

**T.C.
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKSORUBİSİN KAYNAKLI KARDİYOTOKSİSİTEDE ATP
DUYARLI POTASYUM KANALLARIN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGÜL AYDIN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADYAMAN, 2019

T.C.
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKSORUBİSİN KAYNAKLI KARDİYOTOKSİSİTEDE ATP DUYARLI
POTASYUM KANALLARIN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Özgül AYDIN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Bu tez 08/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç.Dr. Yusuf SEVGİLER
Danışman

Doç.Dr. Eylem TAŞKIN GÜVEN
Üye

Prof.Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
Üye

Prof.Dr. Ahmet KAYRALDIZ
Üye

Doç.Dr. Tamer KAYIŞ
Üye

Prof. Dr. Murat KOCA
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu'ndaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DOKSORUBİSİN KAYNAKLI KARDİYOTOKSİSİTEDE ATP DUYARLI POTASYUM KANALLARIN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Özgül AYDIN

Adıyaman Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Yusuf SEVGİLER

II. Danışman: Doç.Dr. Eylem TAŞKIN GÜVEN

Yıl: 2019, Sayfa: 48

Jüri: Doç.Dr. Yusuf SEVGİLER

Doç.Dr. Eylem TAŞKIN GÜVEN

Prof.Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

Prof.Dr. Ahmet KAYRALDIZ

Doç.Dr. Tamer KAYIŞ

Dokсорubisin (DOK) yumuşak doku kanserlerine karşı kullanılan bir ilaçtır. Fakat, kanser olmayan dokular üzerine toksik etkileri vardır. İlacın istenmeyen bu yan etkilerine karşı hala bir tedavi bulunamamıştır. DOK'a ilişkin hücre toksisitesi reaktif oksijen türleri (ROS) ve mitokondri işlev kayıplarıyla ilişkili olabilir. ATP-duyarlı potasyum kanallarının (KATP) iskemi-reperfüzyonun da dahil olduğu çeşitli patolojilere karşı koruyucu olduğu ispatlanmıştır. Bu çalışmanın amacı KATP'nin açılmasının DOK kaynaklı kardiyotoksositeye karşı koruyucu olup olmadığını araştırmaktır. Sıçan kalp kası hücre hattı (H9c2) kullanılarak 24 saatlik uygulamayla kontrol, KATP kanal açısı olan diyazoksit (DIA), DOK ve DIA+DOK olmak üzere dört deney grubu oluşturuldu. F-aktin dağılımları, mitokondri membran potansiyeli (MMP), süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi ve çeşitli protein ifadeleri analiz

edildi ve ardından istatistik değerlendirme yapıldı. DOK, SOD enzim aktivitesinde azalmayla ERK1/2 protein ifadesinde artışa ve AMPK protein ifadesinde azalmaya yol açarken, DIA ile birlikte DOK uygulanması bu değişimleri düzelitti. DOK, F-aktin hasarına neden oldu, fakat DIA bu hasarı da azalttı. Oksidatif stres kaynaklı apoptozis nedeniyle kardiyomiyosit kaybı, DOK kaynaklı sitotoksisite için önemli bir mekanizmadır ve değişimler DIA ortak uygulaması ile azaldı. Sonuç olarak, KATP kanallarının açılması DOK kaynaklı kardiyotoksisiteye karşı koruyucudur ve DIA, DOK kemoterapisinde hücreyi korumak için aday bir ajan olabilir.

Anahtar Kelimeler: ATP duyarlı potasyum kanalları; AMP ile aktive olan kinaz, Doksorubisin; Diyazoksit

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

INVESTIGATION of THE EFFECT of ATP SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS on DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOTOXICITY

Özgül AYDIN

Adiyaman University

Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc.Prof Dr. Yusuf SEVGİLER

Advisor: Assoc.Prof.Dr. Eylem TAŞKIN GÜVEN

Year: 2019, Page: 48

Jury: Assoc.Prof Dr. Yusuf SEVGİLER

Assoc.Prof.Dr. Eylem TAŞKIN GÜVEN

Prof.Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

Prof.Dr. Ahmet KAYRALDIZ

Assoc.Prof.Dr. Tamer KAYIŞ

Doxorubicin (DOX) is a drug for solid tissue cancer treatment. However, it has some side effects on non-cancerous cells. Treatment for its undesirable cytotoxicity is still not found. DOX cytotoxicity might be related to reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial dysfunction. Protective effects of ATP-sensitive potassium channels (KATP) has been well documented against some pathological conditions, including ischemia-reperfusion. This study aimed to investigate whether the opening of KATP reverses the cardiotoxicity of DOX. Rat cardiomyocyte cell line (H9c2) was exposed for 24 hours to its medium served as control; Diazoxide (DIA), one of KATP opener; DOX, and DIA plus DOX. Distribution of actin filaments, mitochondrial membrane potential (MMP), superoxide dismutase (SOD) enzyme activity and some protein expressions were analyzed with proper tests and then statistical analysis was

performed. Although DOX decreased SOD enzyme activity, AMPK protein levels and increased the ERK1/2 protein levels, DIA co-treatment restored them. DOX destroyed cytoskeleton via actin distribution, but DIA ameliorated the distribution as well. Although DOX elevated MMP, DIA reversed the DOX's effect on MMP. Cardiomyocytes loss by oxidative stress-mediated apoptosis is an important mechanism for DOX-induced cytotoxicity, and the alternations were attenuated with DIA co-treatment. Consequently, the opening of KATP has protective effects on DOX-induced cardiotoxicity and DIA may be a candidate agent to protect the cell in DOX chemotherapy.

Key Words: ATP sensitive potassium channels; AMP-activated kinase; Doxorubicin; Diazoxide

DESTEKLER

Bu tez çalışması Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (ADYÜBAP) Koordinasyon Birimi Başkanlığı tarafından FEFYL/2018-0001 numaralı proje ile desteklenmiştir.



BEYAN

“Doksozobisin Kaynaklı Kardiyotoksisitede ATP Duyarlı Potasyum Kanallarının Etkisinin Araştırılması” başlıklı tezimde çalışmaların tamamen akademik kurallara ve etik değerlere sadık kalınarak yürütüldüğünü ve yazımda yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ayrıca alıntılardan bilimsel etiğe uygun atıf yaparak yararlanmış olduğumu beyan ederim.

Özgül AYDIN

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım süresince değerli yardım ve desteklerini esirgemeyen tez danıőmanlarım Sayın Doç.Dr. Yusuf SEVGİLER'e ve Sayın Doç.Dr. Eylem TAŞKIN GÜVEN'e, tez çalıőmam için gerek analiz gerekse de yazım sürecinde değerli katkılarını esirgemeyen Sayın Doç.Dr Celal GÜVEN'e ve Sayın Arő.Gör.Dr. Salih Tunç KAYA'ya teőekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	III
DESTEKLER.....	V
BEYAN.....	VI
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XI
SİMGELER ve KISALTMALAR	XII
1. GİRİŞ	1
1.1. Antrasiklinler.....	1
1.1.1. Antrasiklinlerin Antitümör Aktivitesi	3
1.1.2. Antrasiklinler ve apoptoz: DNA Hasarındaki Rolü ve p53	3
1.2. Doksorubisin Kaynaklı Kardiyotoksisitenin Patofizyolojisi.....	6
1.3. Doksorubisinin Diğer Dokulardaki Toksisitesi.....	8
1.4. Doksorubisinin Serbest Radikaller ve Oksidatif Hasar ile İlişkisi.....	9
1.5. ATP Duyarlı Potasyum Kanalları	10
1.5.1. ATP Duyarlı Potasyum Kanallarının Tipleri	11
1.5.2. ATP Duyarlı Potasyum Kanallarının Kalp Patolojileri ile İlişkisi.....	12
1.6. AMP ile Aktive Olan Protein Kinaz	12
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	15
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	18
3.1. Kimyasal Maddeler	18
3.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler.....	18
3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	20
3.3.1. Sıvı Azotta Saklanan H9c2 Hücrelerinin Hazırlanması.....	20
3.3.2. H9c2 Hücrelerinin Çoğaltılması	20
3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması	21
3.5. Oksidatif Stres Parametrelerinin Saptanması.....	22
3.5.1. Total Antioksidan Durumun Ölçülmesi	22
3.5.2. Total Oksidan Seviyenin Ölçülmesi.....	23
3.5.3. Oksidatif Stres İndeksinin Hesaplanması	23

3.5.4. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçülmesi	24
3.6. Western Blot Yöntemiyle Hedef Proteinlerin Derişimlerinin Belirlenmesi ...	24
3.7. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Ölçülmesi.....	25
3.8. İmmunofloresans Yöntemi ile Apoptotik Hücre Sayısının Belirlenmesi	26
3.9. İstatistiksel Analiz.....	27
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	28
4.1. BULGULAR	28
4.1.1. Oksidatif Stres Parametreleri	28
4.1.1.1. Total antioksidan durum	28
4.1.1.2. Total oksidan durum	28
4.1.1.3. Oksidatif stres indeksi	28
4.1.1.4. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi.....	29
4.1.2. Protein İfadesindeki Değişimler.....	30
4.1.2.1. SUR2A protein ifadesindeki değişim	30
4.1.2.2. Kir6.2 protein ifadesindeki değişim.....	30
4.1.2.3. ERK1/2 protein ifadesindeki değişim	30
4.1.2.4. AMPK protein ifadesindeki değişim.....	31
4.1.2.5. NF-κB protein ifadesindeki değişim	31
4.1.2.6. Sitokrom c protein ifadesindeki değişim.....	31
4.1.3. Mitokondri Membran Potansiyeli	32
4.1.4. F-Aktin Organizasyonu	33
4.1.5. Apoptotik Hücre Sayıları	33
4.2. TARTIŞMA	38
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	43
KAYNAKLAR	45
KİŞİSEL BİLGİLER.....	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Dokсорubisin (DOK) ve türevi Epirubisin (EPI) ile Daunorubicin (DNR) ve türevi Idarubisin (IDA)'nin iskelet yapısının gösterimi	2
Şekil 4.1.	Dokсорubisin, diyazoksit ya da birlikte uygulamalarından 24 saat sonra H9c2 hücrelerinde bazı protein ifadelerindeki değişim	29
Şekil 4.2.	Dokсорubisin, diyazoksit ya da birlikte uygulamalarından 24 saat sonra H9c2 hücre mitokondrilerinde membran potansiyeli değişimi	31
Şekil 4.3.	Dokсорubisin, diyazoksit ya da birlikte uygulamalarından 24 saat sonra H9c2 hücrelerinde F-aktin organizasyonunun gösterilmesi	32
Şekil 4.4.	Dokсорubisin, diyazoksit ya da birlikte uygulamalarından 24 saat sonra apoptotik H9c2 hücre sayısının gösterilmesi	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. SOD ölçümü için kullanılan maddeler ve miktarları	22
Çizelge 4.1. Doksorubisin, diyazoksit ya da birlikte uygulamalarından 24 saat sonra H9c2 hücre hattında oksidatif stres parametrelerindeki değişim	27
Çizelge 4.2. Doksorubisin, diyazoksit ya da birlikte uygulamalarından 24 saat sonra TUNEL pozitif hücre sayılarındaki değişim	34

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrad derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µmol	Mikromolar
Eq	Ekivalan
g	Gram
U	Ünite
M	Molar
m ²	Metrekare
mL	Mililitre
nm	Nanometre

Kısaltmalar

100X	100 Kat
40X	40 Kat
20X	20 Kat
Abs	Absorbans
ADP	Adenozin difosfat
ADR	Adriyamin
AIF	Apoptoz indükleyici faktör
ALT	Alanin aminotransferaz
AMP	Adenozin monofosfat
AMPK	5'-Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz
Arg	Arjinin
AST	Aspartat aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
c-DMEM	Complete Dulbecco's Modified Eagle's Medium
CHF	Konjestif kalp yetmezliği
CK	Kreatin kinaz
CRT	Kalretikülin
DIA	Diyazoksit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNR	Daunorubicin
DOK	Doksorubisin
EKG	Elektrokardiyografi
ELISA	Enzim-bağlı immünosorbent testi

EPI	Epirubisin
ERK	Ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinazlar
ETS	Elektron taşıma zinciri
F-aktin	Polimer yapıdaki aktin
FBS	Fetal sığır serum albümini
FI	Istituto Ricerche Farmitalia
GPx	Glutasyon peroksidaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H9c2	Sıçan kalp kası hücre hattı
HMGB-1	High mobility group box 1 proteini
HSP	Isı şok proteini
ICD	İmmünojenik hücre ölümü
IDA	İdarubisin
INT	Istituto Nazionale dei Tumori
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethyl benzimidazolyl carbocyanine
iodide	
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
KATP	ATP-duyarlı potasyum kanalları
L	Litre
LDH	Laktat dehidrogenaz
LKB1	Serin/Treonin kinaz 11
Lys	Lizin
MAPK	Mitojen ile aktive edilen protein kinaz
MMP	Mitokondriyal membran potansiyeli
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
OSI	Oksidatif stres indeksi
p53	Tümör protein 53
PBS	Fosfat ile tamponlanmış serum fizyolojik çözeltisi
PBS-T	Tris içeren fosfat ile tamponlanmış serum fizyolojik çözeltisi
PKC-ε	Protein kinaz C epsilon
PVDF	Poliviniliden diflorür
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TAS	Total antioksidan durum
TLR4	Toll like receptor-4
TNF-α	Tümör nekroz faktör-α reseptör
TNF	Tümör nekroz faktör
TOS	Total oksidan durum

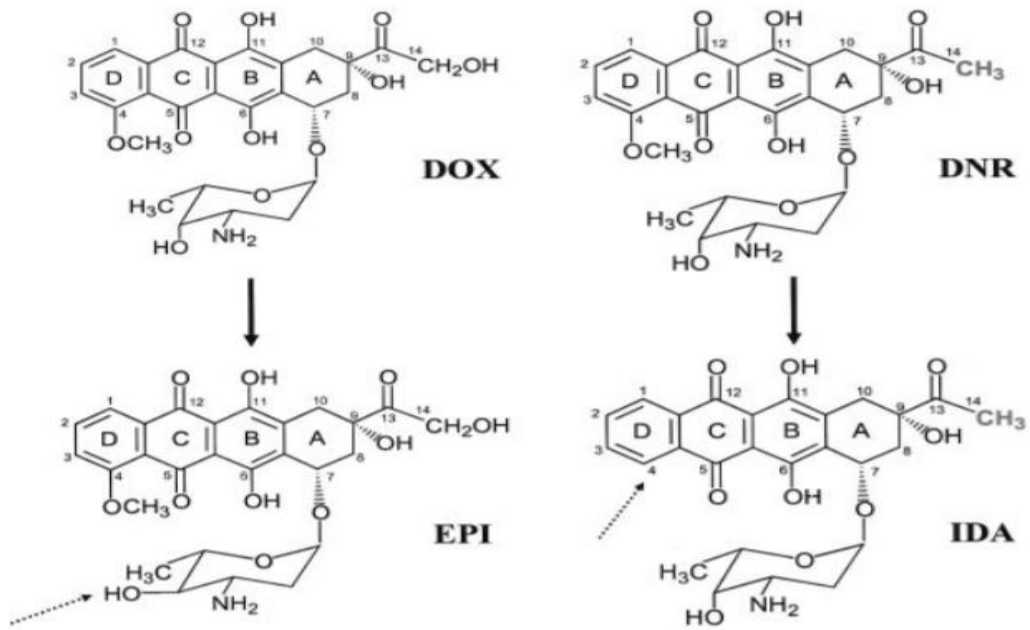
1. GİRİŞ

Dünya çapındaki toplam ölüm oranının %45'ini kardiyovasküler hastalıklar ve kanser oluşturmaktadır [1]. Yapılan araştırmaların sonuçlarına göre, kansere bağlı ölüm oranlarının giderek artacağı ve 2030 yılında 12 milyon kişinin kanserden öleceği tahmin edilmektedir [2]. Kanser tedavisinde kullanılan antrasiklin türevi ilaçlar, şimdiye kadar ki en etkili ve en yaygın kullanılan antikanser kemoterapötiklerindedir [3, 4]. Fakat çocukluk ya da ergenlik çağında antrasiklin ile kanser tedavisi gören kişilerin sayıları arttıkça, ilacın yan etkisi olarak tanımlanan kardiyovasküler hastalıkların görülme sıklığı da artmaktadır ve bu artış ilacın dozuna bağlıdır [5]. Lotrionte vd. (2013) hastaların kemoterapi rejimlerinde düzenlemeler yapılmasına karşın ilaca bağımlı kardiyotoksisite riskinin önemli ölçüde devam ettiğini bildirmiştir [6]. Antrasiklin ile oluşan kardiyotoksistide erken tanı yöntemleri hala geliştirilemediği için kardiyotoksisiteyi yok etmeye ve/veya azaltmaya yönelik çalışmalar sürdürülmektedir.

1.1. Antrasiklinler

Toprak bazlı mikroorganizmalardan antikanser bileşiklerin aranmasına 1950'lerde başlamıştır [7]. Milano'da bulunan the Istituto Ricerche Farmitalia (FI) 1957'de ve Istituto Nazionale dei Tumori (INT) 1960 yılında yeni biyosentetik antitümör ilaçların geliştirilmesi programına dahil oldular. Bu iki enstitünün yöneticileri olarak FI'dan Dr. Guilo Bertive ve INT'den Prof. Pietro Bucalossi 1960 yılında işbirliği anlaşması imzaladı. Bu anlaşma çerçevesinde INT bünyesinde antikanser ilaç geliştirmeye yönelik yeni bir merkez kuruldu [8]. O yıllarda, parlak kırmızı bir pigment üreten yeni bir *Streptomyces peucetius* suşu izole edildi ve bu bakteriden fare tümörlerine karşı oldukça etkili olduğu belirlenen bir antibiyotik üretildi [7]. FI ve INT arasındaki ortak işbirliği anlaşmasından 3 yıl sonra klinik testlere hazır olan daunorubicin (DNR) adlı yeni antikanser ilaç geliştirildi. Bundan bir yıl sonra Amerika Birleşik Devletleri ve İtalya'da ilacın antikanser etkinliği kabul edildi [8]. Bu yeni antibiyotik akut lösemi ve lenfoma tedavisinde başarıyla

kullanıldı. Bununla birlikte, 1967'de, DNR'nin ölümcül kalp toksisitesine neden olabileceği kabul edildi. Araştırmacılar, DNR'den daha sonra 14-hidroksidaunorubicin ya da adriyamisin olarak adlandırılacak olan doksorubisini üretmek için *Streptomyces spp.* de genetik modifikasyon yaptılar [7, 9]. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalar sonucunda DOK'un, DNR'den daha aktif olduğu saptanmıştır [9]. Bu iki antrasiklin arasındaki fark DOK'un yan zincirinin alkolle sonlanmasına karşın, DNR'nin bir metil grubu ile sonlanmasıdır (Şekil 1.1). Bu farklılık, DOK ve DNR'nin spektral farklılıklarına neden olur. Bunun dışında kalan iskelet yapısı bütünüyle aynıdır ve şeker ile ağırlıktan oluşurlar [10]. DOK; meme kanseri, çocukluk çağı gibi yumuşak doku tümörleri, sarkomları ve kötü huylu lenfomaların tedavisinde sıklıkla kullanılırken; DNR akut lenfoblastik ya da miyeloblastik lösemilerin tedavisinde kullanılır. Bu ilaçlara alternatif olarak epirubisin (EPI) ve idarubisin (IDA) de geliştirilmiştir. IDA, DNR türevidir. DNR'nin iskelet yapısında bulunan D halkasından 4-metoksi grubunun çıkartılması ile elde edilir. EPI ise, DOK'un yarı sentetik formudur ve aralarındaki fark daunozaminin 4. C'a bağlı -OH grubunun ekvatorial epimerleşmesidir. Bu epimerleşmenin ilacın faaliyet aralığı üzerine çok az etkisi vardır; fakat yapılan çalışmalar sonucunda EPI ve IDA, DOK ve DNR'ye oranla daha yüksek kardiyotoksisite gösterdiğinden alternatif olarak kullanımı daha azdır [10].



Şekil 1.1. Doksorubisin (DOK) ve türevi Epirubisin (EPI) ile Daunorubicin (DNR) ve türevi Idarubisin (IDA)'nin iskelet yapısının gösterimi [10]

1.1.1. Antrasiklinlerin Antitümör Aktivitesi

Antrasiklinlerin antitümör aktivitesini açıklayan bazı mekanizmalar vardır. Bunlar;

1. Antrasiklinler hücre siklusunun S ve G2 fazında etki ederek hızla çoğalan tümör hücrelerinin replikasyonunu engeller ve antitümör etki oluşturur [10].
2. Diğer bir mekanizma, antrasiklinlerin DNA süper sarmalının oluşumunu, DNA'nın replikasyon, transkripsiyon süreçlerini ve DNA'nın onarımında görev alan topoizomerazları etkilemesi üzerinden gerçekleşir [11, 12]. Topoizomeraz II'nin inhibisyonu yoluyla DNA'da hasara yol açarlar. DNA interkalasyonu ile baz çiftleri arasına girerek DNA replikasyonunu durdurur, transkripsiyonu ve translasyonu da engellerler [11, 12]. Antrasiklinler, DNA iplikçiklerinin topoizomeraz II ile kesilmesinden faydalanarak guanin-sitozin bazlarının arasına girer ve DNA'nın tekrar kapanmasına engel olurlar. Ayrıca topoizomeraz II'nin inhibisyonu sonucunda DNA'da meydana gelen kırıklar apoptotik yolları uyararak apoptozu başlatır [5, 11, 13].
3. Hücre membranına etki ederek yapıyı bozar, zarın iyon geçirgenliğini değiştirir ve böylelikle serbest radikal üretilmesi ve dolayısıyla lipid peroksidasyonu ile hücre hasarına yol açarlar [11, 12].

1.1.2. Antrasiklinler ve apoptoz: DNA Hasarındaki Rolü ve p53

Canlıda kararlı iç dengenin devamı için apoptoz yani programlanmış hücre ölümü kaçınılmazdır. Apoptoz yolağındaki hücreler aldığı sinyal ile kendilerini yok etmek için birtakım düzenlemeler yapar. Komşu hücreler ile bağlantısını kopararak uzaklaşır ve büzülürler. Daha sonra zarla örtülü parçalara bölünerek makrofajlar tarafından sindirilirler. Bu sürecin düzenlenmesinde p53, sitokrom c, Ca⁺², Bcl-2 gen

ailesi ve kaspazlar görev alır. Bcl-2 gen ailesinin proapoptik proteinleri (örneğin; Bad ve Bax) hücrede antiapoptotik proteinlerden (örneğin; Bcl-2 ve Bcl-xL) fazla ise hücre apoptoza yönelir. Bu durumda hücreler, sitokrom *c* ile apoptoz indükleyici faktörün (AIF) salınımını artırarak apoptozu başlatır. Antiapoptotik proteinlerin fazla olduğu durumda, iyon tranportu düzenlenir ve Ca^{+2} derişimi kontrol altına alarak apoptozu önleyebilir. DOK, Ca^{+2} homeostazını ve mitokondriyal membran potansiyelini bozarak mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olur ve böylece hücrenin enerjisinin tükenmesine yol açar [14].

Doksorubisin, solid ve hematolojik kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmasına karşın yan etkilerinin fazla olması nedeniyle kullanımı doza bağlı olarak sınırlandırılmaktadır. Kardiyotoksik kemoterapötiklerin yan etkilerini azaltmak amacıyla hesaplanan, vücut yüzey alanının toplamına düşen maksimum doz; DOK için $450-600 \text{ mg/m}^2$, DNR için 500 mg/m^2 'dir [10]. Toplam dozun üzerindeki değerler, klinik kardiyotoksikite riskinde önemli artışa yani konjestif kalp yetmezliğine (CHF) ve ölüme neden olur. Yaygın olarak kullanılan bu kemoterapötik ilacın toksisitesinin azaltılması ve daha kullanışlı analoglarının geliştirilmesi yönündeki çalışmalar günümüzde hala devam etmektedir.

Doksorubisinin toksik etkileri, sıklıkla kalp dokusuyla ilişkilidir [3, 15, 16]. DOK ile uyarılan CHF, ilerleyici sol ventriküler işlev bozukluğu ile karakterize olup geri döndürülemez kalp yetmezliği ile DOK'a bağlı ölüm oranının en az %20'sini oluşturur [16, 17]. Kalp dokusu yağ oksidasyonuna dayalı enerji üretimi nedeniyle mitokondrilerce zengindir. Kardiyomiyositlerin kullandığı ATP'nin %90'undan fazlasını üreten mitokondrilerde DOK'un birikme eğiliminde olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [3, 18]. Bundan dolayı diğer organlarla karşılaştırıldığında, kalp, DOK'un yol açtığı hasara daha duyarlıdır [19]. DOK'un, istenmeyen ciddi kardiyotoksik yan etkilerinin yanı sıra beyin, böbrek ve karaciğer gibi organlarda da toksik etkilerinden ötürü kullanımı sınırlıdır. Toksisitenin ve kalp yetmezliği riskinin azaltılması amacıyla DOK'un klinikte kullanılan terapötik dozunun azaltılması genel tercih edilen durumdur. Çünkü DOK kaynaklı CHF'nin görülme sıklığı, doza bağımlıdır; örneğin, vücut yüzeyine düşen toplam doz 400 mg/m^2 'nin altında iken CHF'nin görülme sıklığı %0,14; 550 mg/m^2 iken %7 ve 700

mg/m² iken %18'dir [5]. DOK kaynaklı toksisitenin azaltılması için uygulanan diğer bir yöntem ise antioksidan tedavidir. Antioksidan maddeler ile DOK kaynaklı kardiyomiyopatiyi önlemeye yönelik birçok çalışma bulunmaktadır [4, 15, 18]. Fakat antioksidan tedaviler beklenildiği ölçüde olumlu sonuçlar göstermemiştir. Örneğin, demir şelatörü olan deksrazoksan [20] DOK ile birlikte verildiğinde toksisitenin önemli derecede azalmadığı saptanmıştır [15]. DOK ayrıca iyon dengesi, hücrel demir ve kalsiyum metabolizmasındaki değişiklikler, sarkoplazmik retikulum işlevinin bozulması, mitokondriyal işlev bozukluğu ve apoptotik hücre kaybı gibi bir dizi olaya neden olur [4, 17]. DOK'un neden olduğu kardiyotoksisite nefropati, mukozit ve kilo kaybı ile de sonuçlanabilir [16].

Doksorubisin ile oluşan oksidatif stresin, MAPK-bağımlı apoptotik hücre yolağını aktifleştirdiği bildirilmiştir [1]. Mitojen ile aktive edilen protein kinazlar (MAPK); hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (ERK1/ERK2; p44MAPK/p42MAPK), *c-Jun N-terminal* kinazlar (JNK) ve p38-MAPK'ların da içinde bulunduğu geniş bir protein kinaz ailesidir [1, 21]. MAPK'lar, hücre çoğalmasında ve farklılaşmasında görev üstlenirken aynı zamanda hipoksik, genotoksik ve oksidatif koşullarda apoptozu tetikleyebilir. Bu sitoplazmik proteinler, hücre zarından çekirdeğe bilgi akışını sağlar. DOK kaynaklı oksidatif stres durumunda, ERK1/2, JNK ve p38 kinazlar aktif hale geçer. p38-MAPK'nın immün ve inflamatuvar yanıtlarda yer alan önemli bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa B'yi (NF-κB) ve tümör nekroz faktörünü (TNF) tetiklediği belirlenmiştir. NF-κB ve TNF alt birimi (IL-1β) etkileşime girerek hücrel yanıt oluşturur. ERK1/2'nin aktivasyonuna sırasıyla, Raf ve MEK aracılık eder. Ras, Raf ile aktifleşir ve MEK aracılığıyla ERK1/2'yi fosforilleyerek aktive eder. ERK1/2 yolağı; hücrenin çoğalması, ölümü ve hücre iskeletinin şekillenmesinde rol oynar. JNK yolağı; hücre çoğalmasını uyarır ve JNK ile indüklenen apoptozda Bcl-2 protein ailesinin fosforilasyonu ve ifadenmesi önemlidir [22].

Yapılan çalışmalarda yan etkilerine karşın DOK'un, fare tümör hücrelerinde immünojenik hücre ölümlerine (ICD) neden olduğu gösterilmiştir. ICD'nin başlangıcından birkaç saat sonra, pre-apoptotik tümör hücrelerinde, kalretikülin (CRT) ve ısı şok proteini (HSP) 70 endoplazmik retikulumdan salınarak hücre

yüzeyine doğru yer değiştirir. Daha sonra, hücreler, geç apoptoz markırı olan high mobility group box proteini 1'i (HMGB1) hücre dışı sıvıya salarlar [23]. Hücre ölümleri ve çeşitli nedenlerle serbest kalan HMGB-1'in ifadenmesi artar ve bu protein hücre zarında bulunan Toll like receptor (TLR)-4 ile etkileşerek bağışıklık tepkimelerini indükler [24].

1.2. Doksorubisin Kaynaklı Kardiyotoksisitenin Patofizyolojisi

Diğer dokulara oranla kalbin istenmeyen yan etkilere daha duyarlı olmasının çeşitli nedenleri vardır. DOK ile indüklenen kardiyotoksisite doza bağlıdır ve redoks tepkimeler nedeniyle oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS) yoğunluğu nedeniyle hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidan sistemin zayıflaması sonucu oluşan oksidatif stresle indüklenir; ancak kesin mekanizması belirsizdir [3, 15, 25]:

1. Yapılan çalışmalarda, kalp dokusunun antioksidan enzim aktivitesinin diğer dokulara oranla daha zayıf olduğu belirtilmektedir. Özellikle antioksidan savunmanın önemli bileşenlerinden olan glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesinin düşük olduğu vurgulanmaktadır. Ayrıca katalaz (CAT) enzim aktivitesinin de az olduğu bilinmektedir [15, 19]. Hücrelerde mitokondrilerin çok olması oksidan madde üretiminin artışı anlamına gelmektedir. Antioksidan enzim aktivitesi de zayıf olan kalp kası hücrelerinde DOK, kolaylıkla oksidatif stresin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır [3, 18].
2. Kalp dokusu, enerjisinin çoğunu yağların β -oksidasyonu aracılığıyla mitokondride üretir. ATP'nin üretildiği mitokondrilerde DOK'un birikme eğiliminde olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [3, 18]. Bu nedenle mitokondriyal yapıdaki herhangi bir değişim kalp kası hücre işlevini etkiler. DOK kardiyotoksisitesinin ilerlemesi sonucu, mitokondrilerde morfolojik ve işlevsel bozukluklar başta olmak üzere apoptoz ile birlikte mitokondriyal ATP üretiminde düşüş meydana geldiği bildirilmiştir [17, 18].
3. DOK'un plazma ve sitozolden daha çok mitokondrinin matriksi içerisinde biriktiği gösterilmiştir. Özellikle mitokondrilerin krista yapılarında hasara neden olmaktadır. Elektron taşıma zincirinde (ETS) görev yapan Kompleks-I,

II, III ve IV'ün yapısını bozup enerji üretimini sekteye uğratarak kalp kası hücrelerinde enerji stresine neden olduğu bildirilmektedir. Bu da DOK'un kalp kasına yan etkisinde mitokondrilerin önemli rol oynadığını göstermektedir. 5 gün süreyle 20 mg/kg DOK ile tedavi edilen farelerin mitokondrilerinde Kompleks I ve II'nin inhibe olduğu tespit edilmiştir [18].

Mitokondri, programlanmış hücre ölümü olan apoptozun denetlenmesi açısından da önemli bir organeldir. Katyonik DOK, ökaryotik hücre metabolizması için gerekli ve iç mitokondriyal membrandaki anyonik bir fosfolipit olan kardiyolipine yüksek ilginlikle bağlanma özelliğine sahiptir. Bu yolla DOK, sitokrom *c* gibi kardiyolipin ile ilişkili çevresel proteinlerin iç mitokondriyal membrandan ayrılmasına ve sitozole salınmasına neden olur. Sitokrom *c*'nin salınması, ETS ve dolayısıyla enerji üretimini etkiler ve programlanmış hücre ölümünün başlatılmasını destekler [3, 11, 14, 18]. Bu salınma ile, kaspaz 3 ve kaspaz 9'un parçalanmasıyla apoptotik süreç başlatılmış olur [14].

Bazı çalışmalar indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enzimi aktivasyonu ve peroksinitrit oluşumu sonucunda oluşan yüksek nitrik oksit (NO) derişiminin DOK kardiyotoksitesine neden olabileceğini de göstermiştir [15, 17, 18]. Kardiyomiyositlerde bu şekilde meydana gelen oksidatif ve nitrozatif stres, geri dönüşümsüz DNA hasarı ve kalp enerjisinde değişim ile apoptoza yol açar [4, 17]. Serbest radikaller aynı zamanda membran hasarına yol açan lipit peroksidasyonuna da neden olur [3].

1.2.1. Doksorubisin Kaynaklı Kardiyotoksite Çeşitleri

Doksorubisinin kalp üzerindeki toksik etkileri tedavinin herhangi bir döneminde ortaya çıkabilir. 4 tipi vardır [26]. Bunlar:

- ✓ Akut kardiyotoksik etki: Akut mitokondriyal iskemi nadir olarak hastaların %0,4-41'inde görülmektedir. İlacın uygulanması esnasında veya birkaç saat sonra ortaya çıkan etkilerdir. QRS voltajında azalma, sinüs taşikardisi, ventriküler ve supraventriküler ekstra atımlar, QT uzaması görülebilir. Ayrıca

yapılan çalışmalar sonucunda, gelişen akut komplikasyonların ilacın dozu ve uygulama yöntemiyle ilişkisi saptanmamıştır.

- ✓ Subkronik kardiyotoksik etki: İlacın son dozundan birkaç gün veya hafta sonra ortaya çıkar. Miyokardiyumlarda toksisite veya perikardit sık rastlanan patolojik durumlardır.
- ✓ Erken kronik kardiyotoksik etki: Kardiyomiyositlerde kemoterapiden dolayı tekrarlanan DOK'a maruziyet sonucu ortaya çıkar. Hastaların %0,4-23'ünde görülür. İlacın uygulanmasından birkaç hafta veya birkaç ay sonra sol başta olmak üzere her iki ventrikülü de içeren ciddi kalp yetersizliği görülür. Egzersiz toleransında azalma, efor dispnesi, sağ ve sol ventriküler ejeksiyon fraksiyonunda azalma saptanan klinik bulgular arasındadır. Nadir görülen durumlar ise, akciğer ödemi veya kardiyojenik şoktur.
- ✓ Gecikmiş tip kardiyotoksik etki: Kemoterapi sonlandırıldıktan birkaç yıl sonra meydana gelir. Ölüm gibi ciddi durumlarla sonuçlanabilir. Uygulanan dozun şiddeti ve hastanın yaşı bu tip kardiyotoksisite ile ilişkilidir.

1.3. Doksorubisinin Diğer Dokulardaki Toksisitesi

Doksorubisin genelde kardiyomopatiye neden olmakla birlikte akut pankreatite de neden olmaktadır. Akut pankreatit etkisi çoğunlukla vaka sunumu şeklindedir. Örneğin; 20 yaşında alkolik olmayan bir kadına yapılan karın duvarı ameliyatında 3. derecede nörosarkoma tespit edilmiştir. Hastaya DOK ile birlikte 69 mg/m² ifosfamid ve 5 g/m² uromiteksan uygulanmıştır. Nadir olmasına karşın kemoterapiyle indüklenen pankreatitin DOK ve ifosfamidin kombine kullanımıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir [27].

Doksorubisinin toksik etkilerinin gözlemlendiği diğer bir organ da karaciğerdir. İlacın bu toksik etkilerinin, redoks döngüsüne bağlı oksidatif stres ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Karaciğer dokusunda DOK'un indüklediği oksidatif stres mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmasına karşın, iki farklı mekanizma öne sürülmektedir. Bunlardan ilki, DOK'un redoks döngüsü sırasında bir elektron indirgenmesiyle DOK radikallerinin oluşumudur. Bu indirgenme tepkimesi,

NADPH-sitokrom P450 redüktazlar, NOS, NADPH oksidaz gibi çeşitli enzimler tarafından katalize edilir. DOK radikalının O₂ ile tepkimesi, süperoksit anyon radikallerini oluşturur. Daha sonra, bu tepkime defalarca tekrarlanarak oksidatif stres meydana gelebilir. DOK radikali üretimine neden olan enzimler, karaciğer hücrelerinde yüksek oranda bulunur. İkinci mekanizma ise, DOK Fe³⁺ ile kolaylıkla tepkimeye girerek Fe²⁺-DOK kompleksi meydana getirir. Oluşan kompleks kolaylıkla moleküler oksijen ile tepkimeye girer ve kolaylıkla süperoksit anyon radikali ya da hidroksil radikali oluşumuna neden olur [28]. Karaciğerin özellikle DOK radikal üretiminde rol oynadığı öne sürülmüştür [29].

1.4. Doksorubisinin Serbest Radikaller ve Oksidatif Hasar ile İlişkisi

Doksorubisinin metabolizması sırasında oluşan ROS'un kardiyotoksisiteye neden olduğunu öne süren birçok çalışma vardır [30]. DOK'un kardiyotoksitesinin araştırılması için birçok hayvan türü kullanılmıştır ve araştırmaların sonuçları DOK'un toksik etkisinin ağırlıklı olarak oksidatif stres ve enerji metabolizmasında oluşan bozulmalar ile meydana geldiğini ortaya koymuştur [16]. Oksidatif hasardan korunmak için aerobik metabolizmaya sahip hücreler, enzimatik ve non-enzimatik antioksidan savunma sistemlerini geliştirmişlerdir. Enzimatik antioksidan sistem genellikle GPx, süperoksit dismutaz (SOD), CAT ve tiyoredoksin peroksidazdan oluşur. Non-enzimatik antioksidan sistemler, vitaminler (A, C, E), glutatyon (GSH), karotenoidler, flavonoidler, lipoik asit ve ürik asidi içerir. ROS'un artışı, antioksidan savunmayı aşan kritik bir yoğunluğa ulaşırsa proteinler ve lipitler gibi hücrel bileşenlere zarar verir ve bu zarar iskemi-reperfüzyon hasarı, kanser vb. hastalıklara neden olur. DOK kaynaklı kardiyomiyopatide de hem oksidan maddelerde artış hem de antioksidanlarda azalma olduğu gösterilmiştir. DOK'un mitokondri Kompleks-I ile etkileşimi yüksek oranda ROS üretimine neden olur. Bununla birlikte, mitokondriyal permeabilite; mitokondriyal kalsiyum homeostazı ve mitokondriyal enerji üretiminin bozulmasına yol açar. Dolayısıyla antioksidan madde tedavisi, DOK'un neden olduğu oksidatif stresle başa çıkma yöntemi olarak düşünülür [14, 31]. Bu bilgiler yapılan çalışmalar ile desteklenmektedir. Örneğin, DOK'a maruz

kalan sıçan kalp kasından elde edilen mitokondrilerde mitokondriyal membran potansiyelinin (MMP), ATP düzeyinin ve tiyoredoksin redüktaz (TrxR) aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada, DOK'un total antioksidan durumu (TAS) azalttığı ve total oksidan durumu (TOS) artırdığı da bildirilmiştir [32].

Kalp dokusu, sistolik işlevinin devamı için yüksek miktarda ATP harcar. Mitokondri ATP'ye bağlı membran potansiyeli de dahil olmak üzere bir çok hücrel işlemde sorumludur [16]. Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon süreçlerinde ROS üretilir ve oluşan ROS antioksidan enzimler (CAT, SOD, vb.) yardımıyla elimine edilir. ROS üretimi ile detoksifiye edilmesi arasındaki denge korunmazsa mitokondriyal dejenerasyon meydana gelerek apoptoz tetiklenebilir [29, 33]. DOK kaynaklı kardiyotoksisitenin giderilmesinde, CAT ve SOD gibi hücre içi antioksidan proteinlerin aşırı ifadenmesi önemlidir. SOD, süperoksit anyon radikallerini hidrojen perokside (H_2O_2)'ye dönüştürürken CAT ve GPx H_2O_2 'yi suya detoksifiye eder [4, 15]. CAT'ın aşırı ifadenmesinin DOK toksisitesini azalttığını gösteren çalışmalar vardır [11]. DOK'un GPx, SOD ve CAT enzim aktiviteleri üzerine etkileri de araştırılmıştır. DOK tedavisi yapılan sıçanların kalp dokularında, SOD ve CAT enzim aktivitelerinin değişmediği ancak GPx aktivitesinin engellendiği saptanmıştır [4].

Doksorubisin NADPH oksidaz tarafından bir semikinon serbest radikaline indirgenir. Bu durumdaki DOK, süperoksit anyon radikalini oluşturmak üzere O_2 ile tepkimeye girer ve bu radikaller H_2O_2 'yi oluşturur. Demir varlığında H_2O_2 'den hidroksil radikali meydana gelebilir. Oluşan tüm bu radikaller DNA, lipid ve proteinlerde hasara neden olabilir [34].

1.5. ATP Duyarlı Potasyum Kanalları

ATP-duyarlı potasyum kanalları (KATP) metabolik stres durumunda aktive olan tek kanaldır. Bu kanalların ana düzenleyicisi hücre içi ATP:ADP oranıdır. Bu duyarlılıktan dolayı KATP kanalları, hücre içi değişen metabolik olaylara hücrel yanıt verirler [35, 36]. Bu kanalların açılması hücre içinden dışına doğru potasyum iyonlarının taşınması ile hücre aktivitesini azaltarak koruyucu rol oynar [16-18].

KATP kanallarının açılmasında etkili olan faktörler arasında yaşlanma, metabolizmanın değişmesi ve diğer iyon kanallarıyla olan etkileşim yer almaktadır [37]. KATP kanallarının alt tipleri bulunur ve bu tipler birbirinden hücre içi nükleotidlere ve farmakolojik ajanlara gösterdikleri duyarlılık farkına göre ayrılırlar [35].

KATP kanalları; insülin salgılanması, kalbin korunması, hücre stresine cevap verilmesi gibi birçok olayda görev alır [17]. Özellikle metabolik olarak yüksek aktivite gösteren dokularda bulunurlar. Kalp, beyin, böbrek, kas ve kan damarlarındaki KATP kanalları hücrel enerji düzeylerinin korunmasında sensör görevi üstlenirler. Metabolik stres esnasında sitoplazmadaki ADP/ATP oranını düzenler ve böylece hücre hiperpolarize edilir. Hücreye kalsiyum akışı azaltılır [38-40].

1.5.1. ATP Duyarlı Potasyum Kanallarının Tipleri

Kalp, beyin, böbrek, kas ve kan damarlarında KATP kanalları vardır ve kardiyovasküler dokularda bol miktarda üretilir [41]. KATP, por kısmı Kir ve düzenleyici sülfonilüre reseptörü (SUR) adı verilen alt birimlerinden oluşan hetero-oktamerik komplekstir. Kir'in Kir6.1 ve Kir6.2 olmak üzere iki, SUR'un SUR1 ve SUR2; ayrıca SUR2'nin de SUR2A ve SUR2B olmak üzere alt tipleri bulunmaktadır [35, 41, 42]. Düz kastaki KATP kanalının açılması hücre içi ATP değişikliklerinden neredeyse hiç etkilenmez, bu kanalların açılması nükleotid difosfat varlığına bağlıdır [36]. Keşfedildiği 1983 yılından günümüze kadar KATP'nin açık ya da kapalı pozisyonunun düzenlenmesinde hücre metabolizmasının, farmakolojik ajanların ve bazı hücre sinyal yollarının önemli roller üstlendiğine dair bulgular vardır [43]. KATP, hücrelerin elektriksel potansiyelinde yaptığı değişikliklerle patofizyolojik koşullara karşı koruyucu bir rol oynar [37]. Yapılan çalışmalarda düzenleyici kısım olan SUR'un hücre içi ATP miktarına duyarlı olduğu gösterilmiştir. Sağlıklı hücrelerin sitoplazmasında yeterli miktarda olması nedeniyle ATP, SUR alt birimi ile etkileşerek kanalın kapalı pozisyonda kalmasını sağlar. Metabolik stres gibi patolojik koşullar altında ATP miktarında meydana gelen azalma ile bu etkileşim ortadan

kalkar ve kanal açılır. KATP'nin açılması ile hücre metabolizması yavaşlar ve böylece koruyucu özelliği ortaya çıkar.

KATP'nin yapısı dokudan dokuya farklılık göstermektedir. Örneğin ventriküler kalp kası hücrelerinde KATP, Kir6.2 ve SUR2A'dan oluşurken, pankreasda Kir6.2 ve SUR1'den, kan damarlarında Kir6.1 ve SUR2B'den oluşmaktadır [36, 37]. SUR'lara sülfonilürelerin bağlanması pankreatik β hücrelerinde KATP'lerin kapanmasına neden olur. Bu da hücreyi depolarize ederek L-tipi Ca^{2+} kanallarının açılmasıyla insülin sekresyonunu sağlar [40].

1.5.2. ATP Duyarlı Potasyum Kanallarının Kalp Patolojileri ile İlişkisi

ATP duyarlı potasyum kanalları, doku iskemisi ve iskemik reperfüzyon hasarı gibi patolojik olayların yanında yaşlanma gibi olgularda da önemli ve yararlıdır [37]. Çalışmalar genel olarak mitokondriyal KATP kanallarının koruyucu rolü üzerine yoğunlaşmış olsa da sarkolemmal KATP kanallarının KATP kanal alt birim eksikliği olan farelerde iskemi ve iskemik ön koşullanmada koruyucu rol üstlendiği de göstermiştir [19, 37].

KATP ifadenmesinin kalp rahatsızlığı olan hastalardaki miktarı bilinmemekle birlikte artan ifadenmenin hastalık sonrası kalbin korunmasına yardımcı olabileceği öne sürülmüştür. Hafif kronik iskemi durumunda KATP'nin sinyal yollarının aydınlatılamamış olmasına karşın akut şiddetli iskemi yapılan sıçanlarda KATP'nin Kir6.1 alt tipinin ifadenmesinin arttığı gösterilmiştir [39].

1.6. AMP ile Aktive Olan Protein Kinaz

Tüm ökaryotik canlılarda bulunan AMPK (5'-adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz) hücresel olayları düzenlemede ve hücrenin enerji sensörü olarak görev yapmaktadır. AMPK hücresel enerjinin azalması ile aktive edilir [18, 41]. Aktive edildiğinde, ATP üretimini artırmak ve sağkalım yolağını indüklemek için çeşitli yolları başlatırken ATP tüketim yollarını kapatır [25, 35].

AMP ile aktive olan kinaz α , β ve γ olmak üzere 3 alt birimden oluşur, her bir alt birimin birden fazla izoformu (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2 ve γ_3) vardır. Bu izoformların ifadenmesi farklı genler tarafından sağlanır. Hücrel enerji dengesi α alt birimi tarafından sağlanır. β ve γ alt birimleri düzenleyici alt birimlerdir [25, 44]. AMPK α 1 alt ünitesi karaciğer, yağ doku, pankreas adacık hücreleri, endotel ve vasküler düz kasta bulunur. Metabolizmanın ve kan damarlarının kasılmasının düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir. AMPK α 2 alt ünitesi ise iskelet ve kalp kasında β alt ünitesi, α 1-2 ve γ alt ünitelerinin bağlanmasını sağlayan bir iskelet görevi görmektedir. γ alt ünitesi ise AMP ve ATP'nin bağlanma bölgelerini taşımaktadır [25, 35, 45].

Sıçan kalp kası primer hücre hattı izole edilerek yapılan bir çalışmada AMPK ile KATP arasında hem işlevsel (patch clamp) hem de proteinel ilişki saptanmıştır [35, 37]. Metabolik strese yanıt olarak, AMPK, ATP'nin tükenmesi sonucu AMP düzeyindeki küçük artışlar yoluyla aktive edilerek hücrel enerjiyi dengelemek için çok sayıda metabolik yolu düzenler. ATP tüketim yolları inhibe edilirken ATP sentez yolları aktive edilmektedir [35, 46]. Bunlara ek olarak, AMPK, LKB1, TSC2 ve p53 dahil olmak üzere çeşitli tümör baskılayıcıları aracılığıyla apoptozu indükler [25, 46]. LKB1 AMPK'nın yukarı aktivasyon kinazıdır ve TSC2 ile p53 doğrudan AMPK'nın substratlarıdır [25, 46]. Özetle AMPK, bir yandan hücre içindeki enerji dengesini diğer yandan da apoptozu teşvik etmek dahil önemli hücrel işlevleri düzenler [47].

AMP ile aktive olan kinaz aktivitesindeki artış; kas kasılmasındaki artış, hipoksiya, iskemi, ısı şoku, pH düşüşü, glikoliz inhibisyonu gibi metabolik stres durumları aracılığıyla olur. Stres koşulları altında düzenleyici rol oynamanın yanı sıra, AMPK karaciğerde glukoz uyarımı dahil olmak üzere, pankreas adacıklarından insülin aktivitesi sağlama, vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) uyarımı ve iskelet kasında anjiyojenez ve vasküler endotel hücrelerinde NO uyarımı gibi görevleri de üstlenmektedir. AMPK'nın hedefi olan bazı iyon kanalları tespit edilmiştir ve epitel sodyum kanallarının AMPK tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir [35]. Kalpte AMPK'nın aktivasyonu, diğer dokuların aksine, şiddetli enerji yoksunluğu ve kardiyak iskemi gibi patolojik durumlarda son korunma aracı gibi davranır [46]. Çalışmalarda ROS varlığında DOK'un AMPK aktivitesini

indükleyerek kanser hücrelerinin apoptozuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir [47]. Fakat H₂O₂'nin AMPK'nın aktivasyonunu azalttığı kanıtlanmıştır [45].

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Yumuşak doku tümörlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan DOK faklı mekanizmaların işlediği süreçler sonunda başta kalp olmak üzere birçok organda toksik etkiye neden olmaktadır. Farklı dokularda DOK-indüklü toksisite için oksidatif stres ana mekanizma olarak ileri sürülmektedir. Bu çalışmaların birçoğunda antioksidant terapinin DOK-indüklü toksisiteden korunmada yararlı olacağı önerilmektedir.

Doksorubisin uygulanan sıçanların böbrek dokusunda antioksidant molekül glutasyon miktarı ile antioksidant enzimler olan CAT, SOD, GPx ve glutasyon S-transferaz (GST) aktiviteleri azalırken lipit peroksidasyonu düzeylerinde artış meydana gelmiştir. Antioksidant molekül protocatechuic asidin doksorubisinden önce uygulanması oksidatif stres parametrelerinde düzelmeye yol açmıştır [48].

Doksorubisin uygulanan erkek sıçanlarda azalan serum SOD aktivitesinin ve artan serum lipit peroksidasyonu düzeylerinin fluvastatinin DOK tedavisinden önce ya da sonra uygulandığı gruplarda kontrol düzeylerine doğru iyileşme gösterdiği belirlenmiştir [49]. Bu sonuçlara göre fluvastatinin antioksidan savunmayı uyararak DOK-indüklü testis dokusu apoptozuna karşı koruma sağlayabileceği bildirilmiştir.

Doksorubisin uygulanan Swiss albino sıçanların böbrek dokusunda azalan SOD aktivitesi ile glutasyon miktarı ve artan lipit peroksidasyonu düzeyleri antioksidant alfa-lipoik asit etkisinde iyileşme göstermiştir [50]. Benzer bir durum, DOK'un neden olduğu apoptotik markerlarda da ölçülmüştür. Alfa-lipoik asidin antioksidan ve antiapoptotik etkileri ile DOK toksisitesine karşı koruyucu olabileceği bildirilmiştir.

Doksorubisin etkisindeki Sprague-Dawley sıçanlarının karaciğer dokusunda artan lipit peroksidasyonu düzeyleri ile azalan SOD, GPx ve CAT antioksidan enzim aktiviteleri pravastatin uygulanan sıçanlarda kontrol düzeylerine değişim göstermiştir [51].

Kardiyotoksisite DOK tedavisinde en yaygın görülen yan etkilerden bir tanesidir [52]. DOK'un neden olduğu kardiyotoksisiteyi gidermeye yönelik birçok çalışma yapılmıştır.

Antioksidan etkileri bilinen flavonoid apigenin, DOK uygulanan erkek sıçanlarda, kalp dokusunda azalan SOD aktivitesi ile artan lipit peroksidasyonu miktarının kontrol düzeylerinde iyileşmesine neden olmuştur [52]. Apigenin DOK'un neden olduğu apoptotik protein artışı ve antiapoptotik protein azalmasına karşı da etki göstermiştir.

Doksorubisin etkisindeki 129/sv farelerinde artan ROS miktarı ve lipit peroksidasyonu düzeyleri, azalan SOD, CAT, GPx ve GST protein transkriptleri ile artan apoptotik Bax ve azalan antiapoptotik Bcl-2 protein düzeyleri, bir flavonoid olan genistein etkisinde kontrol düzeylerine iyileşme göstermiştir. Bu sonuçlara göre genistein antioksidan savunma ile ilgili sinyal mekanizması aracılığı ile DOK'un prooksidant ve proapoptotik özelliğine karşı koruyucu etki göstermektedir [53].

Doksorubisinin kardiyotoksik etkilerine karşı koruyucu etkisini araştırdığımız diazoksit (DIA) potasyum kanalı aktivatörü olarak hücre membranının potasyum iyonlarına karşı geçirgenliğinde artışa neden olmaktadır.

Fare insülinoma hücre hattında DIA, glukoz varlığında palmitik asidin neden olduğu Ca^{2+} iyon ve apoptotik hücre artışını engelleyerek yararlı etki göstermiştir [54]. Palmitik asit indüklü endoplazmik retikulum stresine karşı yalnızca glukoz varlığında Ca^{2+} salınımını engelleyerek, DIA koruyucu etkili olmuştur.

Amiloid beta proteini ($A\beta$) nöronal hücrelerde oksidatif stres yoluyla hücre ölümüne yol açarak Alzheimer hastalığının patojenezinde önemli bir rol oynamaktadır. Wistar sıçan kolinerjik nöron kültüründe DIA, $A\beta$ proteininin neden olduğu NADPH oksidaz 2 (NOX2) protein ifadenmesini ve dolayısıyla artan ROS miktarı ile lipit peroksidasyonu düzeylerini azaltarak yararlı etki göstermiştir [55].

Diazoksit, DOK etkisindeki Wistar sıçanların kalp dokusunda artan H_2O_2 ve troponin T miktarını azaltırken doku DOK birikimine etki etmemiştir. Mitokondriyal ATP duyarlı K kanallarının DOK indüklü toksisiteden korunmada önemli bir mekanizma sağladığı bildirilmiştir [56].

Ayrıca DIA'nın DOK kaynaklı toksisitesindeki olası etkilerini araştıran birkaç çalışma vardır. Bunlardan birisi, DOK uygulamasından yarım saat önce DIA uygulanan dişi farelerde, DOK'un neden olduğu kalp fonksiyon kayıplarının azaldığı rapor edilmektedir. DIA'nın bu iyileştirici etkisinde SERCA-II proteininde yaptığı

artışa ve fosfolamban proteininde yaptığı azalmaya bağlı olarak hücre içi kalsiyum homeostazisinin yeniden sağlanmasının katkısının olabileceği vurgulanmaktadır.

Başka bir çalışmada ise, gap kavşakların önemli bir bileşeni olan konneksin-43'ün mitokondri membranında bulunduğu ve DOK'un bu proteinin miktarında azalmaya neden olduğu rapor edilmektedir. DIA'nın ise DOK etkisiyle azalan konneksin-43 proteininde artışa neden olduğu savunulmaktadır [57].

Doksozobisin terapisinden önce DIA uygulanan sıçanlarda, DOK kaynaklı kalp hasarının azaldığı bildirilmektedir. Bu çalışmanın sonucuna dayalı olarak araştırmacılar DIA'nın DOK'un neden olduğu kalp fonksiyon hasarına karşı mitokondriyal KATP'lerin açılmasına bağlı azalan oksidatif stres aracılığıyla koruyucu olabileceği kanısına varmışlardır [56].

Yine DIA gibi başka mitokondriyal KATP kanal açıcıların DOK kaynaklı kalp toksisitesine karşı koruyucu olduğuna dair çalışmalar da mevcuttur.

Bir diğer mitokondriyal ATP'ye bağlı potasyum (mitoKATP) kanal açıcısı olan nikorandil (2-nikotinamidoetil-nitrat ester)'in özellikle NO ile aktifleşerek anjina pektoris ve akut kalp yetmezliği tedavisinde kullanıldığı bildirilmektedir [17].

Çalışmamızda amacımız, DOK etkisindeki sıçan kalp kası hücre hattında KATP kanal açıcısı olan DIA'nın koruyucu etki mekanizmasının; antioksidan enzim aktivitesinin, oksidatif stres durumunun, F-aktin organizasyonunun, mitokondriyal membran potansiyelinin, apoptotik hücre sayısının ve bazı protein ifadelendirmelerinin ölçülmesi aracılığıyla, araştırılmasıdır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM**3.1. Kimyasal Maddeler**

1. Dulbecco's Modified Eagle's Medium besi yeri (DMEM) Sigma-Aldrich
2. Fetal sığır serum albümini (FBS) Sigma
3. Glutamin Gibco
4. Streptomisin Gibco
5. Penisilin Gibco
6. Diyazoksit Sigma-Aldrich
7. Doksorubisin Sigma-Aldrich
8. SuperSignal™ Western blot enhancer Invitrogen
9. Fosfat ile tamponlanmış tuz-tris tamponu (PBS-T) Invitrogen
10. Alkalin fosfataz çözeltisi Thermo-Fisher
11. TAS/TOS kiti Reel Assay
12. SOD kiti Abcam
13. 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide (JC1) Sigma-Aldrich
14. TUNEL kiti Roche
15. Triton X-100 Sigma
16. PVDF membran Invitrogen
17. Tripsin EDTA Gibco
18. Paraformaldehit Sigma-Aldrich
19. Dimetil sülfoksit (DMSO) Sigma-Aldrich
20. Embriyonik sıçan kalp kası hücre hattı (H9c2) Prof.Dr. Belma
TURAN'dan hediye
21. Oje

3.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler

1. İnkübatör Thermo Scientific
2. Hücre kültür flaskları ISOLAB

3. Hücre kültür plakaları	Eppendorf
4. Jel elektroforez tankı	Invitrogen
5. iBlot cihazı	Invitrogen IB1001EU
6. Orbital karıştırıcı	Cleaver Scientific
7. Coverslip	ISOLAB
8. Lam	ISOLAB
9. Pastör pipeti	ISOLAB
10. İmmüno Floresan mikroskop	Olympus BX51
11. ELISA okuyucu	BioTek μ Quant Microplate Spectrophotometer
12. Otomatik pipet seti	Axygen AxyPet
13. Otomatik pipet seti	Eppendorf
14. Distile Su Cihazı	Millipore Rios 8
15. Pens	
16. Sıvı azot tankı	International Cryogenics, Inc.
17. Santrifüj	Hettich-Universal 32
18. Inverted mikroskop	Olympus 1M
19. Cryo tüpü	ISOLAB
20. Falkon tüpü	ISOLAB

3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmamızda embriyonik sıçan kalp kası hücre hattı (H9c2) kullanıldı.

3.3.1. Sıvı Azotta Saklanan H9c2 Hücrelerinin Hazırlanması

Cryo tüpleri içerisinde -196°C sıvı azot tankının içinde saklanmakta olan hücreler 37°C sıcaklıkta çözüldü. Hücrelerin saklandığı ortamda bulunan DMSO'nun toksik etkisinin azaltılması amacıyla ortama 5-6 mL complete-DMEM (c-DMEM) ilave edilerek santrifüj edildi. Bu işlem iki defa tekrar edildi ve her bir santrifüj işlemi sonunda süpernatant uzaklaştırıldı. DMSO ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra hücreler çoğaltılmak üzere flasklara ekildi.

3.3.2. H9c2 Hücrelerinin Çoğaltılması

H9c2 hücre hattı; DMEM besiyerine %10 sığır serum albumini, 2 mM glutamin ve 100 IU/mL penisilin, 0,1 mg/mL streptomisin antibiyotikleri ilave edilerek (c-DMEM) hücre kültür flasklarında 37°C ve %5 karbondioksit (CO₂) koşullarındaki inkübatörde çoğaltıldı. 2-3 günde bir inverted mikroskop altında büyümeleri takip edildi. Yeterli çoğunluğa (%80) ulaştıktan sonra kültür besiyerinden uzaklaştırıldı ve flasklara 8-10 mL Tripsin-EDTA çözeltisi eklendi, 37°C'de %5CO₂'li inkübatörde 5 dakika inkübe edildi. Yüzeyden kaldırılan hücreler, daha sonra tripsinin uzaklaştırılması için pipet yardımıyla 15 mL'lik steril falkon tüplerine alındı. Falkon tüplerine 5 mL c-DMEM eklendi ve 4000 rpm'de 4 dak. santrifüj edilerek süpernatant uzalaştırıldı. Dipte kalan pellet kısmı 5 mL c-DMEM içerisinde çözdürüldü.

3.3.2.1.Hücre sayısının belirlenmesi

Santrifüjlüme işlemi sonrası pellete c-DMEM eklenerek elde edilen süspansiyondan Thoma lamına 10 µL damlatıldı. Lam üzerinde rastgele seçilen 10

karedeki hücre sayısı, mL'deki ortalama hücre sayısı şeklinde belirlendi. Hücreleri çoğaltmak için 75 mL'lik flasklara ekim yapıldı.

3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması

“KATP kanallarının açılması doksorubisinin kardiyotoksik etkisini azaltır” hipotezini test etmek amacıyla H9c2 hücre hattı ile;

	Gruplar	Uygulama Süresi
1	Kontrol	24 saat
2	Diyazoksit (100 μ M)	24 saat
3	Doksohubisin (2,6 μ M)	24 saat
4	Diyazoksit (100 μ M) + Doksohubisin (2,6 μ M)	24 saat

olmak üzere 4 deney grubu oluşturuldu. Her bir deney grubu 4 tekrarlı olacak şekilde yapıldı.

1. Kontrol Grubu: Besiyerinin olası etkilerine karşı duyulan şüpheyi gidermek ve diğer gruplardaki değişiklikleri anlayabilmek amacıyla kontrol grubu oluşturuldu. Kontrol grubunu içeren plakadaki her bir kuyucuğa 140 μ L hücre kültürü ve 860 μ L DMEM eklendi.
2. Diyazoksit Grubu: KATP açıcısının tek başına etkisinin olup olmadığına dair şüpheleri gidermek ve Diyazoksit+Doksohubisin grubunun etkisini anlayabilmek amacıyla oluşturuldu. H9c2 hücre hattı 100 μ M DIA ile 24 saat süreyle inkübe edildi.
3. Doksohubisin grubu: DOK'un tek başına oluşturduğu toksisiteyi ve Diyazoksit+Doksohubisin grubunda DIA'nın DOK toksisitesine etkisini anlamak üzere oluşturuldu. Kanser hastalarının DOK verildikten sonra plazmalarında ölçülen DOK derişimi 1-5 μ M'dir. Çalışmamızda 2,6 μ M derişiminde DOK H9c2 hücre hattına 24 saat süreyle uygulandı.
4. Diyazoksit+Doksohubisin Grubu: “KATP kanallarının açılması doksohubisinin kalp üzerinde toksik etkisini azaltır.” hipotezini desteklemek amacıyla bu deney

grubu oluşturuldu. 2.6 µM DOK ve 100 µM DIA, H9c2 hücre hattına 24 saat süreyle uygulandı.

Deney grupları oluşturulduktan sonra hücreler, 37°C ve %5 CO₂ koşullarındaki inkübatörde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonunda aşağıda belirtilen analizlere geçildi.

3.5. Oksidatif Stres Parametrelerinin Saptanması

Numunelerdeki total oksidan/antioksidan seviyesi spektrofotometrik yöntemler ile mikropłaka okuyucuda ölçüldü. Ölçümler için ticari kit kullanıldı.

3.5.1. Total Antioksidan Durumun Ölçülmesi

Numunelerin içerdiği antioksidan maddeler koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini renksiz ABTS formuna indirger. 660 nm'deki absorbans (Abs) değeri, numunenin toplam antioksidan seviyesi ile ilişkilendirilir.

Birinci Abs ölçümü için standart ve örneklerden 7,5 µL plaka kuyucuklarına alındı ve üzerine 125 µL Reagent 1 eklendi. Ölçüm 660 nm dalga boyuna ayarlanmış ELISA okuyucu cihazında yapıldı. İkinci Abs ölçümü için kuyucuklara 18,75 µL Reagent 2 eklenerek oda sıcaklığında 10 dak. bekletildi ve sürenin sonunda 660 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Sonuçlar deklemler ile hesaplanarak, µmol Trolox Eq/L olarak ifade edildi. Çalışma standardı deiyonize su ile seyreltildi.

Hesaplama:

$$\text{Sonuç} = [(\Delta\text{Abs Std1}) - (\Delta\text{Abs Numune})] / [(\Delta\text{Abs Std1}) - (\Delta\text{Abs Std2})]$$

$\Delta\text{Abs Std1} = (\text{Standart 1'in ikinci Abs değeri} - \text{Standart 1'in birinci Abs değeri})$

$\Delta\text{Abs Std2} = (\text{Standart 2'nin ikinci Abs değeri} - \text{Standart 2'nin birinci Abs değeri})$

$\Delta\text{Abs Numune} = (\text{Numunenin ikinci Abs değeri} - \text{Numunenin birinci Abs değeri})$

3.5.2. Total Oksidan Seviyenin Ölçülmesi

Çalışma, örnekte bulunan oksidanların, demir iyonu-şelatör kompleksindeki ferröz demiri ferrik iyonla oksitlemesi prensibine dayanır. Ferrik iyon, asidik ortamda kromojen ile renkli bir kompleks yapar. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, örnekte bulunan toplam oksidan molekül miktarı ile ilişkilendirilir. Kalibrasyon H₂O₂ ile yapıldı. Çalışma standardı deiyonize su ile seyreltildi. Birinci Abs ölçümü için standart ve numunelerden 18,75 µL plaka kuyucuklarına alındı ve üzerine 125 µL Reagent 1 eklendi. 530 nm’de Abs ölçümü yapıldı. İkinci Abs ölçümü için kuyucuklara 6,25 µL Reagent 2 eklenerek oda sıcaklığında 10 dak. bekletildi. 660 nm dalga boyunda Abs ölçümü yapıldıktan sonra sonuçlar litre başına µM H₂O₂ eşdeğeri (µmol H₂O₂ Equiv/L) cinsinden ifade edildi.

Hesaplama:

$$\text{Sonuç} = (\text{AbsNumune}/\text{AbsStandart2}) \times 20(\text{Standart2 Değeri})^*$$

Numune Absorbansı (AbsNumune) = (Numunenin İkinci Abs - Numunenin İlk Abs)

$$\text{Absorbans Standart 2} = (\text{Standart 2'nin İkinci Abs} - \text{Standart 2'nin İlk Abs})$$

$$*\text{Standart2 Değeri} = 20 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eşdeğeri/L}$$

3.5.3. Oksidatif Stres İndeksinin Hesaplanması

Oksidatif stres indeksi (OSI) aşağıdaki denklem yardımıyla hesaplandı:

$$\text{OSI (Arbitrary unit): TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}) / \text{TAS } (\mu\text{mol Trolox Eq/L})$$

3.5.4. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Süperoksit dismutaz (SOD) önemli antioksidan enzimlerden biridir. Satın alınan bir SOD kiti kullanılarak kolorimetrik ölçüm yapıldı (Abcam; ab65354). Üretici firmanın önerdiği şekilde aşağıdaki çizelge kullanılarak hazırlanan örnek ve körler 37°C’de 20 dak. inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından ölçüm 450 nm dalga boyuna ayarlanmış ELISA okuyucu cihazında (BioTek μ Quant Microplate Spectrophotometer) yapıldı ve değerler % inhibisyon oranı olarak verildi.

Çizelge 3.1. SOD ölçümü için kullanılan maddeler ve miktarları

Madde	Örnek (μ L)	Kör 1 (μ L)	Kör 2 (μ L)	Kör 3 (μ L)
Örnek miktarı	20	0	20	0
ddH ₂ O	0	20	0	20
WST çalışma solüsyonu	200	200	200	200
Enzim çalışma solüsyonu	20	20	0	0
Sulandırma tamponu	0	0	20	20

3.6. Western Blot Yöntemiyle Hedef Proteinlerin Derişimlerinin Belirlenmesi

Elektroforez cihazına, camlar arasında, hazır akrilamid jel (%10'luk) yerleştirildi. Cihaz ünitesi elektroforez tamponu (0,025 M Tris baz, 0,192 M glisin ve %0,1 SDS) ile dolduruldu. Proteinler elektroforez yöntemiyle moleküler ağırlıklarına göre bantlar halinde ayrıştırılmak üzere markır ve örneklerden eşit miktarda (100 μ g'lık protein olacak şekilde) jeldeki kuyucuklara yüklendi. Yükleme yapıldıktan sonra tankın tamamı tampon ile dolduruldu ve örnekler 130 volt altında yaklaşık 1 saat boyunca yürütüldü. Sürenin sonunda jel, camdan ayrıldı ve membrana transfer işlemi için hazırlandı. Proteinlerin membrana transferi için işlem basamakları (sünger- blot kâğıdı- jel- PVDF membran- blot kâğıdı- sünger) izlendi ve akrilamid

jel blotlama cihazına yerleştirildi. Transfer işlemi 10 dak.'da yapıldı. Ardından bantların daha net ve belirgin görünmesi için bir sinyal artırıcı çözelti membrana uygulandı. Sinyal artırıcı uygulanan membran 15 dak. orbital karıştırıcıda çevrildi, böylece sinyal artırıcı ile yeterince etkileşmesi sağlandı. Süre sonunda membran üç kez distile su ile yıkandı. Membranla antikorlar arasındaki non-spesifik proteinleri bloklamak için, orbital karıştırıcı üzerinde 1 saat boyunca, %5'lik FBS ile doyurma işlemi yapıldı. Doyurma işleminden sonra membranlar, TBS-T çözeltisi (0,02 M Tris baz, 0,14 M NaCl ve %0,2 Tween-20) ile 5'er dak. aralıklarla üç kez yıkandı. Proteinlerin tanımlanması için her bir birincil antikor (SUR2A, Kir6.2, ERK1/2, AMPK, NF-κB ve sitokrom c) protokolüne göre %5'lik PBS-T ile 1/500 oranında seyreltildi. Bu durumda bloklama tamponu olarak sinyal artırıcı eklendi. Birincil antikorlarla yeterince etkileşmesi için membran, orbital karıştırıcı yardımıyla +4°C'de bir gece çevrildi. İkincil antikorlar (anti-tavşan ve anti-fare) ile etkileşime sokulmadan önce membran, PBS-T ile 10'ar dak. aralıklarla üç kez orbital karıştırıcı yardımıyla yıkandı. İkincil antikorlar bloklama tamponu (%5 BSA+PBS-T) içinde protokolüne uygun şekilde 1/3000 oranında seyreltildi. Membran ikincil antikorlar ile 1 saat oda sıcaklığında orbital karıştırıcı yardımıyla inkübe edildi. Süre sonunda membran, her biri 10 dak. olmak üzere üç kez PBS-T çözeltisi ile yıkandı. Alkalen fosfataz substratı içeren BCIP/NBT çözeltisi yardımı ile görüntüleme işlemi yapıldıktan sonra standart molekül ağırlıklarına sahip markır kullanılarak hedeflenen proteinler görüntülendi.

3.7. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Ölçülmesi

JC-1, mitokondriyal membran potansiyelini ölçmek için kullanılan çift emisyonlu, zar potansiyeline duyarlı floresan bir boyadır. Sağlıklı hücrelerde mitokondriyal membran potansiyeli yüksektir ve JC-1, 560 - 595 nm'de sırasıyla geniş uyarma ile çok dar emisyon spektrumları sergileyen kırmızı J-agregatlar oluşturur. Apoptotik hücreler ya da sağlıklı hücrelerde (depolarize) düşük membran potansiyelinden dolayı JC-1 boyası birikmediği için 485 - 535 nm'de yeşil J-agregatlar oluşur. Mikroskopik inceleme sırasında apoptotik olmayan hücrelerde sitozol kırmızı renkli, apoptotik hücrelerde ise yeşil renkli olarak görüntülenir. JC-

1'in kırmızı-yeşil floresan oranı sadece membran potansiyeline bağlıdır ve mitokondriyal boyut, şekil veya yoğunluktan etkilenmez.

Daha öncesinde hazırlanan her bir örnek plaka kuyucuklarına konuldu ve 6 µM JC-1 boyası eklenerek 90 dak. oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübe edildi. 90 dak. sonunda örnekler ayrı ayrı JC1 yıkama çözeltisi ile 2 defa yıkandı. JC-1 ışınması DP72 kameralı Olympus BX51 mikroskobu yardımı ile görüntülendi.

3.8. İmmüno Floresans Yöntemi ile Apoptotik Hücre Sayısının Belirlenmesi

Apoptotik hücre sayısını belirlemek üzere TUNEL (Roche) kiti kullanıldı. Oluşturulan deney gruplarındaki H9c2 hücreleri yöntemin uygulanabilmesi için flaskların içine yerleştirilen cam coversliplere ekildi, 24 saat sonunda işleme alındı. Çalışma için taze %4'lük paraformaldehit hazırlandı (4 g toz paraformaldehit, 100 mL PBS'de çözüldü) ve hücreler 40 dak. boyunca 37°C' de %5 CO₂ koşullarında inkübe edildi. 3 defa PBS ile yıkama yapıldı. Hücre porlarının geçirgenliğinin artırmak ve böylece TUNEL kitinin hücrelerin içine kolay nüfuz edebilmesini sağlamak üzere %0,002'lik Triton X-100 deterjanı kullanıldı. Bu işlem buz üzerinde 10 dak.'da yapıldı. TUNEL master karışımı her bir örneğe 50 µL olacak şekilde eklendi ve 80 dak. boyunca 37°C, %5 CO₂ koşullarında inkübe edildi. 3 defa PBS ile yıkama yapıldı. Cam coverslipler lama kapatılıp, kuruması beklendikten sonra, etrafı oje ile çizildi. Sonrasında immüno floresan mikroskobunda 20X, 40X ve 100X objektifte alan taramaları yapıldı. Elde edilen görüntülerde yalnızca apoptoza giden yani DNA kırıkları bulunan hücreler boyanır ve kırmızı floresan ışınma meydana gelir. Bu hücreler TUNEL pozitif hücre olarak değerlendirildi, sayıldı ve fotoğrafları çekildi. Normal hücreler ise siyah zemin içerisinde kalarak görünmemektedir. Bu işlemlerin tümü karanlık odada yapıldı. Apoptotik hücre sayılarının belirlenmesinde ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>, versiyon 1.52) programından yararlanılmıştır.

3.9. İstatistiksel Analiz

Analizlerden elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi IBM SPSS 22.0 paket istatistik programında (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22) yapıldı. Verilerin normalitesi Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildi. Normal dağılım gösteren veriler tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) testine tabi tutuldu. Bu test ile gruplar arasında fark görülmüşse öncelikle veri setlerinin Levene testi ile homojenitesi araştırıldı. Homojenlik gösteren veri setleri için gruplar arasındaki istatistiksel ayırım Duncan *post-hoc* testi ile, homojenlik göstermeyen veri setleri için gruplar arasındaki ayırım Tamhane's T2 *post-hoc* testi ile analiz edildi. Normal dağılım göstermeyen veri setleri arasındaki istatistiksel önem derecesi öncelikle Kruskal-Wallis testi uygulanarak belirlendi. Kruskal-Wallis testinde önem gösteren parametrelerde sürekli bir değişken yönünden bağımsız iki grup arasında fark olup olmadığını test etmek için Mann-Whitney *U* Testi uygulandı. Veriler aritmetik ortalama±standart hata şeklinde sunuldu ($P<0.05$).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA**4.1. BULGULAR****4.1.1. Oksidatif Stres Parametreleri**

Dokso rubisinin neden olduğu yan etkiler en fazla kalpte açığa çıkar. Bu da DOK kaynaklı yan etkinin en çok araştırıldığı doku olarak kalbi ön plana çıkarır. DOK kaynaklı kardiyak hasarın nedenleri tam olarak bilinmemektedir. Fakat, DOK'un yan etkilerinin ortaya çıkmasında oksidatif stresin önemli olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Yapılan bu tez çalışmasında total antioksidan ve oksidan durumu ile bu iki değer aracılığıyla hesaplanan oksidatif stres indeksi oksidatif koşulları belirleyebilmek üzere analiz edildi. Ayrıca önemli bir antioksidan enzim olan SOD aktivitesindeki değişim de ölçüldü (Çizelge 4.1.).

4.1.1.1. Total antioksidan durum

Grupların TAS değerleri arasında herhangi bir istatistiksel ayırım bulunamamıştır ($P>0.05$) (Çizelge 4.1.).

4.1.1.2. Total oksidan durum

Grupların TOS değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Çizelge 4.1.).

4.1.1.3. Oksidatif stres indeksi

Gruplar arasında OSI değerleri arasında istatistiksel düzeyde fark yoktur (Çizelge 4.1.).

4.1.1.4.Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi

Dokso rubisin SOD aktivitesinde azalmaya neden olmuştur (Çizelge 4.1.) ve bu azalma DIA grubuna göre de anlamlıdır ($P<0.05$). DIA uygulanan grupta da aktivitede azalma meydana gelmiştir. Bununla birlikte DOK'un DIA ile birlikte verildiği grupta SOD aktivitesi yalnızca DOK verilen gruba göre artarken yalnızca DIA uygulanan gruba göre istatistiksel önemde değildi (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Dokso rubisin, diyazoksit ya da birlikte uygulamalarından 24 saat sonra H9c2 hücre hattında oksidatif stres parametrelerindeki değişim

	TAS ($\mu\text{mol Trolox}$ Eq/L)	TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/L)	OSI (Arbitrary unit)	SOD (% inhibisyon)
Kontrol	2,209 \pm 0,607	25,758 \pm 2,377	84,04 \pm 15,90	69,067 \pm 0,742 ^a
DIA	3,582 \pm 0,745	33,671 \pm 3,059	102,06 \pm 22,75	47,106 \pm 1,461 ^b
DOK	3,058 \pm 0,670	26,126 \pm 1,830	76,16 \pm 13,05	25,507 \pm 4,002 ^c
DIA+DOK	2,625 \pm 0,411	28,330 \pm 2,803	103,87 \pm 19,30	48,607 \pm 3,330 ^b

DIA: Diyazoksit grubu, DOK: Dokso rubisin grubu, DIA+DOK: Diyazoksit+Dokso rubisin grubu, SOD: Süperoksit dismutaz, TAS: Total antioksidan durum, TOS: Total oksidan durum, OSI: Oksidatif stres indeksi. Veriler aritmetik ortalama \pm standart hata şeklinde sunulmuştur. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında istatistik fark bulunmaktadır ($P<0.05$; SOD, TAS ve TOS analizleri için $N=8$; OSI analizi için $N=5-7$).

4.1.2. Protein İfadesindeki Değişimler**4.1.2.1.SUR2A protein ifadesindeki değişim**

Doksorubisinin kardiyotoksitesisi üzerine KATP'nin etkisinin DIA aracılığı ile araştırıldığı bu tez çalışmasında, KATP'yi oluşturan protein alt birimlerinin miktar değişimleri de analiz edildi. Kalp kas hücrelerinde, KATP, Kir6.2/SUR2A alt birimlerinden oluşmaktadır. Kontrol grubu ile DIA grupları arasında SUR2A proteini bakımından fark bulunamamıştır. DOK grubunda ise kontrol ve DIA grubuna göre SUR2A protein ifadesi azaldı. DOK ve DIA'nın birlikte uygulandığı grupta SUR2A protein ifadesi, DOK grubuna oranla artış göstermesine karşın kontrol ve DIA gruplarına oranla daha düşük düzeydedir (Şekil 4.1.).

4.1.2.2.Kir6.2 protein ifadesindeki değişim

Kontrol ve DIA grupları arasında 24 saat uygulama süresi sonunda Kir6.2 protein ifadesi yönünden herhangi bir fark bulunamamıştır. H9c2 hücrelerinde, Kir6.2 protein ifadesi, 24 saat DOK etkisinden sonra kontrol grubuna oranla artış gösterdi. DIA+DOK grubunda ise Kir6.2 protein ifadesi DOK grubuna göre azaldı (Şekil 4.1.).

4.1.2.3.ERK1/2 protein ifadesindeki değişim

Mitojen ile aktive olan kinaz ailesi üyesi olan ERK1/2, proapoptotik yollar ve sağkalım yollarıyla ilişkilidir. Kontrol ve DIA gruplarına ait ERK1/2 protein ifadeleri arasında fark bulunamamıştır. 24 saatlik DOK etkisindeki grupta ise ERK1/2 protein ifadesi hem kontrol hem de DIA gruplarına oranla artış gösterdi. DIA+DOK grubunda ise DOK-indüklü ERK1/2 protein ifadesinde iyileşme görülmüştür (Şekil 4.1.).

4.1.2.4.AMPK protein ifadesindeki değişim

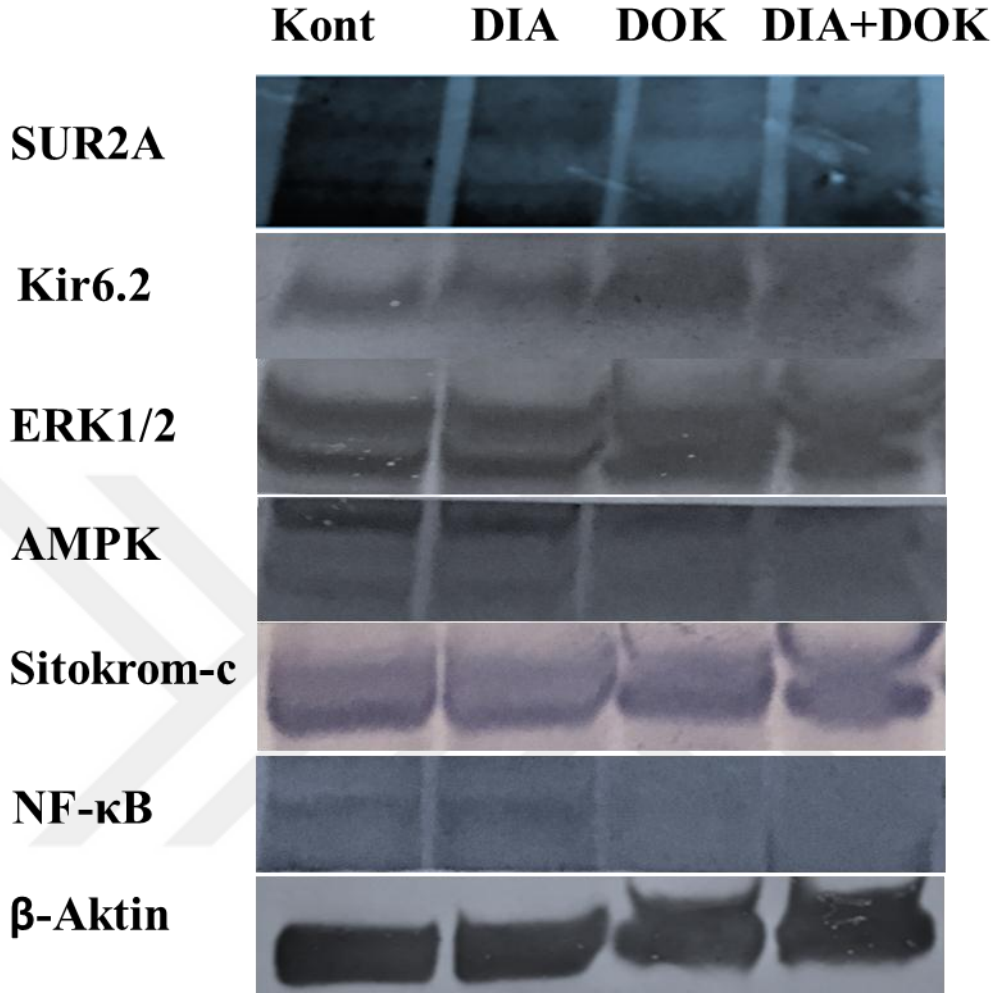
AMPK, hücrede meydana gelen enerji stresine duyarlı bir proteindir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrol ve DIA grupları arasında AMPK protein ifadesi yönünden herhangi bir fark bulunamamıştır. 24 saat DOK etkisinden sonra AMPK protein ifadesi azalırken, DIA, DOK'un AMPK proteini azaltıcı etkisi üzerinde herhangi bir aktiviteye sahip değildi (Şekil 4.1.).

4.1.2.5.NF-κB protein ifadesindeki değişim

NF-κB, MAPK yolağının son bileşeni proteinlerden bir tanesidir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrol ve DIA grupları arasında NF-κB protein ifadesi yönünden herhangi bir fark bulunamamıştır. 24 saat DOK etkisinden sonra H9c2 hücrelerinde NF-κB protein ifadesi hem kontrol hem de DIA grubuna göre azalma göstermiştir. DIA, DOK'un NF-κB proteini azaltıcı etkisi üzerinde herhangi bir aktiviteye sahip değildi (Şekil 4.1.).

4.1.2.6.Sitokrom c protein ifadesindeki değişim

Sitokrom c, ETS'de son elektron alıcısı olmasının yanında mitokondriyal apoptoz yolağının başlatılmasında da anahtar proteinlerden bir tanesidir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrol ve DIA grupları arasında sitokrom c protein ifadesi yönünden herhangi bir fark bulunamamıştır. Buna karşın, 24 saat DOK etkisi sonunda H9c2 hücrelerinde sitokrom c protein miktarında azalma meydana gelmiştir. DIA, DOK-kaynaklı sitokrom c azalmasını engelleyici etki yapmıştır (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Dokсорubisin, diyazoksit ya da birlikte uygulamalarından 24 saat sonra H9c2 hücrelerinde bazı protein ifadelerindeki değişim. Kont: Kontrol grubu, DIA: Diyazoksit grubu, DOK: Dokсорubisin grubu, DIA+DOK: Diyazoksit+Dokсорubisin grubu

4.1.3. Mitokondri Membran Potansiyeli

Yapılan çalışmalar, DOK'un plazmadan çok organellerde özellikle de mitokondride birikme eğiliminde olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla DOK'un yan etkileri de mitokondri hasarıyla ilişkilidir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrol ve DIA grupları arasında MMP yönünden herhangi bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.2. A , B). 24 saatlik etki süresi sonunda DOK, H9c2 hücre mitokondrilerinde

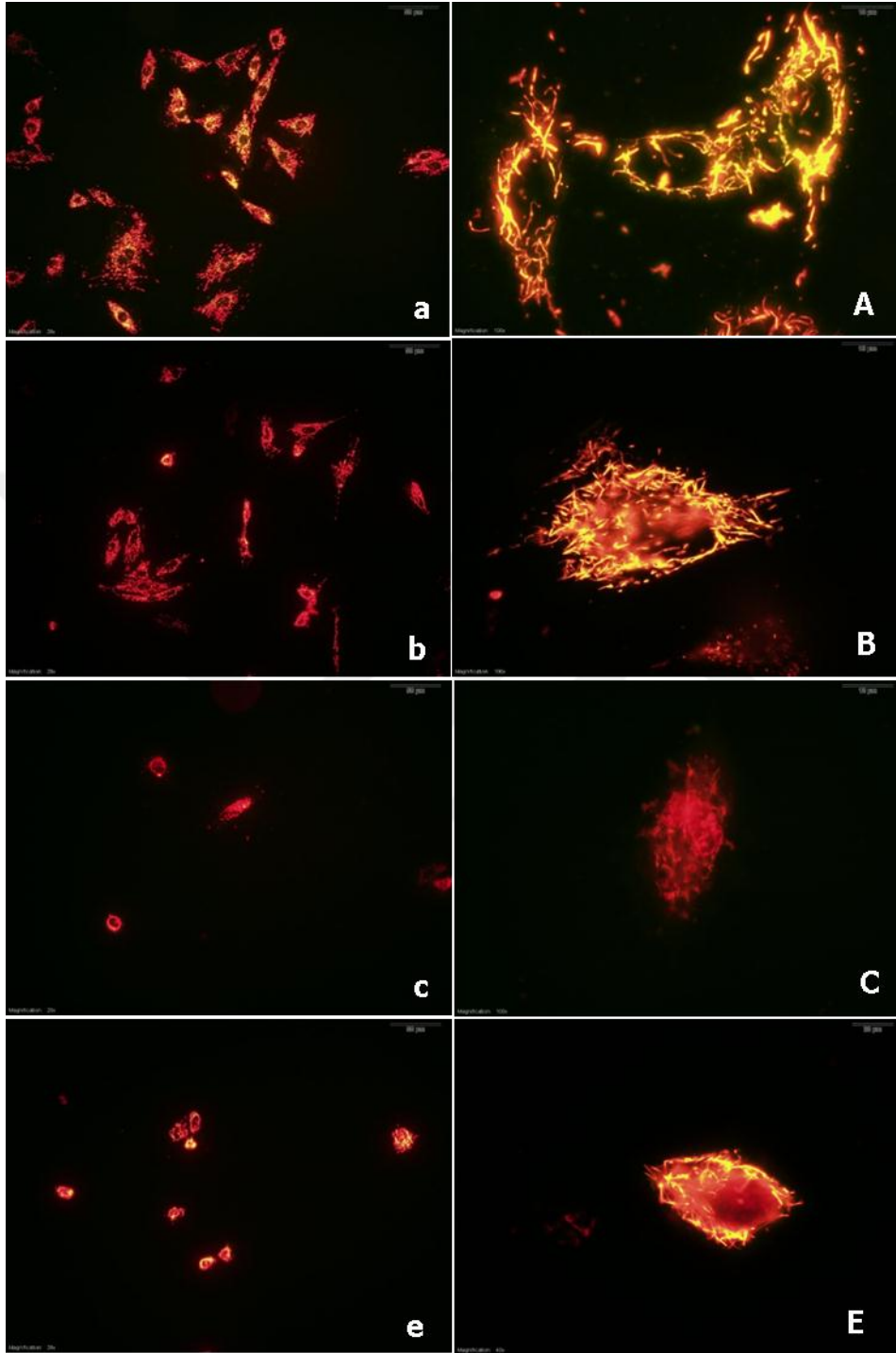
MMP'yi azaltarak depolarizasyona neden oldu. DIA, DOK varlığında meydana gelen MMP depolarizasyonunu düzeltici etki yapmıştır (Şekil 4.2. C, E).

4.1.4. F-Aktin Organizasyonu

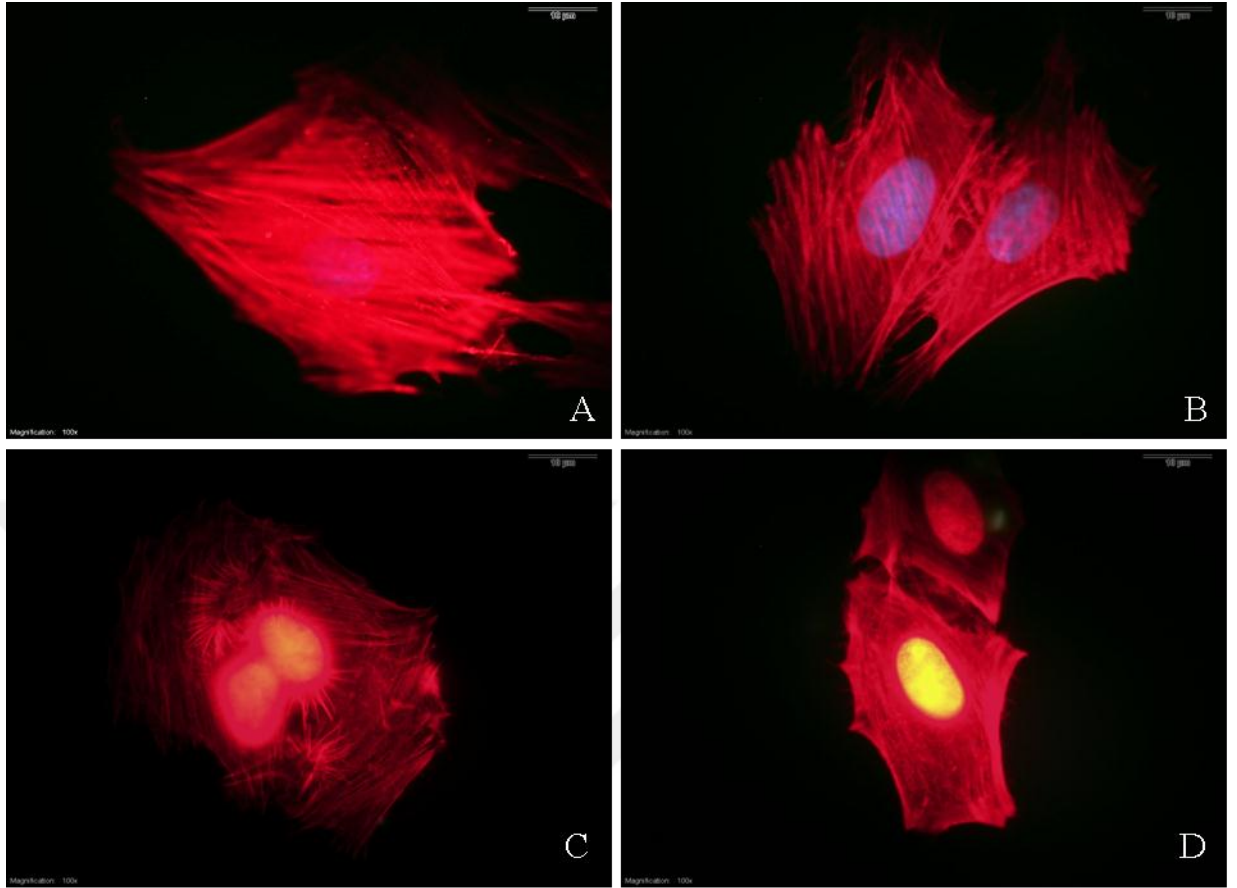
Hücre iskeleti elemanı olan F-aktin kasılabilen hücrelerde ve ayrıca madde transportu için elzemdir. DOK-indüklü kardiyotoksisite, kalbin kasılma kuvvetinde kalıcı kayıplara yola açarak ilerleyen zamanlarda dilate kalp yetmezliğinin gelişmesine neden olur. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrol ve DIA grupları arasında F-aktin organizasyonu yönünden herhangi bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.3. A, B). 24 saatlik etki süresi sonunda DOK, H9c2 hücrelerinde F-aktin organizasyonunun bozulmasına ve filopodiya oluşumuna neden oldu (Şekil 4.3. C). Buna karşın, DIA+DOK grubunda F-aktin organizasyonu, kontrol ve DIA gruplarına benzerdir, aynı zamanda filopodiya oluşumları da gözlemlenmemiştir (Şekil 4.3. D).

4.1.5. Apoptotik Hücre Sayıları

Doksorubisin-indüklü kardiyotoksisitede gözlenen en önemli sonuçlardan biri kalp kası hücre kayıplarına bağlı geri dönüşsüz kalp yetmezliğidir. Kalp hücresi kaybında apoptotik yolak önemli rol oynar. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrol ve DIA grupları arasında apoptotik hücre sayısı yönünden herhangi bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.4. A, B)

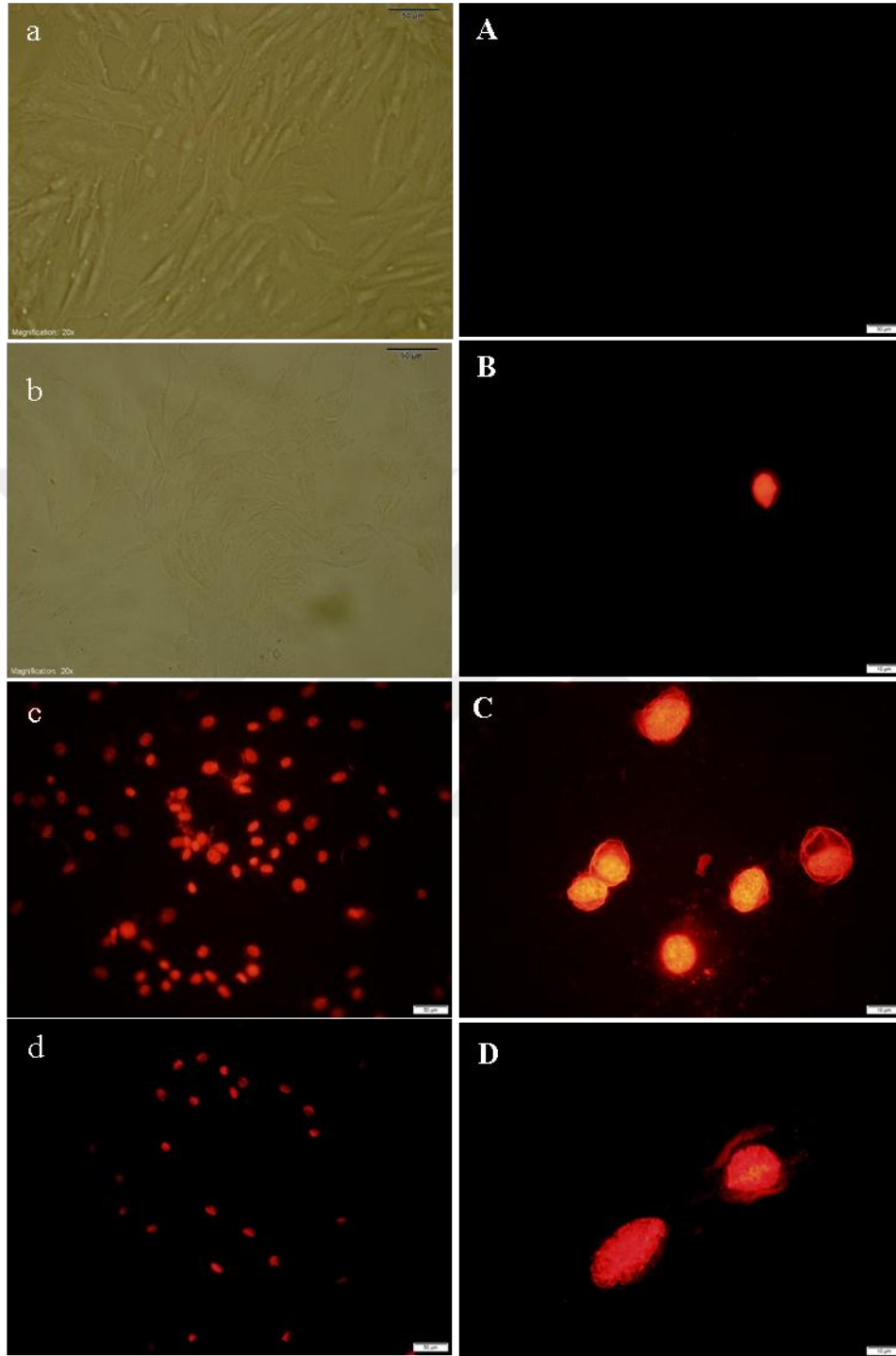


Şekil 4.2. Doksorubisin, diyazoksit ya da birlikte uygulamalarından 24 saat sonra H9c2 hücre mitokondrilerinde membran potansiyeli değişimi. A ve a: Kontrol grubu; B ve b: Diyazoksit grubu; C ve c: Doksorubisin grubu ve D ve d: Diyazoksit+doksorubisin grubu. Küçük harfler: 20X, büyük harfler: 100X büyütmedeki görüntülerdir.



Şekil 4.3. Dokсорubisin, diyazoksit ya da birlikte uygulamalarından 24 saat sonra H9c2 hücrelerinde F-aktin organizasyonunun gösterilmesi. A: Kontrol grubu, B: Diyazoksit grubu, C: Dokсорubisin grubu, D: Diyazoksit+Dokсорubisin grubu. Fotoğraflar 100X objektif görüntüleridir.

24 saatlik etki süresi sonunda DOK, apoptotik hücre sayısının kontrol ve DIA gruplarına oranla önemli düzeyde artışına neden olmuştur ($P<0.05$, Çizelge 4.2., Şekil 4.4. C ve c). DIA, DOK-indüklü apoptotik hücre kaybının azalmasını sağlamıştır (Şekil 4.4.. D ve d, Çizelge 4.2.).



Şekil 4.4. Dokсорubisin, diyazoksit ya da birlikte uygulamalarından 24 saat sonra apoptotik H9c2 hücre sayısının gösterilmesi. A ve a: Kontrol grubu; B ve b: Diyazoksit grubu; C ve c: Dokсорubisin grubu ve D ve d: Diyazoksit+dokсорubisin grubu. Küçük harfler 20X, büyük harfler: 100X büyütmedeki görüntülerdir. a ve b ışık mikroskobu ayarındaki floresan mikroskop görüntüleridir.

Çizelge 4.2. Doksorubisin, diyazoksit ya da birlikte uygulamalarından 24 saat sonra TUNEL pozitif hücre sayılarındaki değişim

	TUNEL Pozitif Hücre Sayısı
Kontrol	0,000±0,000 ^a
Diyazoksit	0,750±0,164 ^b
Doksorubisin	44,063±4,865 ^c
Diyazoksit+Doksorubisin	18,619±1,435 ^d

Veriler aritmetik ortalama±standart hata şeklinde sunulmuştur. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında istatistik fark bulunmaktadır ($P<0.05$; $N=8-21$).

4.2. TARTIŞMA

Çalışmamızda, yumuşak doku kanserlerinin tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılan ve adriyamisin olarak da bilinen DOK'un sıçan kalp kası hücrelerine toksisitesinin ve DIA'nın bu hasara karşı koruyucu etkisinin mekanizmaları araştırılmıştır. Bulgularımıza göre DOK, SOD enzim aktivitesinde azalmaya bağlı olası süperoksit anyon radikali miktarında artış nedeniyle kalp kası hücre hasarına neden olur. SOD enzim aktivitesindeki azalma, MAPK'lardan ERK1/2'inin artışına, AMPK'nın ve MMP'nin azalmasına aracı olur. Sonuçta, DOK, bu yolla apoptotik hücre ölüm yolağını tetikler, kalp kası hücre kayıplarına bağlı kalp işlevinde azalmaya neden olur. KATP kanal açıcısı olan DIA, olasılıkla, DOK'un neden olduğu SOD aktivite kaybında iyileşme yoluyla ERK1/2 miktarında azalmayı sağlar. Bunun sonucunda MMP'de yükselmeye neden olarak apoptotik hücre ölümlerini azaltır.

Oksidatif stres, oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stres neredeyse tüm hücre bileşenlerinde hasara neden olacak etkiye sahiptir. Dolayısıyla birçok hastalığın patojenezine önemli katkısı olduğuna dair literatürde birçok bulgu yer almaktadır [58]. Bu bilgiye paralel olarak, DOK'un neden olduğu kardiyotoksistede birçok hücrel değişimin yer aldığı bilinmesine karşın [29, 31, 32, 58]; en çok kabul gören mekanizma DOK'un prooksidant doğası ile ilişkilidir [3, 14, 56]. DOK, NADPH ve sitokrom P450 redüktaz gibi enzimler aracılığıyla semikinon formuna dönüşürken, oluşan semikinon radikali fazla elektronunu O_2 'ye aktarır ve süperoksit anyon radikalleri meydana gelir. SOD enzimi bu radikalleri H_2O_2 'ye dönüştürür [59, 60]. Oluşan bu radikal ve radikal aracısı formların DOK toksisitesinin meydana gelmesinde baş sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu öngörü antioksidan tedavileri sonucunda toksisitenin azalmasıyla desteklenmektedir [4, 32, 33]. Çalışmamızda, DOK'un kalp kası hücrelerindeki toksik etkisinin TAS, TOS ve OSI analizlerine göre oksidatif koşulların oluşmasından değil de aşağıda açıklandığı üzere SOD aktivitesindeki azalma ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda, DOK TAS, TOS ve OSI'de değişime neden olmaksızın SOD aktivitesini kontrol ve DIA grubuna göre azaltmıştır. Oksidatif stres bulgularımıza benzer bulgular literatürde yer almaktadır [48, 52, 61]. SOD, oluşan süperoksit anyon radikallerini radikal olmayan H_2O_2 'ye dönüştürmektedir [62]. DOK etkisi ile azalan SOD aktivitesi nedeniyle olası süperoksit anyon radikali artışı MAPK'yı aktive edebilmektedir [63]. Bu bilgiler, çalışmamızın bulguları ile uyumludur. DOK uygulanan grupta SOD aktivitesi azalırken MAPK ailesi üyesi olan ERK1/2'nin protein miktarında artış ölçülmüştür. Ayrıca, oksidatif stres meydana gelmeden de DOK, MAPK üyelerini aktif hale getirebilmektedir. Örneğin; karaciğer hücrelerinde DOK'un tüm MAPK üyelerini oksidatif stresten bağımsız olarak aktive ettiği gösterilmiştir. DOK etkisindeki karaciğer hücrelerinde ERK1/2'nin uygulamadan 4 saat sonra artmasına karşın oksidatif stres parametrelerinde değişim olmadığı belirlenmiştir [59]. Süperoksit anyon radikalının fare miyoblast hücre hattında ERK1/2 sinyal yolağını düzenleyebildiği bildirilmiştir [59]. Süperoksit anyon radikalının ERK1/2 üzerinden bu düzenleyici etkisi, bir SOD mimesi tarafından önlenmektedir [64]. Çalışmamızda sıçan miyoblast hücre hattında DOK kaynaklı hücre toksisitesinde SOD miktarının azalması ve ERK1/2'nin aktivasyonunun birbiriyle ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Diyazoksitin DOK toksisitesine karşı koruyucu etkisinin radikal oluşumunun engellenmesi ile ilişkili olduğu belirtilmektedir [56]. Çalışmamız bulgularına göre, DIA'nın iyileştirici etkisinin DOK'un neden olduğu SOD aktivite kaybını azaltması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. İnsan atriyum hücre hattında, mitokondriyal KATP'nin açılması, ROS üretiminde artışa ve MMP'de değişim olmaksızın mitokondriyal şişmeye neden olmaktadır [58]. Aksine, iskemi/reperfüzyon uygulanan *Cavia porcellus* kalp dokusunda DIA, SOD aktivitesine benzer bir şekilde süperoksit anyon radikali miktarında azalmaya neden olmuştur [65]. DIA, sıçan kalp mitokondriyelerinde Kompleks I'de özellikle ters elektron transferi aracılığı ile süperoksit anyon radikali oluşumunu azaltırken Kompleks III'ün Q_0 bölgesinde oksidant-indüklü indirgenme koşullarında tersi etki yapmaktadır. Bu etkilerin tümü de Kompleks II'nin DIA tarafından inhibisyonu ile açıklanabilmektedir [66]. DIA tarafından düşük düzeylerde oluşan ROS, bir takım sinyal yollarını tetikleyerek

kalp dokusunda önkoşullanma yaratmakta, böylece ardışık aşırı ROS üretimine karşı hücreyi dayanıklı hale getirmektedir [67].

Çalışmamızda, DIA, DOK-indüklü ERK1/2 miktarında azalmaya neden olmuştur. Bu azalmanın nedeni SOD aktivesinde DOK grubuna oranla meydana gelen artış olabilir. ERK1/2'deki bu azalmanın başka bir açıklaması ise ERK1/2'nin AMPK ile ilişkisi olabilir. Kardiyak fibroblast hücrelerinde AMPK'nın ERK1/2'yi aktive ettiği belirtilmektedir [68]. Aksine, AMPK ve ERK1/2 arasındaki ilişki komplekstir ve AMPK ERK1/2'yi inhibe edebilmektedir. Şöyle ki; AMPK aktivasyonu kalp gibi bazı dokularda p38'in aktivasyonuna neden olur [69]. p38 ise ERK1/2'yi inhibe eder [70]. Çalışmamızda DOK grubunda ERK1/2 protein miktarı artarken AMPK düzeylerinde azalma görülmüştür. DIA uygulaması ERK1/2 düzeylerinde DOK etkisini gidermeye yönelik etki yapsa da azalan AMPK düzeylerinde herhangi bir değişime neden olmamıştır. Çalışmamızda p38'in protein ifadesindeki değişime bakılmaması bu noktadaki yorumlarımızı eksik bırakmaktadır.

AMPK, ERK1/2 aracılığıyla hem proapoptotik hem de antiapoptotik yollar ile bağlantılıdır. Dahası, ERK1/2 hücre iskeleti, transkripsiyon faktörleri gibi birçok protein ile de ilişkilidir [68]. DOK kaynaklı hasar sırasında AMPK ve ERK1/2 protein miktarlarının değişmesinin, hasar oluşumu sürecine hücre iskeleti elemanlarının da katılabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda DOK'un kalp kası hücre hattındaki toksisitesini ve DOK toksisitesine DIA'nın koruyucu etki mekanizmasını anlamada F-aktin yapısının nasıl etkilendiği de bu çalışmada değerlendirilmiştir. DOK, F-aktin organizasyonunda bozulmaya neden olmuştur. Bu grupta artan ERK1/2 protein miktarı F-aktin organizasyon bozukluğu ile ilişkili olabilir. Artan ERK1/2 miktarı bir negatif feedback döngüsü gibi AMPK'yı da baskılamaktadır [68]. AMPK analizine ilişkin bulgularımız da bu olguyu destekler niteliktedir.

Diğer yandan DIA, DOK'un neden olduğu F-aktin hasarına karşı koruyucu etki göstermiştir. DIA'nın antioksidan etkisi olasılıkla F-aktin organizasyonunu koruyucu özelliği ile ilişkilidir. DIA+DOK grubunda DOK grubuna oranla artan SOD aktivitesi bu düşüncemizi desteklemektedir. Dahası, AMPK'nın SOD ve GPx

aktivitesini artırdığı da belirtilmektedir [71]. Fakat, DIA+DOK grubunda AMPK protein ifadesi yönünden DOK grubuna göre herhangi bir değişim meydana gelmedi. Yine de bu bulgu DIA'nın koruyucu etkisinde AMPK'nın yer almadığı anlamına gelmemektedir. Çünkü bir proteinin toplam miktarında değişim olmasa bile fosforlu yani aktif protein miktarında değişim meydana gelebilmektedir [72]. Hücre işlevlerinde asıl önemli olan aktif protein miktarında meydana gelen değişimdir. Ne yazık ki çalışmamızda gruplara ait fosforlu AMPK miktarına bakılmadı.

Mitokondri işlevi ile hücre iskeleti ve hücre yapısal organizasyonu arasında fonksiyonel ilişki vardır [73]. DOK etkisindeki kardiyomiyositlerde sarko/endoplazmik retikulum Ca^{2+} -ATPaz II (SERCAII) protein miktarının azaldığı ve fosfolamban protein miktarının arttığı ve bu şekilde hücre içi serbest kalsiyum miktarının arttığı belirlenmiştir [57]. DIA, SERCAII ve fosfolamban protein miktarlarını kontrol düzeylerine ulaştırarak DOK-indüklü Ca^{2+} artışını engellemiş olabilir. DIA'nın mitokondri KATP'sine spesifik bir ajan olduğu ve etkilerini bu yolla gerçekleştirdiği belirtilmektedir. [57]. Mitokondrilerde ve sitoplazmada Ca^{2+} iyon homeostazındaki değişim hem mitokondri işlevlerinde bozulmaya hem de oksidatif strese neden olmaktadır [74].

Diyazoksitin DOK toksisitesine karşı H9c2 hücrelerini koruyucu etkisinde Kir6.2 altbiriminin işlevi önemli olabilir. Kir6.2 geni susturulmuş farelerde DIA'nın koruyucu etkisi görülmemektedir [55]. Sprague-Dawley sıçanlarının kalp dokusunda DOK etkisi sonunda Kir6.2 ve SUR2A KATP altbirim gen ve protein ifadenmesinde azalma olduğu ve Se uygulamasının DOK'un bu etkisini azalttığı belirtilmiştir [75]. Her ne kadar bu bulgunun aksine, çalışmamızda, DOK etkisinde KATP kanal altbirimleri Kir6.2 miktarını artırıp SUR2A miktarını azaltsa da DOK toksisitesine karşı DIA KATP kanal bütünlüğünün korunması yoluyla da etkili olmaktadır.

ATP duyarlı potasyum kanallarının iskemi/reperfüzyon gibi stres koşullarında mitokondrilerde aşırı Ca^{2+} yükü oluşmasını engelleyerek MMP'nin korunmasına yardımcı olduğu bildirilmektedir [76, 77]. Bu çalışmalarda özellikle DIA gibi KATP açıcılarının izole kalp mitokondrilerinde Ca^{2+} girişini azaltıp atılımını destekleyerek MMP depolarizasyonunu engellediği vurgulanmaktadır [76]. Çalışmamızda DOK-

indüklü MMP depolarizasyonu DIA varlığında azalmaktadır; böylece, DIA, MMP'nin korunmasına aracılık etmiştir. DOK'un neden olduğu MMP depolarizasyonu her ne kadar ROS üretimi kaynaklı olsa da KATP bütünlüğünün bozulması da pozitif geri besleme ile ROS artışına neden olabilir. Çalışmamızda, bundan yola çıkarak, DIA varlığında KATP kanal bütünlüğünün sürdürülmesinin MMP üzerine koruyucu etkisine katkı sunduğunu söylenebilir.

Diyazoksitin miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarı gibi çeşitli patolojilere karşı koruyucu özelliği F-aktin harabiyetinde ortadan kalkmaktadır [58]. F-aktinin hücre sağkalımındaki önemi, BH3 protein ailesi üyesi olan Bim ve Bmf ile ilişkisinden kaynaklanmaktadır. BH3 ailesi antiapoptotik Bcl2 proteinini baskılamak üzere proapoptotik Bcl2 üyelerini aktive eder. Bim ve Bmf apoptozu tetikleyebilir. Normal fizyolojik koşullar altında, Bim tübülün ile bağlantılıyken, Bmf aktin ile bağlantılıdır. Bu proteinler mitokondri membranında yer alır ve patolojik koşullar altında mitokondri bağlantılarından ayrılarak intrinsik apoptotik yolağı tetikler [58]. Proapoptotik proteinlerin mitokondriden ayrılması MMP'nin depolarize olmasıyla artış gösterir. Bundan dolayı aktin polimerizasyonu ve depolimerizasyonu arasındaki dengenin kaybı apoptotik hücre kayıplarına neden olur. Kalpte, iskemi/reperfüzyon hasarında F-aktin bütünlüğünün bozulduğu bildirilmektedir [58]. Miyokardiyal KATP'nin aktin ile yakından ilişkili olduğu ve bu ilişkide Ap4A proteininin hayati öneme sahip olduğu gösterilmiştir [58]. Bu bağlamda, aktin filamentleri hasar gördüğünde, Ap4A bu ilişkiden kopmakta ve bu da KATP'nin açık kalma olasılığının azalmasına neden olmaktadır. Bu bilgiler ışığında, DOK'un F-aktin organizasyonu bozucu etkisinin yanında KATP altbirimlerinin azalması ile de apoptozdan kaçınma mekanizmalarını etkisiz hale getirdiği söylenebilir. DIA, KATP kanalının ve F-aktinin yapısal bütünlüğünü koruyarak hücrelerin apoptozdan kaçınmasını sağlamaktadır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Günümüzde yaşam tarzının ve beslenme alışkanlıklarının değişmesine, çevre kirliliğine bağlı olarak kanser insidansında artış görülmektedir. Dolayısıyla kanserli hastaların tedavisi için gereken masraf da artmaktadır. Çocukluk çağı ve yumuşak doku kanserlerinin tedavisinde kullanılan DOK 1960'lı yıllarda keşfedilmiştir. Antikanser etkinliğinin yüksek olması ile DOK, kanseri yenen kişi sayısında artışa neden olur. Buna karşın hastaların kalp yetmezliği gibi bazı hastalıklardan dolayı öldükleri fark edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda DOK'un yan etkilerinin tedaviden kısa veya uzun süre sonra açığa çıkabileceği anlaşılmıştır. DOK çok güçlü ve etkili antikanser ilaç olmasından dolayı bu ilaçtan vazgeçilememesi anlaşılabilir bir durumdur. İlacın tedavi için gerekli dozunun çok altında kullanılması ile bu yan etkilerin ortaya çıkması önlenmeye çalışılır. Fakat, ilacın önerilen klinik dozunun altında kullanılması tedavi potansiyelinin azalmasına neden olur. Yan etkilerinin fark edilmesiyle DOK için yoğun bir araştırma süreci başlamıştır. Bu tez çalışmasında DOK'un yan etkisinin en çok görüldüğü kalp kası hücrelerinde DIA'nın koruyucu etkisi araştırıldı. Elde edilen bulgulara dayanarak DOK'un kalp kası hasarının SOD aktivite azalması, F-aktin organizasyon kaybı ve dolaylı olarak KATP kanallarının kapanmasıyla ilişkili olduğu söylenebilir. SOD'nin aktivite kaybı süperoksit anyon radikali üretiminde ve ERK1/2 miktarında artmayla sonuçlanır. ERK1/2 apoptozu tetikleyerek kalp kası kayıplarına neden olur. DOK ile birlikte DIA uygulaması sonucunda DOK'un neden olduğu artan ERK1/2 protein ifadenmesinde iyileşme ile hücre ölüm yolları baskılanmıştır. DIA etkisinde F-aktin organizasyonunda düzelme de DOK kaynaklı hücre hasarında DIA'nın koruyucu rolü olduğunu gösterir.

ÖNERİLER

1. Bu tez çalışması yalnızca kalp kası hücre hattı kullanılarak tasarlandı. Oysa doku, organ ve sistemler bütünü olan canlı sistem daha komplike olabilir. Elde edilecek

sonuçlar da bu bağlamda farklı olabilir. İleri çalışmaların deney hayvanları kullanılacak şekilde planlanması daha uygun olacaktır.

2. Bu çalışmada sadece ERK1/2 protein ifadelerindeki değişim araştırıldı. MAPK üyeleri arasındaki etkileşimin de dikkate alınması ile yeni çalışmalar tasarlanmalıdır.
3. Çalışmada süperoksit anyon radikalleri üzerinden spekülasyon yapılmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda süperoksit anyon radikali oluşumu da ölçülmelidir.
4. Diyazoksitin diğer kanal ve taşıyıcılar üzerine etkileri de vardır. DOK'un neden olduğu hücre hasarının onarımında DIA'nın hem KATP'ler hem de diğer kanal ve taşıyıcılar ile etkileşimi patch-clamp sistemi kullanılarak değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

- [1] N. T. El-Said, E. A. Mohamed ve R. A. Taha, "Irbesartan suppresses cardiac toxicity induced by doxorubicin via regulating the p38-MAPK/NF-kappaB ve TGF-beta1 pathways", *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, vol. 392, no. 6, pp. 647-658, 2019.
- [2] G. King ve S. Soneji, "The future of death in America", *Demogr Res*, vol. 25, pp. 1-38, 2011.
- [3] E. Taskin, E. K. Kindap, K. Ozdogan, M. B. Y. Aycan ve N. Dursun, "Acute adriamycin-induced cardiotoxicity is exacerbated by angiotension II", *Cytotechnology*, vol. 68, no. 1, pp. 33-43, 2016.
- [4] K. Ozdogan, E. Taskin ve N. Dursun, "Protective effect of carnosine on adriamycin-induced oxidative heart damage in rats", *Anadolu Kardiyol Derg*, vol. 11, no. 1, pp. 3-10, 2011.
- [5] M. Minami, S. Matsumoto ve H. Horiuchi, "Cardiovascular side-effects of modern cancer therapy", *Circ J*, vol. 74, no. 9, pp. 1779-86, 2010.
- [6] M. Lotrionte, G. Biondi-Zoccai, A. Abbate, G. Lanzetta, F. D'Ascenzo, V. Malavazi, M. Peruzzi, G. Frati ve G. Palazzoni, "Review ve meta-analysis of incidence ve clinical predictors of anthracycline cardiotoxicity", *Am J Cardiol*, vol. 112, no. 12, pp. 1980-4, 2013.
- [7] S. Rivankar, "An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy", *J Cancer Res Ther*, vol. 10, no. 4, pp. 853-8, 2014.
- [8] G. Cassinelli, "The roots of modern oncology: from discovery of new antitumor anthracyclines to their clinical use", *Tumori*, vol. 2016, no. 3, pp. 226-35, 2016.
- [9] X. Wang, X. Tian, Y. Wu, X. Shen, S. Yang ve S. Chen, "Enhanced doxorubicin production by *Streptomyces peucetius* using a combination of classical strain mutation and medium optimization", *Prep Biochem Biotechnol*, vol. 48, no. 6, pp. 514-521, 2018.
- [10] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo ve L. Gianni, "Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity", *Pharmacol Rev*, vol. 56, no. 2, pp. 185-229, 2004.
- [11] A. V. Pointon, T.M. Walker, K.M. Phillips, J. Luo, J. Riley, S.D. Zhang, J.D. Parry, J.J. Lyon, E.L. Marczylo ve T.W. Gant, "Doxorubicin in vivo rapidly alters expression and translation of myocardial electron transport chain genes, leads to ATP loss and caspase 3 activation", *PLoS One*, vol. 5, no. 9, p. e12733, 2010.
- [12] A. Sun, Y. Cheng, Y. Zhang, Q. Zhang, S. Wang, S. Tian, Y. Zou, K. Hu, J. Ren ve J. Ge, "Aldehyde dehydrogenase 2 ameliorates doxorubicin-induced myocardial dysfunction through detoxification of 4-HNE and suppression of autophagy", *J Mol Cell Cardiol*, vol. 71, pp. 92-104, 2014.
- [14] H. Yapislar, E. Taskin, S. Ozdas, D. Akin ve E. Sonmez, "Counteraction of Apoptotic and Inflammatory Effects of Adriamycin in the Liver Cell Culture by Clinopitolite", *Biol Trace Elem Res*, vol. 170, no. 2, pp. 373-81, 2016.

- [15] I. Andreadou, F. Sigala, E.K. Iliodromitis, M. Papaefthimiou, C. Sigalas, N. Aliqiannis, P. Savvari, V. Gorqoulis, E. Papalabros ve D.T. Kremastinos, "Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress", *J Mol Cell Cardiol*, vol. 42, no. 3, pp. 549-58, 2007.
- [16] R. Wu, H.L. Wang, H.L. Yu, X.H. Cui, M.T. Xu, X. Xu ve J.P. Gao, "Doxorubicin toxicity changes myocardial energy metabolism in rats", *Chem Biol Interact*, vol. 244, pp. 149-58, 2016.
- [17] I. T. Abdel-Raheem, A. Taye ve M. M. Abouzied, "Cardioprotective effects of nicorandil, a mitochondrial potassium channel opener against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats", *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, vol. 113, no. 3, pp. 158-66, 2013.
- [18] M. Tokarska-Schlattner, T. Wallimann ve U. Schlattner, "Alterations in myocardial energy metabolism induced by the anti-cancer drug doxorubicin", *C R Biol*, vol. 329, no. 9, pp. 657-68, 2006.
- [19] M. Tokarska-Schlattner, M. Zauqq, R. Silva da, E. Lucchinetti, M.C. Schaub, T. Wallimann ve U. Schlattner, "Acute toxicity of doxorubicin on isolated perfused heart: response of kinases regulating energy supply", *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 289, no. 1, pp. H37-47, 2005.
- [20] S. W. Langer, "Dexrazoxane for the treatment of chemotherapy-related side effects", *Cancer Manag Res*, vol. 6, pp. 357-63, 2014.
- [21] C. Bagnall-Moreau, S. Chaudhry, K. Salas-Ramirez, T. Ahles ve K. Hubbard, "Chemotherapy-Induced Cognitive Impairment Is Associated with Increased Inflammation and Oxidative Damage in the Hippocampus", *Mol Neurobiol*, 2019.
- [22] Y. Zhang, K. A. Ahmad, F. U. Khan, S. Yan, A. U. Ihsan ve Q. Ding, "Chitosan oligosaccharides prevent doxorubicin-induced oxidative stress and cardiac apoptosis through activating p38 and JNK MAPK mediated Nrf2/ARE pathway", *Chem Biol Interact*, vol. 305, pp. 54-65, 2019.
- [23] M. Kawano, K. Tanaka, I. Itonaga, T. Iwasaki, M. Miyazaki, S. Ikeda ve H. Tsumura, "Dendritic cells combined with doxorubicin induces immunogenic cell death and exhibits antitumor effects for osteosarcoma", *Oncol Lett*, vol. 11, no. 3, pp. 2169-2175, 2016.
- [24] T. Arnold, A. Michlmayr, S. Baumann, C. Burqhuber, U. Pluschnig, R. Bartsch, G. Steqer, M. Gnant, M. Bergmann, T. Bachleitner-Hofmann ve R. Oehler, "Plasma HMGB-1 after the initial dose of epirubicin/docetaxel in cancer", *Eur J Clin Invest*, vol. 43, no. 3, pp. 286-91, 2013.
- [25] W. Yang, I.J. Park, H. Yun, D.U. Im, S. Ock, J. Kim, S.M. Seo, H.Y. Shin, B. Viollet, I. Kanq, W. Choe, S.S. Kim ve J. Ha, "AMP-activated protein kinase alpha2 and E2F1 transcription factor mediate doxorubicin-induced cytotoxicity by forming a positive signal loop in mouse embryonic fibroblasts and non-carcinoma cells", *J Biol Chem*, vol. 289, no. 8, pp. 4839-52, 2014.
- [26] V. J. Ferrans, J. R. Clark, J. Zhang, Z. X. Yu ve E. H. Herman, "Pathogenesis and prevention of doxorubicin cardiomyopathy", *Tsitologiia*, vol. 39, no. 10, pp. 928-37, 1997.

- [27] W. Ben Kridis, A. Khanfir ve M. Frikha, "Acute pancreatitis induced by anticancer chemotherapy", *Acta Clin Belg*, vol. 68, no. 4, pp. 309-10, 2013.
- [28] E. L. De Beer, A. E. Bottone ve E. E. Voest, "Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review", *Eur J Pharmacol*, vol. 415, no. 1, pp. 1-11, 2001.
- [29] E. Taskin, C. Guven, L. Sahin ve N. Dursun, "The Cooperative Effect of Local Angiotensin-II in Liver with Adriamycin Hepatotoxicity on Mitochondria", *Med Sci Monit*, vol. 22, pp. 1013-21, 2016.
- [30] L. C. Kobashigawa, Y. C. Xu, J. F. Padbury, Y. T. Tseng ve N. Yano, "Metformin protects cardiomyocyte from doxorubicin induced cytotoxicity through an AMP-activated protein kinase dependent signaling pathway: an in vitro study", *PLoS One*, vol. 9, no. 8, pp. e104888, 2014.
- [31] N. Dursun, E. Taskin, M. B. Yerer Aycan ve L. Sahin, "Selenium-mediated cardioprotection against adriamycin-induced mitochondrial damage", *Drug Chem Toxicol*, vol. 34, no. 2, pp. 199-207, 2011.
- [32] E. Taskin ve N. Dursun, "The protection of selenium on adriamycin-induced mitochondrial damage in rat", *Biol Trace Elem Res*, vol. 147, no. 1-3, pp. 165-71, 2012.
- [33] E. Taskin ve N. Dursun, "Recovery of adriamycin induced mitochondrial dysfunction in liver by selenium", *Cytotechnology*, vol. 67, no. 6, pp. 977-86, 2015.
- [34] C. F. McTiernan, "Fighting doxorubicin-induced cardiotoxicity with adiponectin", *Cardiovasc Res*, vol. 89, no. 2, pp. 262-4, 2011.
- [35] H. Yoshida, L. Bao, E. Kefaloyianni, E. Taskin, U. Okorie, M. Hong, P. Dhar-Chowdhury, M. Kaneko ve W.A. Coetzee, "AMP-activated protein kinase connects cellular energy metabolism to KATP channel function", *J Mol Cell Cardiol*, vol. 52, no. 2, pp. 410-8, 2012.
- [36] T. Farzaneh ve A. Tinker, "Differences in the mechanism of metabolic regulation of ATP-sensitive K⁺ channels containing Kir6.1 and Kir6.2 subunits", *Cardiovasc Res*, vol. 79, no. 4, pp. 621-31, 2008.
- [37] L. Bao, E. Taskin, M. Foster, B. Ray, R. Rosario, R. Ananthkrishnan, S.E. Howlett, A.M. Schmidt, R. Ramasamy ve W.A. Coetzee, "Alterations in ventricular K(ATP) channel properties during aging", *Aging Cell*, vol. 12, no. 1, pp. 167-76, 2013.
- [38] P. Philip-Couderc, N. I. Tavares, A. Roatti, R. Lerch, C. Montessuit ve A. J. Baertschi, "Forkhead transcription factors coordinate expression of myocardial KATP channel subunits and energy metabolism", *Circ Res*, vol. 102, no. 2, pp. e20-35, 2008.
- [39] V. Raeis, P. Philip-Couderc, A. Roatti, W. Habre, J. Sierra, A. Kalangos, M. Baghetti ve A.J. Baertschi, "Central venous hypoxemia is a determinant of human atrial ATP-sensitive potassium channel expression: evidence for a novel hypoxia-inducible factor 1 α -Forkhead box class O signaling pathway", *Hypertension*, vol. 55, no. 5, pp. 1186-92, 2010.
- [40] M. Nunez, V. Medina, G. Cricco, M. Croci, C. Cocca, E. Rivera, R. Bergoc ve G. Martin, "Glibenclamide inhibits cell growth by inducing G0/G1 arrest

- in the human breast cancer cell line MDA-MB-231”, *BMC Pharmacol Toxicol*, vol. 14, p. 6, 2013.
- [41] E. Kefaloyianni, J. S. Lyssand, C. Moreno, D. Delaroche, M. Hong, D. Fenyő, C. V. Mobbs, T. A. Neubert ve W. A. Coetzee, "Comparative proteomic analysis of the ATP-sensitive K⁺ channel complex in different tissue types”, *Proteomics*, vol. 13, no. 2, pp. 368-78, 2013.
- [42] S. H. Park, W. K. Ho ve J. H. Jeon, "AMPK regulates K(ATP) channel trafficking via PTEN inhibition in leptin-treated pancreatic beta-cells”, *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 440, no. 4, pp. 539-44, 2013.
- [43] K. Shimomura ve Y. Maejima, "KATP Channel Mutations and Neonatal Diabetes”, *Intern Med*, vol. 56, no. 18, pp. 2387-2393, 2017.
- [44] M. A. Ewart ve S. Kennedy, "AMPK and vasculoprotection”, *Pharmacol Ther*, vol. 131, no. 2, pp. 242-53, 2011.
- [45] J. M. Tadie, H. B. Bae, J. S. Deshane, C. P. Bell, E. R. Lazarowski, D. D. Chaplin, V. J. Chaplin, V. J. Thannickal, E. Abraham ve J. W. Zmijewski, "Toll-like receptor 4 engagement inhibits adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase activation through a high mobility group box 1 protein-dependent mechanism”, *Mol Med*, vol. 18, pp. 659-68, 2012.
- [46] S. Gratia, L. Kay, L. Potenza, A. Seffouh, V. Novel-Chate, C. Schnebelen P. Sestili, U. Schlattner ve M. Tokarska-Schlattner, "Inhibition of AMPK signalling by doxorubicin: at the crossroads of the cardiac responses to energetic, oxidative, and genotoxic stress”, *Cardiovasc Res*, vol. 95, no. 3, pp. 290-9, 2012.
- [47] C. Ji, B. Yang, Y. L. Yang, S. H. He, D. S. Miao, L. He ve Z. G. Bi, "Exogenous cell-permeable C6 ceramide sensitizes multiple cancer cell lines to Doxorubicin-induced apoptosis by promoting AMPK activation and mTORC1 inhibition”, *Oncogene*, vol. 29, no. 50, pp. 6557-68, Aralık 16 2010.
- [48] O. R. Molehin, A. A. Adeyanju, S. A. Adefegha, A. O. Oyeyemi ve K. A. Idowu, "Protective mechanisms of protocatechuic acid against doxorubicin-induced nephrotoxicity in rat model”, *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2019.
- [49] C. Gurel, G. C. Kuscu, A. Buhur, M. Dagdeviren, F. Oltulu, N. U. Karabay Yavasoglu ve A. Yavasoglu, "Fluvastatin attenuates doxorubicin-induced testicular toxicity in rats by reducing oxidative stress and regulating the blood-testis barrier via mTOR signaling pathway”, *Hum Exp Toxicol*, p. 960327119862006, 2019.
- [50] E. M. El-Sayed, A. M. Mansour ve W. S. El-Sawy, "Alpha lipoic acid prevents doxorubicin-induced nephrotoxicity by mitigation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats”, *J Biochem Mol Toxicol*, vol. 31, no. 9, 2017.
- [51] E. Mansouri, A. Jangaran ve A. Ashtari, "Protective effect of pravastatin on doxorubicin-induced hepatotoxicity”, *Bratisl Lek Listy*, vol. 118, no. 5, pp. 273-277, 2017.
- [52] M. F. R. Zare, K. Rakhshan, N. Aboutaleb, F. Nikbakht, N. Naderi, M. Bakhshesh ve Y. Azizi, "Apigenin attenuates doxorubicin induced

- cardiotoxicity via reducing oxidative stress and apoptosis in male rats”, *Life Sci*, p. 116623, 2019.
- [53] Z. Bai ve Z. Wang, "Genistein protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity through Nrf-2/HO-1 signaling in mice model”, *Environ Toxicol*, vol. 34, no. 5, pp. 645-651, 2019.
- [54] Y. Zhou, P. Sun, T. Wang, K. Chen, W. Zhu ve H. Wang, "Inhibition of Calcium Influx Reduces Dysfunction and Apoptosis in Lipotoxic Pancreatic beta-Cells via Regulation of Endoplasmic Reticulum Stress”, *PLoS One*, vol. 10, no. 7, p. e0132411, 2015.
- [55] Q. Fu, N. Gao, J. Yu, G. Ma, Y. Du, F. Wang, Q. Su ve F. Che, "Diazoxide pretreatment prevents Abeta1-42 induced oxidative stress in cholinergic neurons via alleviating NOX2 expression”, *Neurochem Res*, vol. 39, no. 7, pp. 1313-21, 2014.
- [56] L. D. Hole, T. H. Larsen, K. O. Fossan, F. Lime ve J. Schjott, "Diazoxide protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in the rat”, *BMC Pharmacol Toxicol*, vol. 15, p. 28, 2014.
- [57] M. Pecoraro, M. Ciccarelli, A. Fiordelisi, G. Iaccarino, A. Pinto ve A. Popolo, "Diazoxide Improves Mitochondrial Connexin 43 Expression in a Mouse Model of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity”, *Int J Mol Sci*, vol. 19, no. 3, 2018.
- [58] C. Guven, "The effect of Diazoxide on norepinephrine-induced cardiac hypertrophy, in vitro”, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, vol. 64, no. 10, pp. 50-54, 2018.
- [59] R. Navarro, R. Martinez, I. Busnadiago, M. B. Ruiz-Larrea ve J. I. Ruiz-Sanz, "Doxorubicin-induced MAPK activation in hepatocyte cultures is independent of oxidant damage”, *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1090, pp. 408-18, 2006.
- [60] M. Kepinska, R. Kizek ve H. Milnerowicz, "Metallothionein and Superoxide Dismutase-Antioxidative Protein Status in Fullerene-Doxorubicin Delivery to MCF-7 Human Breast Cancer Cells”, *Int J Mol Sci*, vol. 19, no. 10, 2018.
- [61] Y. Shi, X. Su, H. Cui, L. Yu, H. Du ve Y. Han, "Combination of quercetin and Adriamycin effectively suppresses the growth of refractory acute leukemia”, *Oncol Lett*, vol. 18, no. 1, pp. 153-160, 2019.
- [62] G. Ambrosio ve J. T. Flaherty, "Effects of the superoxide radical scavenger superoxide dismutase, and of the hydroxyl radical scavenger mannitol, on reperfusion injury in isolated rabbit hearts”, *Cardiovasc Drugs Ther*, vol. 6, no. 6, pp. 623-32, 1992.
- [63] E. Wojtera, A. Konior, N. Fedoryszak-Kuska ve A. Beresewicz, "Obligatory role of intraluminal O₂- in acute endothelin-1 and angiotensin II signaling to mediate endothelial dysfunction and MAPK activation in guinea-pig hearts”, *Int J Mol Sci*, vol. 15, no. 11, pp. 19417-43, 2014.
- [64] W. C. Huang, C. C. Chio, K. H. Chi, H. M. Wu ve W. W. Lin, "Superoxide anion-dependent Raf/MEK/ERK activation by peroxisome proliferator activated receptor gamma agonists 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2), ciglitazone, and GW1929”, *Exp Cell Res*, vol. 277, no. 2, pp. 192-200, 2002.

- [65] M. Maczewski, M. Duda, W. Pawlak ve A. Beresewicz, "Endothelial protection from reperfusion injury by ischemic preconditioning and diazoxide involves a SOD-like anti-O₂- mechanism", *J Physiol Pharmacol*, vol. 55, no. 3, pp. 537-50, 2004.
- [66] S. Droese, P. J. Hanley ve U. Brandt, "Ambivalent effects of diazoxide on mitochondrial ROS production at respiratory chain complexes I and III", *Biochim Biophys Acta*, vol. 1790, no. 6, pp. 558-65, 2009.
- [67] R. Carroll, V. A. Gant ve D. M. Yellon, "Mitochondrial K(ATP) channel opening protects a human atrial-derived cell line by a mechanism involving free radical generation", *Cardiovasc Res*, vol. 51, no. 4, pp. 691-700, 2001.
- [68] M. J. Kim, I. J. Park, H. Yun, I. Kang, W. Choe, S. S. Kim ve J. Ha, "AMP-activated protein kinase antagonizes pro-apoptotic extracellular signal-regulated kinase activation by inducing dual-specificity protein phosphatases in response to glucose deprivation in HCT116 carcinoma", *J Biol Chem*, vol. 285, no. 19, pp. 14617-27, 2010.
- [69] S. Jacquet, E. Zarrinpashneh, A. Chavey, A. Ginion, I. Leclerc, B. Viollet, G. A. Rutter, L. Bertrand ve M. S. Marber, "The relationship between p38 mitogen-activated protein kinase and AMP-activated protein kinase during myocardial ischemia", *Cardiovasc Res*, vol. 76, no. 3, pp. 465-72, 2007.
- [70] S. Grethe, N. Coltella, M. F. Di Renzo ve M. I. Porn-Ares, "p38 MAPK downregulates phosphorylation of Bad in doxorubicin-induced endothelial apoptosis", *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 347, no. 3, pp. 781-90, 2006.
- [71] Z. Zhu, R. Li, Y. Lv ve W. Zeng, "Melatonin protects rabbit spermatozoa from cryo-damage via decreasing oxidative stress", *Cryobiology*, vol. 88, pp. 1-8, 2019.
- [72] B. Goni-Allo, E. Puerta, M. Ramos, B. Lasheras, J. Jordan ve N. Aguirre, "Minoxidil prevents 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced serotonin depletions: role of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels, Akt and ERK", *J Neurochem*, vol. 104, no. 4, pp. 914-25, 2008.
- [73] V. Shneyvays, L. K. Mamedova, A. Korkus ve A. Shainberg, "Cardiomyocyte resistance to doxorubicin mediated by A(3) adenosine receptor", *J Mol Cell Cardiol*, vol. 34, no. 5, pp. 493-507, 2002.
- [74] V. Adam-Vizi ve A. A. Starkov, "Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts", *J Alzheimers Dis*, vol. 20 Suppl 2, pp. S413-26, 2010.
- [75] Z. W. Liu, X. L. Niu, K. L. Chen, Y. J. Xing, X. Wang, C. Qui ve D. F. Gao, "Selenium attenuates adriamycin-induced cardiac dysfunction via restoring expression of ATP-sensitive potassium channels in rats", *Biol Trace Elem Res*, vol. 153, no. 1-3, pp. 220-8, 2013.
- [76] E. L. Holmuhamedov, L. Wang ve A. Terzic, "ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria", *J Physiol*, vol. 519 Pt 2, pp. 347-60, 1999.
- [77] M. Miyamae, S. A. Camacho, M. W. Weiner ve V. M. Figueredo, "Attenuation of postischemic reperfusion injury is related to prevention of

[Ca²⁺]_m overload in rat hearts”, *Am J Physiol*, vol. 271, no. 5 Pt 2, pp. H2145-53, 1996.



KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Özgül AYDIN
Doğum Yeri : Arpaçay
Doğum Tarihi : 07.04.1995
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : ozgul36@windowlive.com

Eğitim Durumu

Derece	Alan	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Genel Biyoloji	Adıyaman Üniversitesi	2019
Lisans	Biyoloji	Adıyaman Üniversitesi	2015
Lise	Fen Bilimleri	Arpaçay Anadolu Lisesi	2011