardit prevalansı Avustralya, Avrupa ve Kuzey Amerika' da bildiren oranlara benzerdir. Afrika ve Orta Doğu için kalp yetmezliğin yüzdesi olarak miyokardit oranı bölgeye ve etiyolojiye göre değişmektedir. Afrika' da tanı araçlarının eksikliği de göz önünde bulundurularak dilate kardiyomiyopati kalp yetmezliğinin başlıca nedeni olarak tanımlanmıştır. Batı Avrupa' daki verilerde çoğunlukla kalpteki viral genomların akut ve kronik dilate kardiyopatide yaygın olduğu ve kötü prognozla ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Kuzey Amerika' da çocuklarda miyokardit dilate kardiyomiyopatinin yaygın bir nedenidir. Miyokarditte Kuzey Amerika kardiyomiyopati, transplantasyon ve ölüm oranınının 5 yıl sonra %50' den fazla olduğu öne sürülmüştür.

2.5.2. Etiyoloji

Miyokarditin etiyolojik nedenleri enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan olarak ayrılır. Viral ajanlar Adenovirüsler, Enterovirüsler (coxsackievirus), Herpes virüsleri (İnsan Herpes virüsleri 6, Epstein-Barr virüsü), Hepatit C virüsü, HIV, İnfluenza A, Parovirüs B19, Koronavirüs (Sars-CoV2) içermektedir. Parazit ajanlar olarak Larva göçmenleri ve Şistozomiyaz yer alır. Bakteriyel ajanlar Borrelia türleri, Mikobakteri türleri, Mikoplazma, Pnömoni, Treponema pallidum, Streptokok türlerinden oluşmaktadır. Mantar ajanları Aspergillus türleri, Kandida türleri, Coccidioides türleri, Kriptokok türleri, Histoplazma türleri içermektedir. Protozoal ajanlarda Trypanosoma Cruzi (Chagas hastalığı) yer alır.

Enfeksiyöz olmayan nedenler arasında sık görülen Otoreaktif miyokardit önemlidir. İmmünolojik sendromlar olarak Churg-Strauss sendromu, Diabetes mellitus, Enflamatuar barsak hastalığı, Dev hücreli miyokardit, Wegener granülomatozu, Sarkoidoz, Sistemik lupus eritematoz, Takayasu arteriti, Tirotoksikoz içermektedir. Toksikite oluşturan ajanlar içerisinde antrasiklinler, kokain, interlökin-2, alkol miyokardit oluşumunda riskli bulunmaktadır. Aşırı duyarlılık nedeni olarak sefalosporinler, dogoksin, diüretikler, dobutamin, sülfonamidler, trisiklik antidepresan görülmektedir. Miyokardit, kalp transplantasyonunun en sık nedeni olan dilate kardiyomiyopati ile de gelişebilir. Kök hücre veya kalp transplantasyonuna red durumda

%1 oranında miyokardit görülebilmektedir. Bunların dışında da diğer enfeksiyöz olmayan etiyolojiler kaynaklı dilate kardiyomiyopati meydana gelmektedir (Liguori vd 2020).

2.5.3. Klinik

Gençlerde daha sık görülmekle birlikte her yaştan bireyi etkileyebilen miyokardit, çeşitli klinik semptomlara sahiptir. Miyokardit klinikopatolojik sınıflanması akut, fulminan, subakut ve kronik formlarından oluşur. Değişken klinik sunum göstermesiyle tanı konulması zor olabilmektedir. Asemptomatik vakaların yanında klinik tablo sıklıkla ortaya çıkmaktadır. En yaygın klinik belirtileri göğüs ağrısı, ateş ve dispnedir. Miyokarditin diğer bulguları çarpıntı, senkop ve yorgunluğu içerir (Lampejo vd 2021, Sagar vd 2012).

Miyokarditin klinik belirtileri, hafif göğüs rahatsızlığı semptomları ile miyokardiyal fonksiyonda bozulma olmaksızın geçici çarpıntı ile birlikte subklinik tablodan kardiyojenik şok veya mortalite riski oluşturabilen ventriküler aritmi ile birlikte fulminan miyokardit ve kalp yetmezliğine kadar oldukça değişkendir (Tyminska vd 2022).

Pediyatrik hastalarda klinik tablo yaşa göre değişir. Bebeklerde endişe, halsizlik, ateş, iştahsızlık, takipne, taşikardi ve siyanoz gibi spesifik olmayan semptomlar ön plandayken 2 yaşından büyük çocuklarda semptomlar göğüs ağrısı, karın ağrısı, kas ağrısı, yorgunluk, öksürük ve ödem içerebilir. Yeni doğanlar veya bebekler genellikle daha ciddi şekilde etkilendiğinden, semptomların şiddeti çocuğun yaşına bağlıdır (Blauwet ve Cooper 2010).

2.5.4. Tedavi

Miyokarditin optimum seviyede tedavisini sağlamak için yeterli bir tanı almak ve etiyolojisini belirlemek gerekir. Miyokardit tanısında endomiyokardiyal biyopsi etiyolojinin, inflamatuvar sürecinin tipini ve miyokardiyal fibrozisin derecesinin belirlemesini sağlayan altın bir standarttır. Miyokardit veya inflamatuvar

kardiyomiyopatiden şüphelenen durumlarda ilk tanısal incelemede transtorasik ekokardiyografi yapılmalıdır. Kardiyak morfoloji ve fonksiyon hakkında bilgi verirken ayırıcı tanıda yardımcı olur. Görüntüleme teknolojisi olarak invaziv olmayan kardiyak manyetik rezonans, tanısal kriterlere sahiptir (Tyminska vd 2022).

Akut viral miyokardit sırasında egzersiz viral replikasyonu artırabilir ve sağkalımı kısaltabileceğinden akut miyokarditli hastalarda fiziksel aktivite sınırlandırılmalıdır. Standart kalp yetmezliğinde tedavisi almalı, aritmiler izlenmeli ve tedavi edilmelidir. Bu önlemler semptomatik rahatlama için tasarlanmıştır. Hastalığın ilerlemesi ve dilate kardiyomiyopatiye dönüşümünü durdurmak için patojenik mekanizmalar ele alınmalıdır (Dennert vd 2008).

Akut miyokardit tedavisi mevcut klinik senaryoya göre değişmektedir. Akut dilate kardiyomiyopati ve kalp yetmezliği sendromu ile başvuran hastalarda, kronik kalp yetmezliği için standard olan destekleyici önlemler ve nörohormonal blokaj ile farmasötik tedavi endikedir. Olağan tedaviye yanıt vermeyen kronik inflamatuvar kardiyomiyopatili hastaların çoğunda miyokardiyal inflamasyonun immünohistokimyasal kanıtı vardır. Mekanik dolaşım desteği, optimum tıbbi bakıma rağmen kardiyojenik şoklu hastalarda transplantasyon veya iyileşme için bir köprü oluşturabilir. Akut miyokarditte iyileşme süresi birkaç günden birkaç aya kadar değişmektedir. Yetişkinlerde miyokardit için transplantasyon sonrası sağkalım, diğer nedenlerle kalp transplantasyonundan sonraki sağkalıma benzerdir (Sagar vd 2012).

2.5.5. Patofizyoloji

İnsanlarda miyokarditin patofizyolojisi tam olarak anlaşılammıştır. Kardiyotropik virüsler miyokardiyal dokuya sızarak doğrudan miyokardiyal hasara ve inflamasyona yol açarken, miyokardın kendisini işgal etmeden yani sitokin fırtınası veya hücre/antijen yoluyla miyokardiyal hasara neden olabilmektedirler (Tyminska vd 2022). Viral miyokardit seyrinin 3 faz ile karakterize edildiği öne sürülmektedir. Başlangıçta, virüsün miyositlere girmesine özel bir reseptör aracılık etmektedir. Coxsackievirüs–adenovirüs reseptörü aracılığıyla kardiyomiyositlerin yüzeyine yapışarak, konakçı hücrelerde çoğaldıkları, kardiyomiyositlerin hücre iskeleti proteinlerinin bozulmasına ve sonuç olarak miyokardiyal hasara neden olurlar. Viral girişten sonra, virüs replikasyonu

tarafından indüklenen miyositlerin akut hasarı, miyosit nekrozuna, hücre içi antijenlerin (kardiyak miyozin) ortaya çıkmasına ve ardından doğal öldürücü hücrelerin ve makrofajların istilası ile karakterize edilen konakçının bağışıklık sisteminin aktivasyonuna yol açar. Miyokarditin akut fazı sadece birkaç gün sürer. Virüs kaynaklı yaralanmanın akut fazından sonra, ikinci faz otoimmün reaksiyonlarla karakterize edilir. Birkaç haftadan birkaç aya kadar süren bu subakut faz, moleküler taklit yoluyla konakçının organlarını hedefleyebilen aktive edilmiş virüse özgü T lenfositler tarafından tanımlanır. Sitokin aktivasyonu tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin (IL-1 ve -6) viral ve kardiyak proteinlere karşı antikolar kardiyak hasarı şiddetlendirebilir ve kontraktıl fonksiyonun bozulmasına neden olabilir. Otoimmün süreçler miyokarddaki virüs genomunun saptanmasından bağımsız olarak devam eder ve miyokardiyal yeniden şekillenme ve dilate kardiyomiyopati gelişimi ile karakterize edilen kronik faza yol açar. Viral miyokarditin patofizyolojisinde viral girişten sonra virüs replikasyonu, miyositlerin akut hasarına (akut miyokardit) ve konağın bağışıklık sisteminin aktivasyonuna (subakut miyokardit) yol açar (Kindermann vd 2012).

Miyokardit patogenezinde bağışıklık sisteminin rolü hem yararlı hem de zararlı olabilir. Hızlı ve yeterli bağışıklık reaksiyonu etkili bir patojen temizliği sağlarken aynı savunma mekanizmaları tetikleyici faktörlere karşı otoimmün fenomenine yol açabilir. Patolojik olarak, otoantikoların veya otoreaktif T lenfositlerin yokluğunda provoke edilmemiş miyokardiyal inflamasyonu temsil edebilir. Bu durumda miyokardit, yetersiz B, T ve dendritik hücre yanıtlarından kaynaklanır ve kardiyomiyositlerin yüzeyinde kendi antijenlerini tanıyan ve önemli bir patojenik rol oynayan otoantikoların üretimine yol açar (Tyminska vd 2022). Otoantikolar kasılma yapılarına, iyon kanallarına, enerji metabolizmalarındaki proteinlere karşı miyokarditte tanımlanmıştır. Miyokardit patofizyolojisindeki çeşitli otoantikoların rolleri kalpte ve hasarlı kardiyomiyositlerde yetersiz inflamasyon üretimi, kardiyak disfonksiyon ve miyokardiyal inflamasyon gibi tanımlanmaktadır (Dennert vd 2008).

Fulminan miyokarditte nekrotik miyokard dokusunda T lenfositler, makrofajlar ve nadiren B lenfositler gibi çok sayıda infiltrate olan bağışıklık hücresi görülmüştür. Düzensiz sitokin salgılanması çok sayıda bağışıklık hücresinden meydana gelmekte ve bağışıklık sisteminin etkilendiğini ve bozulduğunu göstermektedir. Sitokin fırtınası çeşitli etiyolojiler tarafından tetiklenebilir. Hücre içi bileşenlerin hasarlı kardiyomiyositlerden sızması, TLR reseptörlerini aktive ederek doğuştan gelen bağışıklık tepkisini başlatır. Yükseltilmiş sitokinler, reseptör aracılı sinyalleşmeyi aktive ederek, ERK ve MAPK

aktivitesini ve nükleer faktör-kappa B ve STAT3 gibi transkripsiyon faktörlerini artırarak sürekli sitokin döngüsüne yol açan sitokin ekspresyonuna neden olurlar. Sitokin aşırı üretimde miyokard kasılmasına ve elektrik iletimi üzerinde doğrudan etkilere sahiptir. IL-1 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler miyokardın kasılma gücünü ve hızını doğrudan azaltabilmektedir. Sitokin fırtınasının olumsuz bir etkisi olarak da mitokondrinin işlevini bozarak, kalbin metabolik durumu etkilenmektedir (Hang vd 2020).

Doksorubisin gibi en yaygın kullanılan antrasiklin antikanser ajanlarının neden olduğu kardiyotoksisite mekanizmaları DNA hasarı, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, otofaji ve metabolik inflamasyon, hücre içi sinyalleşme, transkripsiyon faktörleri ve apoptoz yolları içermektedir (Kitakata vd 2022). Antrasiklinler en çok mitokondri ve çekirdekte birikmektedir. Antrasiklinler oksidatif fosforilasyonda yer alan birçok mitokondriyal solunum zinciri kompleksine müdahale ederek ROS oluşumuna yol açar. ROS üretimi, demir varlığında şiddetlenir ve çeşitli membran ve mitokondriyal DNA bileşenleri ile ROS etkileşimi, otofajide değişikliklere ve kardiyomiyosit apoptoz ve nekrozun indüklenmesine yol açar. Ayrıca nükleer faktör-kappa B ve TNF- α içeren proinflamatuvar yolları aktive eder ve kalbin esas inflamatuvar mediatörleri olan NLRP3 (Nod benzeri reseptör proteini 3), IL-1 ve IL-6'nın transkripsiyonunu yükseltir. Kardiyomiyosit ölümü, inflamatuvar kaskadlar ve ROS üretiminin daha fazla aktivasyonuna yol açarak, miyokarda fibrozis ve elektriksel değişiklikler ile fonksiyonel ve yapısal değişikliklere yol açar (Vuong vd 2022).

2.6. Otofaji Mekanizması

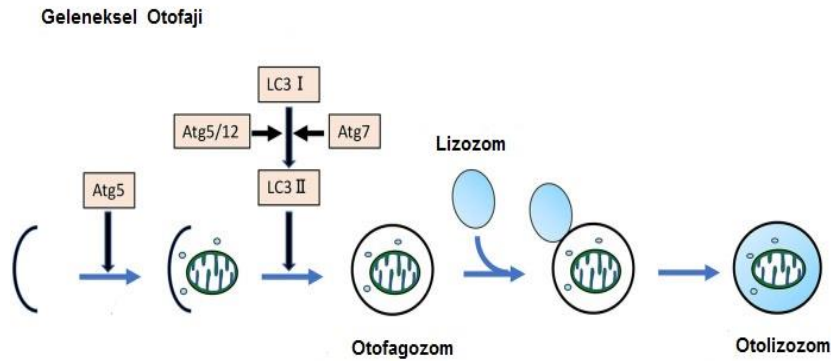
Otofaji, besin açlığı, metabolizmadaki değişiklikler, ROS birikimi, enerji ve oksijen durumları için normal şartların yanında metabolik stres altındaki durumlarda da hücre ve doku homeostazını sağlamayı amaçlayan bir süreçtir (Koleini ve Kardami 2017). Programlanmış hücre ölümü olarak kaspazdan bağımsız katabolik bir mekanizmadır. Çok sayıda organ ölümü otofaji olarak ifade edilirken tüm hücrenin ölümü apoptoz olarak adlandırılmaktadır (Xiao vd 2019).

Otofaji, mikro-otofaji, şaperon aracılı otofaji ve makro-otofaji olarak alt bölümlere ayrılabilir. Makrotofajide, proteinler veya sitozolik bileşenler, sitoplazmada ortaya çıkan, sitoplazmik materyali içine alan ve sonrasında lizozomlarla birleşerek kargolarının bozulmasına yol açan otofagozom adı verilen veziküllerde tutulur. Mikrotofajide, proteinler doğrudan lizozomal membranın invajinasyonundan üretilen veziküllerin içine alınır. Şaperon aracılı otofajide, vezikül oluşmaz bunun yerine sitozolik proteinler, ısı şoku ile aynı kökenli protein 70/ısı şoku proteini –alfa8 tarafından parçalanmak üzere lizozomal lümene yer değiştirir (Shaikh vd 2016).

Otofajinin beş temel basamağı başlama, çekirdeklenme, genişleme, olgunlaşma ve bozunmayı içerir (Xiao vd 2019).

Otofagozom oluşumu 3 adımdan gerçekleşir. Unc-51 benzeri kinaz (ULK) kompleksi, otofajik çift membranlı veziküllerin oluşumunu başlatır. ULK kompleksi, ULK1 veya 2, Atg13, Atg101 ve 200 kDa'lık fokal yapışma kinaz ailesi etkileşimli proteini (FIP200) içerir. Rapamisin (mTOR) kompleksinin memeli homologu, ULK kompleksinin tamamen baskılanmasıyla otofajik aktiviteyi azaltır. Beclin 1, Atg14L, Vps34 ve Vps15'ten oluşan sınıf III fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) kompleksinde otofajinin başlatılmasında önemli bir bileşendir (Yamaguchi 2019). Beclin 1, sınıf III tipi fosfoinositid 3 ile etkileşime girerek otofajik sürecin otofagozom oluşumunda önemli bir rol oynar. Beclin 1 ve Vps34 kompleksinin kinaz aktivitesinin aktivasyonu, fosfatidilinositol 3-fosfat üretimini teşvik eder, böylece lipid membran uzamasını, kargo alımını ve otofagozom olgunlaşmasını kolaylaştırır (Maejima vd 2016). Açlık veya AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), PI3K kompleksini düzenleyen ULK kompleksini aktive edebilir. Başlamadan sonra, izolasyon zarı bir lipid kinaz sinyal kompleksi tarafından uzar ve vezikülün genişlemesi ve tamamlanması için ubikuitin benzeri protein konjugasyon yolları gereklidir. İki ubikuitin benzeri konjugasyon sistemi, Atg5, Atg12 ve Atg16L1 kompleksi ve mikrotübül ile ilişkili protein 1 hafif zincir 3 (LC3), bu adımlarda önemli rol oynar. Konjugasyon, LC3-I' in bir fosfatidiletanolamin konjuge formu olan LC3-II' ye dönüşmesini indükler. LC3-II, otofagozom adımda, otofagozom lizozomla birleşerek otofagozomun sekestre ürünlerinin ve iç zarının lizozomdan asit hidrolazlar tarafından parçalandığı bir otolizozom oluşturur. Bu bileşenler, ATP üretimi veya hücrenin hayatta kalması için protein sentezi olarak geri dönüştürülebilir (Yamaguchi 2019). LCI, hücre iskeleti stabilitesinde önemli bir rol oynamaktadır ve çeşitli hücre görevlerinde yer alır. Otofajiye katılan MAP1B- LCI mikrotübül ile ilişkili protein 1B- hafif zincir 1 kritik bir düzenleyicidir (Arasaki vd 2018).

Moleküler mekanizmasına göre otofaji kanonik (geleneksel) ve alternatif olarak sınıflandırılabilir. Kanonik otofajide Atg5/Atg7 önemli rol oynar bu yüzden kanonik otofajiye Atg5/Atg7 bağımlı otofajide denilmektedir (Feng vd 2022).



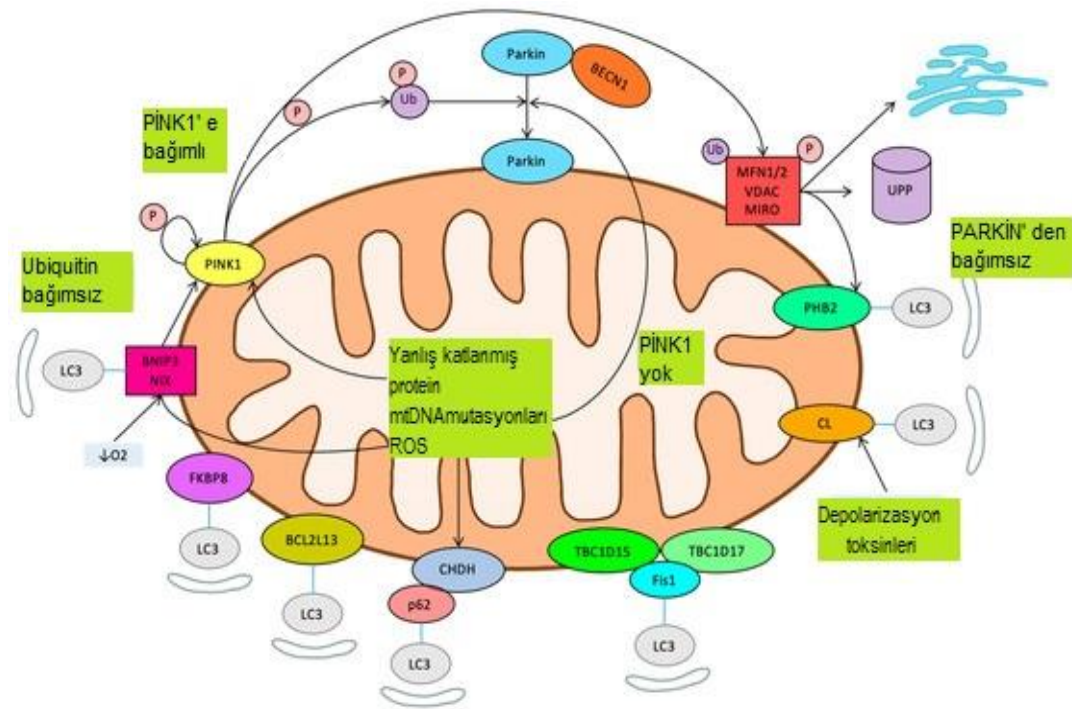
Şekil 2.6 Atg5/Atg7 gerektiren LC3' e bağlı geleneksel otofaji (Uchikado vd 2022' den değiştirilerek).

2.6.1. Mitofaji

Mitokondri, hücre içi güç merkezi, programlanmış hücre ölümü, apoptoz, mitofaji, otofaji, metabolizma, kalsiyum akışı ve doğuştan gelen bağışıklık gibi birçok fizyolojik süreçte görev alır. Kalp için mitokondri yüksek enerji ihtiyacı, kardiyomiyosit farklılaşması ve kasılma işlevi için özellikle gereklidir. Hemodinamik stres nedeniyle dışsal ve içsel faktörler mitokondriye zarar verebilir, bu hasarlı mitokondri yan ürünler olarak ROS üreterek hücre işlev bozukluğuna ve hücre ölümüne yol açabilir. Hasarlı mitokondri veya mitokondriyal disfonksiyon kalp yetmezliği, nörodejeneratif hastalıklar ve kardiyovasküler yaşlanma gibi birçok kalp ile ilgili hastalıkların nedenidir. Bu yüzden mitokondriyal kalite kontrolü, özellikle kardiyomiyositlerde hücre homeostazın korunması için önemlidir (Yamaguchi 2019, Song vd 2021).

Mitofaji, bilinen üç ana mitokondriyal kalite kontrol mekanizmalarından biridir. Hasarlı ve fazla mitokondriyi seçici olarak bozan özel bir otofaji çeşididir. Patolojik koşullar altında, mitofaji hücrenin besin açlığı ve hipoksi gibi çeşitli stres durumlarında savaştığı kritik bir mekanizma görevi yapar (Song vd 2021).

Mitofaji dört adımda tamamlanmaktadır. İlk önce hedef mitokondri ağından izole edilir. İkinci olarak bozulma için işaretlenir, üçüncüsünde otofaji reseptörleri mitokondriyi içine alan otofagozom oluşumunu sağlayan otofagozom zarındaki LC3B bağlanan Bnip3, Nix ve p62 dahil olmak üzere bir dizi farklı adaptör proteini tarafından mitokondri otofagozomun içine alır. Son olarak, otofagozom bir lizozomla birleşir ve içindeki kargo lizozomal enzimler tarafından parçalanır. Mitofaji, reaktif oksijen türleri (ROS) mitokondriyal membran potansiyelinin çökmesi ve düşük ATP seviyeleri tarafından uyarılır (Song vd 2021, Delbridge vd 2017).



Şekil 2.7 Başlıca mitofaji yollarının özeti (Doblado vd 2021' den modifiye edilmiştir).

VDAC: voltaja bağlı anyon seçici kanal, MFN1/2: mitofusin 1 ve 2, BNİP3: adenovirus E1B 19 kDa etkileşimli protein 3, Fis1: fisyon protein, BCL2L13: Bcl2 benzeri 13, TBC1D15: TBC1 alan ailesi üyesi 15, CHDH: kolin dehidrojenaz, PHB2: Prohibitin 2, CL: kardiyolipin, MIRO: mitokondriyal Rho.

Otofagozom alma sürecinde ubiquitin gerekip gerekmediğine göre, mitofaji iki türe ayrılabilir. Ubiquitin bağımlı mitofajide, PTEN ile indüklenen varsayılan kinaz 1 (PINK1)/Parkin sinyal yolu mekanizmasından oluşur. Parkin, 465 amino asit kalıntısı olan sitoplazmik bir proteindir. Ubiquitin bağımsız mitofajide ise Bnip3 gibi mitokondriyal reseptörler görev alır (Li vd 2021, Song vd 2021).

Mitofajinin hasarlı mitokondriyi ortadan kaldırma sürecine Beclin-1 ve diğer moleküllerde aracılık etmektedir. Beclin-1, miyokard fibrilasyonundan sonra mitofaji akışının artışı sağlayan ve otofaji sırasında bir "protein platformu" temsil eder. LC3B-I/LC3B-II oranı ve toplam LC3B-II seviyeleri, fibrilasyondan sonra miyokarda gerçekleşen mitofajinin belirteçleri olarak kullanılabilir. LC3, otofagozom veziküllerini mitokondrinin fagositoz bölümlerine iletir ve ardından LC3-I ve LC3-II yoluyla lizozomlarla birleşir. Kısa bir yarı ömre bağlı olarak, LC3B-II parçalanabilir ve orijinal izoformu LC3-I' e geri dönüştürülebilir (Li vd 2021).

2.7. Deney Hayvanlarında Miyokardit Modeli

Miyokardit gibi inflamatuvar kalp hasarlarının hücresel ve moleküler mekanizmalarını anlama ihtiyacı nedeniyle deneysel miyokardit için hayvan modelleri geliştirilmiştir. Çeşitli hayvan modellerinde yapılan çalışmalar ile miyokardit patofizyolojisi araştırılmaktadır (Yuan vd 2003).

Deney hayvanlarında saflaştırılmış domuz kardiyak miyozini kullanılarak deneysel otoimmün miyokardit modeli oluşturulur. Saflaştırılmış kardiyak miyozin ile bağışıklanan bir sıçanda indüklenen deneysel otoimmün miyokardit, insan miyokarditine benzemekte ve dilate kardiyomiyopatiye dönüşebilmektedir. Otoimmün reaksiyon moleküler mekanizmasının incelenmesi ve yeni tedavilerin araştırılması için iyi bir deneysel hayvan modelidir (Han vd 2013, Zhao vd 2020). Klinik öncesi kemirgen miyokardit modelinde, belirli zamanlarda enflamasyonun saptanabilirliği test edilebilir, kontrast ajanlar arasında karşılaştırma yapılabilir ve histolojik değerlendirmeler doğrulanabilir (Tada vd 2019). Deneysel otoimmün miyokarditin histolojik bulguları, mononükleer hücre infiltrasyonunu içeren fibrozis ve miyosit nekrozu ile insan miyokarditine benzerdir (Jeuthe vd 2016).

Deneysel otoimmün miyokarditin klasik modeli tam Freund adjuvanı ile birlikte kardiyak miyozin verilmesiyle yüksek prevalans ve yüksek miyozin otoantikor miktarları sonucunda miyokarditin indüklendiği gösterilmiştir. Kendinden antijen sunan hücrelerin aktivasyonu miyokarditin indüksiyonu için önemli olması nedeniyle kemik iliği kaynaklı dentritik hücreler ile birlikte kardiyak miyozin peptid transferiyle diğer deneysel otoimmün miyokardit modeli geliştirilmiştir (Blyszczuk 2019).

Viral miyokardit araştırmalarında klinik ve deneysel miyokardit modeli oluşturmak için Coxsackie virüsü B3 enjekte edilmektedir (Li ve Xie 2022). Coxsackie virüsü B3 ile indüklenen miyokarditin fare modelinde şiddetli pankreatit ve yüksek sistemik inflamatuvar yanıt olduğundan yetişkin hastalardan ziyade bebeklerde Coxsackie virüsü B3 enfeksiyonunu taklit eder. Viral miyokarditin hayvan modellerinin klinik ilişkisini iyileştirmek için, Parvovirüs B19 miyokarditli hastalardan alınan endomiyokardiyal biyopsi örneklerinde en sık saptanan virüs olduğu için, Parvovirüs B19 ile indüklenen miyokardit modellerinin geliştirilmesi gerekmektedir (Tschöpe vd 2021).

Antrasiklin antibiotiklerinin zararlı etkilerini oluşturmak için hem büyük hemde küçük laboratuvar deney hayvanları kullanılmaktadır. Domuzlar, maymunlar, köpekler gibi büyük laboratuvar hayvanların kardiyovasküler sistem anatomik yapılarının insanlara benzerliği bir avantaj iken gereken ilaç miktarı, kan örneği alımı ve intravenöz enjeksiyon uygulamadaki teknik zorluklar önemli dezavantajlardır (Podyacheva vd 2021).

2.7.1. Dokrobusin ile indüklenen deney hayvanları miyokardit modeli

Antrasiklinlerin toksik etkilerini incelemek için küçük laboratuvar hayvanları olan fare ve sıçan sıklıkla kullanılmaktadır. Böylece kısa süre içerisinde hayvan numunesi üzerinde ilaç incelemeye izin verilebilmekte, miyokardiyal hasar dereceleri ve potansiyel kardiyoprotektif tedavinin etkinliği değerlendirilebilmektedir. Enjeksiyon protokolüne bağlı olarak bu modeller kısa süreli veya uzun süreli tasarlanabilir (Podyacheva vd 2021). Farelerde oluşturulan modellerde intraperitoneal yöntem denenerek doksorubisin toksisitesi oluşturmak için uygulamaya kabul edilmiştir. Doxorubisinin farmakokinetik özellikleri intraperitoneal ve intravenöz yöntem olarak

karşılaştırılarak dokulardaki ilaç konsantrasyonlarının benzer olduğu gösterilmiştir (Mostafa vd 2000, Podyacheva vd 2021).

Antrasiklinlerin oluşturduğu kardiyotoksisiteyi izlemek için hayvan çalışmalarında kardiyak görüntüleme ve biyokimyasal belirteçler kullanılır. Sıçan kalbinin küçük boyutuna ve hızlı kalp atışına rağmen, sıçan kalp fonksiyonunu değerlendirmek için ekokardiyografi kullanılmaktadır. Ekokardiyografinin iki önemli indeksi olan ejeksiyon fraksiyonu ve fraksiyon kısalması ile sol ventrikül kontraktilesi değerlendirilmektedir. Evrensel olarak kardiyotoksisiteyi indüklemek için kullanılan doksorubisin oral, intravenöz veya intraperitoneal yolla uygulanarak her deneye özgü doz rejimi şeklinde miyokardiyal kontraktilete baskılanır. Kardiyak fonksiyon bozukluğu açısından kardiyotoksisite ekokardiyografi ile teşhis edilir ve kalp fonksiyonu objektif ölçütlere dayanır (Georgiadis vd 2020).

Sıçanlara 20 mg/kg dozlarında uygulanan doksorubisin, doksorubisinin kalp dokusundaki yan etkilerini incelemek için uygun bir modeldir. Sıçanlarda bu doz, 70 kg'lık bir insanda 250 mg' a eşdeğerdir (Carvalho vd 2016). Stewart ve ark. (2019) tek doz olarak 15 mg/kg DOX intraperitoneal yolla uygulayarak doksorubisinin kaynaklı kardiyotoksisiteyi sıçanlarda araştırmışlardır. Literatürde 2-20 mg/kg arası değişen doz miktarları vücut ağırlığına göre tek enjeksiyonlu akut uygulama veya farklı süreler boyunca DOX uygulanarak çalışmalar yapılmıştır (Hayward ve Hydock 2007, Zhang vd 2019, Zhou vd 2022).

2.8. Doksorubisin

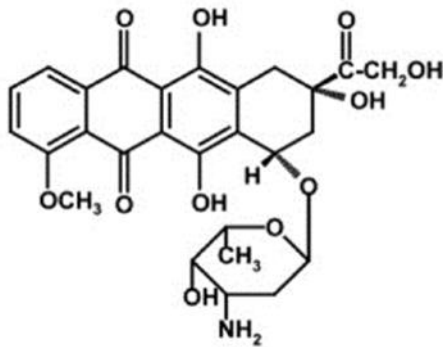
Doksorubisin en yaygın olarak kullanılan birinci nesil antrasiklin (Danesi vd 2002) olan sitotoksik bir ajandır. Güçlü bir antikanser ilacı olan doksorubisin parlak kırmızı pigment üreten *Streptomyces peucetius* ATCC 2795, gram pozitif filamentli bakteri türü tarafından üretilmektedir (Thi Pham vd 2021). Doksorubisin hidroklorür (HCl) lipozomal enjeksiyonu, klinik onay alan ilk lipozomal kapsüllü antikanser ilacıdır. Lipozomal kapsülleme, lipid bazlı (lipozom) formülasyon ile geleneksel antrasiklinlerin terapötik indeksini artırmayı amaçlamaktadır (Rivankar 2014).

Doksorubisin, meme kansinomu, sarkomlar, osteosarkom, lösemi ve lenfomalar gibi katı tümörler ve hematolojik maligniteleri tedavi etmek için kemoterapide kullanılmaktadır. DOX, DNA topoizomeraz II enziminin bir inhibitörüdür ve DNA' ya zarar verir. Doksorubisin, tümörlerin tedavisinde çok etkili olmasına rağmen terapötik aralığı kardiyomiyopati ve konjestif kalp yetmezliğine yol açan kardiyotoksitesi nedeniyle sınırlıdır (Sohail vd 2022, Liang vd 2016).

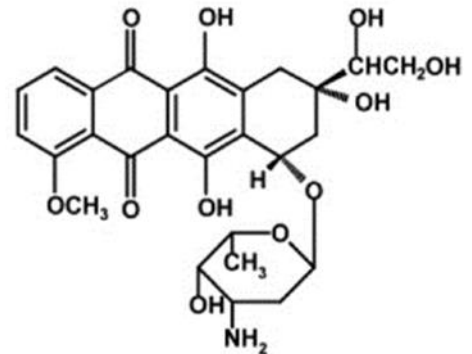
Doksorubisin intravenöz uygulamadan sonra lineer farmakokinetik sergiler, plazma ve dokularda yaygın olarak dağılır. Başlangıç yarı ömrü ($t_{1/2\alpha}$) 4.8 dk, ($t_{1/2\beta}$) de 2.6 saat ve son olarak 48 saat içerisinde ($t_{1/2\gamma}$) ile üç fazlı bir plazma bozunmasına uğrar (Danesi vd 2002). Atılımı karaciğer ve böbrek tarafında yapılmaktadır, biyolojik yarılanma ömrü 5 dakika ve 30-40 saat olarak belirtilmiştir (Joerger vd 2005). Kan-beyin bariyerini geçmez ve beyin omurilik sıvısındaki ilaç konsantrasyonuna ulaşmaz (Rawat vd 2021). Miyokarddan DOX klirensi plazma klirensinin çok gerisindedir, bu da kalbin DOX' a neden bu kadar duyarlı olduğunu açıklayabilir.

Doksorubisin, bir naftasenkinon çekirdeği ve bir amino şeker olan daunosaminden oluşmaktadır. Hem hidrofilik hem de hidrofobik bölgelere sahip olması nedeniyle hücre zarlarının yanısıra plazma proteinlerine bağlanabilir. DOX, ayrıca hem asidik hem de bazik fonksiyonlara sahip olması sayesinde çeşitli hücresel bölümlere girebilen çok yönlü bir bileşik yapıdadır (Mitry ve Edwards 2015).

Doksorubisin



Doksorubisinol



Şekil 2.8 Doksorubisin ve metaboliti olan doksorubisinolun kimyasal yapısı (Mitry ve Edwards 2015' den değiştirilerek).

Doksorubisin uygulandıktan sonra karaciğerde aktif metaboliti ve anti tümör aktivitesini sağlayan doksorubisinol' e metabolize edilir. Doksorubisinol, antineoplastik aktiviteyi sağlayan aktif kısımdır (Danesi vd 2002, Rawat vd 2021).

Doksorubisinin tümör hücreleri üzerindeki tedavi etme mekanizmaları, kardiyotoksisite mekanizmalarından farklıdır. Bunlar makromoleküllerin sentezinin inhibisyonu, ROS üretilmesi, DNA bağlanması, Topoizomeraz II enziminin inhibisyonu ile DNA' ya zarar verme ve apoptoz başlangıcı gibi mekanizmalardan oluşur (Chatterjee vd 2010). Topoizomeraz II enzimi DNA bölünme komplekslerini inhibe etmesiyle DNA replikasyonu ve transkripsiyonu bloke ederek tümör hücresinin ölümü gerçekleşir (Liang vd 2016).

2.8.1. Doksorubisine bağlı kardiyotoksisite mekanizması

Kardiyotoksisitenin en yaygın olarak kabul edilen tanımı, sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunda (LVEF) başlangıca göre %10 veya daha fazla azalma veya başlangıca kıyasla LVEF' nin < %50' ye düşmesidir (Chung ve Youn 2016).

Doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin insidansı ve şiddeti doza bağlıdır. 550 mg/m² nin üzerindeki kümülatif dozlar alındıktan sonra insidans oranı %30' a kadar yükselmektedir. Bu riski engellemek için ömür boyu doz limitleri kullanılır. Bununla birlikte, hastaların %2-7' si yine de kardiyotoksisite geliştirecektir (Liang vd 2016). Genellikle kardiyotoksisitenin kümülatif dozla artışı kabul edilmektedir. Günümüzde kabul edilen güvenli kümülatif doksorubisin dozu < 450 mg/m² dir (Tian vd 2020).

Doksorubisin kardiyotoksisitesi akut olabilir, uygulama sırasında ve uygulamadan sonraki 2-3 gün içinde ortaya çıkabilir. Akut kardiyotoksisite insidansı yaklaşık %11' dir. Erken etkiler dışında, subakut kardiyotoksisite birkaç hafta ile birkaç ay arasında ortaya çıkabilir. Bu etkiler Ca²⁺ dinamiklerinde değişim, oksidatif stresin artması ve mitokondriyal enerjide değişim olarak görülebilir (Mitry ve Edwards 2016). Uzun süreli doksorubisin uygulanmasından sonra şiddetli, kümülatif ve doza bağlı kronik kardiyak toksisite meydana gelebilir. Kardiyotoksisite miyosit vakuolasyonu ve dejenerasyon, interstisyel ödem ve konjestif kalp yetmezliğine yol açan fibroplazi ile kronik, ilerleyici bir kardiyomyopatiye dönüşür (Umlauf ve Horky 2002).

Doksorubisin kaynaklı kardiyotoksistelerde birden fazla moleküler mekanizmanın rol aldığı görülmektedir. En yaygın olarak kabul edilen hipotez, kardiyak oksidatif stres sonucu reaktif oksijen türlerinin üretilmesidir (Chung ve Youn 2016). Ayrıca DOX kardiyotoksitesindeki metabolik akışların azalması oksidatif stres dışında çoğunlukla mitokondriyal kayıp ve mitokondriyal işlev bozukluğundan da kaynaklandığı öne sürülmektedir (Timm vd 2020).

Mitokondri ve çekirdekte DOX birikimi sonucunda ilacın toksisite etkileri görülür. Mitokondriyal solunum zincirindeki NADH ve sitokrom P450 sistemi ile nikotinamid adenozin dinükleotid fosfat (NADPH) arasında biyoaktivasyon gerçekleşir. NADPH, trifosfopiridin nükleotid oksidaz enzimi (Ma vd 2020), süperoksit anyon serbest radikalleri ve semikinon DOX (Ma vd 2020) oluşturmak için moleküler oksijen varlığında DOX' un indirgenmesi için bir elektron donörü görevi görür. Bu süreç DOX redoks döngüsü olarak bilinir. Bu döngü lipidlere ve proteinlere doğrudan zarar verebilen veya hidrojen peroksit dahil diğer ROS' lara dönüşebilen süperoksit anyon üretimini artırır (Wallace vd 2020).

DOX indirgendikten sonra doğrudan demir ile etkileşime girerek oksidatif stres oluşturabilir. DOX' un hidroksi ve keton grupları, Ferrik iyon (Fe^{+3}) ile etkileşerek bir kompleks oluşturur. Bu kompleks hücre zarı ile etkileşerek lipid peroksidasyonuna neden olur ve serbest radikaller oluşturur. DOX, mitokondride demir birikiminden sorumludur ve miyokardiyal hücrede apoptoz olayına neden olur (Adhikari vd 2021).

DOX, solunum zincirinin diğer kompleksleri ve oksidatif fosforilasyonda yer alan diğer proteinler ile etkileşim sonucunda artan ROS üretimi yoluyla mitokondriyal fonksiyonu bozabilir (Wallace vd 2020). DOX, hedef olarak kardiyolipine bağlandığı zaman, iç mitokondriyal zardaki protein işlevini ve dolayısıyla enerji üretimini bozar. DOX ve kardiyolipinin geri dönüşümsüz olarak bağlanması mitokondride DOX birikimine neden olur. Elektron taşınmasında önemli bir rolü olan kardiyolipin DOX ile oluşturduğu kompleks nedeniyle birkaç enzimin aktivitesini engeller ve elektron taşıma zincirinin değişmesine neden olur. Kardiyolipin, iç mitokondriyal membranın içerisinde bulunan fosfolipid bileşenidir ve solunum zincirinin aktivitesi için gereklidir. Kardiyolipin çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengindir ve peroksidatif hasara karşı hassastır (Timm ve Tyler 2020, Lamberti vd 2014).

DOX tedavi için uygulandığında, nöronal NO sentaz, indüklenebilir NO sentaz ve endotelial NO sentaz (eNOS) enzimlerinin aracılık ettiği artan nitrik oksit

sentezinden sorumludur. Nitrik oksit, hasarlı miyokard dokularında yüksek miktarlarda bulunur. Peroksinitritten lipid peroksidasyonu ile nitrik oksit, mitokondride nekroz ve apoptoza neden olan oksidatif stresin gelişmesinden sorumludur (Adhikari vd 2021). DOX tarafından meydana gelen hücre hasarından eNOS' a bağlı reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri birikimi ilişkilidir (Kong vd 2022).

Topoizomerazlar, tüm organizmada bulunan yüksek oranda muhafaza edilen proteinlerdir. Kardiyomiyosit çekirdeğinde mitokondrilerinde en az altı topoizomeraz izoformu bulunur. Topoizomeraz tip II' ler DNA yapısının burulma kaynaklı stresini azaltmak için sadece tek DNA zincir kırılmalarını indükleyerek topoizomeraz I' den farklıdır. Topoizomeraz II, çift sarmallı DNA kırıklarını oluşturarak en ölümcül DNA hasarına neden olur. Kalp topoizomeraz II proteinleri içerisinde iki izoform IIa ve IIb ve bir mitokondriyal IIb izoformu bulunur. DOX topoizomeraz II' nin ilerlemesini bloke etmek için DNA ile birleşen bir topoizomeraz inhibitörüdür. DOX, topoizomeraz IIa ve IIb ye eşit olarak bağlanır (Mitry ve Edwards 2016).

Kalsiyum homeostazının bozulması DOX' un başka bir toksik etkisidir. Doksorubusinol hücre zarında bulunan kalsiyum pompasını (SERCA) değiştirerek sarkoplazmik retikulum tarafından kalsiyum tutulmasına müdahale eder. Ayrıca sarkolemmadaki sodyum/potasyum pompası da kalsiyumun kardiyomiyosit sarkolemmasına geçişi için gereken sodyum gradyanını bozan doksorubisinolden etkilenir. DOX ile Ca/kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CAMKII) fosforilasyonu ve CaMKII' nin Ca²⁺ bağımlı aktivasyonu patolojik olarak Ca²⁺ artığını göstermiştir. CaMKII' nin fosforilasyonu, kardiyak ryanodin reseptörü 2 (RyR2) kümelerini açarak sarkoplazmik retikulümdan kontrolsüz bir kalsiyum akışına izin verebilir. Bu pompaların ve kanalların bozulması kalsiyum homeostazını değiştirir, sonuç olarak mitokondriyal disfonksiyon ve apoptoz ortaya çıkmaktadır (Mitry ve Edwards 2016, Kong vd 2022).

DOX ile indüklenen akut kardiyotoksistide rol oynayan apoptoz, otofaji, piroptoz ve ferroptoz dahil olmak üzere tanımlanmış birkaç hücre ölümü mekanizmaları vardır (Kong vd 2022). DOX ile otofaji arasındaki etkileşim çok önemlidir. DOX, otofaji reaksiyonlarının hem indüklenmesine hem de inhibisyonuna neden olur. Otofaji ile ilgili olan Bnip3 molekülü, mitokondriyi otofagozomlara ayırmak ve ayrıştırmak için dış mitokondriyal membrandaki LC3 ile etkileşime girmektedir. Bnip3 ekspresyonu, mitokondriyal geçirgenlik gözeneklerinin açılması, aşırı mitokondriyal parçalanmayı, mitofajiyi ve nekrozu indükleyerek yukarı regülasyonu DOX kaynaklı kardiyomiyopati ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Kitakata vd 2022).

2.9. Hipotez

Çalışmamızın hipotezleri şunlardır:

1-Doksozobisin ile oluşturulan sıçan miyokardit modelinde gerek Doksozobisin ve gerekse Ang-(1-7)' nin otofajik belirteçler ya da SERCA üzerine bir etkisi olabilir.

2-Doksozobisin sıçan miyokardit modelinde MasR ekspresyonlarını azaltabilir.

3-ACE2 ekspresyonları üzerinde Doksozobisin olumsuz etki sergileyebilir.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız, Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu 23.02.2021 tarih ve 03 sayılı toplantısında görüşülerek PAUHDEK-2021/14 no ile onay almıştır.

Projemizde Wistar Albino cinsi erkek sıçan deney hayvanları 8' li gruplar halinde pleksiglas kafeslere alınarak, $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ortam ısısında ve $60\pm 5\%$ nem oranında 12 saat karanlık/aydınlık olacak şekilde tutulmuşlardır. Tüm sıçanlara çalışma boyunca standart diyet ve su verildi. Tüm deneysel çalışma Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yürütülmüştür. RT-PCR ve ELISA okumaları için Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı' ndan destek alınmıştır.

3.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar:

In vivo kullanılan kimyasallar; Doxorubicin hydrochloride (BLD Pharma, USA. Cat# BD32885), Ang-(1-7) (AdooQ, USA. Cat# A14862) serum fizyolojik içinde çözündürülüp, allikotlanarak -20°C ' de saklandı.

In vitro kullanılan kimyasallar; Chloroform (Merck KGaA, Germany Cat# 102445), Isopropanol (Isolab, Germany Cat# 961.022), Ethanol (Carlo Erba, France Cat# CE414605), RNAase free water (Invitrogen, USA. Cat# 10977035), Trizol (MRC, USA. Cat# TR118), Phosphate buffer saline (PBS) : 1xPBS 1L: 8g NaCl (Sigma Aldrich Cat#, 0.2g KCl, 1.44g Na_2HPO_4 , 0.24g KH_2PO_4).

3.2 Çalışma Grupları

Çalışmamıza alınacak olan sıçanların vücut ağırlıkları ölçülmüş ve sıçanlar rastgele olarak kafeslerine yerleştirilmiştir. Ön çalışmaya dahil olan 6 sıçanda öncelikle miyokardit modeli Doksorubusin tek doz olarak (15mg/kg) ve 4mg/kg 4 hafta süre ile deneme yapılmıştır. Çalışma sonunda tek doz Doksorubusin ile çalışmaya devam edilmiştir.

Deney hayvanı grupları

Grup 1: Kontrol grubu (n=8): Bu gruptaki sıçanlara dekapitasyon gününe kadar 0.4ml/kg/gün tek doz serum fizyolojik intraperitoneal (i.p.) olarak verildi.

Grup 2: Doksorubusin grubu (n=8): Bu gruptaki sıçanlara çalışmanın 7. günü 15mg/kg tek doz Doksorubusin i.p. olarak verildikten sonra kalan günlerde serum fizyolojik i.p. olarak uygulandı.

Grup 3: Anjiyotensin- (1-7) grubu (n=8): Bu gruptaki sıçanlara çalışmanın son gününe kadar 1mg/kg Anjiyotensin-(1-7) i.p. olarak verildi.

Grup 4: Doksorubusin+ Anjiyotensin-(1-7) grubu (n=8): Bu gruptaki sıçanlara 1. günden itibaren Ang-(1-7) 1mg/kg başlandı. Çalışmanın 7. günü Doksorubusin 15mg/kg i.p. uygulandı. Daha sonra dekapitasyon gününe kadar Ang-(1-7) ile devam edildi.

3.3. Çalışma Protokolü



3.4. Deneş Hayvanı Miyokardit Modeli:

Deneş hayvanı miyokardit modelinde Doksorubisin ile indüklenen miyokardit modeli kullanıldı. Çalışma modelinde sıçanlara tek doz 15mg/kg' a Doksorubisin uygulandı (Resim 3.1). Miyokardit modeli oluşturulmasında farklı doz ve uygulama süreleri bulunmaktadır (Renu vd 2018, Podyacheva vd 2021). Tek doz 10mg/kg ve 15 mg/kg doksorubisinin benzer kardiyak disfonksiyon oluşturduğu ve bu dozun insanlardaki 550mg/m² kümülatif toksik doza karşılık geldiği bildirilmektedir (Abdelatty vd 2021, Todorova vd 2012).

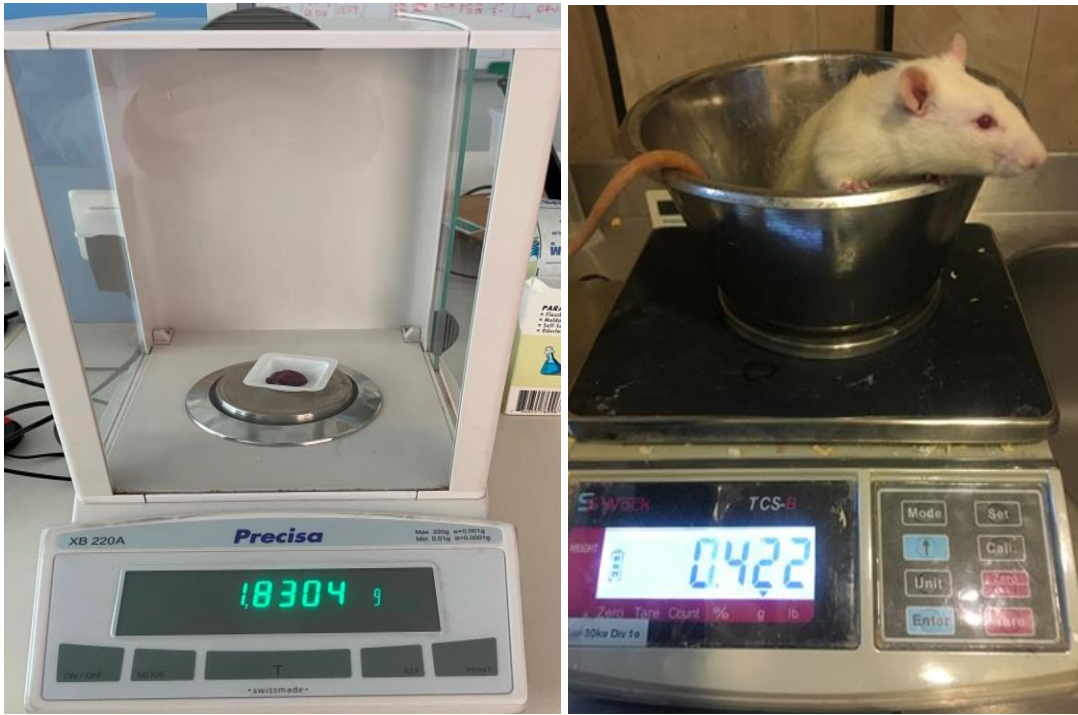


Resim 3.1 İntraperitoneal Ang-(1-7) ve Doksorubisin enjeksiyonu

3.5. Deneş Hayvanlarının İn Vivo Ölçümleri

3.5.1.Kilo ve kalp ağırlığı ölçümleri

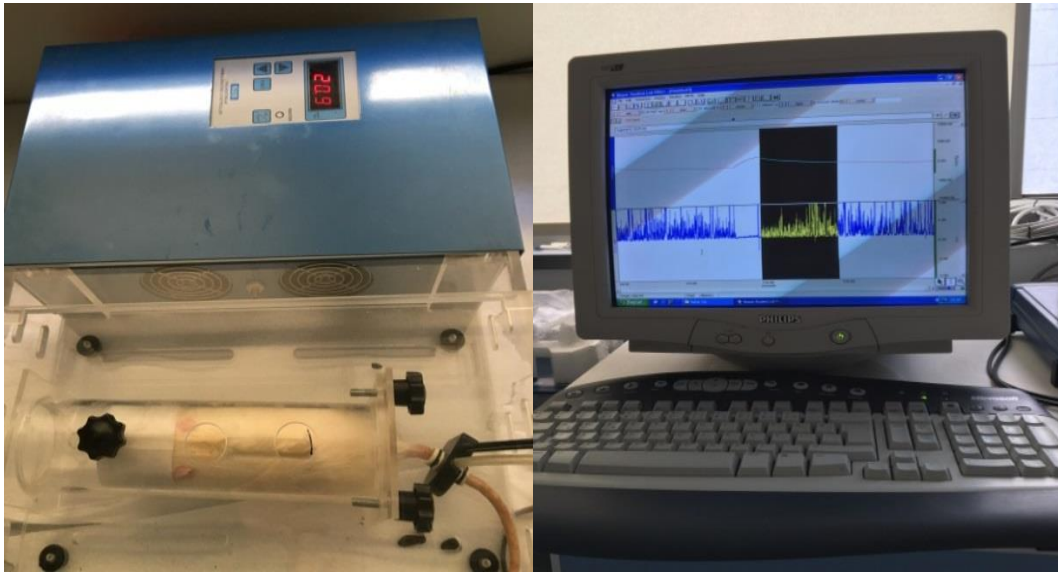
Çalışmamıza dahil olan tüm sıçanlar düzenli olarak hergün izlendi, vücut ağırlıkları deney protokolü içerisinde hergün ölçüldü. Dekapitasyon sonrası kalp ağırlıkları ölçümü analitik terazi (Denver Instrument, USA) ile yapıldı (Resim 3.2).



Resim 3.2 Sıçan kalp ağırlığı ve vücut ağırlığı ölçümü

3.5.2. Kuyruk kan basıncı ölçümü

Çalışma başında ve dekapitasyon öncesi her sıçanın kuyruk kan basınçları ölçüldü ve Bipoac Student Lab Software programında kaydedildi (Non invasive blood pressure measurement system- COMMAT, TR). Deney hayvanları kuyruk kan basıncı ölçümü öncesi kuyrukları açıkta kalacak şekilde restainera yerleştirilerek, 30 dakika boyunca cihazda 37°C sıcaklıkta ve sessiz bir alanda bekletildi. Tansiyon ölçümleri, manşon kuyruk distaline gelecek şekilde yerleştirilerek her sıçan için en az 3 ölçüm yapılarak kaydedildi (Resim 3.3).



Resim 3.3 Sıçan kuyruk kan basıncı ölçümü

3.6. Sakrifikasyon

Çalışma protokolü son günü derin anestezi altında pençe sıkıştırma ile anestezi derinliği ölçüldü. İntraperitoneal anestezi için 8 mg/kg ksilazin hidroklorid + 80 mg/kg ketamin hidroklorid uygulandı. Daha sonra sıçanlar sakrifiye edildi (Resim 3.4). Anterior torakotomi uygulandı. Sıçanların intrakardiyak kan örnekleri alındı. Sıçanlardan alınan kan örnekleri 10 dk bekletildikten sonra 5000 rpm' de 5 dk santrifüje (Nüve santrifüj, NF200, Türkiye) edildi. Deney hayvanlarının kalbi çıkartılarak, analitik terazide ölçüm yapıldı. Doku ve serum örnekleri moleküler analizler için -80°C' de derin dondurucuda saklandı.



Resim 3.4 Sakrifikasyon

3.7. Deney Hayvanlarının İn Vitro Ölçümleri

3.7.1. Doku homojenizasyonu

Sakrifikasyon sonrası -80°C derin dondurucuda bulunan kalplerden sol ventrikül diseksiyonu yapıldı. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) çalışmaları için sol ventrikül örnekleri ayırma işlemi yapıldı ve ağırlıkları tekrar ölçüldü.

RT-PCR çalışmaları için 100mg olarak tartılan sol ventrikül örneklerine 1mL TRI-Reagent (Bioshop Canada, Cat#TRI 118.200) eklendi. ELISA için hazırlanan yaklaşık 100mg ağırlığındaki örneklere 9 katı oranında PBS eklendi. Sol ventrikül örnekleri 2000-2100 rpm aralığında 2 vitesli ateşlemesiz motorlu mekanik karıştırıcıda (Heidolph RZR 2021, Germany) homojenize edildi. Homojenize örnekler 5dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra örnekler 1.5 mL' lik steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.

3.7.2. RNA izolasyonu

PikoReal RT-PCR sisteminde (Thermo Fisher Scientific, İngiltere) kullanılmak üzere sıçanların sol ventrikül doku örneklerinden RNA izolasyonu aşağıda belirtilen şekilde yapıldı:

- 1) Oda sıcaklığında bulunan doku homojenatlarına faz ayrımını gerçekleştirmek üzere TRI-Reagent ilave edildi.
- 2) Ventrikül dokusu homojenatına 200 µl kloroform (102445, Merc) eklenmesi ardından 15 dakika 14.000g 4°C de santrifüje (Hettich Universal 320R, Almanya) edildi.
- 3) RNA içeren supernatan kısım ayrı bir ependorfa alındı ve 1:1 ölçüde izopropanol (961.022 IsoLab, Almanya) eklendi.
- 4) Daha sonra 10 dakika 14.000g 4°C santrifüj edildikten sonra supernatan kısım atıldı.
- 5) RNA peleti 1ml 70% etanolde vorteks ile karıştırma yapıldı.
- 6) Sonrasında 10 dakika 10.000g 4°C de santrifüje edilerek yıkandı.
- 7) Supernatan kısım pipet ile çekilip atılarak ve 10 dakika havada kurutma yapıldı.
- 8) 35 µl Nuclease free water (İnvitrogen, Cat#10977035) eklenerek 60 °C' de 15 dakika inkübe edildi.
- 9) RNA örnekleri kullanılana kadar -80 °C' de saklandı.

Sıçanların sol ventrikül RNA örneklerindeki LC3II, LCI B, Beclin 1, Atg5, Atg7, SERCA 2a, MasR, AT1R, eNOS mRNA ekspresyon düzeyleri PikoReal RT-PCR analizi ile belirlendi. Referans gen olarak GAPDH kullanıldı.

3.7.3. RNA konsantrasyonu ve saflığının belirlenmesi

RNA örneklerinin konsantrasyonu NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA) spektrofotometre cihazına 1 µl yüklenerek değerlendirildi. NanoDrop verilerinden elde edilen RNA miktarlarından (ng/µl) 1µg RNA içeren hacim (µl) hesaplandı. RNA saflığı

260/280 nm' deki absorbands değer ölçümü ile kontrol edildi. Saflık oranları 1.6 üzerinde olan absorbands değerleri dikkate alındı.

3.7.4. cDNA sentezi

Örneklerden 1 µg toplam RNA alındı ve OneScript Plus cDNA Sentez Kiti (G236, Canada) ile üreticinin belirttiği yöntemde komplementer DNA (cDNA) sentezi 20 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirildi.

cDNA sentezi için gerekli olan komponent ve miktarları aşağıdaki tablo 3.1' de belirtildi. Kontrol için ters transkriptaz içermeyen örnekler de hazırlandı.

Tablo 3.1 cDNA sentezi için gerekli bileşenler ve miktarları

Komponent	Hacim
5X RT Buffer	4 µl
dNTP	1 µl
Primerler	1 µl
Toplam RNA	1 µg
OneScript Plus RTase	1 µl
Nuclease-free H ₂ O	20 µl tamamlandı

3.7.5. RT-PCR reaksiyonları

Gerçek zamanlı polimeraz zinciri reaksiyonu (RT-PCR) analizi için hazırlanan reaksiyonlarda primer dizilimleri hedef genler olan LC3 II, LCI B, Beclin 1, Atg5, Atg7, Serca 2a, MasR, AT1R, eNOS ve referans gen GAPDH mRNA ekspresyonları ölçümünde kullanıldı. Aşağıdaki tablo 3.2' de kullanılan primer dizilimleri gösterildi.

Tablo 3.2 RT-PCR reaksiyonunda kullanılan primerler

Gen	Forward Primer Dizisi	Reverse Primer Dizisi	Referans
LC3II	TTTGTAAGGGCGGTTCTG	GAAGTGGCTGTATGTCTGTC	Huang vd 2013
LC1B	CCGCCTCCACCATATCACCAC	CTGCTGTTGCCTCTCCCTCTG	Kitamura vd 2007
Beclin 1	ACCGAACTTGTTCCCTATG	CCTCCAGTGTCTTCAATC	Huang vd 2013
Atg5	AGTGGAGGCAACAGAACC	GACACGAACTGGCACAT	Jiang vd 2015
Atg7	ACAGCCCTGCCATACTTCTT	AGGGTGCTGGGTTAGGTTAC	Chi vd 2022
SERCA 2a	TCTGACTTTTCGTTGGCTGTG	GCCTTTGTTATCCCCAGTGA	Wang vd 2014
MasR	CTTTGTGGAGAACGGGAT	GGAGATGTCAGCAATGGA	Costa-Besada vd 2018
AT1R	CACACAACCCTCCCAGAAAG	TTGGGGCAGTCATCTTGG	Klimas vd 2015
Enos	GGCAACATGAGAGCTGCATA	GCAAGTGCAACCAGCAAGA	Han vd 2014
GAPDH	GTCGGTGTGAACGGATTTG	TCCCATTCTCAGCCTTGAC	Huang vd 2013

Hedef ve referans genlerin primerleri (Oligomer, Türkiye) 100 μ M konsantrasyonda dilüe edildi. 5 μ l BlasTaq™ 2X qPCR Mastermix (Abm, Kanada Cat# G891, G892), primerler, şablon DNA ve nükleaz içermeyen su (20 μ l' ye tamamlayacak hacimde) karıştırıldı. Hazırlanan karışımın bileşenleri ve hacimleri aşağıdaki tablo 3.3 de gösterilmiştir.

Tablo 3.3 qPCR reaksiyonunun bileşenleri ve hacimleri

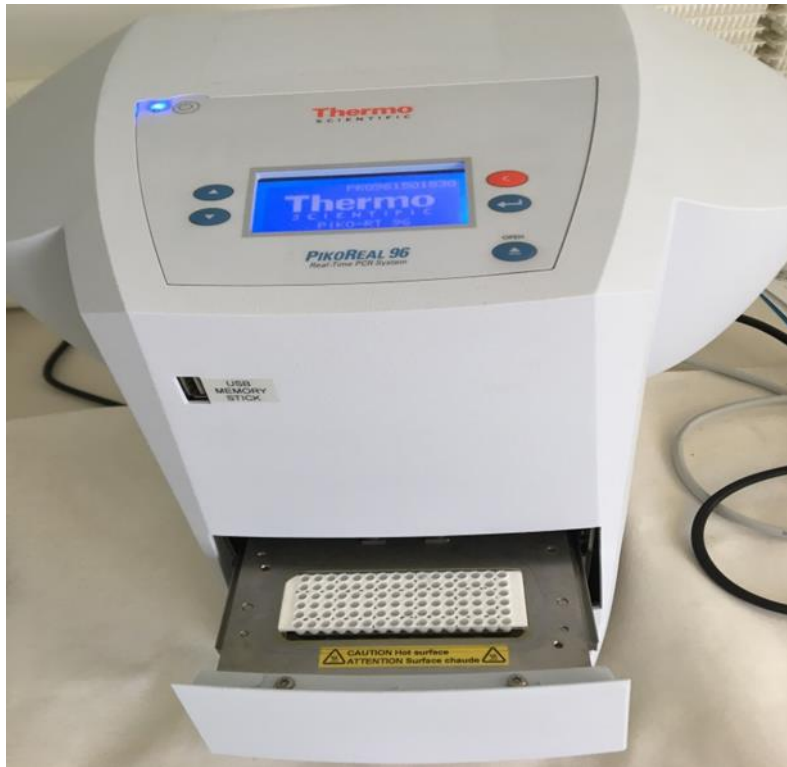
Komponent	Hacim
SYBR Green I	5 μ l
Forward Primer	0.5 μ l
Reverse Primer	0.5 μ l
Template DNA	1 μ g
Nuclease-free H ₂ O	20 μ l tamamlandı

Hazırlanan karışım üçerli tekrarda pikoplate içerisine yüklendi ve ardından cDNA örnekleri yaklaşık 50 ng/ μ l (1 μ l cDNA) kuyucuklara eklenerek toplamda 10 μ l

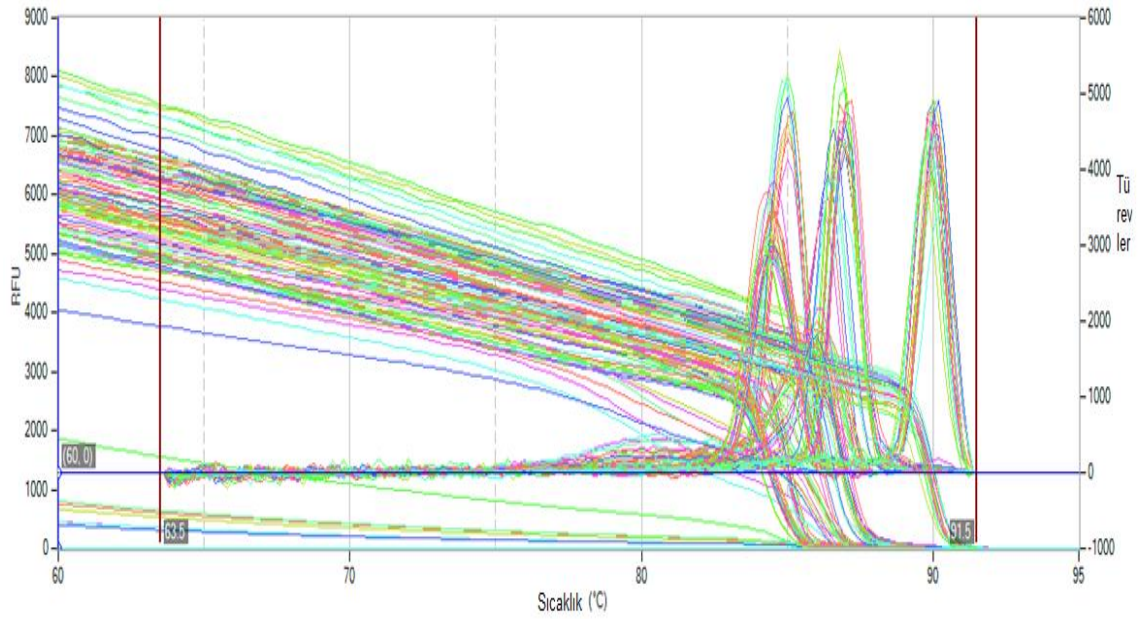
hacimde reaksiyon hazırlandı. Pikoplate, sealing film ile kapatıldı. Analizler PikoReal 96 RT-PCR sisteminde (Thermo Fisher Scientific, İngiltere) gerçekleştirildi (Resim 3.5).

Tablo 3.4 Primerler için kullanılan qRT – PCR programı

İşlem basamağı	Sıcaklık	Süre		Döngü
		Standart	Hızlı	
Enzim Aktivasyonu	95 °C	3 dk	3 dk	1
Denatürasyon	95 °C	15 sn	1 sn	
Yapışma/Uzama	60 °C	1 dk	10 sn	40
Erime Eğrisi	Kullanılan cihazın talimatları uygulandı			



Resim 3.5 RT-PCR cihazı ve reaksiyon için hazırlanan pikoplate



Şekil 3.1 RT-PCR gen ekspresyon grafiği.

3.7.6. mRNA ekspresyon düzeylerinin analizi

RT-PCR reaksiyonları sonrasında gen ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak belirlendi (Schmittgen ve Livak 2008). C_t değerleri, RT-PCR döngüsünde ilk kez çoğaltma ürünün saptandığı eşik değeri döngüsü ve ilişkili gen ekspresyonu yani hedef/kontrol oranı olarak tanımlanır. Her numunenin erime eğrisine bakılarak uygun C_t değerleri kullanıldı. Hedef gen ve referans gen arasındaki fark olan ΔC_t her bir numune için hesaplandı (ΔC_t numune = C_t hedef gen - C_t referans gen).

Kontrol grubunun ΔC_t ortalaması alınarak Ang-(1-7), DOX ve Ang-(1-7) + DOX uygulanan gruplardan alınan numunelerin ΔC_t değerleri ile arasındaki fark olan $\Delta\Delta C_t$ hesaplandı. Ekspresyon oranını ifade eden $2^{-\Delta\Delta C_t}$ her numune için hesaplandı. Her grubun $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerlerinin ortalaması hesaplanarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

3.8. Elisa Yöntemi

3.8.1. Ang-(1-7) ölçümü

Çalışmada serum ve kalp örneklerinde Rat Angiotensin 1-7 Elisa kit (Ang-(1-7)) (Bioassay Technology Laboratory, China. Cat# E1171Ra) ve Rat Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) (Bioassay Technology Laboratory, China Cat#E0968Ra) iki ayrı kit kullanıldı (Resim 3.8). Ölçümler kit protokolü çerçevesinde gerçekleştirildi. Kit protokolü çerçevesinde kısaca aşağıdaki uygulamalar gerçekleştirildi.

- Tüm reaktifler kullanımdan önce oda sıcaklığına getirildi ve analiz işlemleri oda sıcaklığında uygulandı.
- Ang-(1-7) için kit içindeki 2400ng/L' lik standarttan, standart dilüsyonu kullanılarak sırasıyla 1200, 600, 300, 150, 75 ng/L' lik standart konsantrasyonları hazırlandı.
- 96' lık kuyucuklu pleytlere önce standartlar duplike olarak 50µL eklendi. Standart çözelti içerisinde biotinylated antikor olduğu için ayrıca biotinylated antikor eklenmedi.
- Gerek sol ventrikül doku gerekse serum örnekleri her kuyucuğa 40 µL olacak şekilde duplike ya da triplike eklendi. Sonra üzerlerine 10 µL Rat anti- Ang(1-7) antikorunu ilave edildi. 50 µL streptavidin-HRP standart ve örneklerin bulunduğu kuyucuklara eklendi. Ancak boş (blank) kuyucuğa eklenmedi. Pleyt kapatıcı ile kapatıldıktan sonra 37°C' de 60 dk inkübe edildi.
- Daha sonra kit yıkama tamponu ile kuyucuklar 5 kez yıkandı. Her yıkamada tampon 30sn-1dk arası bekletildi.
- Yıkama tamponu dökülerek 50 µL substrat solüsyonu önce A daha sonra B eklendi. Kapatıcı ile kapatılan pleyt karanlık ortamda 37°C' de 10 dk inkübe edildi.
- Süre sonunda 50 µL stop solüsyonu her kuyucuğa eklenir eklenmez, pleyt 10 dk içerisinde 450nm dalga boyunda mikropleyt okuyucuda (Thermo Scientific Multiskan Go, USA) optik yoğunlukları ölçüldü.

Okuma işlemi bitiminde SkanIt Software 4.1 for Microplate Readers RE, ver. 4.1.0.43 programı kullanılarak tüm kuyucuklardaki absorbans değerleri 0 ng/L' deki

absorbans değerlerinden çıkarılarak normalizasyon yapıldı. Standartların absorbans değerlerinden 4-parametrik lojistik eğri (4-PL) izilerek örneklerimizin konsantrasyonları hesaplandı.



Resim 3.6 Sıçan Ang 1-7 Elisa kit

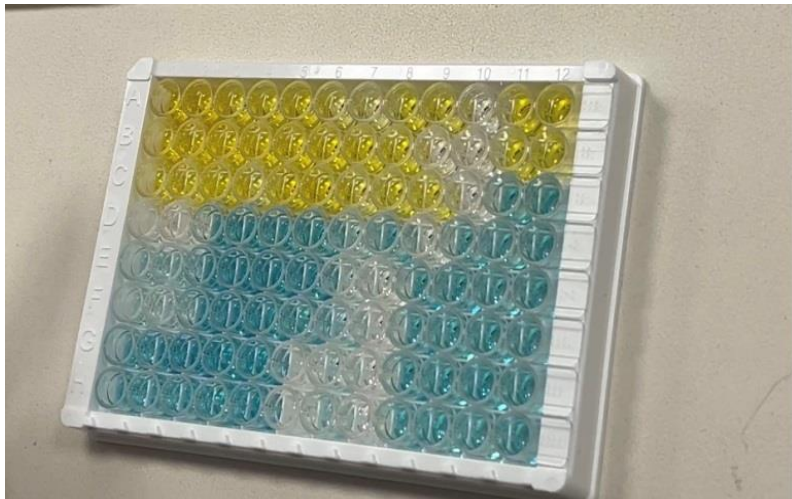
3.8.2. ACE2 lümü

İşlem basamakları aynı olmakla birlikte kısaca üretici firmanın protokolü kapsamında aşağıdaki uygulamalar gerçekleştirildi.

- Tüm reaktifler kullanımdan önce oda sıcaklığına getirildi ve analiz işlemleri oda sıcaklığında uygulandı.
- ACE2 kitinde 128ng/mL' lik standarttan, standart dilüsyonu kullanılarak sırasıyla 64, 32, 16, 8, 4 ng/mL'lik standart konsantrasyonları hazırlandı.
- Standartlar 50 μ L olarak pleytlere eklendi. Standart zelti içersinde biotinylated antikor olduğu için ayrıca biotinylated antikor eklenmedi.

- Hem sol ventrikül doku hem de serum örnekleri her kuyucuğa 40 µL olacak şekilde duplike ya da triplike eklendi. Üzerlerine 10 µL Rat anti - ACE2 antikoru kuyucuklara eklendi. 50 µL streptavidin-HRP standart ve örneklerin bulunduğu kuyucuklara eklendi. Ancak boş (blank) kuyucuğa eklenmedi. Pleyt kapatıcı ile kapatıldıktan sonra 37°C' de 60 dk inkübe edildi.
- Daha sonra kit yıkama tamponu ile kuyucuklar 5 kez yıkandı. Her yıkamada tampon 30sn- 1dk arası bekletildi.
- Yıkama tamponu dökülerek 50 µL substrat solüsyonu önce A daha sonra B eklendi. Kapatıcı ile kapatılan pleyt karanlık ortamda 37°C' de 10 dk inkübe edildi.
- Süre sonunda 50 µL stop solüsyonu her kuyucuğa eklenir eklenmez, pleyt 10 dk içerisinde 450nm dalga boyunda mikropleyt okuyucuda (Thermo Scientific Multiskan Go, USA) optik yoğunlukları ölçüldü (Resim 3.7).

Okuma işlemi bitiminde SkanIt Software 4.1 for Microplate Readers RE, ver. 4.1.0.43 programı kullanılarak tüm kuyucuklardaki absorbans değerleri 0 ng/L' deki absorbans değerlerinden çıkartılarak normalizasyon yapıldı. Standartların absorbans değerlerinden 4-parametrik lojistik eğri (4-PL) çizilerek örneklerimizin konsantrasyonları hesaplandı.



Şekil 3.7 Elisa kit pleyt örneği

3.9. İstatiksel Analiz

Çalışmada elde edilen verilerin istatiksel analizi için SPSS 25.0 (IBM SPSS Statistics 25 Software) yazılımı kullanıldı. Her grubun verileri ortalama±standard sapma olarak tabloda ifade edilerek grafik olarak gösterildi. Parametrik test varsayımları sağlandığından bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) kullanıldı. İstatiksel analiz sonucu $p < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

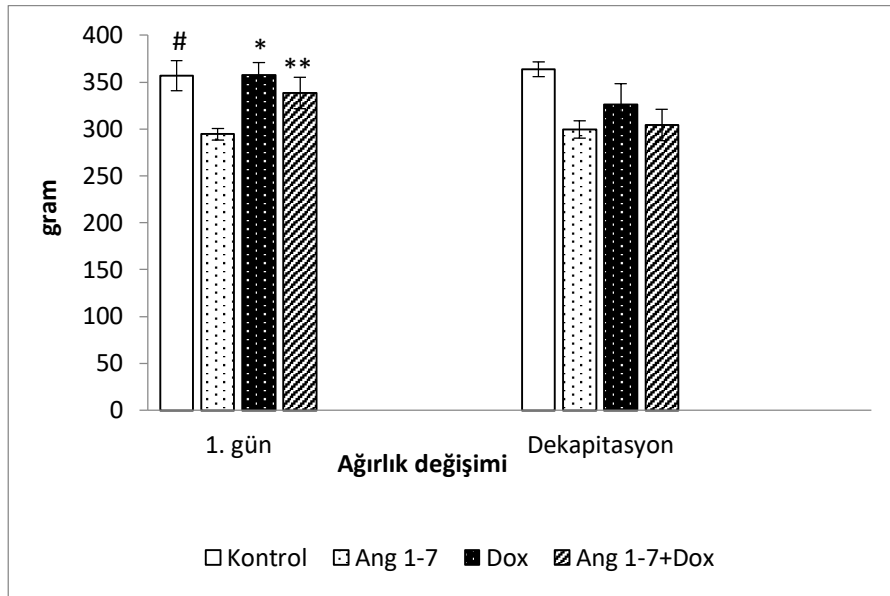
4. BULGULAR

4.1. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlığı

Her gruptaki sıçanların deneyin başlangıç günü ve deneyin son günü vücut ağırlıkları ölçüldü. Kontrol grubunda sıçan vücut ağırlıkları + %1.96 oranında artış ve Ang-(1-7) verilen gruptaki sıçan vücut ağırlığı + %1.69 artış görüldü. Dox grubundaki sıçanların vücut ağırlığı - %8.90 oranında azalma görüldü. Ang-(1-7) ve Dox verilen grupta ise vücut ağırlığında -%9.99 oranında azalma meydana geldi. Deney hayvanlarına ait vücut ağırlığı verileri tablo 4.1' de gösterilmiştir.

Tablo 4.1 Deney hayvanlarının vücut ağırlığı ortalamaları ölçümü

	1. gün	Dekapitasyon	Başlangıca göre % Değişim
Kontrol	356,8 ± 35,8	363,8 ±39,1	+ 1,96
Ang-(1-7)	294,4 ± 28,3	299,4 ± 20,5	+ 1,69
Dox	357,8 ± 28,7	326,2 ±49,3	- 8,90
Ang-(1-7)+Dox	338,4 ± 37,1	304,6 ±37,4	- 9,99

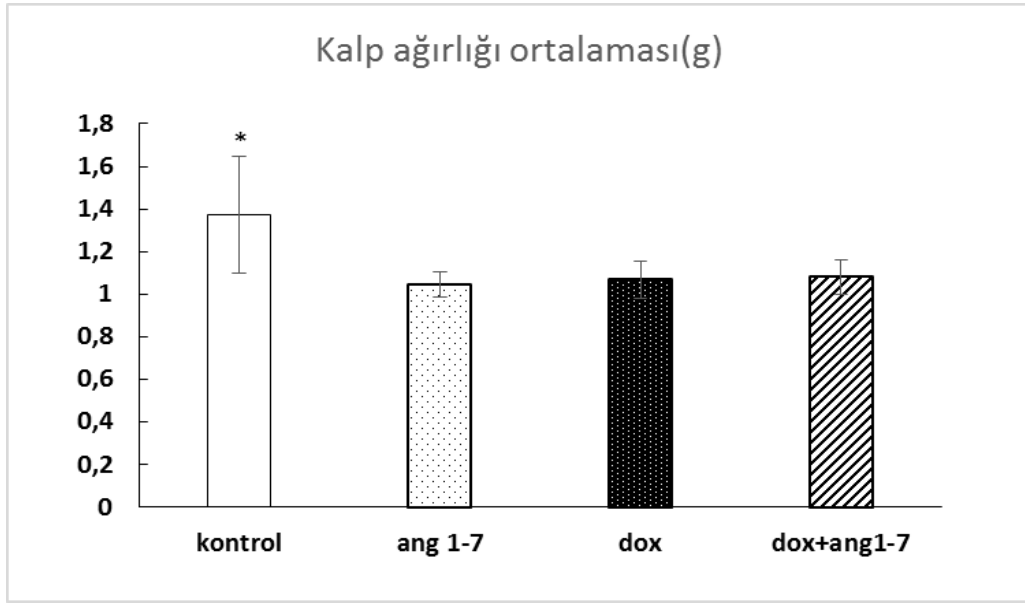


Şekil 4.1 Deney hayvanlarında vücut ağırlığı değişimi. # $p<0.007$, * $p<0.05$, ** $p<0.0002$.

Kontrol grubu ve tek başına Ang-(1-7) alan sıçanlarda dekapitasyon günündeki kilo değerleri 1. gün ile karşılaştırıldığında her iki grupta kilo artışı olduğu saptandı (sırasıyla % 1.96 ve %1.69). Kontrol grubunda bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.007$). Gerek Dox ve gerekse Dox+ Ang-(1-7) alan gruplarda 1. güne göre karşılaştırıldığında her iki grupta ağırlıkların azaldığı saptandı. Dox grubunda $p<0.05$ ve Dox+ Ang-(1-7) grubunda $p<0.0002$ istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde 1. güne göre kilo kaybı olduğu görüldü. Bu kayıp Dox+ Ang-(1-7) grubunda en fazlaydı.

4.2. Deney Hayvanlarının Kalp Ağırlığı

Sıçanlar sakrifiye edildikten sonra kalp ağırlıkları ölçüldü. Kontrol grubu kalp ağırlık ortalaması $1,372\pm0,35$ gr iken bu değerler Ang-(1-7), Dox, Dox+ Ang-(1-7) gruplarında sırası ile $1,046\pm0,181$, $1,068\pm0,12$ – ve $1,079\pm0,19$ olarak bulundu.

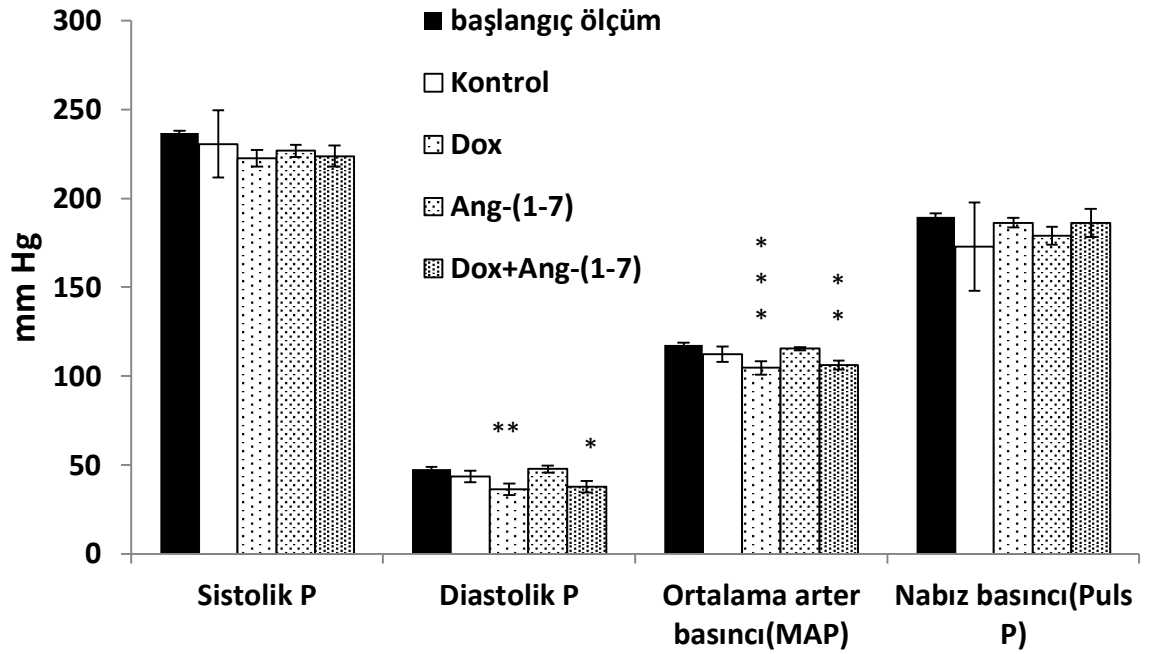


Şekil 4.2 Sıçan kalp ağırlığı ortalaması. * $P < 0.05$ kontrol vs Ang-(1-7), Dox, Ang-(1-7) + Dox.

Dekapitasyon gününde ölçülen kalp ağırlıkları gruplar arası karşılaştırıldığında kontrol grubu kalp ağırlığı Ang-(1-7), Dox, Dox+Ang-(1-7) gruplarına göre anlamlı olarak farklıydı.

4.3. Kuyruk kan basıncı ölçümleri

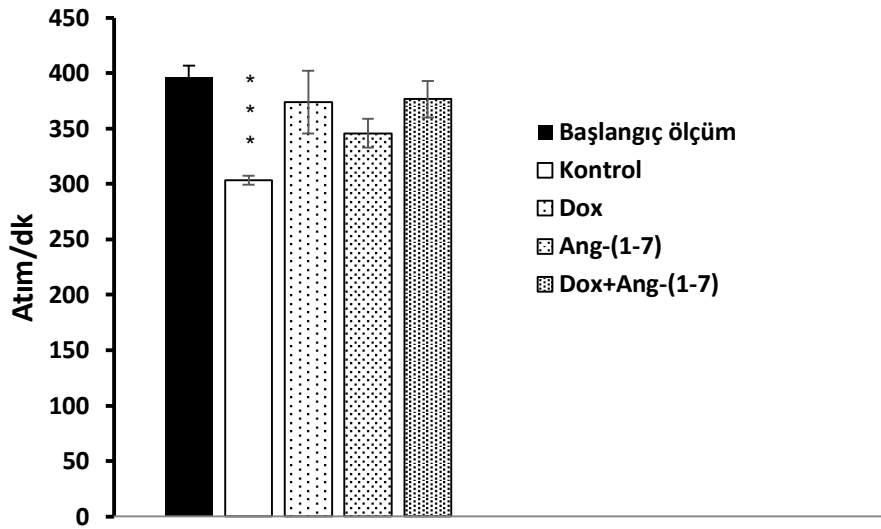
Deney hayvanlarının başlangıç ölçüm değeri alınarak daha sonra gruplara rastgele olarak ayrıldı. Kuyruk kan basıncı ve nabız atımı değerleri istatistiksel olarak tek yönlü ANOVA analizi ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.3 Deney hayvanlarının kuyruk kan basıncı ölçümü. *p<0.03, **p<0.01, ***p<0.001.

Diyastolik kan basıncı Dox grubu ve Dox + Ang-(1-7) grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde başlangıç ölçüm değerine göre azaldı (sırasıyla p<0.01 ve p<0.03). Ortalama arter basıncı benzer şekilde Dox grubu ve Dox + Ang-(1-7) grubunda anlamlı olarak azalma gözlemlendi (sırasıyla p<0.001 ve p<0.01).

Deney hayvanlarında Ang-(1-7) grubunda kan basıncı için istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi.



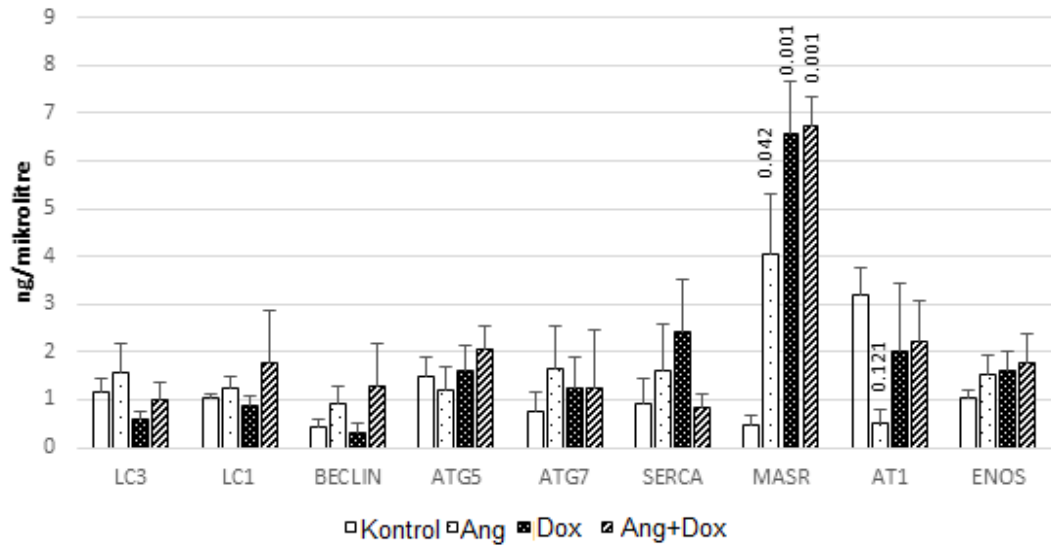
Şekil 4.4 Sıçan gruplarında kalp atım hızı grafiği. *** $p < 0.01$.

Deney hayvanlarında sadece kontrol grubunda kalp atım hızı başlangıç ölçüm değerine göre anlamlı şekilde azaldı ($p < 0.01$).

Ang-(1-7) grubunda kalp atım hızında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik saptanmadı.

4.4. Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları

Gerçek zamanlı RT-PCR analizi ile sıçanların sol ventrikül dokularındaki LC3 II, LCI B, Beclin 1, Atg5, Atg7, Serca 2a, MasR, AT1R, eNOS genlerin mRNA ekspresyonları şekil 4.5' de gösterilmiştir.

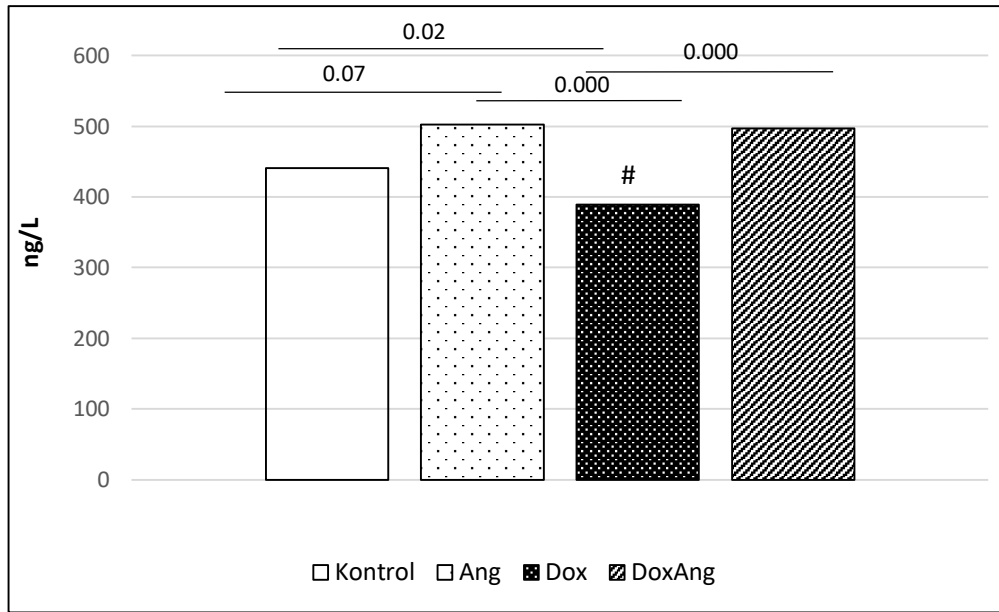


Şekil 4.5 RT-PCR ile hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri

Gerçek zamanlı RT-PCR çalışmalarında LC3, LC1, Beclin 1, Atg5, Atg7 seviyeleri açısından gruplar arasında fark bulunmadı. SERCA ekspresyonu Doksorubusin grubunda artmış olmakla birlikte istatistiksel olarak bir fark bulunmadı. eNOS ekspresyonu Ang-(1-7) ve Doksorubusin alan gruplarda artmış olmakla birlikte kontrole göre anlamlı bulunmadı. MasR ekspresyonu Ang-(1-7) ve Doksorubusin alan gruplarda kontrole göre oldukça anlamlı şekilde ($p < 0.01$) artmıştır. Bu artış Doksorubusin ve Ang-(1-7)+ Doksorubusin alan gruplarda diğer gruplara göre anlamlı olarak daha fazlaydı. AT1 ekspresyonu Ang-(1-7) alan grupta kontrole göre anlamlı şekilde ($p < 0.01$) azalmıştır.

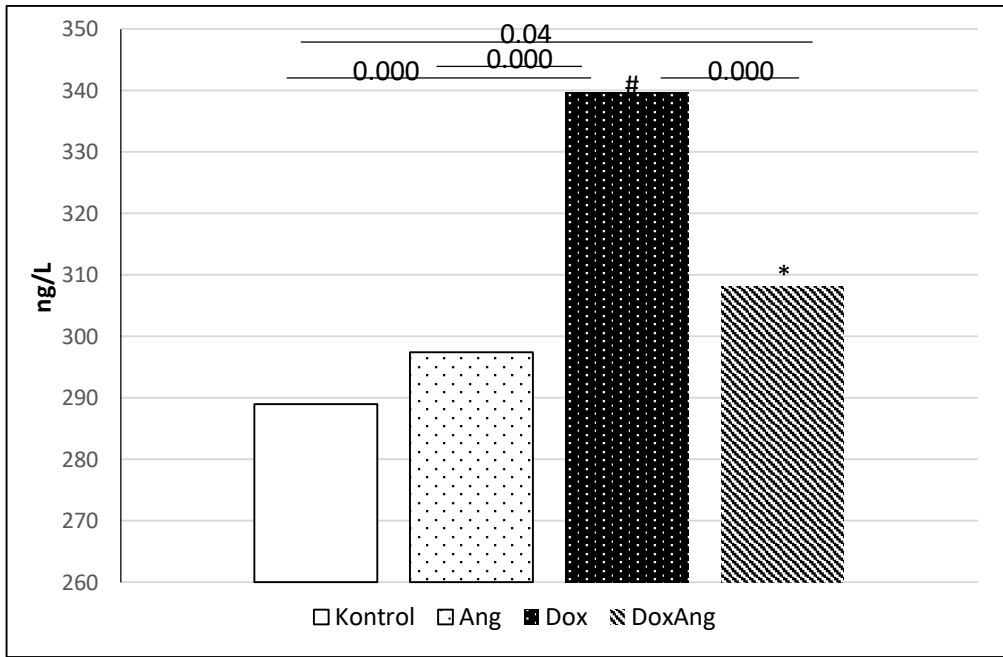
4.5. Elisa Kitleri İle Anjiyotensin-(1-7) Ve Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2 Ekspresyon Ölçümleri

4.5.1. ANG-(1-7) ekspresyon ölçümü



Şekil 4.6 Kalp dokusunda Ang-(1-7) ölçümü. # $p < 0.02$ Dox vs kontrol, Ang-(1-7), Dox+ Ang-(1-7)

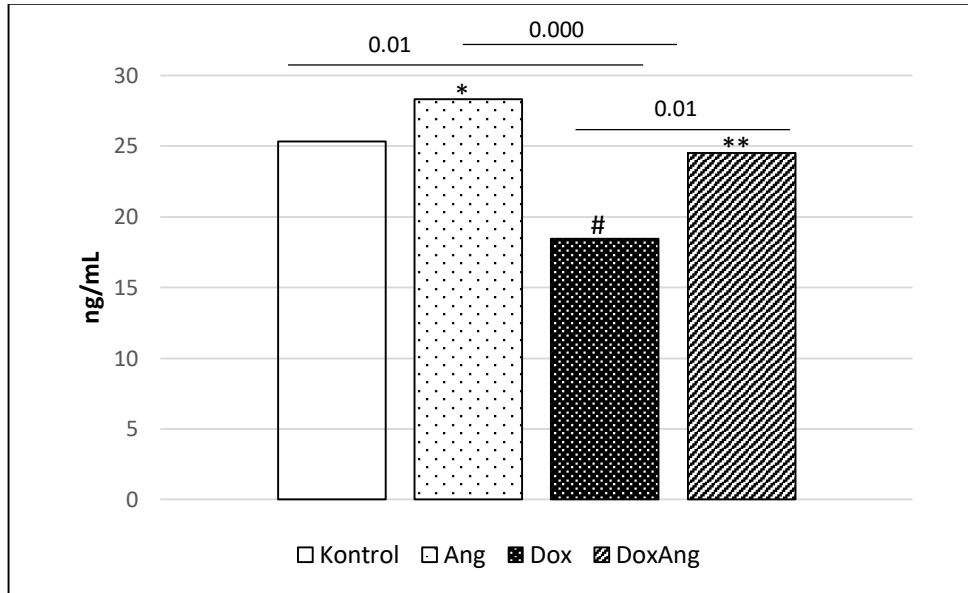
Deney hayvanlarının kalp dokusunda ELISA yöntemi ile ölçülen Ang-(1-7) seviyeleri görülmektedir. Kalp dokusunda Ang-(1-7) ekspresyon seviyeleri Ang-(1-7) alan grupta artmış olmasına rağmen kontrole göre anlamlı değildir. Yalnızca Doksorubusin alan sıçanlarda Ang-(1-7) seviyeleri kontrol, Ang-(1-7) ve Dox+ Ang-(1-7) grubuna göre oldukça anlamlı şekilde azalmıştır.



Şekil 4.7 Serumda Ang-(1-7) ölçümü. # $p < 0.000$ Dox vs kontrol, Ang-(1-7), Dox+ Ang-(1-7), * $p < 0.04$ kontrol vs Dox+ Ang-(1-7).

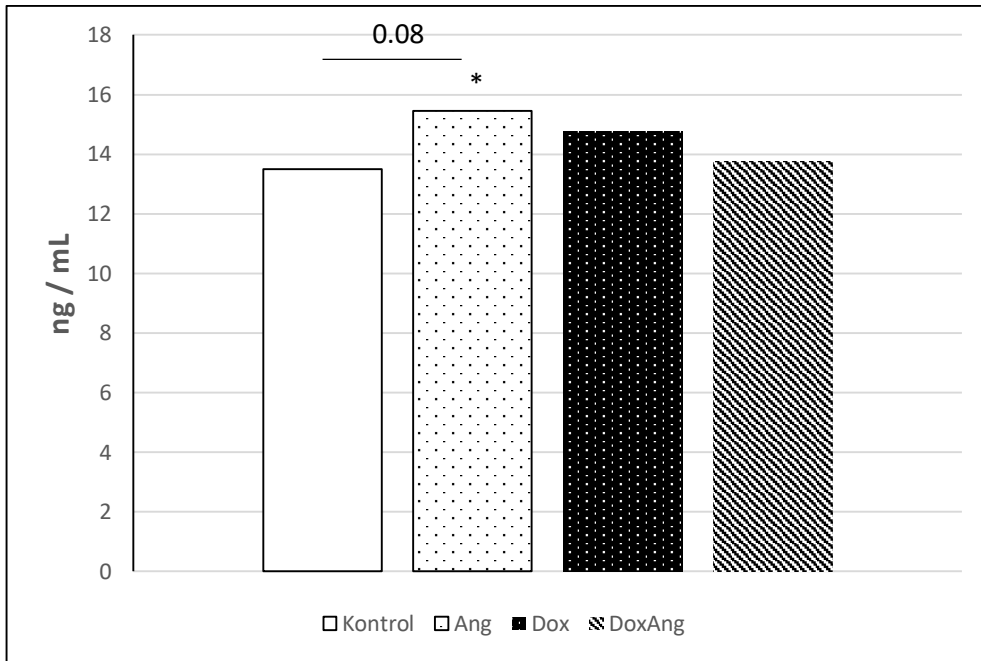
Deney hayvanlarının serumunda ELISA yöntemi ile ölçülen Ang-(1-7) seviyeleri görülmektedir. Kontrol ve Ang-(1-7) alan sıçanlarda serum Ang-(1-7) seviyeleri açısından fark bulunmamıştır. Ancak Doksorubusin verilen sıçanlarda diğer 3 grup ile karşılaştırıldığında serumda Ang-(1-7) seviyeleri anlamlı şekilde artmıştır. Doksorubusin ve Ang-(1-7) verilen grupta serum Ang-(1-7) seviyeleri tek başına Doksorubusin verilen gruba göre anlamlı olarak azalmıştır.

4.5.2. ACE2 ekspresyon ölçümü



Şekil 4.8 Sıçan kalp dokusunda ACE2 seviyeleri. # $p < 0.01$ Dox vs kontrol, Ang-(1-7), Dox+ Ang-(1-7), * $p < 0.000$ Ang-(1-7) vs Dox, ** $p < 0.01$ Dox+ Ang-(1-7) vs Dox.

Deney hayvanlarının kalp dokularında ELISA yöntemi ile ölçülen ACE2 seviyeleri ng/mL değerinden verilmiştir. ACE2 seviyelerinin Doksorubusin verilen sıçanlarda diğer 3 gruba göre anlamlı olarak azaldığı görülmektedir ($p < 0.01$). Bu anlamlılık en fazla tek başına Ang-(1-7) alan grup ile tek başına Doksorubusin alan grup arasındadır ($p < 0.000$). Kontrol ve tek başına Ang-(1-7) alan grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Doksorubusin+Ang-(1-7) alan grupta ACE2 seviyeleri tek başına Doksorubusin grubu ile kıyaslandığında artmış bulunmuştur ve anlamlıdır.



Şekil 4.9 Sıçan serumunda ACE2 ekspresyonları. * $p < 0.08$ Ang-(1-7) vs kontrol.

Deney hayvanlarının serumunda ACE2 seviyeleri ng/mL değerinden verilmiştir. ELISA sonuçlarına göre serum ACE2 seviyeleri açısından yalnızca Ang-(1-7) alan grup kontrole göre anlamlı olarak artmıştır. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır.

5.TARTIŞMA

Miyokardit, her yaşta insanı etkileyebilen, değişken klinik prezentasyon ve progresyon gösteren miyokardın inflamatuvar bir durumudur. Etiyolojisi bir enfeksiyona sekonder olarak ortaya çıkabilen, immün sistem kaynaklı, toksik maddelere maruz kalma, ilaç reaksiyonları gibi çeşitli nedenler içermektedir. Çeşitli değişken faktörler nedeniyle miyokarditin insidansı kesin olarak bilinmemektedir. Miyokarditin tahmin edilemeyen ilerleyişini daha iyi anlamak için altta yatan patofizyolojik sürecin ele alınması gerekmektedir (Blauwet ve Cooper 2010, Dennert vd 2008, Leone vd 2019).

Doksorubisin ile indüklenen sıçan miyokardit modeli deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Tek doz olarak intraperitoneal yolla verilen Doksorubisin akut ve kronik kardiyotoksik etkiler ortaya çıkarmaktadır. Klinik kullanımda antikanser ilaç olarak gerek çocuk gerekse erişkin kanserlerinde kullanılan bu ilaç kalpte aritmilere, kardiyomiyopatiye, sol ventriküler disfonksiyonuna ve konjestif kalp yetmezliğine yol açabilmektedir (Renu vd 2018). Sıçanlara 20 mg/kg dozlarında uygulanan DOX, doksorubisinin kalp dokusundaki yan etkilerini incelemek için uygun bir modeldir. Sıçanlarda bu doz, 70 kg' lık bir insanda 250 mg' a eşdeğerdır (Carvalho vd 2016). Stewart ve ark. (2019) tek doz olarak 15 mg/kg DOX intraperitoneal yolla uygulayarak doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisiteyi sıçanlarda araştırmışlardır. Literatürde 2-20 mg/kg arası değişen doz miktarları vücut ağırlığına göre tek enjeksiyonlu akut uygulama veya farklı süreler boyunca DOX uygulanarak çalışmalar yapılmıştır (Hayward ve Hydock 2007, Zhang vd 2019, Zhou vd 2022).

Doksorubisin, antineoplastik ajan olarak kullanılan bir antrasiklin antibiyotiktir. Yüksek antitümör etkinliği nedeniyle hematolojik ve katı malignitelerin tedavisinde

kullanılmaktadır. Ancak kanser hücrelerine etkili olma yeteneğine karşılık geri dönüşü olmayan kardiyotoksisite nedeniyle kullanımı sınırlıdır. Çok sayıda çalışma doksorubisin kaynaklı kardiyomiyopatilerin moleküler mekanizmalarını araştırmaktadır. DOX serbest radikaller oluşumu, oksidatif stres, inflamasyon, apoptoz, hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonlarının yükselmesini içeren kardiyotoksisite yanında çoklu organ toksisitesine de neden olmaktadır (Li vd 2016, Jacevic vd 2018, Park vd 2008).

Renin-anjiyotensin sistemi, diğer işlevlerinin yanısıra kan basıncını, elektrolit dengesini ve kardiyak yeniden şekillenmeyi kontrol eden, kardiyovasküler ve renal fizyolojinin önemli bir düzenleyicisidir. Anjiyotensin-(1-7), neprilisin anjiyotensin I üzerindeki hidrolitik etkisi veya Anjiyotensin II (Ang II)' nin anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) tarafından bozunmasıyla oluşturulabilen renin-anjiyotensin sisteminin önemli bir biyoaktif bileşenidir. ACE2 ve Ang-(1-7) Mas reseptörü kardiyomiyositlerde bir arada bulunmaktadır ve Ang-(1-7) doğrudan miyokard içinde üretilebilmektedir. Ang-(1-7) Mas reseptörünün endojen bir ligandı olarak tanımlanmadan önce farmakolojik aktif bir peptid olarak tanımlanmıştır (Teixeria vd 2017, Zhang vd 2017). Ang-(1-7) kardiyoprotektif etkileri ile ilgili araştırmalar kalp yetmezliği, miyokard enfarktüs, hipertansiyon, miyokardiyal iskemi, hipertrofi gibi modeller üzerinde öne sürülmüştür. Ang-(1-7) kardiyoprotektif etkileri deneysel otoimmün miyokarditin indüklediği kalp yetmezliği modelinde bildirilmiştir (Sukumaran vd 2011).

Çalışma boyunca kontrol grubu ve Ang-(1-7) alan grupta kilo izlemlerinde deney hayvanlarının deney başlangıcındaki kilo ölçümlerine göre dekapitasyon öncesi ağırlık kazandığı saptandı. RAS sistemi bileşenlerinin kilo kaybı üzerine olan etkisini araştıran bir çalışmada Ang-(1-7)' nin Sprague Dawley sıçanlarda kilo kaybına neden olmadığı ancak Ang II' nin beyin aracılı anti- obez potensinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Winkler vd 2018). Beyinde AT1 reseptörlerinin Ang II' nin metabolik işlevlerini düzenleyebileceğini, Ang II sinyalizasyonunun AT1 reseptörler üzerinden metabolik hızı artırabileceği belirtilmiştir. Her ne kadar RAS sisteminin bir bileşeni olan Ang-(1-7) ile de metabolik aktivitede ve glukoz kullanımında bir azalma beklense de Winkler ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bu yönde bir sonuç bulunmaması bizim de çalışmamızı desteklemektedir. İntraserebroventriküler infüzyon olarak verilen Ang II' nin ise hipotalamik- hipofiz- adrenal eksen (HPA) aktivitesini ve dolayısıyla kortikosteronu artırarak sıçanlarda plazma insülinini doğrudan düşürerek obez sıçanlarda glikoz kontrolünde etkili olabileceği gösterilmiştir.

Doksorubisin tek doz olarak verildiğinde sıçanlarda kilo kaybına neden olmaktadır. İlginç olarak Ang-(1-7) verilmekte olan sıçanlara 7. gün de tek doz Doksorubisin verilmesi başlangıç vücut ağırlık değerleri ile karşılaştırıldığında daha da anlamlı şekilde kilo kaybına neden olmaktadır. Yüksek Ang-(1-7) seviyelerinin vücut ağırlığını azalttığı deney hayvanlarında yapılan çalışmada gösterilmiştir (Schuchard vd 2015). Çalışmamızda Doksorubisin verilmesi sonrası serumda Ang-(1-7) seviyelerinin anlamlı şekilde yüksek bulunması bu kilo kaybının doksorubisin ile indüklenen Ang-(1-7) seviyelerindeki artışla ilişkili olabileceğini göstermektedir. Ayrıca yüksek seviyelerdeki Ang-(1-7), Mas reseptörü aracılığı ile özellikle beyaz yağ dokuda termogenezi uyararak kilo kaybına neden olmaktadır (Vargas-Castillo vd 2020).

Sıçanlara gerek Doksorubisin tek doz gerekse Ang-(1-7)' nin çalışma protokolü boyunca verilmesi sıçan kalp ağırlıklarında kontrole göre anlamlı olarak farklılık gösterdi. Hem Doksorubisin hem de Ang-(1-7) kalp ağırlıklarını azaltmaktadır. Kronik olarak Doksorubisin verilen deney hayvanlarında sol ventrikül sistol sonu boyutlarının, diastol sonu sol ventrikül arka duvar kalınlığının ve interventiküler septal duvar kalınlığının artması ile birlikte kalp ağırlıklarının azaldığı gösterilmiştir (Moutabian vd 2022). Moutabian ve ark.' larının yaptığı çalışmada Doksorubisin ile tedavi edilen sıçanlardaki kalp dokularının histolojik incelemesinde, çapraz çizgilenme, miyokardiyal endokilema şişmesi ve nispeten rezorbe olan sarkoplazmik matris, miyokardiyal hücrelerde düzensizlik ve pul pul nekrotik hücreler dahil olmak üzere miyokardiyal hasarlar saptanmıştır. Yine tek doz 20 mg/kg i.p. yolla verilen Doksorubisin kalp ağırlıklarında azalmaya neden olmaktadır (Zhang vd 2018). Literatürde Ang-(1-7)' nin kalp ağırlıkları üzerine etkisini gösteren bir çalışmaya rastlamadık. Ancak kalp ağırlıkları dekapitasyon günündeki vücut ağırlıklarına oranlandığında gruplarda sırası ile kontrol: 3,46, Ang-(1-7): 3,50, Doksorubisin: 3,27, Ang-(1-7)+ Doksorubisin: 3,22 oranları elde edilmektedir. Bu oranlar karşılaştırıldığında Doksorubisin tek başına ve Doksorubisin+ Ang-(1-7) alan gruplarda kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranı azalmasına rağmen anlamlı bulunmamıştır. Tek başına kalp ağırlığından çok bu oranın ele alınması daha doğru olacaktır. Çünkü sıçanların gelişimsel aşamalarında ve cinsiyete göre oranların değiştiği gösterilmiştir (De Carvalho 2014). Her iki cinsten ve ağırlığı $200 \pm 30g$ olan sıçanlarda bu oranın 3.52 ± 0.103 arasında olduğu (Shikalgar ve Naikwade 2018) bildirilmiştir. Elde edilen oran bizim çalışmalarımızdaki sonuçlar ile uyumludur.

Hemodinamik parametreler incelendiğinde Doksorubisin deney hayvanlarında diyastolik kan basıncı ve ortalama kan basıncı değerlerinde azalmaya sebep olmuştur. Bu sonuçlar daha önceden yapılan çalışmalar ile tutarlılık göstermektedir. Kalbin diyastolik ve sistolik işleyişi kardiyak disfonksiyon ile yakından ilişkilidir. Literatürde Doksorubisinin diyastolik disfonksiyonu indüklediği dolayısıyla sistolik fonksiyonda değişikliklere neden olduğu belirtilmiştir. Bu değişikliklerde kan basıncında azalma ile sonuçlanmaktadır (Wu vd 2018). Doksorubisin uygulanmasından sonra kanıtlanan miyokardiyal hasar için sistolik ve diyastolik basınçta azalma, ek olarak ortalama arter basıncındaki azalma neden olarak gösterilmektedir. Hemodinamik değişiklikler için kalsiyum homeostazı değişimi, kasılma proteinlerinde azalma, miyofibrillerde hasar ve miyokardiyal diyastolik fonksiyon bozukluğuna yol açan sarkoplazmik retikulum ATPaz aşağı doğru regülasyonunun rol oynadığı belirtilmektedir (Rahbardar vd 2022).

Patil ve Balaraman (2011) yaptığı çalışmada beş haftalık bir süreç içerisinde DOX total doz 15 mg/kg olacak şekilde uygulanmış ve serbest radikal üretiminin artmasıyla kardiyovasküler anormallikler ortaya çıkmıştır. DOX' un hemodinamik parametreleri etkilediği rapor edilmiştir. Sistolik kan basıncı, diyastolik kan basıncı ve ortalama kan basıncında kontrol grubuna göre karşılaştırma yapıldığında bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlardan farklı olarak aşamalı bir artış saptanmıştır.

Ang-(1-7) bağlı kan basıncı üzerindeki etkinin var olup olmadığı önemli bir sorudur. Subkütan infüzyon yöntemiyle kronik Ang-(1-7) uygulanması bazal kan basıncı üzerinde değişikliğe neden olmamıştır (Guo vd 2017). Bu sonuç çalışmamızda Ang-(1-7) bağlı olarak kan basıncı üzerinde bir değişiklik saptanmaması bulgusuna benzerdir. Daha önceden yapılan çalışmalarda Ang-(1-7) infüzyonunun ortalama kan basıncında geçici bir artış gösterirken renal atılımında da bir artış olduğuna dair sonuçlar mevcuttur. Ang II ile indüklenen hipertansiyonda, Ang-(1-7) infüzyonu doğrudan vasküler etkilerden daha çok renal hemodinamiklerde değişiklik, sodyum ve su atılımını artırması gibi etkiler meydana gelmiştir (Kuczeriszka vd 2017). Bununla birlikte Ang-(1-7)' nin yararlı etkileri Mas reseptörü aracılığıyla hipertansiyon durumunda vasküler tansiyonu ve kan basıncını azalttığına dair bulgular belirtilmiştir. Ang-(1-7) ile ortalama arteriyel basıncın azalması mesentrik arter relaksasyonunu indükleyerek hipertansiyonda total periferel direnci azaltmaktadır (Zhang vd 2019). Çelişen bulgular için olası açıklamalar farklı hayvan modellerinin kullanılması veya gözlemlerin uygulama zamanının farklılığı olabilir (Guo vd 2017).

Doksozubusin alan gruplarda kalp atım hızında başlangıca göre bir değişiklik olmaz iken, sadece kontrol grubunda başlangıca göre kalp atım hızında anlamlı şekilde azalma bulunmuştur. Kalp atım hızındaki azalma yüzdeleri hesaplandığında kontrol grubundaki azalma %23 olup, bu azalma başlangıç değer ile karşılaştırıldığında anlamlıydı. Ang-(1-7) uygulanan grupta görülen azalma %13 olup, başlangıç değerine göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. RAS' ın bir bileşeni olan Ang-(1-7), gerek santral gerek periferik etkileri ile kan basıncını düşürür ve barorefleks duyarlılığını düzeltir. Bu da ACE2/Ang 1-7/Mas aksının ACE/Ang II/AT1R aksının karşı düzenleyicisi olduğunu gösterir (Hatip-Al-Khatib 2021). Ang-(1-7)' nin kalp hızında azalma etkisi kalp üzerinde Ang II tarafından inhibe edilen parasempatik etkinliğin periferik olarak düzeltilmesi söz konusu olabilir (Stoyell-Conti vd 2021). Doksozubusin alan her iki grupta da kalp atım hızları açısından bir değişiklik olmayıp azalma oranı sırasıyla Doksozubusin grubunda %6 ve Ang-(1-7)+Doksozubusin alan grupta %5 olarak saptanmıştır.

İlginç olarak Ang-(1-7) uygulanan sıçanlara Doksozubusin verildiğinde kalp hızında daha da az değişiklik olmaktadır. Oysa Doksozubusin' in serum Ang-(1-7) seviyelerinin diğer tüm gruplara göre anlamlı şekilde arttırdığı bu çalışmamızda gösterilmiştir. Artan Ang-(1-7), Doksozubusin ile indüklenen miyokardit modelinde kalp hızı üzerine etki göstermemektedir. Doksozubusin Mas reseptörü ya da ACE2 ekspresyonu üzerindeki etkisi ile Ang-(1-7)' nin bu etkisini engelleyebilir. Çalışmamızda yalnızca Doksozubusin alan grupta anlamlı şekilde Mas reseptör ekspresyonlarında artış saptanırken, kalp dokusunda ACE2 seviyelerinde anlamlı azalmanın olması Doksozubusin'in daha ziyade ACE2 aracılı olarak Ang-(1-7)' nin periferik etkilerini inhibe ettiğini gösterebilir.

RT-PCR çalışmaları sonucunda SERCA ekspresyonunun Doksozubusin grubunda artmış olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. SERCA kalsiyum iyonlarının sitozolden sarkoplazmik retikuluma transferinde majör bir rol oynamaktadır, hem iskelet hem de kalp kasında SERCA aracılı kalsiyum iyonlarının salınımı kas gevşemesine neden olur. Birçok kardiyovasküler sistem patofizyolojisinde olduğu gibi SERCA' larda bir düzensizlik olabilir. Moleküler docking çalışmalarında SERCA' ların Doksozubusin ile etkileştiği gösterilmiş ve bu etkileşimin daha çok hidrofilik bir etkileşim olduğu ve aktif bölge ile etkileşmediği, Doksozubusin' in SERCA fonksiyonu üzerine görünen bir etkisi olmayabileceği belirtilmiştir (Mohan vd 2023). Pecararo ve ark. yaptığı çalışmada ise tek doz Doksozubusin verilen farelerde SERCA2

ekspresyonlarının tekrarlayan dozlarda verildiğinde anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (Pecararo vd 2017). Bu çalışmanın aksine 2 hafta boyunca 6 doz bölünmüş olarak 15mg/kg Doksorubusin kümülatif olarak verildiğinde SERCA2 mRNA ekspresyonlarının azaldığı ve sitozolik kalsiyum seviyelerinde artış olduğunu bildiren çalışmalarda bulunmaktadır (Agustini vd 2016). Çalışmamızda SERCA ekspresyonu Doksorubusin grubunda artmış olmakla birlikte istatistiksel olarak diğer gruplarla arasında bir fark bulunmamıştır.

Kronik olarak, Doksorubisin kaynaklı miyokardiyal disfonksiyon, hücre içi kalsiyum değişiklikleri ile ilişkilidir (Dodd vd 1993). Artan miyosit kalsiyum konsantrasyonu ile birlikte farklı proteinlerin ekspresyonundaki değişiklikleri tanımlanmıştır. Bu proteinler arasında SERCA2, fosfolamban ve ryanodin reseptörünün azalmış gen ekspresyonunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Kim vd 2006). Zhang ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada Doksorubisin'in indüklediği SR kalsiyum düzenlemesindeki fonksiyon bozukluğunun SERCA2 ve fosfolamban ekspresyonlarının azalması aracılığıyla meydana geldiğini açıklamışlardır. Ancak akut doksorubisin toksisitesinden sonra kalsiyum homeostazını etkileyen gen kodlayan proteinlerin ekspresyonunu değerlendiren bir çalışmada (Polegato vd 2015) Doksorubisin'in SERCA2a, fosfolamban ve ryanodin reseptör gen ekspresyonunu değiştirmediği gösterilmiştir. Protein seviyeleri ve işlevi ayrıca transkripsiyon sonrası mekanizmalar tarafından da düzenlenebildiğinden, artan pasif miyokardiyal sertlik ve sol ventrikül disfonksiyonunda hücre içi kalsiyumunda geçici değişikliklerinin katkısı olabileceği belirtilmektedir. Artan hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarının sarkoplazmik retikulumdan bağımsız mekanizmalarla olabileceği bildirilmektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlarda MasR ekspresyonlarının Doksorubusin verilen grupta kontrole göre anlamlı olarak artması dikkat çekicidir. Doksorubusin MasR ekspresyonunu yukarı regüle etmektedir. MasR' ü G protein kenetli reseptörlerden olup yararlı etkilerinin Ang-(1-7) bağlanması ile ortaya çıktığı belirtilmiştir (Povlsen vd 2020). Mas reseptörü insan kardiyomiyositlerinde bulunur (Zhang vd 2012) ve vazodilatasyon, anti-fibroz, anti-hipertrofik ve anti-proliferatif etkiler gibi Ang-(1-7)' nin bilinen kardiyoprotektif etkilerinin çoğuna aracılık eder. Çalışmamızda kalp dokusunda ACE2 seviyelerinin Doksorubusin verilen grupta anlamlı olarak azaldığı, ancak Ang-(1-7) seviyelerinin Doksorubusin verilen grupta kalp dokusunda azalırken serumda arttığı bulunmuştur. Yüksek Doksorubusin seviyeleri ACE2' yi inhibe ederek kalp fonksiyon

bozukluğuna yol açabilir. MasR ekspresyonundaki artış Doksorubusin verilen grupta artmış Serum Ang-(1-7) seviyeleri ile ilişkili olabilir.

Ang-(1-7), Ang II için karşıt rol oynayan bir RAS biyoaktif peptid olarak bilinmektedir. Ang II yüksek derecede özel membran reseptörleri olan AT1 ve AT2' ye bağlanmaktadır, böylece hücreiçi olayların başlamasını indüklemektedir. Literatürde kronik Ang-(1-7) uygulamasının kalp dokusunda Ang II seviyelerini azalttığı, 6 günde saatte 2µg doz Ang-(1-7) uygulamasının AT1 reseptör ekspresyonlarını etkilemediği belirtilmiştir (Mendes vd 2005). Sıçan kalbinde iskemik reperfüzyon hasarı modelinde ise Ang-(1-7)' nin farmakolojik konsantrasyonu artmış AT1 reseptör ekspresyonlarını daha da artırdığı gösterilmiştir (Oudot vd 2004). Bizim alışmamızda ise sadece Ang-(1-7) grubunda AT1 ekspresyonlarının azaldığına dair istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmiştir. Literatürde bu bulgu mikromolar konsantrasyonlarda Ang-(1-7) sıçan vasküler düz kas hücrelerinde Ang II reseptörü AT1 aşağı regüle ettiğine (Clark vd 2001) ve kronik Ang-(1-7) uygulamasının hipertansif sıçanların hipotalamusunda AT1 reseptör mRNA ekspresyonunu azalttığını (Kangussu vd 2021) gösteren çalışmalar ile desteklenmektedir.

Rahimi ve ark. yaptıkları çalışmada Ang-(1-7) ile tedavinin Dox uygulanan erkek ve dişi yavru sıçanlarda in vivo kardiyak fonksiyonu iyileştirdiği gösterilmiştir. Bu çalışmada oksidatif strese ait parametreler değerlendirilmiş, süperoksit oluşumu ve oksidatif stres belirteçlerinde bir azalmanın olduğu bildirilmiştir. Ang II' nin Ang-(1-7)' ye dönüşümünü katalize eden ekzojen Ang-(1-7) veya ACE2' nin aşırı ekspresyonun, yetişkin erkek sıçanların kalplerini Doksorubusin aracılı dilate kardiyomiyopati ile ilişkili kardiyak morfolojik hasardan koruduğu belirtilmiştir (Rahimi vd 2020). Çalışmamızda MasR ekspresyonlarındaki artışın ve kalp dokusunda ACE2 seviyelerindeki azalmanın Doksorubusin ile oluşan kardiyomiyopatiye verilen bir yanıt olduğunu düşünmekteyiz. Doksorubisinin kalpteki olumsuz etkilerinde ACE2/Ang 1-7/Mas aksının önemli bir şekilde rol oynadığı söylenebilir.

6.SONUÇLAR

Çalışmamızda Doksorubisin tek doz 15 mg/kg i.p. tek doz uygulanarak oluşturulan sıçan miyokardit modelinde Ang-(1-7)' nin kardiyoprotektif etkileri araştırıldı.

- 1- Doksorubisin alan gruplarda çalışma boyunca kilo kaybı görüldü. Kalp ağırlığındaki azalma Ang-(1-7) ve Doksorubisin alan gruplarda görüldü.
- 2- Doksorubisin verilen sıçanlarda kalp dokusunda Ang-(1-7) seviyesinin diğer 3 gruba göre anlamlı olarak azaldığı saptandı.
- 3- Deney hayvanlarının kalp dokusunda ACE2 seviyeleri Doksorubisin alan grupta diğer 3 gruba göre karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmış bulundu.
- 4- Deney hayvanlarının serumunda Ang-(1-7) seviyeleri Doksorubisin grubunda diğer 3 gruba göre anlamlı olarak artmıştı.
- 5- Sıçanların serumunda ACE2 seviyeleri yalnızca Ang-(1-7) verilen grupta kontrole göre anlamlı olarak artmış bulundu. Diğer sıçan grupları arasında fark gözlenmedi.
- 6- Kuyruk kan basıncı ölçümlerinde Doksorubisin alan gruplarda diyastolik kan basıncı ve ortalama arter basıncında anlamlı şekilde azalma saptandı.
- 7- Ang-(1-7) grubunda kuyruk kan basıncında ve nabız hızında bir değişiklik görülmedi.
- 8- Kalp atım hızı için sadece kontrol grubunda başlangıç değere göre azalma gözlemlendi.
- 9- RT-PCR çalışmalarında LC3, LC1, Beclin, Atg5, Atg7 seviyeleri açısından gruplar arasında fark bulunmadı. SERCA ekspresyonu Doksorubisin grubunda artmış olmakla birlikte istatistiksel olarak bir fark bulunmadı.

- 10-Deney hayvanlarında eNOS ekspresyonu Ang-(1-7) ve Doksorubisin alan gruplarda artmış olmakla birlikte kontrole göre anlamlı bulunmadı.
- 11-MasR ekspresyonu Ang-(1-7) ve Doksorubisin alan gruplarda kontrole göre oldukça anlamlı şekilde artmıştı. Bu artış Doksorubisin ve Ang-(1-7)+ Doksorubisin alan gruplarda diğer gruplara göre anlamlı olarak daha fazlaydı.
- 12-AT1 ekspresyonu Ang-(1-7) alan grupta kontrole göre anlamlı şekilde azalmıştı.

Sonuçlara göre, Doksorubisin ile indüklenen sıçan miyokardit modelinde kalp dokusunda Ang-(1-7) ekspresyonları azalırken serumda artmaktadır. Miyokardit durumunda Ang-(1-7) seviyelerinin serumda izlenmesi kardiyomiyositlerdeki hasar hakkında bilgi verebilir. Doksorubisin ile indüklenen miyokardit modelinde oluşan hasar otofajik mekanizmalardan bağımsız gibi görünmektedir. Bu hasarda MasR ekspresyonlarındaki artış dikkat çekicidir. MasR ekspresyonlarındaki artış otofajik süreçlerin gelişimini engelleyebildiğine dair bir sonuç çıkarılabilir. Miyokardit fizyopatolojisinde yönelik olarak renin-anjiyotensin sisteminin bileşenlerinin izlenmesi ve ileride yapılacak çalışmalar ile desteklenmesi yararlı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

Abdelatty A, Ahmed MS, Abdel-Kareem MA, Dmerdash M, Mady R, Saad AS, Albrakati A, Elmahallawy EK, Elsawak A, Abdo W. Acute and Delayed Doxorubicin-Induced Myocardiotoxicity Associated with Elevation of Cardiac Biomarkers, Depletion of Cellular Antioxidant Enzymes, and Several Histopathological and Ultrastructural Changes. *Life (Basel)* 2021; 11(9): 880.

Abwainy A, Babiker F, Akhtar S, Benter IF. Endogenous angiotensin-(1-7)/Mas receptor/NO pathway mediates the cardioprotective effects of pacing postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2016; 310(1): 104-12.

Adamcova M, Kawano I, Simko F. The Impact of microRNAs in Renin–Angiotensin-SystemInduced Cardiac Remodelling. *Int J Mol Sci* 2021; 22(9): 4762.

Adhikari A, Asdaq SMB, Al Hawaj MA, Chakraborty M, Thapa G, Bhuyan NR, Imran M, Alshammar MK, Alshehri MM, Harshan AA, Alanazi A, Alhazmi BD, Sreeharsha N. Anticancer Drug-Induced Cardiotoxicity: Insights and Pharmacogenetics. *Pharmaceuticals (Basel)* 2021; 14(10): 970.

Agustini FD, Arozal W, Louisa M, Siswanto S, Soetikno V, Nafrialdi N, Suyatna F. Cardioprotection mechanism of mangiferin on doxorubicin-induced rats: Focus on intracellular calcium regulation. *Pharm Biol* 2016; 54(7): 1289-1297.

Arasaki K, Nagashima H, Kurasawa Y, Kimura H, Nishida N, Dohmae N, Yamamoto A, Yanagi S, Wakana Y, Inoue H, Tagaya M. MAP1B-LC1 prevents autophagosome formation by linking syntaxin 17 to microtubules. *EMBO Rep* 2018; 19(8): 45584.

Avazmohammadi R, Soares JS, Li DS, Raut SS, Gorman RC, Sacks MC. A Contemporary Look at Biomechanical Models of Myocardium. *Annu Rev Biomed Eng* 2019; 21: 417–442.

Blatter LA, Kanaporis G, Martinez-Hernandez E, Oropeza-Almazan Y, Banach K. Excitation-contraction coupling and calcium release in atrial muscle. *Pflugers Arch* 2021; 473(3): 317–329.

Blauwet L and Cooper L. Myocarditis. *Prog Cardiovasc Dis* 2010; 52: 274-288.

Blyszczuk P. Myocarditis in Humans and in Experimental Animal Models. *Front Cardiovasc Med* 2019; 6: 64.

Bublitz M, Musgaard M, Poulsen H, Thogersen L, Olesen C, Schiott B, Morth JP, Moller JV, Nissen P. Ion Pathways in the Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem* 2013; 288(15): 10759–10765.

Bruce E and Kloet AD. The intricacies of the renin angiotensin system in metabolic regulation. *Physiol Behav* 2017; 178: 157–165.

Carvalho PB, Gonçalves AF, Alegre PHC, Azevedo PS, Roscani MG, Bergamasco C, Modesto PN, Fernandes AA, Minicucci M, Paiva SAR, Antonio L, Zornoff M, Polegato BF. Pamidronate Attenuates Oxidative Stress and Energetic Metabolism Changes but Worsens Functional Outcomes in Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats. *Cell Physiol Biochem* 2016; 40: 431-442.

Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin Cardiomyopathy. *Cardiology* 2010; 115(2): 155–162.

Chi RF, Li L, Wang AL, Yang H, Jie X, Zhu ZF, Wang K, Li B, Yang LG, Qin FZ, Zhang C. Enhanced oxidative stress mediates pathological autophagy and necroptosis in cardiac myocytes in pressure overload induced heart failure in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2022; 49(1): 60-69.

Chung WB and Youn HJ. Pathophysiology and preventive strategies of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Korean J Intern Med* 2016; 31(4): 625–633.

Clark MA, Diz DI, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) Downregulates the Angiotensin II Type 1 Receptor in Vascular Smooth Muscle Cells. *Hypertension* 2001; 37(4): 1141-6.

Cooper LT, Keren A, Sliwa K, Matsumori A, Mensah GA. The global burden of myocarditis: part 1: a systematic literature review for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors 2010 study. *Glob Heart* 2014; 9(1): 121-9.

Costa-Besada MA, Valenzuela R, Garrido-Gil P, Villar-Cheda B, Parga JA, Lanciego JL, Labandeira-Garcia JL. Paracrine and Intracrine Angiotensin 1-7/Mas Receptor Axis in the Substantia Nigra of Rodents, Monkeys, and Humans. *Mol Neurobiol* 2018; 55(7): 5847-5867.

Danesi R, Fogli S, Gennari A, Conte P, Tacca MD. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships of the Anthracycline Anticancer Drugs. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41(6): 431-444.

Delbridge LMD, Mellor KM, David JT, Gottlieb RA. Myocardial stress and autophagy: mechanisms and potential therapies. *Nat Rev Cardiol* 2017; 14(7): 412–425.

De Carvalho CAM, Thomazini JA. Study of Wistar Rats Heart at Different Stages in the Evolutionary Cycle. *Int J Morphol* 2014; 32(2): 614-617.

Dennert R, Crijns H, Heymans S. Acute viral myocarditis. *Eur Heart J* 2008; 29: 2073-2082.

Doblado L, Lueck C, Rey C, Samhan-Arias AK, Prieto I, Stacchiotti A, Monsalve M. Mitophagy in Human Diseases. *Int J Mol Sci* 2021; 22(8): 3903.

- Dodd DA, Atkinson JB, Olson RD, Buck S, Cusack BJ, Fleischer S, Boucek RJ. Doxorubicin cardiomyopathy is associated with a decrease in calcium release channel of the sarcoplasmic reticulum in a chronic rabbit model. *J Clin Invest* 1993; 91(4): 1697-1705.
- Dominguez F, Kühl U, Pieske B, Garcia-Pavia P, Tschöpe C. Update on myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: reemergence of endomyocardial biopsy. *Rev Esp Cardiol* 2016; 69 (2): 178-187.
- Dyla M, Terry DS, Kjaergaard M, Sorensen TML, Andersen JL, Andersen JP, Knudsen CR, Altman RB, Nissen P, Blanchard SC. Dynamics of P-type ATPase transport cycle revealed by single-molecule FRET. *Nature* 2017; 551(7680): 346–351.
- Eisner DA, Caldwell JL, Kistamas K, Trafford AW. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circ Res* 2017; 121(2): 181–195.
- Erickson JR, He BJ, Grumbach IM, Anderson ME. CaMKII in the Cardiovascular System: Sensing Redox States. *Physiol Rev* 2011; 91(3): 889–915.
- Espinoza-Fonseca LM. The -ATPase facilitates bidirectional proton transport across the sarco/endoplasmic reticulum. *Mol Biosyst* 2017; 13(4): 633–637.
- Feng H, Wang N, Zhang N, Liao HH. Alternative autophagy: mechanisms and roles in different diseases. *Cell Commun Signal* 2022; 20(1): 43.
- Ferrario CM and Mullick AE. Renin Angiotensin Aldosterone Inhibition in the Treatment of Cardiovascular Disease. *Pharmacol Res* 2017; 125: 57–71.
- Gaddam RR, Chambers S, Bhatia M. ACE and ACE2 in Inflammation: A Tale of Two Enzymes. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2014; 13(4): 1-11.
- Georgiadis N, Tsarouhas K, Rezaee R, Nepka H, Kass GE, Dorne JCM, Stagos D, Toutouzas K, Spandidos DA, Kouretas D, Tsitsimpikou C. What is considered cardiotoxicity of anthracyclines in animal studies. *Oncol Rep* 2020; 44(3): 798–818.
- Gironacci MM. Angiotensin-(1-7): beyond its central effects on blood pressure. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2015; 9(4): 209-216.
- Golpour A, Patriki D, Hanson PJ, McManus B, Heidecker B. Epidemiological impact of myocarditis. *J Clin Med* 2021;10(4): 603.
- Gomes ERM, Santos RAS, Guatimosim S. Angiotensin-(1-7)-mediated signaling in cardiomyocytes. *Int J Hypertens* 2012; 2012(493129) :1-8.
- Guo L, Yin A, Zhang Q, Zhong T, O'Rourke ST, Sun C. Angiotensin-(1-7) attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy via a Sirt3-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2017; 312(5): 980-991.
- Han L, He S, Wang Y, Yang L, Liu S, Zhang T. Advances in monoclonal antibody application in myocarditis. *J Zhejiang Univ Sci B* 2013; 14(8): 676-687.
- Han X, Zhang R, Anderson L, Rahimian R. Sexual dimorphism in rat aortic endothelial function of streptozotocin-induced diabetes: Possible involvement of superoxide and nitric oxide production. *Eur J Pharmacol* 2014; 723: 442-50.

- Hang W, Chen C, Seubert J, Wang D. Fulminant myocarditis: a comprehensive review from etiology to treatment and outcomes. **Signal Transduc and Target Ther** 2020; 5: 287.
- Hatip-Al-Khatib I. Beyin renin anjiyotensin sistemi: Homeostaz ve hastalıklarda moleküler mekanizmaları Renin Anjiyotensin Sistemi: Yeni Ufuklar. 1. Baskı. Ankara: **Türkiye Klinikleri** 2021; p. 18-25.
- Hayward R and Hydock DS. Doxorubicin cardiotoxicity in the rat: an in vivo characterization. **J Am Assoc Lab Anim Sci** 2007; 46(4): 20-32.
- Henderson CA, Gomez CG, Novak SM, Mi-Mi L, Gregorio CC. Overview of the Muscle Cytoskeleton. **Compr Physiol** 2017; 7(3): 891–944.
- Hong T and Shaw RM. Cardiac T-Tubule microanatomy and function. **Physiol Rev** 2017; 97: 227–252.
- Huang J, Wang J, Gu L, Bao J, Yin J, Tang Z, Wang L, Yuan W. Effect of a Low-Protein Diet Supplemented with Ketoacids on Skeletal Muscle Atrophy and Autophagy in Rats with Type 2 Diabetic Nephropathy. **PLoS One** 2013; 8(11): 81464.
- Jagnandan D, Sessa WC, Fulton D. Intracellular location regulates calcium-calmodulin – dependent activation of organelle-restricted eNOS. **Am J Physiol Cell Physiol** 2005; 289: 1024-1033.
- Jacevic V, Dragocevic-Simic V, Tatomirovic Z, Dobric S, Bokonjic D, Kovacevic A, Nepovimova A, Valis M, Kuca K. The Efficacy of Amifostine against Multiple-Dose Doxorubicin-Induced Toxicity in Rats. **Int J Mol Sci** 2018; 19(8): 2370.
- Jeuthe S, Wassilew K, Oh-Ici D, Da Silva T, Münch F, Berger F, Kuehne T, Pieske B, Messroghli D. Myocardial T1 maps reflect histological findings in acute and chronic stages of myocarditis in a rat model. **J Cardiovasc Magn Reson** 2016; 18: 19.
- Jiang H, Xiaoa J, Kanga B, Zhu X, Xin N, Wang Z. PI3K/SGK1/GSK3 β signaling pathway is involved in inhibition of autophagy in neonatal rat cardiomyocytes exposed to hypoxia/reoxygenation by hydrogen sulfide. **Exp Cell Res** 2016; 345(2): 134-40.
- Joerger M, Huitema A, Meenhorst P, Schellens J, Beijnen J. Pharmacokinetics of low-dose doxorubicin and metabolites in patients with AIDS-related Kaposi sarcoma. **Cancer Chemother Pharmacol** 2005; 55: 488–496.
- Kangussu LM, Melo-Braga MN, Souza Lima BS, Santos RAS, Andrade HM, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) Central Mechanisms After ICV Infusion in Hypertensive Transgenic (mRen2)27 Rats. **Front Neurosci** 2021; 15: 624249.
- Kasapoğlu S ve Demirel Yılmaz E. Renin anjiyotensin sistemi ve reseptörleri Renin Anjiyotensin Sistemi: Yeni Ufuklar. 1. Baskı Ankara: **Türkiye Klinikleri** 2021; p. 1-7.
- Keidar S, Kaplan M, Gamliel-Lazarovich A. ACE2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin (1-7). **Cardiovasc Res** 2007; 73(3): 463-9.
- Kiess TO ve Kockskämper J. SERCA Activity Controls the Systolic Calcium Increase in the Nucleus of Cardiac Myocytes. **Front Physiol** 2019; 10: 56.

- Kim SY, Kim SJ, Kim BJ, Rah SY, Chung SM, Im MJ, Kim UH. Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes. *Exp Mol Med* 2006; 38(5): 535-545.
- Kindermann I, Barth C, Mahfoud F, Ukena C, Lensk M, Yilmaz A, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U, Cooper L, Böhm M. Update on myocarditis. *JACC* 2012; 59(9): 779-92.
- Kitakata H, Endo J, Ikura H, Moriyama H, Shirakawa K, Katsumata Y, Sano M. Therapeutic Targets for DOX-Induced Cardiomyopathy: Role of Apoptosis vs. Ferroptosis. *Int J Mol Sci* 2022; 23(3):1414
- Kitamura C, Shirai K, Inoue M, Tashiro T. Changes in the Subcellular Distribution of Microtubule-Associated Protein 1B During Synaptogenesis of Cultured Rat Cortical Neurons. *Cell Mol Neurobiol* 2007; 27(1): 57-73.
- Klimas J, Olvedy M, Ochodnicka-Mackovicova K, Kruzliak P, Cacanyiova S, Kristek F, Krenek P, Ochodnický P. Perinatally administered losartan augments renal ACE2 expression but not cardiac or renal Mas receptor in spontaneously hypertensive rats. *J Cell Mol Med* 2015; 19(8): 1965-74.
- Koleini N and Kardami E. Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncotarget* 2017; 8(28): 46663-46680.
- Kranias EG and Hajjar RJ. Modulation of Cardiac Contractility by the Phospholamban/SERCA2a Regulatome. *Circ Res* 2012; 110(12): 1646–1660.
- Kobirumaki-Shimozawa F, Oyama K, Serizawa T, Mizuno A, Kagemoto T, Shimozawa T, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. Sarcomere Imaging by Quantum Dots for the Study of Cardiac Muscle Physiology. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012:313814.
- Kong CY, Guo Z, Song P, Zhang X, Yuan YP, Teng T, Yan L, Tang QZ. Underlying the Mechanisms of Doxorubicin-Induced Acute Cardiotoxicity: Oxidative Stress and Cell Death. *Int J Biol Sci* 2022; 18(2): 760-770.
- Köylü H. Tıbbi Fizyoloji Klinik Anlatımlı, *İstanbul Tıp Kitapevleri*, İstanbul, 2016, s. 228-234.
- Kuczeriska M, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J, Prieto MC, Navar LG. Modulating Role of Ang1-7 in Control of Blood Pressure and Renal Function in AngII-infused Hypertensive Rats. *Am J Hypertens* 2018; 31(4): 504-511.
- Kumar R, Thomas CM, Yong QC, Chen W, Baker KM. The Intracrine Renin-Angiotensin System. *Clin Sci (Lond)* 2012; 123(5): 273–284.
- Lambert DW, Hooper NM, Turner AJ. Angiotensin-converting enzyme 2 and new insights into the renin–angiotensin system. *Biochem Pharmacol* 2008; 75(4): 781–786.
- Lamberti M, Giovane G, Garzillo EM, Avino F, Feola A, Porto S, Tombolini V, Domenico MD. Animal Models in Studies of Cardiotoxicity Side Effects from Antineoplastic Drugs in Patients and Occupational Exposed Workers. *BioMed Res Int* 2014; 2014(240642): 1-8.
- Lampejo T, Durkin S, Bhatt N, Guttmann O. Acute myocarditis: aetiology, diagnosis and management. *Clin Med* 2021; 21(5): 505-510.

- Laver DR. Regulation of the RyR channel gating by Ca^{2+} and Mg^{2+} . *Biophys Rev* 2018; 10: 1087–1095.
- Leone O, Pieroni M, Rapezzi C, Olivotto I. The spectrum of myocarditis: from pathology to the clinics. *Virchows Arch* 2019; 475(3): 279-301.
- Li B and Xie X. A20 (TNFAIP3) alleviates viral myocarditis through ADAR1/miR-1a-3p-dependent regulation. *BMC Cardiovasc Disord* 2022; 22: 10.
- Li DL, Wang ZV, Ding G, Tan W, Lou X, Criollo A, Xie M, Jiang N, May H, Krychenko V, Schneider JW, Gillette TG, Hill JA. Doxorubicin Blocks Cardiomyocyte Autophagic Flux by Inhibiting Lysosome Acidification. *Circulation* 2016; 133(17): 1668-87.
- Li XC, Zhang J, Zhuo JL. The vasoprotective axes of the renin-angiotensin system: physiological relevance and therapeutic implications in cardiovascular, hypertensive and kidney disease. *Pharmacol Res* 2017; 125: 21-38.
- Li XC, Zhu D, Zheng X, Zhang J, Roman RJ, Zhuo JL. Intratubular and Intracellular Renin-Angiotensin System in The Kidney: A Unifying Perspective in Blood Pressure Control. *Clin Sci (Lond)* 2018; 132(13): 1383–1401.
- Li Y, Zheng N, Ding X. Mitophagy Disequilibrium, a Prominent Pathological Mechanism in Metabolic Heart Diseases. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2021; 14: 4631-4640.
- Liang S, Brundage RC, Jacobson PA, Blaes A, Kirstein MN. Pharmacokinetic–pharmacodynamic modelling of acute N-terminal pro B-type natriuretic peptide after doxorubicin infusion in breast cancer. *Br J Clin Pharmacol* 2016; 82: 773–783.
- Liguori C, Farina D, Vaccher F, Ferrandino G, Bellini D, Carbone L. Myocarditis: imaging up to date. *Radiol Med* 2020; 125: 1124–1134.
- Lu F and Pu WT. The architecture and function of cardiac dyads. *Biophys Rev* 2020; 12: 1007–1017.
- Ma W, Wei S, Zhang B, Li W. Molecular Mechanisms of Cardiomyocyte Death in Drug-Induced Cardiotoxicity. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 434.
- Maejima Y, Isobe M, Sadoshima J. Regulation of autophagy by Beclin 1 in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2016; 95: 19-25.
- Magder S. The meaning of blood pressure. *Crit Care* 2018; 22(1): 257.
- Marín-García J. Gene- and Cell-Based Therapy for Cardiovascular Disease in Post-Genomic Cardiology, 2nd Edition, *Academic Press*, NJ, 2014, s 924.
- Mendes AC, Ferreira AJ, Pinheiro SVB, Santos RA. Chronic infusion of angiotensin-(1–7) reduces heart angiotensin II levels in rats. *Regul Pept* 2005;125(1-3): 29-34.
- Miller AJ and Arnold AC. The Renin-Angiotensin System in Cardiovascular Autonomic Control: Recent Developments and Clinical Implications. *Clin Auton Res* 2019; 29(2): 231–243.
- Mitry MA and Edwards JA. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *Int J Cardiol Heart Vasc* 2016; 10: 17–24.

Mohan UP, Kunjiappan S, Pichiah PBT, Arunachalam S. Doxorubicin Disrupts the Calcium Homeostasis through its Antagonistic Activity on PINK1—An In-silico Approach. **Biointerface Research in Applied Chemistry** 2023; 13(1): 82.

Mostava MG, Mima T, Ohniski ST, Mori K. S-allylcysteine ameliorates doxorubicin toxicity in the heart and liver in mice. **Planta Med** 2000; 66(2): 148-51.

Moutabian H, Ghahramani-Asl R, Mortezaazadeh T, Laripour R, Narmani A, Zamani H, Ataei G, Bagheri H, Farhood B, Sathyapalan T, Sahebkar A. The cardioprotective effects of nano-curcumin against doxorubicin-induced cardiotoxicity: A systematic review. **BioFactors** 2022; 48(3): 597–610.

Nikitina LV, Kopylova GV, Shchepkin DV, Nabiev SR, Bershitsky SY. Investigations of Molecular Mechanisms of Actin–Myosin Interactions in Cardiac Muscle. **Biochemistry (Mosc)** 2015; 55: 255-288.

Oudot A, Vergely C, Ecarnot-Laubriet A, Rochette L. Pharmacological concentration of angiotensin-(1–7) activates NADPH oxidase after ischemia–reperfusion in rat heart through AT1 receptor stimulation. **Regul Pept** 2005;127(1-3): 101-10.

Park KH, Kim SY, Gul R, Kim BJ, Jang KY, Chung HT, Sohn DH. Fatty Acids Ameliorate Doxorubicin-Induced Intracellular Ca²⁺ Increase and Apoptosis in Rat Cardiomyocytes. **Biol Pharm Bull** 2008; 31(5): 809-15.

Parks RJ and Howlett SE. Sex differences in mechanisms of cardiac excitation–contraction coupling, **Pflugers Arch** 2013; 465: 747–763.

Patel VB, Zhong JC, Grant MB, Oudit GY. Role of the ACE2/Angiotensin 1–7 axis of the Renin-Angiotensin System in Heart Failure. **Circ Res** 2016; 118(8): 1313–1326.

Patil L and Balaraman R. Effect of Green Tea Extract on Doxorubicin Induced Cardiovascular Abnormalities: Antioxidant Action. **Iran J Pharm Res** 2011; 10(1): 89–96.

Peana D and Domeier TL. Cardiomyocyte homeostasis as a therapeutic target in heart failure with reduced and preserved ejection fraction. **Curr Opin Pharmacol** 2017; 33: 17–26.

Pecoraro M, Rodríguez-Sinovas A, Marzocco S, Ciccarelli M, Iaccarino G, Pinto A, Popolo A. Cardiotoxic Effects of Short-Term Doxorubicin Administration: Involvement of Connexin 43 in Calcium Impairment. **Int J Mol Sci** 2017; 18(10): 2121.

Podyacheva EY, Kushnareva EA, Karpov AA, Toropova YG. Analysis of Models of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Rats and Mice. A Modern View From the Perspective of the Pathophysiologist and the Clinician. **Front Pharmacol** 2021; 12: 670479.

Polegato BF, Minicucci MF, Azevedo PS, Carvalho RF, Chiuso-Minicucci F, Pereira EJ, Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Matsubara BB, Matsubara LS. Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity is Associated with Matrix Metalloproteinase-2 Alterations in Rats. **Cell Physiol Biochem** 2015; 35(5): 1924-1933.

Povlsen AL, Grimm D, Wehland M, Infanger M, Krüger M. The Vasoactive Mas Receptor in Essential Hypertension. **J Clin Med** 2020; 9(1): 267.

Raeymaekers L, Vandecaetsbeek I, Wuytack F, Vangheluwe P. Modeling Ca²⁺ Dynamics of Mouse Cardiac Cells Points to a Critical Role of SERCA's Affinity for Ca²⁺. ***Biophys J*** 2011; 100(5) : 1216–1225.

Rahbardar MG, Eisvand F, Rameshrad M, Razavi BM, Hosseinzadeh H. In Vivo and In Vitro Protective Effects of Rosmarinic Acid against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. ***Nutr Cancer*** 2022; 74(2): 747-760.

Rahimi O, Kirby J, Varagic J, Westwood B, Tallant EA, Gallagher PE. Angiotensin-(1–7) reduces doxorubicin-induced cardiac dysfunction in male and female Sprague-Dawley rats through antioxidant mechanisms. ***Am J Physiol Heart Circ Physiol*** 2020; 318(4): 883–894.

Rathod N, Bak JJ, Primeau JO, Fisher JE, Espinoza-Fonseca LM, Lemieux MJ, Young HS. Nothing Regular about the Regulins: Distinct Functional Properties of SERCA Transmembrane Peptide Regulatory Subunits. ***Int J Mol Sci*** 2021; 22: 8891.

Rawat PS, Jaiswal A, Khurana A, Bhatti JS, Navik U. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. ***Biomed Pharmacother*** 2021; 139: 111708.

Renu K, Abilash VG, Tirupathi Pichiah PB, Arunachalam S. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy - An update. ***Eur J Pharmacol*** 2018; 818: 241-253.

Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. ***J Cancer Res Ther*** 2014; 10(4); 853-858.

Sagar S, Liu P, Cooper L. Myocarditis. ***Lancet*** 2012; 379(9817): 738–747.

Sarmah N, Nauli AM, Ally A, Nauli SM. Interactions among Endothelial Nitric Oxide Synthase, Cardiovascular System, and Nociception during Physiological and Pathophysiological States. ***Molecules*** 2022; 27(9): 2835.

Schmittgen TD and Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_t method. ***Nat Protoc*** 2008; 3(6): 1101-8.

Schuchard J, Winkler M, Stolting I, Schuster F, Vogt FM, Barkhausen J, Thorns C, Santos RA, Bader M, Raasch W Lack of weight gain after angiotensin AT1 receptor blockade in diet-induced obesity is partly mediated by an angiotensin-(1-7)/ Mas-dependent pathway. ***Br J Pharmacol*** 2015; 172(15): 3764–3778.

Shaikh S, Troncoso R, Criollo A, Bravo-Sagua R, Garcia L, Morselli E, Cifuentes M, Quest A, Hill JA, Lavandero S. Regulation of cardiomyocyte autophagy by calcium. ***J Physiol Endocrinol Metab*** 2016; 310(8): 587–596.

Shikalgar TS and Naikwade NS. Cardioprotective effect of fulvic acid on doxorubicin induced cardiac oxidative stress in rats. ***Int J Pharm Sci Res*** 2018; 9(8): 3264-73.

Simoese Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, Teixeira MM. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. ***Br J Pharmacol*** 2013; 169(3): 477-492.

Sohail M, Yu B, Sun Z, Liu J, Li Y, Zhao F, Chen D, Yang X, Xu H. Complex polymeric nanomicelles co-delivering doxorubicin and dimethoxycurcumin for cancer chemotherapy ***Drug Delivery*** 2022; 29(1): 1523-1535.

Song Y, Xu Y, Liu Y, Gao J, Feng L, Zhang Y, Shi L, Zhang M, Guo D, Qi B, Zhang M. Mitochondrial Quality Control in the Maintenance of Cardiovascular Homeostasis: The Roles and Interregulation of UPS, Mitochondrial Dynamics and Mitophagy. ***Oxid Med Cell Longev*** 2021; 2021(3960773): 1-12.

Squire J. Special Issue: The Actin-Myosin Interaction in Muscle: Background and Overview. ***Int J Mol Sci*** 2019; 20: 5715.

Stewart LK, Smoak T, Hydock DS, Hayward R, O'Brien K, Lisano JK, Boeneke C, Christensen M, Mathias A. Milk and kefir maintain aspects of health during doxorubicin treatment in rats. ***J Dairy Sci*** 2019; 102: 1910–1917.

Stoyell-Conti FF, Chabbra A, Puthentharayil J, Rigatto K, Speth RC. Chronic administration of pharmacological doses of angiotensin 1-7 and iodoangiotensin 1-7 has minimal effects on blood pressure, heart rate, and cognitive function of spontaneously hypertensive rats. ***Physiol Rep*** 2021; 9(7): 14812.

Su C, Xue J, Ye C, Chen A. Role of the central renin-angiotensin system in hypertension. ***Int J Mol Med*** 2021; 47(6): 95.

Sukumaran V, Veeraveedu PT, Gurusamy N, Yamaguchi K, Lakshmanan AP, Ma M, Suzuki K, Kodama M, Watanabe K. Cardioprotective Effects of Telmisartan against Heart Failure in Rats Induced By Experimental Autoimmune Myocarditis through the Modulation of Angiotensin-Converting Enzyme-2/Angiotensin 1-7/Mas Receptor Axis. ***Int J Biol Sci*** 2011; 7(8): 1077-1092.

Swaminathan PD, Purohit A, Hund TJ, Anderson ME. CaMKII: linking heart failure and arrhythmias. ***Circ Res*** 2012; 110(12): 1661–1677.

Sweeney HL and Hammers DW. Muscle Contraction. ***Cold Spring Harb Perspect Biol*** 2018; 10(2): 023200.

Tada Y, Tachibana A, Heidary S, Yang PC, McConnel MV, Dash R. Ferumoxytol-enhanced cardiovascular magnetic resonance detection of early stage acute myocarditis. ***J Cardiovasc Magn Reson*** 2019; 21(1): 77.

Talman V and Ruskoaho H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. ***Cell Tissue Res*** 2016; 365: 563–581.

Tang KS, Medeiros ED, Shah AD. Wide pulse pressure: A clinical review. ***J Clin Hypertens*** 2020; 22: 1960–1967.

Teixeira LB, Parreiras-e-Silva LT, Bruder- Nascimento T, Duarte DA, Simoes SC, Costa RM, Rodriguez DY, Ferreira PAB, Silva CAA, Abrao EP, Oliveira EB, Bouvier M, Tostes RC, Costa-Neto CM. Ang-(1-7) is an endogenous β -arrestin-biased agonist of the AT1 receptor with protective action in cardiac hypertrophy. ***Sci Rep*** 2017; 7(1): 11903.

Thi Pham VT, Nguyen HT, Nguyen CT, Choi YS, Dhaka D, Kim TS, Jung HJ, Yamaguchi T, Sohng JK. Identification and enhancing production of a novel macrolide compound in engineered *Streptomyces peucetius*. ***RSC Adv*** 2021; 11: 3168-3173.

Tian Z, Yang Y, Yang Y, Zhang F, Li P, Wang J, Yang J, Zhang P, Yao W, Whang X. High cumulative doxorubicin dose for advanced soft tissue sarcoma. ***BMC Cancer*** 2020; 20: 1139.

Timm KN and Tyler DJ. The Role of AMPK Activation for Cardioprotection in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. **Cardiovasc Drugs Ther** 2020; 34: 255–269.

Timm KN, Perera C, Ball V, Henry JA, Miller JJ, Kerr M, West JA, Sharma E, Broxholme J, Logan A, Savi D, Dodd MS, Griffin JL, Murphy MP, Heather LC, Tyler DJ. Early detection of doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats by its cardiac metabolic signature assessed with hyperpolarized MRI. **Commun Biol** 2020; 3(1): 692.

Todorova VK, Beggs ML, Delongchamp RR, Dhakal I, Makhoul I, Wei JY, Klimberg VS. Transcriptome profiling of peripheral blood cells identifies potential biomarkers for doxorubicin cardiotoxicity in a rat model. **PLoS One** 2012; 7(11): 48398.

Tschöpe C, Ammirati E, Bozkurt B, P, Caforio AL, Cooper LT, Felix SB, Hare JM, Heidecker B, Heymans S, Hübner N, Kelle S, Klinge K, Maatz H, Parwani AS, Spillmann F, Starling RC, Tsutsui H, Seferovic P, Linthout SV. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: current evidence and future directions. **Nat Rev Cardiol** 2021; 18(3): 169–193.

Tyminska A, Ozieranski K, Skwarek A, Kaplon-Cieslicka A, Baritussio A, Grabowski M, Marcolongo R, Caforio A. Personalized Management of Myocarditis and Inflammatory Cardiomyopathy in Clinical Practice. **J Pers Med** 2022; 12(2): 183.

Uchikado Y, Ikeda Y, Ohishi M. Current Understanding of the Pivotal Role of Mitochondrial Dynamics in Cardiovascular Diseases and Senescence. **Front Cardiovasc Med** 2022; 9(905072): 1-19.

Umlauf J and Horoky M. Molecular biology of doxorubicin-induced cardiomyopathy. **Exp Clin Cardiol** 2002; 7(1): 35-9.

Van der Velden J and Stienen GJM. Cardiac Disorders and Pathophysiology of Sarcomeric Proteins. **Physiol Rev** 2019; 99(1): 381-426.

Vargas- Castillo A, Tobon- Cornejo S, Valle- Mondragon LD, Torre- Villalvazo I, Schcolnik- Cabrera A, Guevara- Cruz M, Pichardo- Ontiveros E, Fuentes- Romero R, Bader M, Alenina N, Vidal-Puig A, Hong E, Torres N, Tovar AR. Angiotensin-(1-7) induces beige fat thermogenesis through the Mas receptor. **Metabolism** 2020; 103: 154048.

Vuong JT, Stein-Merlob AF, Cheng RK, Yang EH. Novel Therapeutics for Anthracycline Induced Cardiotoxicity. **Front Cardiovasc Med** 2022; 9: 863314.

Wallace KB, Sardao VA, Oliveira PJ. Mitochondrial determinants of doxorubicin-induced cardiomyopathy. **Circ Res** 2020; 126: 926-941.

Wang X, Qu XQ, Zhang TT, Zhang JF. Testosterone suppresses ventricular remodeling and improves left ventricular function in rats following myocardial infarction. **Exp Ther Med** 2015; 9(4): 1283-1291.

WEB_1 Labster theory. <https://theory.labster.com/serca2>, (son güncellenme tarihi: 19.04.2018, alındığı tarih: 11.10.2022)

Wester A, Devocelle M, Tallant EA, Chappell MC, Gallagher PE, Paradisi F. Stabilization of Angiotensin-(1–7) by key substitution with a cyclic non-natural amino acid. **Amino Acids** 2017; 49: 1733–1742.

- Winkler M, Bader M, Schuster F, Stölting I, Binder S, Raasch W. Development of obesity can be prevented in rats by chronic icv infusions of AngII but less by Ang(1–7). *Pflugers Arch* 2018; 470(6): 867-881.
- Wu R, Yao P-A, Wang H-L, Gao Y, Yu H-L, Wang L, Cui X-H, Xu X, Gao J-P. Effect of fermented *Cordyceps sinensis* on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Mol Med Rep* 2018; 18(3): 3229-3241.
- Xiao B, Hong L, Cai X, Mei S, Zhang P, Shao L. The true colors of autophagy in doxorubicin-induced cardiotoxicity(Review). *Oncol Lett* 2019; 18: 2165-2172.
- Yamaguchi O. Autophagy in the Heart. *Circ J* 2019; 83: 697 – 704.
- Yuan Z, Shioji K, Kishimoto C. Immunohistological analyses of myocardial infiltrating cells in various animal models of myocarditis. *Exp Clin Cardiol* 2003; 8(1): 13–16.
- Zima AV, Bovo E, Mazurek SR, Rochira JA, Li W, Terentyev D. Ca handling during excitation-contraction coupling in heart failure. *Pflugers Arch* 2014; 466(6): 1129-1137.
- Zhang D, Xu Q, Wang N, Yang Y, Liu J, Yu G, Yang X, Xu H, Wang H. A complex micellar system co-delivering curcumin with doxorubicin against cardiotoxicity and tumor growth. *Int J Nanomedicine* 2018; 13: 4549–61.
- Zhang F, Tang H, Sun S, Luo Y, Ren X, Chen A, Xu Y, Li P, Han Y. Angiotensin-(1-7) induced vascular relaxation in spontaneously hypertensive rats. *Nitric Oxide* 2019; 88: 1-9.
- Zhang S, You ZQ, Yang L, Li LL, Wu YP, Gu LQ, Xin YF. Protective effect of Shenmai injection on doxorubicin-induced cardiotoxicity via regulation of inflammatory mediators. *BMC Complement Altern Med* 2019; 19(1): 317.
- Zhang T, Li Z, Dang H, Chen R, Liaw C, Tran TA, Boatman PD, Connolly DT, Adams JW. Inhibition of Mas G-protein signaling improves coronary blood flow, reduces myocardial infarct size, and provides long-term cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 302(1): 299–311.
- Zhang X, Cheng HJ, Zhou P, Kitzman DW, Ferrario CM, Li WM, Cheng CP. Cellular Basis of Angiotensin-(1–7)-Induced Augmentation of Left Ventricular Functional Performance in Heart Failure. *Int J Cardiol* 2017; 236: 405–412.
- Zhang Y, Chen Y, Zhang M, Tang Y, Xie Y, Huang X, Li Y. Doxorubicin induces sarcoplasmic reticulum calcium regulation dysfunction via the decrease of SERCA2 and phospholamban expressions in rats. *Cell Biochem Biophys* 2014; 70(3): 1791-1798.
- Zhao Q, Yin L, Zhang L, Jiang D, Liu L, Ji H. Chitoheptaose Promotes Heart Rehabilitation in a Rat Myocarditis Model by Improving Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antiapoptotic Properties. *Oxid Med Cell Longev* 2020; 2020(2394704): 1-13.
- Zhou P, Gao G, Zhao CC, Li J, Peng J, Wang S, Song R, Shi U, Wang L. In vivo and in vitro protective effects of shengmai injection against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Pharm Biol* 2022; 60(1): 638–651.

Zhou X, Zhang P, Liang T, Chen Y, Liu D, Yu H. Relationship between circulating levels of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1–7)-MAS axis and coronary heart disease. **Heart Vessels** 2020; 35(2): 153–161.

ZhuGe R, Fogarty KE, Tuft RA, Lifshitz LM, Sayar K, Walsh JV. Dynamics of Signaling between Ca²⁺ Sparks and Ca²⁺- activated K⁺ Channels Studied with a Novel Image-based Method for Direct Intracellular Measurement of Ryanodine Receptor Ca²⁺ Current. **J Gen Physiol** 2000; 116(6): 845–864.