

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA DOXORUBICIN UYGULAMALARINDA KALP DOKUSU
HASARININ MOLEKÜLER VE PATOLOJİK YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

Zeynep ÇELİK KENAR

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Ertan ORUÇ

KONYA-2024

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA DOXORUBICIN UYGULAMALARINDA KALP DOKUSU
HASARININ MOLEKÜLER VE PATOLOJİK YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

Zeynep ÇELİK KENAR

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Ertan ORUÇ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından
21112009 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2024

ÖNSÖZ

Ülkemizde ve dünyada hem hayvanlarda hem de insanlarda giderek artan kanser oranlarıyla beraber kanser tedavisinde kullanılan ilaç çeşitleri ve miktarları da artmaktadır. Özellikle artan evcil hayvan besleme hobisi nedeniyle hayvanlarda görülen kanser oranları da artış göstermekte, bu kanserleri tedavi etmek için kullanılan ilaçların ve yeni yöntemlerin araştırılması için çalışmalar yapılmaktadır. Doxorubicin birçok kanser türünde uzun yıllardır etkili şekilde kullanılan antibiyotik kökenli kemoterapötik bir ilaçtır. Ancak hem kullanımı sırasında hem de kullanımından sonraki uzun yıllarda sebep olduğu kardiyotoksisite, Doxorubicin'in etkili bir şekilde kullanımının önüne geçmekte ve kardiyotoksik etkileri yanında ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Doxorubicin'in meydana getirdiği toksisitenin mekanizmalarının daha iyi anlaşılması uzun yıllardır kullanılan bu kemoterapötüğün kalpte meydana getirdiği hasarı azaltmak/engellemek için oldukça önemlidir.

Bu çalışmada deneysel olarak erkek ratlara farklı doz ve sürelerde uygulanan Doxorubicin'in kalpte meydana getirdiği hasar histopatolojik ve moleküler olarak araştırılmıştır.

Çalışmanın başından sonuna kadar bilgi birikimini ve tecrübelerini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Ertan ORUÇ'a desteklerinden dolayı teşekkürü borç bilirim. Doktora eğitimim süresince bilgisini ve desteğini esirgemeyen, ders dönemimde bana danışmanlık yapan Prof. Dr. M. Kemal ÇİFTÇİ hocama teşekkür ederim. Doktora eğitimim boyunca destekleri ve bilgi birikimleri ile yanımda olan başta Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mustafa ORTATATLI'ya ve diğer Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Mehmet TUZCU'ya, Prof. Dr. Özgür ÖZDEMİR'e, Doç. Dr. M. Burak ATEŞ'e ve Prof. Dr. Fatih HATİPOĞLU'na teşekkür ederim. Tez projem süresince yine bilgi birikimleri ve tecrübeleriyle çalışmama yardımcı olan Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Kamil ÜNEY ve Prof. Dr. Enver YAZAR'a, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Emrah SUR'a şükranlarımı sunarım. Ayrıca tez çalışmamın bir bölümünde bana yardımcı olan Arş. Gör. Ayşenur TURAL'a, doktora öğrencisi Muhammed ÖNER'e ve doktora öğrencisi Rabia SALİK'e teşekkür ederim. Tez projemi destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinatörlüğüne

teşekkür ederim.

Eğitim-Öğretim hayatım boyunca yanımda olup bana destek olan annem Esmer ÇELİK'e, doktora eğitimim süresince her zaman yanımda olan kardeşim Esra ÇELİK'e ve tez projem süresince desteğini esirgemeyen, sevgisi ve ilgisiyle yanımda olan sevgili eşim Şahin KENAR'a sonsuz teşekkür ederim. Eğitim-Öğretim hayatımın tamamında bana koşulsuz desteğini sunan ve her zaman yanımda olan babam Cemal ÇELİK'e ve günümüzde medeniyet denildiğinde akla ilk gelen ülkelerin hiçbirinde benzeri uygulamalar yokken, bugün bile kız çocuklarının ve kadınların ikinci sınıf vatandaş olarak kabul edildiği bazı ülkelerin aksine, biz kadınlara birey olma fırsatı ve eşit eğitim hakkı tanıyan Ulu Önder Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK'e sonsuz minnet duygusuyla teşekkür ediyor ve bu tez çalışmasını onlara adıyorum.

Zeynep ÇELİK KENAR

Haziran/2024

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	ix
SUMMARY	x
1.GİRİŞ.....	1
1.1 Memelilerde Kalp	1
1.2. Doxorubicin (DOX).....	3
1.2.1. DOX'un Farmakokinetiği	3
1.2.2. DOX Metabolitlerinin Kalp Üzerine Etkileri.....	4
1.2.3. Doxorubicin'in Kalp Üzerindeki Toksik Etkileri ve Bu Etkilerin Mekanizmaları	7
1.2.4. Veteriner Hekimliği Alanında DOX Kullanımı	10
1.3. Hücre Ölümü.....	12
1.3.1 Apoptozis.....	13
1.3.2. Nekrozis	18
1.3.3. Otofaji.....	19
1.3.4. Nekroptozis	23
1.3.5. Ferroptozis.....	25
1.3.6. mPTP aracılı programlı hücre ölümü	27
1.3.7 Piroptozis.....	29
1.3.8. Alkalptozis.....	29
1.3.9. Paraptozis	30
1.3.10. Metuozis	30
1.4. p21.....	31
1.5. TNF- α	32
1.6. eNOS.....	34
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
2.1. Gereç	37
2.1.1. Hayvan materyali	37
2.1.2. Kimyasallar	37
2.1.3. Cihazlar	37
2.1.4. Kullanılan kitler ve primerler	38
2.1.5. Kullanılan diğer malzemeler	38
2.1.6. Kullanılan program ve yazılımlar	38
2.2. Yöntem.....	39

2.2.1. Deneysel Dizayn ve Uygulamalar	39
2.2.2. Nekropsi, Makroskopik Muayene ve Örneklemeler	41
2.2.3. Histopatolojik Muayene	41
2.2.4. Moleküler İnceleme.....	43
2.2.5. İstatistiksel İnceleme	45
3. BULGULAR.....	46
3.1. Makroskopik Bulgular	46
3.3. Histopatolojik Bulgular.....	48
3.2. Real Time-PCR Bulguları.....	73
3.2.1. Bcl-2	73
3.2.2. Kaspaz-3.....	74
3.2.3. TNF-alfa	75
3.2.4. p21	76
3.2.5. Beclin-1	77
3.2.6. eNOS	78
4. TARTIŞMA	79
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	93
6. KAYNAKLAR	95
7. EKLER	112
Ek-A Etik Kurul Kararı.....	112
8. TURNİTİN RAPORU	113
9. ÖZGEÇMİŞ.....	115

SİMGELER VE KISALTMALAR

2-DG	: 2-deoksi- d -glikoz
ACSS-2	: Acyl-koenzim A sentetaz kısa zincirli aile üyesi-2
ADAM17	: Tümör nekroz faktörü-a-dönüştürücü enzim
ADP	: Adenozin difosfat
ADP-riboz	: Adenozin difosfat-riboz
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
AKR	: Aldo-Keto redüktazlar
Akt	: Protein kinaz B
AMPK	: Adenozin Monofosfat-Aktive Edici Protein Kinaz
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive eden faktör-1
ApoBDs	: Apoptotik cisimcikler
Atg1	: Otofaji ilişkili gen-1
Atg12	: Otofaji ilişkili gen-12
Atg13	: Otofaji ilişkili gen-13
Atg14	: Otofaji ilişkili gen-14
Atg4	: Otofaji ilişkili gen-4
Atg5	: Otofaji ilişkili gen-5
Atg7	: Otofaji ilişkili gen-7
ATP	: Adenozin trifosfat
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
BAD	: B hücreli lenfoma -2 ilişkili hücre ölümü agonisti
BAK	: B cell lymphoma -2 Antagonist/Killer
BAX	: B hücreli lenfoma -2 ilişkili X
Bcl-2	: B hücreli lenfoma -2 apoptoz düzenleyicisi
Bcl-xL	: B-cell lymphoma-extra large
Beclin 1	: Otofaji ilişkili bir gen
Bfl-1	: Apoptoz düzenleyici gen
BH3	: Pro- ve anti-apoptotik genlerin arasındaki dengeyi düzenleyen gen ailesi
BH4	: Tetrahidrobioplerin
BOK	: Bcl-2 related ovarian killer
CA9	: Karbonik anhidraz-9
CAD	: Kaspazla aktifleşen DNAz

CaM	: Kalmodulin
CASP3	: Kaspaz-3
CAT	: Katalaz
CBR	: Karbonil redüktazlar
CDK	: Sikline bağımlı kinaz
CDK1	: Sikline bağımlı kinaz-1
CDK2	: Sikline bağımlı kinaz-2
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
CPP32	: Kaspaz-3
CPP32B	: Kaspaz-3
CsA	: Siklosporin A
CsD	: Siklosporin D
Cyp D	: Siklofilin D
DAMP	: Hasar ilişkili moleküler patern
DISC	: Ölüm indükleyen sinyal kompleksi
DNA	: Deoksiriboz nükleik asit
DNaz	: Deoksiribonükleaz
DNR	: Daunorubisin
DOX	: Doxorubicin
DOXol	: Doxorubicinol
DR4	: Death receptor 4
DR5	: Death receptor 5
Endo-G	: Endonukleaz-G
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
ER	: Endoplazmik retikulum
ETZ	: Elektron taşıma zinciri
FAD	: Flavın adenin dinükleotid
FADD	: FAS- ilişkili ölüm alanı proteini
Fas	: TNF reseptör ailesinden bir reseptör
FasL	: Fas ligandı
FIP200	: 200 kDa'lık FAK ailesi kinaz etkileşimli proteini
FMN	: Flavın mononükleotid
GATA4	: Bir transkripsiyon faktörü

GPX4	: Glutatyon peroksidaz 4
H2A	: Bir histon proteini
H2AX	: Histon iki AX protein
Hsp90	: Isı şoku proteini-90
IAF	: İnhibitör apoptotik faktör
ICAD	: İnaktif kaspaz aktive edici DNaz
IL-18	: İnterlöykin-18
IL-1 β	: İnterlöykin-1 β
iNOS	: İndüklenebilir NOS
JTC-801	: Opioid türü analjezik ilaç
kDa	: Kilodalton
KO	: Knock-out
LC3	: Mikrotübül ilişkili protein
LC3-I	: Mikrotübül ilişkili protein-I
LC3II	: Mikrotübül ilişkili protein-II
LDH	: Laktat dehidrojenaz
L-NAME	: L-N ^G -Nitro arjinin metil ester
MAP-LC3	: Mikrotübüllerle ilişkili sitozolik protein LC3
Mcl-1	: Bir antiapoptotik gen
MDA	: Malondialdehit
MLKL	: Karışık Lineage Kinaz Alanı Benzeri Protein
mPTP	: Mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneği
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
mTOR	: Rapamisinin memeli hedefi
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NCCD	: Hücre Ölümü İsimlendirme Komitesi
NDUFS	: NADH dehidrogenaz (ubiquinone) Fe-S
Nec-1	: Necrostatin-1
NFAT	: Aktive edilmiş T lenfositlerin nükleer faktörü
NFkB-1	: Nükleer faktör NF-kappa-B-1
NF- κ B	: Aktive edilmiş B hücrelerinin nükleer faktör kappa-hafif zincir arttırıcısı
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz

NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NOXA	: BH3 ailesinden bir protein
NSA	: Nekrosulfonamid
OH	: Hidroksil
p21	: Sikline bağımlı kinaz inhibitörü
p62/SQSTM1	: p62/sekestozom 1
PARP	: Poli (ADP-riboz) polimeraz
PI3K	: Fosfatidilinositol 3- kinaz
PIN	: NOS'un protein inhibitörü
PPR	: Pentatrikopeptid tekrarı
PtdIns3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PUFA	: Çoklu doymamış yağlar
PUMA	: BH3 ailesinde bir protein
RAS	: Bir proto-onkogen ve bunu kodlayan gen
RHIM	: RIP homotipik etkileşim motifi
RIPK1	: Reseptörle etkileşime giren serin / treonin-protein kinaz 1
RIPK3	: Reseptörle etkileşime giren serin / treonin-protein kinaz 3
ROS	: Reaktif oksijen türevleri
SCA-1	: Kaspaz-3
SMAC	: İkinci mitokondri kaynaklı Kaspaz Aktivatörü
SOD	: Süperoksit dismutaz
TNF	: Tümör nekroz faktör
TNF α	: Tümör nekroz faktör- α
Top2 α	: Topoizomeraz 2 α
Top2 β	: Topoizomeraz 2 β
TOR	: Rapamisinin hedefi
TRAIL	: TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand
ULK1	: Unc-51 benzeri otofajiyi aktive eden kinazlar 1
ULK2	: Unc-51 benzeri otofajiyi aktive eden kinazlar 2
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
Vps34	: Vakuolar protein sıralama-34
zVAD-florometil	: Bir pan-kaspaz inhibitörü

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ratlarda Doxorubicin Uygulamalarında Kalp Dokusu Hasarının Moleküler ve Patolojik Yöntemlerle Araştırılması

Zeynep ÇELİK KENAR

Veterinerlik Patolojisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2024

Bu çalışmada ratlara farklı dozlarda uygulanan Doxorubicin'in kalp üzerindeki etkileri apoptoz, nekroz/nekroptoz, otofaji, hücre yaşlanması ve endotel hasarı yönünden moleküler ve patolojik olarak araştırıldı. Çalışmada kontrol grubunda 6, deneme gruplarında (DOX-D, DOX-Y ve DOX-K) 8'er hayvan olmak üzere 30 adet 12 haftalık erkek wistar-albino rat kullanıldı. Çalışma öncesinde hayvanların ağırlıkları tartılarak kaydedildi. Çalışmada DOX-D grubuna tek doz 3 mg/kg, DOX-Y grubuna tek doz 12 mg/kg ve DOX-K grubuna 24 saat arayla 4 gün boyunca 3 mg/kg ip DOX uygulandı. Kontrol grubuna ise aynı koşullar altında 12 ml/kg serum fizyolojik ip olarak verildi. Gruplardaki hayvanlar son doz Doxorubicin uygulamasından sonraki 7'nci günde tartıldıktan sonra ağırlıkları kaydedildi ve sistemik nekropsileri gerçekleştirildi. Nekropside kalbin makroskopik incelemesi ile birlikte ağırlığı tartıldıktan sonra bir kısmı moleküler inceleme (Bcl-2, Kaspaz-3, Beclin-1, TNF- α , p21 ve eNOS) için -80 °C'ye, bir kısmı da histopatolojik incelemeler için %10'luk formole alındı. Çalışmada kalbin histopatolojik incelemeleri sonucunda kontrol grubu dışındaki bütün gruplarda şiddeti değişen derecelerde dejenerasyon, intrasitoplazmik vakuolizasyon, nekroz, kanama ve mast hücre degranülasyonları belirlendi. Çalışmada RT-PCR analizleri sonuçlarına göre en düşük Bcl-2 oranı DOX-Y grubunda, en yüksek kaspaz-3 oranı DOX-Y grubunda, en yüksek TNF- α oranı DOX-K grubunda, en yüksek p21 oranı DOX-Y grubunda, en yüksek Beclin-1 oranı DOX-Y grubunda en düşük eNOS oranı ise DOX-K grubunda tespit edildi. Çalışmanın sonucunda Doxorubicinin doza bağımlı olarak kardiyotoksik etkilerinin şiddeti değişiklik gösterse de, deneme gruplarının tamamında apoptozu, nekrozu/nekroptozu, otofajiyi indüklediği, hücre yaşlanmasını arttırdığı ve endotel hasarına sebep olduğu gözlemlendi. Histopatolojik incelemeler sonucu en fazla lezyonun yüksek doz ve tekrarlayan doz uygulamalarında gözlenmesi Doxorubicinin mümkün olduğunca etkin ama düşük dozlarda kullanılması gerektiğini göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Doxorubicin, histopatoloji, kardiyotoksite, rat, RT-PCR.

SUMMARY

REPUCLIC OF TURKIYE
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation of Heart Tissue Damage in Doxorubicin-Administered Rats by Molecular and Pathological Methods

Zeynep ÇELİK KENAR

Department of Veterinary Pathology

PhD THESIS/KONYA-2024

In this study, the effects of Doxorubicin administered to rats at different doses on the heart were investigated molecularly and pathologically in terms of apoptosis, necrosis/necroptosis, autophagy, cell aging, and endothelial damage. 30 12-week-old male Wistar-albino rats were used in the study, 6 animals in the control group and 8 animals in the experimental groups (DOX-D, DOX-Y, and DOX-K). Before the study, the weights of the animals were weighed and recorded. In the study, a single dose of 3 mg/kg IP was administered to the DOX-D group, a single dose of 12 mg/kg IP was administered to the DOX-Y group, and 3 mg/kg IP DOX was administered to the DOX-K group for 4 days with a 24-hour interval. The control group was given 12 ml/kg physiological saline i.p. under the same conditions. On the 7th day after the last dose of Doxorubicin administration, their weights were recorded and systemic necropsies were performed. At necropsy, after the macroscopic examination of the heart and the weight of the heart are determined, some of it is stored at -80 °C for molecular examination (Bcl-2, Caspase-3, Beclin-1, TNF- α , p21, and eNOS) and some were taken into at 10% formaldehyde. for histopathological examinations. As a result of histopathological examinations of the heart, degeneration, intracytoplasmic vacuolization, necrosis, hemorrhage, and mast cell degranulation of varying degrees of severity were determined in all groups except the control group. According to the results of RT-PCR analysis in the study, the lowest Bcl-2 rate was in the DOX-Y group, the highest caspase-3 rate was in the DOX-Y group, the highest TNF- α rate was in the DOX-K group, the highest p21 rate was in the DOX-Y group, and the highest p21 rate was in the DOX-Y group. The highest Beclin-1 rate was detected in the DOX-Y group and the lowest eNOS rate in the DOX-K group. As a result of the study, although the severity of cardiotoxic effects of Doxorubicin varied depending on the dose, it was observed that it induced apoptosis, necrosis/necroptosis, autophagy, increased cell aging and caused endothelial damage in all experimental groups. As a result of histopathological examinations, the fact that most lesions were observed in high-dose and repeated-dose applications showed that Doxorubicin should be used as effectively as possible but in low doses.

Key Words: Doxorubicin, histopathology, cardiotoxicity, rat, RT-PCR.

1.GİRİŞ

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de giderek artan evcil hayvan besleme hobisi mevcuttur. Bu davranış beraberinde evcil hayvanların yaşam sürelerinin uzamasına ve evcil hayvanlarda görülen neoplastik hastalıkların görülme sıklığının artmasına neden olmuştur. Bu neoplastik hastalıkların birçoğunun tedavisinde kullanılan Doxorubicin çok iyi bir antineoplastik ilaç olmasına rağmen çoğu zaman ciddi kardiyotoksik etkilere sebep olur. Doxorubicinin neden olduğu bu kardiyotoksikite neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle Doxorubicin'in kardiyotoksik etkilerinin mekanizmalarının iyi anlaşılması ve meydana gelen kardiyotoksikitenin azaltılması/önlenmesi gerekmektedir.

1.1 Memelilerde Kalp

Kalp bütün memelilerde iki atrium, iki ventrikül olmak üzere dört odacıktan oluşmaktadır. Büyüklüğü canlının türüne, ırkına, yaşına, cinsiyetine ve vücut ağırlığına göre değişmekle beraber vücut ağırlığının farelerde %0,40-0,60'ını, ratlarda %0,20-0,50'sini, insanlarda %0,40-0,45'ini, köpeklerde %0,47-0,79'unu, kedilerde %0,33-0,77'sini, ineklerde %0,65-0,87'sini, atlarda %0,60-1'ni oluşturmaktadır (Schummer ve ark 1981, Buhl 2008, McDonough ve Southard 2017, Treuting ve ark 2017). Kalpte atriumlar interatrial, ventriküller ise interventriküler septumla birbirinden ayrılır. Ventriküller yoğun kas yapısına sahiptir. Kan sağ ventrikülden pulmoner arter aracılığıyla akciğerlere, pulmoner ven aracılığı ile sol atriuma, daha sonra da sol ventrikülden aorta pompalanarak sistemik dolaşıma katılır. Kanı pompalamak için gerekli olan yüksek basınç ihtiyacı nedeniyle sol ventrikül duvarı sağ ventrikülden daha kalındır. Kalp duvarının en dış yüzeyine epikardiyum, ortadaki kas yapısına miyokardiyum ve en içte bulunan, kanla temas eden yüzeyine de endokardiyum adı verilir. Kalbin etrafında kalbi korumakla görevli, içinde bir miktar seröz sıvı bulunan ve perikardiyum adı verilen bir fibröz kese mevcuttur. Bu kese kalbi, etrafındaki akciğer, özefagus gibi organlardan ayırır (McDonough ve Southard 2017, Treuting ve ark 2017).

Memeli kalbi, sinir sisteminden ayrı olarak uyarı oluşturabilir. Bunu birkaç milimetre kareye yayılan, bağ dokusuyla ayrılmış miyosit kümesinin oluşturduğu hilal benzeri bir şekle sahip sinoatrial düğüm aracılığı ile yapar. Sinüs düğümü olarak da bilinen sinoatrial düğüm, superior vena cavanın açıklığı ile sağ atriumun üst

duvarındaki crista terminalis'in birleştiği yerde bulunur. Sinoatrial düğümü oluşturan miyositlerin kendiliğinden elektriksel bir uyarı oluşturma yetenekleri vardır. Bu özelleşmiş miyositlerde meydana gelen uyarı önce perinodal hücrelere ve geçiş hücrelerine iletilir. İletilen uyarılar sayesinde önce atriumlar daha sonra da uyarının atrioventriküler nod aracılığıyla his demetlerine ve purkinje liflerine iletimi sonucu ventriküller kasılır. Böylece kan hem akciğerlere hem de vücudun geri kalanına pompalanmış olur (Opthof 1988, Kashou ve ark 2017, Kalyanasundaram ve ark 2019).

Rat kalpleri histopatolojik olarak incelendiğinde atrial ve ventriküler miyokardın benzer histolojik özelliklere sahip olduğu görülür. Fakat atriumların duvarları daha ince, kardiyomiyositleri ise ventriküllerdeki kardiyomiyositlere oranla daha küçük, ince ve uzun olma eğilimindedir (Treuting ve ark 2017). Rat kalbi ayrıca az epikardiyal yağ veya subendokardiyal bağ dokusu içeren ince epikardiyal ve endokardiyal katmanlara sahiptir. Rat kalplerinde iki çekirdekli kardiyomiyositler fizyolojiktir ve yaygın olarak görülürler. Çekirdeklerdeki kromatin granüler şekilde gözükür ve bir veya iki tane belirgin çekirdekçiğe sahiptir (Treuting ve ark 2017, Maynard ve Downes 2019). Yer yer dallanan kardiyomiyositler birbirlerine interkalat disk adı verilen özel bağlantılarla bağlanırlar. İnterkalat diskler iki hücrenin dezmozomlarla birbirine sıkı bir şekilde bağlandığı ve hücreden hücreye elektriksel uyarı iletiminin mümkün olduğu bölümlerdir (Treuting ve ark 2017, Maynard ve Downes 2019). Histolojik olarak interkalat diskler miyofibrillerin uzunlamasına eksenine dik olacak şekilde soluk çizgiler halinde görülür. Bahsedilen bu yapı özellikle kalbin uzunlamasına kesitlerinde daha iyi görünür. Kalbin normal yapısı histolojik olarak incelendiğinde yer yer enine kesitler de yaygındır. Bu enine kesitlerde kardiyomiyositlerin çekirdekleri daha yuvarlak gözükür ve interkalat diskler gözlenmez ancak miyosit dışı hücre tipleri ve kardiyak intersitisyum daha iyi gözükür (Treuting ve ark 2017, Maynard ve Downes 2019). İntersitisyumda zengin bir damar ağı bulunur, bu sayede her bir kardiyomiyosit birden fazla kılcal damarla çevrilebilir. Bunun yanı sıra az sitoplazmaya ve yoğun kromatinli oval ila düz çekirdeklere sahip bol miktarda fibroblast ve endotel hücreleri de mevcuttur. Ayrıca intersitisyumda az sayıda lenfosit ve makrofaj ile beraber çok az sayıda adiposit de bulunabilir (Treuting ve ark 2017)

1.2. Doxorubicin (DOX)

DOX; geniş spektrumlu bir antibiyotik olmakla beraber, hematopoietik, lenfoblastik ve solid tümörler de dahil olmak üzere çeşitli neoplastik hastalıklarda tek başına veya diğer tedavi yöntemleriyle beraber kullanılan antrasiklin türevi antikanserojen bir ilaçtır. Antrasiklinler şimdiye kadar geliştirilmiş en etkili antikanser ilaçlar arasında yer almaktadır (Yalçın ve ark 2010). İlk antrasiklin, 1960'ların başlarında *Streptomyces peucetius* adlı bir bakteriden izole edilmiş ve Daunorubisin (DNR) olarak adlandırılmıştır. DNR lenfoma ve akut lösemi tedavisinde bir süre başarı ile kullanıldıktan sonra 1967 yılında ölümcül kalp toksisitesine neden olduğu ortaya çıkmıştır (Bachur 1979). Daha sonra *Streptomyces peucetius*'ta gerçekleştirilen modifikasyonlar sonucu hidroksidaunorubicin ya da adriyamisin olarak da adlandırılan DOX elde edilmiştir. DOX ve Daunorubisin'den başka Epirubisin ve İdarubisin adı verilen kemoterapötikler de antrasiklinlere dahildir ve organizmada benzer etkilere sahiptirler. DOX, kromoforik bir trisiklik halka ve buna bağlı iki özdeş pentapeptit halkasından oluşan bir antrasiklindir. Antrasiklin molekülü tetrasiklik çekirdek ve amino şekerden oluşur. Tetrasiklik kısım ilaca kırmızı rengini verir. Antrasiklinlerin hepsi tetrasiklik halkaya bitişik kinon ve hidrokinon gruplarına sahiptir. DOX, DNR molekülündeki 14 numaralı karbona hidroksil grubunun bağlanmasıyla oluşur. Yapıdaki amino-şeker grubunun amino grubu, DOX'un suya afinitesi farklı olan farklı maddelere bağlanmasına izin veren en reaktif gruptur. Bu sayede DOX, farklı hücre yapılarında farklı miktarlarda birikim gösterir (Speth ve ark 1988, Seitz ve ark 1995, Edwardson ve ark 2015).

1.2.1. DOX'un Farmakokinetiği

DOX gastrointestinal kanaldan iyi emilmediği için genellikle intravenöz (IV) olarak uygulanır. Karaciğerde hızlı bir şekilde metabolize edilir. Metabolizasyonu sırasında bir keton grubu hidroksil grubuna indirgenir ve daha az aktif -ol grubu yani Doxorubicinol (DOXol) oluşur. 13-OH-doxorubicinol olarak da bilinen DOXol, DOX'un ana metabolitidir ve belirli bir antitümör aktiviteye sahiptir. DOX karaciğer tarafından hızlı bir şekilde metabolize edildikten sonra diğer organlara dağılsa da vücutta uzun süre kalabilir. Vücuttan atılımı çoğunlukla safra yoluyla olduğu için karaciğer hasarının söz konusu olduğu durumlarda DOX'un metabolizasyonu yavaşlar ve vücutta birikmeye başlayabilir. DOX'un yarılanma süresi 12-18 saattir ve plazma

proteinlerine %70'ten fazla bağlanma gösterebilir (Robert ve Gianni 1993, Edwardson ve ark 2015, Sallustio ve Boddy 2021).

1.2.2. DOX Metabolitlerinin Kalp Üzerine Etkileri

DOX'un da üyesi olduğu Antrasiklinlerin etki mekanizmaları günümüzde hala tam anlamıyla çözülememiş olsa da yapılan çalışmalar sonucu bazı mekanizmalar aydınlatılmıştır. Antrasiklinlerin hücrelere plazma membranından pasif diffüzyonla geçtikten sonra proteazomlara bağlanarak çekirdeğe taşındıkları düşünülmektedir. Çekirdeğe girdikten sonra ise DNA'ya proteozomlardan daha fazla affinite gösterdikleri için DNA'ya bağlanırlar (Edwardson ve ark 2015). Antrasiklinlerin, DNA'nın zincirleri arasında çapraz bağlara neden olma, interkalasyon yapma, DNA'yı alkile etme ve topoizomerez II'yi inhibe etme gibi etkilerinin olduğu ve bu etkiler sayesinde özellikle hızlı çoğalan hücrelerin çoğalmasını engellediği düşünülmektedir (Sinha ve Politi 1990, Kiyomiya ve ark 1998, 2001, Zhang ve ark 2012). Antrasiklinlerin ayrıca lipit oksidasyonu aracılığıyla plazma membranında ve DNA'da hasara sebep olduğu, yüksek miktarlarda reaktif oksijen türevlerinin (ROS) birikimine de neden olduğu bildirilmiştir (Muindi ve ark 1985, Mizutani 2007, Sawyer ve ark 2010, Edwardson ve ark 2015).

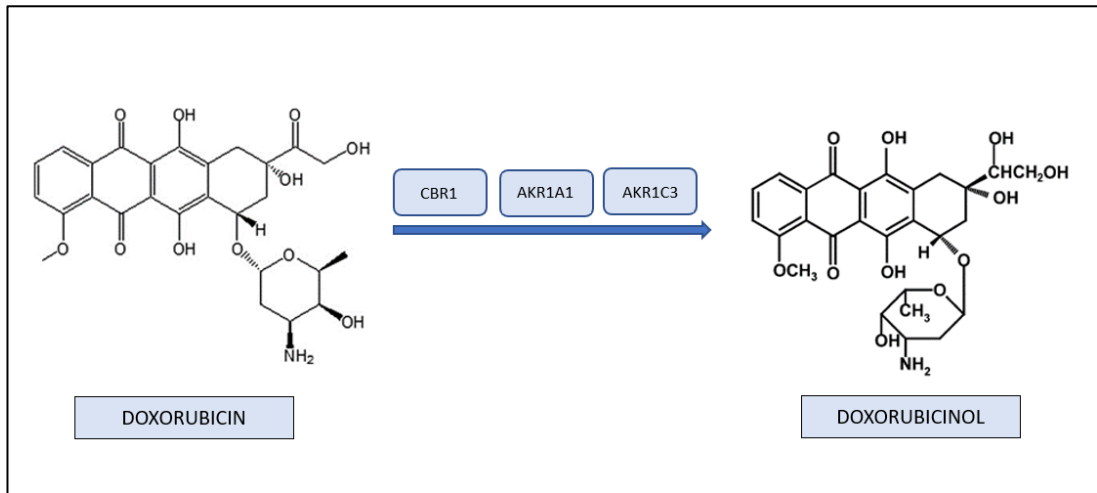
Antrasiklinlerin vücuttaki metabolizasyonu, antrasiklinlerin antineoplastik aktivitesini artıran veya azaltan metabolitlerin oluşumuyla sonuçlanabilecek hidroksilasyon, semikinon oluşumu veya deoksiaglikon oluşumu yoluyla gerçekleşir (Novotna ve ark 2008, Edwardson ve ark 2015).

Hidroksilasyon

Hidroksilasyon, kimyasal bileşiklerin yapısına hidroksil (OH) grubunun eklenmesiyle meydana gelen kimyasal bir olaydır (Zhu ve ark 2017). Hidroksilasyon reaksiyonuna çoğunlukla metal iyonları gibi katalizörler ve ısı aracılık eder (Raju 2019). Antrasiklinlerin C13 pozisyonunda hidroksillenmiş halleri ana bileşikten daha polar bir özellik gösterir ve suda daha yüksek çözünürlüğe sahiptir. Ancak hidroksillenmiş metabolitler suda çözünürlükleri artmasına rağmen, bazı dokulardan - özellikle kalp dokusundan- ana bileşiğe göre çok daha yavaş atılıp birikme eğilimi göstermeleriyle beraber antineoplastik etkileri de azalmış olur (Peters ve ark 1981, Licata ve ark 2000, Edwardson ve ark 2015). Hidroksilasyonda, DOX'un

metabolizasyonunda görev alan karbonil redüktazlar (CBR) ve Aldo-Keto redüktazlar (AKR) önemli rol oynarlar. CBR'lerden özellikle CBR1'in karaciğer, böbrek ve gastrointestinal sistemde DOX'un hidroksilasyonunu sağlayan baskın redüktaz olduğu bildirilmiştir (Kassner ve ark 2008). AKR ailesinden ise özellikle AKR1 alt ailesinden AKR1A1'in DOX'un DOXol'e dönüştürülmesinde yer alan olası AKR olduğu düşünülmektedir (Şekil 1.1.). Başka kemoterapi ajanlarının metabolizmasında ve detoksifikasyonunda da rol oynayan AKR1 alt ailesinden özellikle AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1 gibi redüktazların antrasiklinler tarafından üretilen ROS'un neden olduğu reaktif aldehytlerin detoksifikasyonunda da rol oynadığı bildirilmiştir (Jin ve Penning 2007, Bains ve ark 2010).

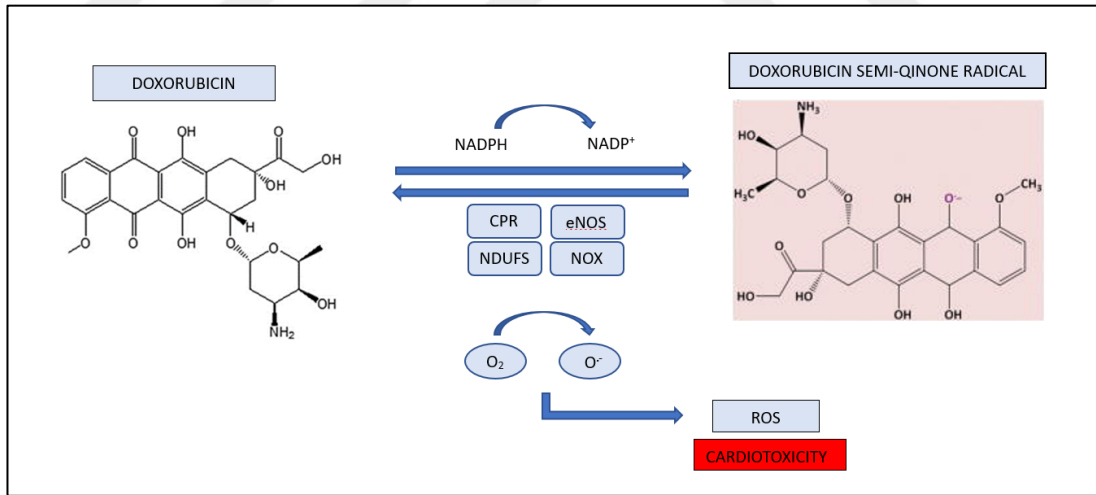
Özellikle DOX için olmak üzere, daha sonra bahsedilecek olan etkilerin yanı sıra antrasiklinlerin kanser hastalarındaki başlıca toksik yan etkisi, hidroksillenmiş metabolitlerinin yüksek kardiyotoksik özellikleriyle de ilgilidir. DOX'un metabolizasyonu sırasında bir keton grubunun hidroksil grubuna indirgenmesi sonucu meydana gelen DOXol'ün ventriküler miyositlerdeki uyarım ve kasılma aksı üzerinde doğrudan bir etkisinin olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark 2001). Özellikle insanlarda hidroksile antrasiklinlerin, tedavi sırasında ve/veya tedaviden sonraki dönemlerde ortaya çıkabilen kardiyomiyopatiye neden olduğu görülmüştür (Licata ve ark 2000, Edwardson ve ark 2015).



Şekil 1.1. DOX'un karbonil redüktazlar ve aldo-keto redüktazlar tarafından hidroksilasyonunun şematize edilmesi. Edwardson ve ark (2015)'dan modifiye edilmiştir.

Semikinon oluşumu

Semikinonlar, hidrokinonun kendisi veya katekol gibi bir hidrokinonun bir kinona dehidrojenasyonu veya alternatif olarak bir kinon eklenmesi işlemi sırasında bir hidrojen atomunun elektronuyla birlikte çıkarılması sonucu meydana gelen serbest radikallerdir (Song ve Buettner 2010). Antrasiklinlerde semikinon oluşumu kinon içeren grubun NADH- ve NADPH- bağımlı redüktazlar tarafından katalize edilmesi ve bir elektron indirgemesi ile oluşur (Şekil 1.2.). Genel olarak antrasiklinlerin semikinon metabolitlerinin, hem sağlıklı dokular üzerindeki toksik etkilerinde hem de tümör toksisitesinde, ana bileşenden çok daha etkili olduğu bildirilmiştir (Edwardson ve ark 2015). Antrasiklinlerin semikinon metabolitleri oksijen radikallerinin oluşumuna katkı sağlamanın yanı sıra hücre içindeki makromoleküllerin alkilasyonunu kolaylaştırarak da sitotoksik etkileri ortaya çıkarabilir. Antrasiklinlerden bir elektron indirgenmesini katalize eden enzimler NADPH-sitokrom P450 redüktaz, NADH dehidrogenaz (ubiquinone) Fe-S [NDUFS] ve endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS)'dır (Bachur 1979, Vásquez-Vivar ve ark 1997, Nohl ve ark 1998, Edwardson ve ark 2015).



Şekil 1.2. Semikinon oluşumu. Edwardson ve ark (2015)'dan modifiye edilmiştir.

DOX tedavisi sırasında mide bulantısı, kusma, miyelosupresyon, kardiyak aritmi gibi yan etkiler meydana gelebilir. Ancak kardiyotoksisitenin özellikle semikinon metabolitinin oluşumuna bağlı olduğu düşünülmektedir (Edwardson ve ark 2015). Antrasiklinlerin kardiyotoksisiteye neden olmalarının hücre içi düzeyde karşılığının özellikle mitokondride disfonksiyona sebep olması gösterilmektedir (Edwardson ve ark 2015). Vücuttaki diğer kas dokularında olduğu gibi

kardiyomiyositlerde de ATP üretiminin yaklaşık %90'ı mitokondride gerçekleşmektedir. Kardiyomiyositlerdeki mitokondrilerde yukarıda da bahsedilen NDUFS, eNOS, NOX gibi indirgeyici enzimlerin varlığı DOX tedavisine bağlı olarak kardiyomiyositlerde semikinon oluşumuna neden olmakta ve bunun sonucunda DOX tedavisinin tamamlanmasından dört ila yirmi yıl sonra dahi kardiyotoksisite ortaya çıkabilmektedir (Edwardson ve ark 2015). Yapılan çalışmalarda kardiyomiyositlerin semikinon oluşumuna oldukça elverişli olduğu belirlenmiştir. Örneğin Nohl ve ark (1998) gerçekleştirdikleri çalışmada kardiyomiyositlerin mitokondrilerinde DOX'un kolaylıkla semikinon formuna dönüştürüldüğünü buna karşın hepatositlerde bulunan mitokondrilerde ise bunun gerçekleşmediğini bildirmişlerdir.

Deoksiaglikon oluşumu

DOX'un metabolizasyonunun bir diğer aşaması da 7-deoksiaglikon metabolitine deglikozidasyonudur. 7-deoksiaglikon oluşumu DOX'tan anaerobik ortamda NADPH aracılığı ile iki elektron indirgenmesi sonucu meydana gelir. 7-deoksiaglikon oluşumunun ilacı inaktive ettiğine inanılmakla beraber deoksiaglikon metabolitinin lipid çözünürlüğündeki artış nedeniyle iç mitokondriyal membran ile interkalasyon yaptığı ve ROS üretimine sebep olduğu bildirilmiştir (Giorgio ve ark 2004).

1.2.3. Doxorubicin'in Kalp Üzerindeki Toksik Etkileri ve Bu Etkilerin Mekanizmaları

DOX'un kemoterapötik olarak kullanımını sınırlayan en önemli etken sebep olduğu kardiyotoksisitedir. DOX'un kalp üzerindeki etkileri akut, kronik ve gecikmiş tip olmak üzere üç farklı dönemde görülür.

Akut dönemde görülen yan etkilerin ilacın verilmesinden 2-3 gün sonra ortaya çıktığı ve bu yan etkilerin insidansının %11 olduğu bildirilmiştir (Kong ve ark 2022). Wojnowski ve ark (2005) tarafından 1697 hasta üzerinde yapılan çalışmaya göre, hastaların %3,2'sinin atrial fibrilasyon, akut kalp yetmezliği, miyokardiyal infarktüs, miyokardit, supraventriküler ve ventriküler erken atımlar ve/veya taşikardiler dahil olmak üzere akut kardiyak yan etkiler geliştirdikleri bildirilmiştir. DOX toksisitesine bağlı kronik dönemde görülen etkiler tedavinin son dönemlerinde veya ilacın kesilmesinden hemen sonra görülen etkilerdir ki bu etkiler kümülatif toksisite olarak

da adlandırılır. Kronik dönemde meydana gelen yan etkilerin başında dilate kardiyomiyopatinin olduğu bildirilmiştir (Hrdina ve ark 2000). Kronik kardiyotoksistelerde genellikle sol ventrikül duvarı etkilense de her iki ventrikül duvarının da etkilenebileceği tespit edilmiştir (Monsuez ve ark 2010, Li ve ark 2022). DOX'un sebep olduğu gecikmiş tip kardiyotoksistenin ise insanlarda genellikle çocukluk çağı kanserlerinin tedavisinden sonra ortaya çıktığı ve tedaviden sonraki 10-15 yıl içerisinde görüldüğü kaydedilmiştir (Lipshultz ve ark 1991, Monsuez ve ark 2010). Huang ve ark (2010) tarafından genç farelerde gerçekleştirilen bir çalışmada, fareler akut kardiyotoksisteye neden olmayacak kadar kümülatif doza maruz bırakılmışlar ve yetişkin olana kadar bekletilmişlerdir. Bunun sonucunda DOX'un farelerin kalplerindeki kardiyak progenitor hücreleri azalttığını belirten Huang ve ark (2010), DOX'a bağlı gecikmiş tip kardiyotoksistenin kısmen buna bağlı olduğunu bildirmişlerdir (Monsuez ve ark 2010).

DOX kaynaklı kardiyotoksistenin nedeni tam olarak aydınlatılamamış olsa da birden fazla teori ortaya atılmıştır. DOX'un kalpte en çok etkilediği kısım mitokondri bakımından oldukça zengin olan miyokarddır. Kardiyomiyositlerdeki mitokondri oranının diğer dokularda bulunan mitokondri oranlarından yaklaşık %35-40 daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Goffart ve ark 2004). Mitokondri miktarıyla beraber artan DOX'un kalp spesifitesinin nedeni mitokondrinin iç membranında bol miktarda bulunan, mitokondri iç zarının geçirgenliğini kısıtlayan ve sitokrom oksidazın etkinliği için gerekli olan fosfolipid yapısındaki kardiyolipindir. DOX, kardiyolipini geri dönüşümsüz olarak bağlayarak mitokondrinin membran bütünlüğünü bozar ve sitokrom C'nin önemli bir bağlantı noktasını eksiltir (Sinibaldi ve ark 2013, Schirone ve ark 2022). Toksikite sonrası meydana gelen miyokardiyal disfonksiyonun reaktif oksijen türevleri (ROS) birikimi ile bağlantılı olduğu bilinmektedir (Lebrecht ve ark 2005). Davies ve Doroshov (1986), DOX'un sığır submitokondriyal kalp hücrelerinde ROS ve süperoksit anyonu üretimine sebep olduğunu, bunun sonucunda da mitokondriyal elektron taşıma zincirinin (ETZ) düzensizliğine, özellikle de kompleks I'in redoks döngüsünde azalmaya neden olarak daha fazla miktarda ROS üretimine sebep olduğunu, böylece mitokondriyal disfonksiyonun ortaya çıktığını bildirmişlerdir.

Kardiyolipinden başka kardiyomiyositlerde ROS birikiminin önemli sebeplerinden biri de mitokondrilerdeki artmış demir miktarıdır. DOX, bir Fe-DOX kompleksi oluşturur ve serbest demiri şelatlayıp oksijen ile reaksiyona girerek Fenton reaksiyonunu katalize eder. Aktive demir H_2O_2 'ye elektron donörü olarak fenton reaksiyonuna katılır. Bu reaksiyon sırasında bir $OH\cdot$ üreterek ROS oluşumuna sebep olur. Demir birikimi ayrıca apoptotik olmayan programlanmış hücre ölümüne yani kardiyomiyosit ferroptozuna da sebep olur (Dixon ve ark 2012).

Yüksek demir birikimi sitokrom C ve mitokondriyal Ca^{2+} 'yı serbest bırakarak hücre ölümüne sebep olabilen mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneği (mPTP)'in açılmasına neden olarak da hücre ölümüne sebep olabilir (Schirone ve ark 2022).

Marechal ve ark (2011) yaptıkları çalışmada 16 hafta boyunca DOX tedavisine maruz bırakılan farelerde bir mPTP inhibitörü olan CyA kullanımı sonrası miyokardiyal disfonksiyonun önlendiğini ve kardiyomiyosit ölümlerinin azaldığını bildirmişlerdir. DOX aynı zamanda mitokondriyal DNA (mtDNA)'da mutasyonları indükleyebilir (Sheibani ve ark 2022).

Kardiyomiyositlerde ROS birikiminin bir başka sebebi genel olarak kardiyovasküler protektif etki gösteren endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS)'ın miktarıdır. DOX, eNOS redüktaz enzimine bağlanarak semikinon radikalının oluşumunu indükler. Semikinon oluşumu başlığında da anlatıldığı üzere bu radikal, serbest oksijeni süperoksit (O_2^-) serbest radikale dönüştürerek ROS birikimine neden olur (Kalivendi ve ark 2001, Rawat ve ark 2021).

DOX ile yapılan çalışmaların bazılarında DOX'a bağlı kardiyotoksisitenin endotel hasarına bağlı olabileceği de gösterilmiştir (Taga ve ark 1987, Widmer ve Lerman 2014). DOX tedavisi uygulanan sıçanlarda miyokarddaki küçük koroner damarların endotel hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonunun yükseldiği ve endotelial hücre apoptozunun arttığı tespit edilmiştir (Wu ve ark 2002, Hoffman ve ark 2021).

DOX kardiyotoksisitesinin bir başka nedeni de DOX'un Topoizomerazlar üzerindeki etkisi sonucu ortaya çıkar. Bir antikanser ilacı olarak DOX, hızlı çoğalan kanser hücreleri ve farklılaşmamış hücreler tarafından yüksek oranda eksprese edilen Topoizomeraz 2 α (Top2 α)'yla birlikte hücre döngüsü sırasında nispeten sabit kalan ve kardiyomiyosit gibi hücrelerden eksprese edilen Topoizomeraz 2 β (Top2 β)'yı da hedef

alır. Topoizomerazlar, DNA sarmallarını çözen ve DNA replikasyonunu, transkripsiyonunu, rekombinasyonunu ve kromatinin yeniden şekillenmesini düzenleyen enzimlerdir. DOX, hedefi olan Top2 α 'yla beraber Top2 β 'yı da inhibe ederek kardiyomiyositlerdeki DNA replikasyonuna, RNA transkripsiyonuna ve sentezine engel olur. Ayrıca bu yolla kardiyomiyositlerdeki DNA'da çift zincirli kırılmalara sebep olarak hücrenin ölümüne neden olur (Tewey ve ark 1984, Zhang ve ark 2012, Khiati ve ark 2014).

Yapılan bazı çalışmalara göre DOX'un kardiyomiyositlerdeki kalsiyum seviyelerinde düzensizliğe sebep olduğu bildirilmiştir (Kalivendi ve ark 2005, Menna ve ark 2008). Daha önce de bahsedildiği gibi DOX'un metabolizasyonu sırasında meydana gelen DOXol sodyum-potasyum pompasını inhibe ederek hücre içi kalsiyum artışına neden olur ve nihayetinde hücreyi apoptoza sürükler (Menna ve ark 2008, Rawat ve ark 2021).

DOX, AMPK (Adenozin Monofosfat-Aktive Edici Protein Kinaz) sinyal inhibisyonu yoluyla da kalbe zarar verir. Bir makromolekül protein kompleksi olarak AMPK, bir katalitik bölüm (α), iki regülatör bölüm (β , γ) olmak üzere üç parçadan oluşan hücre içi enerji seviyesi düzenleyicisidir. DOX, AMPK sinyal yolunu inhibe ederek genotoksik stres ve oksidatif stres yoluyla DNA hasarını indükler. Ayrıca AMPK sinyalinin inhibe edilmesi, kalp dokusunda artan enerjik strese ve hipertrofiye yol açar (Rawat ve ark 2021).

DOX ayrıca troponin I, α -aktinin, miyozin, desmin gibi kasılma proteinleri ve Ca²⁺ ATPaz, ryanodin reseptörü 2 gibi sarkoplazmik retikulum proteinleri de dahil olmak üzere çeşitli kalp kasına özgü proteinlerin ekspresyonunu azaltarak da kardiyomiyopatiye sebep olur. Bu proteinlerin ekspresyonundaki azalmalar sonucu kardiyomiyositlerdeki kasılma yeteneğini düşürür (Chatterjee ve ark 2010).

1.2.4. Veteriner Hekimliği Alanında DOX Kullanımı

DOX sadece insan hekimliğinde değil veteriner hekimliğinde de kanser tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır (Hennessey ve ark 1977, Susaneck 1983, Mauldin ve ark 1988, Ogilvie ve ark 1989, Novotney ve ark 1992, Kristal ve ark 2001). Özellikle günümüzde giderek artan evcil hayvan besleme davranışına paralel pet hekimliğindeki artış sebebiyle pet hayvanları daha uzun yaşamakta ve

gözlemlenebilmektedir. Bunun sonucunda da pet hayvanlarında kanser görülme sıklığı artmış, özellikle köpek ve kedilerde DOX kullanımı oldukça yaygın hale gelmiştir. DOX, insanlarda olduğu gibi hayvanlarda da başta kalp olmak üzere birçok organa zarar vermektedir. Hallman ve ark (2019) tarafından 494 köpek üzerinde gerçekleştirilen çalışmanın sonucuna göre DOX tedavisi alan köpeklerin %4'ünde kardiyotoksisite geliştiği görülmüştür. Yine aynı çalışmaya göre kardiyotoksisite dışında mitral kapak yetmezliği, triküspital kapak yetmezliği ve aritmi gibi yan etkilerin meydana geldiği de bildirilmiştir. Reiman ve ark (2008) tarafından kedilerde yapılan bir çalışmada DOX'un kusma, anoreksi, nötropeni ve azotemi gibi bulgulara yol açtığı, ancak kardiyomiyopati gelişmediği bildirilmiştir. O'Keefe ve ark (1993) tarafından 6 kedide yapılan çalışmaya göre kedilerde sol ventrikül iç çapı diyastol ve sistol sonlarının ortalamalarında artış, kardiyomiyositlerde vakuolizasyon belirlenmiş ve sol ventrikülün sağ ventriküle oranla daha fazla etkilendiği bildirilmiştir. Kardiyotoksisitenin yanı sıra O'Keefe ve ark (1993), kedilerde kusma, anoreksi ve ishal gibi gastrointestinal toksisite ve renal toksisite bulgularını da kaydetmişlerdir. Yine Setoguchi ve ark (2023)'nın sunduğu çalışmada çalışma materyali olan kedilerde %3,3 oranında kardiyotoksisite geliştiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada DOX tedavisi alan kedilerde ventriküler aritmi dışında kusma, diyare, anoreksi ve miyelosupresyon görüldüğü belirtilmiştir. Kedilerde DOX tedavisi sonucu oluşan böbrek hasarının kardiyotoksisiteden daha şiddetli olduğu çeşitli çalışmalarla tespit edilmiştir (Cotter ve ark 1985, Mauldin ve ark 1988, O'Keefe ve ark 1993, Reiman ve ark 2008).

DOX'un memelilerde; mitral kapak endokardiyozisi, miyokardiyal fibroz, miyokardiyal nekroz, kardiyomiyositlerde fragmantasyon ve dejenerasyon, arteriyel-arteriyoller amiloidoz, miyofibriler atrofi ve dejenerasyon, interstisyel ödem ve fibrozis, intrasitoplazmik vakuolizasyon, kardiyomiyositlerde hipertrofi, sitomegali, atrofi, nekroz, apoptoz, nötrofilik ve lenfoplazmasitik inflamasyon, makrofaj ve fibroblast infiltrasyonu, atriyal dilatasyon, intraatriyal tromboz, miyokardiyal fibril düzensizliği gibi histopatolojik bulgulara sebep olduğu bildirilmiştir (Billingham 1984, de Leeuw ve ark 2001, Takemura ve Fujiwara 2007, Cove-Smith ve ark 2014, Karabulut ve ark 2021, Podyacheva ve ark 2021).

Ratlarda ilk olarak Mettler ve ark (1977) tarafından yapılan çalışmada kardiyomiyositlerde vakuolizasyon ve dejenerasyonla beraber hafif şiddette fibrozis,

intersitisyel ödem, makrofaj proliferasyonu, miyofibriler nekroz ve intersitisyel ödem bulguları gözlenmiştir. Gün aşırı 2,5 mg/kg dozun 6 sefer verildiği çalışmalarda histopatolojik olarak miyokardiyal liflerde düzensizlikle beraber ödem, yangı ve hücre infiltrasyonları görüldüğü bildirilmiştir (Merlet ve ark 2013, Lončar-Turukalo ve ark 2015, Ahmad ve ark 2017, Cappetta ve ark 2017, Cappetta ve ark 2018, Podyacheva ve ark 2021). Görüldüğü gibi bulgular insan ve diğer memeli hayvanlarla benzerlik göstermektedir.

Dişilere göre erkeklerde hem kalp hastalıklarının görülme sıklığı hem de hastalıklarının şiddetinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (William Dec 2003, Thom ve ark 2006, Frisancho-Kiss ve ark 2007). Bunun nedeni östrojenin mast hücresi ve makrofajların çoğalmasını, histamin ve proinflamatuvar sitokinlerin salınımını azaltmasıdır (Evans ve ark 2001, Mahoney ve ark 2003). Mast hücreleri ve makrofajlar androjen ve östrojen reseptörleri içerirler (Frisancho-Kiss ve ark 2007, Zhang ve ark 2014). Östrojen reseptörlerinin uyarılmasının, mast hücrelerinin ve makrofajların çoğalmasını azaltmakla beraber histamin salınımını yavaşlattığı ve proinflamatuvar sitokinlerin konsantrasyonlarını azalttığı belirtilirken testosteronun zıt etkileri olduğu bildirilmiştir (Lu ve ark 2012). Zhang ve ark (2014) tarafından 33 adet yetişkin erkek, 29 adet 12 haftalık normal dişi ve 10 adet 12 haftalık ovaryumları alınmış dişi ratlar üzerinde 10 hafta boyunca 1 mg/kg olarak uygulanan DOX çalışmasının sonuçlarına göre kontrol gruplarında hem erkek ratlarda hem de dişi ratlarda mast hücrelerinin sayısında artış olmadığı ve morfolojilerinin bozulmamış olduğu, DOX uygulanan ratlarda mast hücrelerinin erkek ratlarda dişi ratlara göre artmış olduğu ve morfolojilerinin bozulmuş olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada DOX uygulanan ovaryumları alınmış dişi ratlarda, DOX uygulanmış normal dişi ratlara göre mast hücre morfolojilerinin bozulmuş olduğu ve sayılarının artmış olduğu belirtilmiştir.

1.3. Hücre Ölümü

Hücre ölümü temelde hücrenin yerine getirdiği fonksiyonların sona ermesi olarak tanımlanabilir (Majno ve Joris 1995). Temel işlevi hasar görmüş, yaşlanmış, fonksiyonlarını yerine getiremeyen ve/veya zararlı hücreleri uzaklaştırarak doku homeostazisini korumak olan hücre ölümü, fizyolojik olabildiği gibi patolojik de olabilmektedir (Fuchs ve Steller 2011, Park ve ark 2023). Hücre Ölümü İsimlendirme Komitesi (Nomenclature Committee on Cell Death-NCCD) hücre ölümünü,

rastlantısal (accidental) ve programlı hücre ölümü olarak iki şekilde sınıflandırır (Galluzzi ve ark 2015). Rastlantısal ya da kazara hücre ölümü, hücrelerin genetik ve farmakolojik müdahalelerle tersine çevrilemeyen şiddetli fiziksel, kimyasal ve mekanik strese maruz kalması durumunda meydana gelen hücre ölümü şekliyle, programlı hücre ölümü moleküler olarak kontrol edildiğinden genetik veya farmakolojik olarak müdahale edilebilir, hızlandırılabilir, yavaşlatılabilir veya durdurulabilir (Galluzzi ve ark 2015, Singh ve ark 2024).

1842'de Alman anatomist Carl Vogt ilk kez kurbağaların metamorfoz sırasında geçirdiği değişiklikleri izleyerek spontan hücre ölümünün fizyolojik bir olay olduğunu öne sürmüştür (Clarke ve Clarke 1996, Park ve ark 2023). Modern immünolojinin öncüsü olarak kabul edilen Rus biyolog Elie Metchnikoff 1882 yılında bazı savunma sistemi hücrelerinin ölmekte olan hücreleri fagosite ettiğini gözlemleyerek savunma sisteminin doku homeostazisini korumadaki rolünü gözler önüne sermiştir (Maghsoudi ve ark 2012). Kerr ve ark (1972), bilinen ölüm şekli nekrozdan farklı olarak “apoptoz” u keşfettiklerinde hücre ölümünün tek bir şekilde olmadığını, farklı mekanizmalarla meydana gelebileceğini göstermişlerdir. Hücre ölüm şekilleri arasında apoptozdan başka 1967 yılında “otofaji”, 1999 yılında mitokondrial intihar anlamına gelen “mitoptosis”, 2000 yılında “paraptosis”, 2001 yılında pyroptosis, 2004 yılında “NETosis”, 2005 yılında “nekroptosis”, 2007 yılında “entosis”, 2008 yılında “methuosis”, 2009 yılında “parthanatos”, 2012 yılında “ferroptosis”, 2013 yılında “autosis”, 2018 yılında “alkoliptosis” ve oxeiptosis”, 2019 yılında “cuproptosis” ve 2022 yılında “erebosis” gibi bir çok farklı hücre ölümü tanımlanmıştır (Deter ve De Duve 1967, Sperandio ve ark 2000, Cookson ve Brennan 2001, Degterev ve ark 2005, Steinberg ve Grinstein 2007, David ve ark 2009, Dixon ve ark 2012, Liu ve ark 2013, Maltese ve Overmeyer 2014, Sun ve ark 2014, Holze ve ark 2018, Liu ve ark 2020, Ciesielski ve ark 2022, Tang ve ark 2022).

1.3.1 Apoptozis

Apoptoz kelimesi ilk kez Kerr ve ark (1972) tarafından morfolojik olarak farklı bir hücre ölümü tipini tanımlamak için kullanılmıştır. Programlı hücre ölümünün bir çeşidi olan apoptoz, hücre ölümünün travmatik versiyonu olan nekroza karşın organizmanın faydası için bazı hücrelerin ölümüne karar verildiği düzenli bir olaydır. Varlığına dair ilk kanıt omurgasızlarda, özellikle de *Caenorhabditis elegans*'ta

yürütülen çalışmalardan gelen apoptoz; çok hücreli canlılarda embriyonik gelişim, doku homeostazisi ve immün yanıt dahil olmak üzere birçok fizyolojik süreçte de rol oynar. Apoptozun sonunda hücre, apoptotik cisimcik (apoptotic body-ApoBDs) olarak da adlandırılan çok sayıda parçaya bölünür ve komşu hücreler tarafından fagosite edilir. Hücre içeriği salınmadığı için bu durum çok az iltihaplanmaya neden olur. Apoptoz esasen kaspazlar adı verilen bir dizi sistein aspartik proteazın aktivasyonu ile meydana gelir (Cohen 1997, D'Arcy 2019, Xu ve ark 2019).

Apoptozu Tetikleyen Etkenler ve Mekanizmaları

Apoptozun başlamasında; hipoksi, DNA hasarı, oksidatif stres, büyüme sinyallerinin azalması, mitokondrilerin dönüşümsüz hasarı gibi nedenler sayılabilir. Hücre bu nedenlerden bir veya birkaçına maruz kaldığında apoptozu başlatabilir. Apoptoz iki şekilde meydana gelir; ölüm reseptörü yolağı olarak adlandırılan ekstrinsik yolak ve Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenen ve mitokondriyal yolak olarak da adlandırılan intrinsik yolak (Song ve Steller 1999, Igney ve Krammer 2002, Danial ve Korsmeyer 2004).

Ekstrinsik yolak (Ölüm reseptörü yolağı)

Apoptozisdeki ekstrinsik yol (ölüm reseptörü yolu), Natural Killer (NK) ya da makrofajların Fas (CD95) gibi bir TNF reseptörünün ligandına (CD95L) bağlanarak reseptörün ve hücre içerisindeki FADD adlı adaptör proteini ile birleşen ölüm bölgesinin trimerizasyonuna yol açmasıyla başlar (Park ve ark 2023). Ölüm indükleyici sinyal kompleksi (death-inducing signal complex-DISC)'nin oluşmasıyla beraber adaptör protein prokaspaz-8 ile birleşerek apoptozu başlatan sinyalizasyon kompleksini oluşturur. Prokaspaz-8, daha küçük birimlere bölünerek kaspaz-8 'i oluşturur. Kaspaz-8 önce bir cellat kaspaz olan ve DNA ile diğer substratları hücre ölümüne yol açmak üzere parçalayan, kaspaz-3 gibi kaspazları aktif duruma getirir. Kaspaz-3 ya proteaz aktivasyonu ile ya da endonükleaz aktivasyonu ile apoptozu başlatır (Coşkun 2011, D'Arcy 2019, Park ve ark 2023). Apoptoz ekstrinsik olarak perforin-granzim yoluyla da başlatılabilir (Trapani ve Smyth 2002). Granzim-B, prokaspaz-10'u aktive ederek ve ICAD (İnaktif kaspaz aktive edici DNaz)'ı

parçalayarak apoptozu başlatabileceği gibi direkt olarak kaspaz-3'ü de aktive edebilir (Elmore 2007).

İntrinsik yolak (Mitokondriyal yolak)

İntrinsik yoldan apoptozun aktivasyonu, mitokondri dış zarının geçirgenlik kazanmasıyla ve apoptozu başlatacak olan sitokrom-c gibi molekülleri serbest bırakmasıyla meydana gelir. Mitokondri dış membranının bütünlüğü, Bcl-2 protein ailesinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri tarafından düzenlenir. Apoptozun gerçekleşmesi için ihtiyaç duyulan pro-apoptotik BAX ve BAK proteinleri doğrudan doğruya, mitokondri membranının geçirgenliğini teşvik eder (Park ve ark 2023). BAX ve BAK gibi pro-apoptotik genlerin bu etkileri, aynı ailenin Bcl-2 ve Bcl-Xl gibi anti-apoptotik üyeleri tarafından inhibe edilir. BAD, BID ve PUMA gibi proteinlerin yer aldığı BH3 proteinleri olarak adlandırılan üçüncü bir protein grubu, Bcl-2 ailesinin pro- ve anti-apoptotik üyeleri arasındaki dengeyi düzenler. BH3 ailesi proteinleri apoptozu, Bcl-2 ailesinin Bcl-2 ve Bcl-Xl gibi anti-apoptotik proteinlerini inaktive ederek teşvik eder (Elmore 2007, Coşkun 2011, Park ve ark 2023). Ekspresyonu gerçekleşen tüm BH3 proteinlerin toplamı, Bcl-2/Bcl-Xl protein engelini aştığında, BAX ve BAK gibi proapoptotik genler aktif duruma gelerek mitokondri membranında por oluşumuna sebep olurlar. Bu porlardan SMAC (Second mitochondria-derived Activator of Caspase), Ca^{2+} , Sitokrom-C, Endo-G (Endonukleaz-G) ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımı uyarılır. Sitokrom-C, oksidatif fosforilasyon için elektron taşıyıcı SMAC, İnhibitör apoptotik faktör (IAF)'ü inhibe ederek apoptozu hızlandırır (IAF'in ortamda bulunması kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonunu engeller). AIF çekirdeği parçalara ayırırken Endo-G de DNA'yı fragmentlerine parçalar. Mitokondriyal porlardan salınan sitokrom-C, Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve ATP'nin katılmasıyla sitozolde Apoptozom adı verilen bir kompleks oluşturur (Coşkun 2011, Park ve ark 2023). Apoptozom kaspaz-9'u aktive ettikten sonra Kaspaz-9 prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir. Aktif kaspaz-3 ICAD'ı inaktifleştirerek Kaspaz aktive edici DNaz (CAD)'ı serbestleştirir. CAD, çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın parçalara ayrılmasına neden olur. Ekstrinsik apoptoz yolundaki kaspaz-8 gibi kaspaz-9 da cellat kaspazların aktivasyonuna neden

olabilir (Danial ve Korsmeyer 2004, Elmore 2007, Coşkun 2011, Meredith ve Dass 2016, D'Arcy 2019).

Görüldüğü gibi hem Bcl-2 hem de kaspaz-3 apoptoz mekanizmasının temelini oluşturan yapıtaşları arasındadır. Bcl-2, insan B hücreli foliküler lenfomalarda 14. ve 18. kromozomların arasındaki kromozomal translokasyonun incelenmesiyle tanımlanmıştır (Tsujimoto ve ark 1985). Tanımlanan diğer onkogenlerin aksine Bcl-2'nin hücre proliferasyonunu indükleyerek değil, hücre ölümüne engel olarak hücre sayısında artışa sebep olduğu bildirilmiştir (Tsujimoto 1989). *C. elegans* solucanı üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar sonucu Bcl-2'nin solucanlardaki homoloğu olan CED-9'un hücre ölümünü inhibe ettiği gösterilmiştir (Hengartner ve ark 1992, Hengartner ve Horvitz 1994). Bcl-2'nin adının verildiği Bcl-2 ailesi proteinlerinde, Bcl-2'nin yanı sıra anti-apoptotik genlerden Bcl-Xl, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1, Bcl-b; pro-apoptotik genlerden BAX, BAK, BOK; BH3 proteinlerinden BAD, PUMA, NOXA gibi proteinler bulunmaktadır (Hardwick ve Soane 2013). Bcl-2, mitokondrinin dış zarında lokalizedir ve hücre sel hayatta kalmanın desteklenmesi ile pro-apoptotik proteinlerin engellenmesinde önemli bir rol oynar. BAX ve BAK gibi Bcl-2 ailesindeki pro-apoptotik proteinler ve bu pro-apoptotik genlerin aktivasyonunu sağlayan BH3 proteinleri, Bcl-2 ve onun homologları olan diğer anti-apoptotik genler tarafından inhibe edilir (Hardwick ve Soane 2013).

CPP32, SCA-1 ya da CPP32B olarak da bilinen kaspaz-3, CASP3 geni tarafından kodlanan bir sistein aspartik proteazdır (Alnemri ve ark 1996). Memelilerde tanımlanan iki alt kaspaz ailesinin apoptotik kaspazlar olarak adlandırılan ailesinden ve alt ailesinin efektör kaspazlarından biri olan kaspaz-3, hücre içinde diğer kaspazlar gibi prokaspaz formundadır. Apoptozun ekstrinsik veya intrinsik yollarla indüklenmesi sonucu başlatıcı kaspazlar olarak adlandırılan kaspaz-8, kaspaz-9 gibi kaspazlar tarafından aktive edilerek aktif forma dönüştürülür (Eskandari ve Eaves 2022). Apoptoz sırasında apoptozomal kompleks tarafından aktive edilen kaspaz-3, kaspazla aktive edilen DNaz (ICAD)'ın inhibitörünün parçalanmasını sağlayarak kaspazla aktive edilen DNaz (CAD)'ın aktifleşmesine neden olur ve böylece DNA fragmentlerine ayrılır (Enari ve ark 1998, Larsen ve Sørensen 2017, Eskandari ve Eaves 2022).

DOX, hücre homeostazisini bozarak, ROS birikimine ve mitokondriyal hasara neden olarak apoptozu indükler. Bunu hem Fas/FasL aracılığıyla kaspaz-8'i daha sonra da kaspaz-3'ü aktive ederek ekstrinsik yol ile, hem de anti-apoptotik genleri aşağı yönlü regüle edip BAX gibi pro-apoptotik genleri aktifleştirerek intrinsik yol ile gerçekleştirebilir (Zhang ve ark 2009, Meredith ve Dass 2016).

Childs ve ark (2002) tarafından ratlara tek doz 20 mg/kg olarak DOX uygulanan çalışmada kardiyomiyositlerde sitokrom C salınımının ve apoptozun arttığı bildirilmiştir. Kim ve ark (2006)'nın yaptıkları çalışmada DOX'un kardiyomiyositlerde Ca^{2+} oranının yükselmesine sebep olarak apoptozu arttırdığını belirtmişlerdir. Kluza ve ark (2004) embriyonik kalp hücrelerinden elde edilen hücre kültürü ile yaptıkları çalışmada DOX'un mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna sebep olduğu ve böylece apoptozda artışa neden olduğu görülmüştür. Yine Kalivendi ve ark (2005) tarafından hem embriyonik hem de yetişkin rat kalbinden elde edilen hücre kültürleri üzerinde yapılan çalışmada DOX'un kardiyomiyositlerde ROS artışına bağlı olarak sitozolik kalsiyum seviyelerinde artışa sebep olduğu, bunun sonucunda da transkripsiyon faktörü olan aktive edilmiş T-lenfositlerin nükleer faktörü (nuclear factor of activated T-lymphocytes-NFAT)'nın kalsiyum/kalsinörine bağımlı aktivasyonunu uyararak apoptozu indüklediği bildirilmiştir. Zhang ve ark (2012) tarafından normal ve Top2 β 'si silinmiş fareler üzerinde 5 mg/kg ve 25 mg/kg IP olarak uygulanan DOX tedavisi sonucu DOX'un normal farelerde ROS artışına sebep olduğu ve buna bağlı olarak apoptozun indüklendiği bildirilmiştir. Top2 β 'si silinen farelerde ise normal mitokondriyal biyogenезin devam ettiği ve kardiyotoksisite meydana gelmediği belirtilmiştir. Gu ve ark (2016) embriyonik rat kalbinden elde edilen hücre kültürlerine uygulanan DOX tedavisi sonucu DOX'un pro-apoptotik genlerin ekspresyonlarını arttırdığını ve apoptozu indüklediklerini bildirmişlerdir. Zhao ve Zhang (2017) tarafından, kardiyomiyositlerden elde edilen hücre kültürü üzerinde farklı dozlarda DOX kullanımı ile gerçekleştirilen çalışmada özellikle ekstrinsik apoptozu indükleyen TNFR1, Fas, DR4, DR5, TRAIL ekspresyonlarının arttığı bildirilmiştir. Akolkar ve ark (2017) ise erkek wistar albino ratlara üç hafta boyunca 6 doz olacak şekilde 2,5 mg/kg olarak uygulanan DOX tedavisi sonrası DOX'un ROS artışının yanı sıra lipid peroksidasyonunda artışa neden olduğunu buna bağlı olarak da apoptozu indüklediğini bildirmişlerdir.

1.3.2. Nekrozis

Doku ve hücrelerin yersel ölümü olarak tanımlanan nekroz, hücre zarının yırtıldığı, hücre organellerinin şişerek hücre dışına çıktığı bir süreç olarak tanımlanır. En yaygın nedeni hipoksi olmakla beraber ısı, radyasyon, travma, elektrik çarpması gibi fiziksel sebepler, toksik maddeler, ağır metaller, patojen mikroorganizmalar ve otoimmün sebepler da nekroza neden olur (Khalid ve Azimpouran 2024). Nekrozda dışarıdan gelen kimyasal ve fiziksel uyarılar hücrenin iyon dengesini bozar. DNA tamiri, genomik stabilite ve apoptoz gibi birçok olaydan sorumlu nükleer enzim Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP), NAD⁺ 'ı ikiye bölerek NAD kaybına neden olur (Park ve ark 2023). Bunun sonucunda meydana gelen ATP eksikliği sonucu iyon pompası fonksiyonunda yetersizlik meydana gelir. İyon pompasının fonksiyonundaki bozulma sonucu hücre sıvı alır ve organeller şişer, plazma membran bütünlüğü bozulur ve osmotik basınç nedeniyle hücre patlar (Park ve ark 2023). Nekrozu takiben hücre içeriği hücreler arası boşluğa dağılarak yangıya neden olur ve nekrotik hücreler nötrofiller ve makrofajlar tarafından fagosite edilerek ortamdan uzaklaştırılır (Golstein ve Kroemer 2007, Coşkun 2011, Brenner ve ark 2015, Park ve ark 2023, Khalid ve Azimpouran 2024). Morfolojik olarak nekrotik hücrelerde karakteristik olarak endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi organeller şişer, plazma zarı yırtılır ve hücre parçalanır. Bu değişiklikler hücrelerin sitoplazmalarının daha eozinofilik, camsı ve vakuollü olmasına neden olur (Khalid ve Azimpouran 2024). ATP'nin sentezinin azalması veya tükenmesi, nekrozda gözlenen ilk biyokimyasal değişiktir. ATP, mitokondride oksijen varlığında oksidatif fosforilasyonla üretilir. Hipoksi veya kimyasal hasarla ilişkili nekrozda, hücrelere oksijen sağlanmasında aksaklık meydana gelir, buna bağlı ATP üretiminde de aksaklık olur. Bu ATP eksikliği, plazma zarındaki enerjiye bağımlı sodyum pompasının arızalanmasına bağlı olarak hücre içine kalsiyum ve su girişine neden olur. (Zong ve Thompson 2006, Coşkun 2011, D'Arcy 2019, Park ve ark 2023, Khalid ve Azimpouran 2024).

DOX, sebep olduğu DNA hasarı, hücre içi ve mitokondriyal Ca²⁺ miktarında artış, mitokondriyal DNA hasarı nedeniyle ATP üretiminde azalma, siklofilin D (Cyp D) bağımlı mitokondriyal geçirgenlik geçişi (mPT) aracılığıyla mitokondride por açılmasına ve mitokondriyal şişme nedeniyle ATP üretiminde azalma, DNA interkalasyonu ve DNA hasarı sonrası PARP-1 ve H2A histon ailesi üyesi X'i (H2AX) aktive ederek NAD ve glikolizisi, dolayısıyla ATP üretimini inhibe etmesi gibi

nedenlerle kardiyomiyositlerde nekroza ve nekroptozu sebep olur (Lebrecht ve Walker 2007, Zhang ve ark 2009, Wang ve ark 2014, Feoktistova ve Leverkus 2015, Meredith ve Dass 2016).

Mukhopadhyay ve ark (2009) tarafından farelere tek doz 20 mg/kg olarak DOX uygulanan çalışmada, DOX'un apoptozla beraber nekrozu da indüklediği belirlenmiştir. Rharass ve ark (2016) tarafından embriyonik rat kalbinden elde edilen hücre kültürlerine uygulanan farklı dozlardaki DOX sonucu, DOX'un kısa süreli maruziyetlerde daha çok apoptozu, uzun süreli maruziyetlerin ise nekrozu indüklediği belirtilmiştir. Dhingra ve ark (2014)'nın postnatal rat kalbinden elde edilmiş hücre kültürlerinde yaptıkları çalışmada DOX'un mitokondriyal hasarın yanı sıra kardiyomiyositlerde nekrozu indüklediği belirtmişlerdir.

1.3.3. Otofaji

Kelime anlamı olarak “kendi kendini yemek” anlamına gelen otofaji ilk olarak yaklaşık yarım yüzyıl önce Deter ve De Duve (1967) tarafından kullanılmıştır (Glick ve ark 2010). Otofaji, hücre içi organellerin ve makromoleküllerin iki veya daha fazla sayıda membranla çevrili veziküller halinde lizozomla birleşmesi ve enzimler tarafından sindirilmesi ile meydana gelir. Otofajinin meydana gelmesinde hem fizyolojik hem de patolojik etkenler rol oynayabilir (Li ve ark 2021). Otofaji, başta enerji yoksunluğu olmak üzere çeşitli stres faktörleri tarafından başlatılabilmekle beraber hücresel farklılaşma, embriyogenez ya da hasarlı organellerin yüzeyinde mevcut olan sinyaller aracılığıyla da indüklenebilmektedir ve hem hücrenin korunmasında hem de hücrenin ölümünde rol oynar (Mizushima ve ark 2008, D’Arcy 2019). Ubikuitin-proteazom sistemi, yanlış katlanmış proteinlerin lizozomal olmayan parçalanması ve daha kısa ömürlü proteinlerin normal dönüşümü için ana mekanizma iken, otofaji uzun ömürlü proteinlerin ve organellerin lizozomal sindirimi için birincil mekanizmadır (Baehrecke 2005, Levine ve Yuan 2005, Dorn 2009). Günümüze kadar üç farklı otofaji şekli tanımlanmıştır. Bunlar makrotofaji, mikrotofaji ve seçici otofaji (şaperon aracılı otofaji)’dir (D’Arcy 2019).

Makrotofajide, hücrenin tüm bölgeleri, otofagozomlar olarak adlandırılan çift membranlı veziküller aracılığıyla çevrelenir ve bu otofagozomlar lizozomlarla birleşerek otofagolizozom haline gelir. Otofagolizozomlarda hücre içeriği enzimler tarafından parçalanır (Cuervo 2004, D’Arcy 2019).

Mikrotofajide, sindirilecek organel veya sitozol bölgesi lizozomlarla direkt etkileşime girer. Mikrotofaji, makrotofajiye göre daha seçicidir ve mitokondri veya peroksizomlar gibi hasarlı organellerin yüzeyinde bulunan sinyal molekülleri tarafından indüklenebilir. Bunun sonucunda bu hasarlı organeller lizozomlarla birleşerek sindirimi başlatırlar. Mikrotofajide lizozomla birleşen organelle göre otofajik vezikülün adı değişebilir. Örneğin lizozomla birleşen organel mitokondri ise otofajik vezikül mitofaji, endoplazmik retikulum ise retikolofaji, ribozom ise ribofaji olarak adlandırılır (He ve Klionsky 2009, D'Arcy 2019).

Şaperon aracılı otofajide, sitoplazma içindeki proteinler, şaperon ve substratın amino asit dizisi içinde bulunan bir pentapeptit arasındaki etkileşim yoluyla sitozolik bir şaperon tarafından lizozomlarla eşleştirilerek otofaji başlatılır (D'Arcy 2019).

Otofaji çalışmalarında özellikle mayalardan *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* ve *Hansenula polymorpha*'daki çalışmalar sonrası 31 adet otofajiyle ilişkili gen (autophagy-related gene, ATG) tespit edilmiştir. ATG proteinleri otofaji sırasında gerçekleşen aşamaların çoğunu düzenlemekle görevlidirler (He ve Klionsky 2009).

Otofaji Mekanizması

Makrotofajinin genellikle ana otofaji mekanizması olduğu kabul edilir. Bu nedenle makrotofaji mekanizması anlatılacaktır. Otofaji süreci, indüksiyon, yük tanıma ve seçme, vezikül oluşumu, otofagozom-vakuol füzyonu ve yükün parçalanmasının ardından sindirilmiş hücre materyalinin sitozole geri salınması dahil olmak üzere birçok adımda gerçekleşir (He ve Klionsky 2009).

Hücrede otofajinin başlatılması için geçerli neden veya nedenlerin oluşması gerekir. Bu nedenler arasında hücrede strese neden olabilecek besin ve enerji yetersizliği başta olmak üzere hormon eksikliği, patojen varlığı, ROS artışı, toksik ajanlar gibi nedenler sayılabilir. Otofajinin en önemli inhibitörü rapamisin hedefi olarak bilinen (target of rapamycin) TOR'dur. TOR hücrede, hücre büyümesini ve protein sentezini kontrol eden bir serin/treonin protein kinazdır. Bu proteinin eksikliğinde veya baskılanmasında hem mayalarda hem de memelilerde otofajinin arttığı bildirilmiştir (He ve Klionsky 2009). Memelilerdeki TOR (mammalian target of rapamycin-mTOR), memelilerde otofajiden sorumlu en önemli proteindir. Mayalarda rapamisin ile TOR'un baskılanması sonucu Atg1 kinaz aktivitesinin aktifleştirildiği ve

otofajinin indüklendiği bildirilmiştir (Kamada ve ark 2000). Otofajide görev olan iki Atg1 proteini tanımlanmıştır. Bunlar Unc-51 benzeri kinaz 1 (ULK1) ve Unc-51 benzeri kinaz -2 (ULK2)'dir. mTOR'un rapamisin ya da açlık gibi nedenlerle inhibe edilmesi sonrası ULK1 ve ULK2 aktive olur ve otofajinin aktivasyonu için Atg13 ve FIP200 (FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa)'ü fosforile eder. mTOR'un yanı sıra Adenosin monofosfatla aktifleştirilen protein kinaz (AMPK), Beclin-1, Bcl-2, fosfoinositid-3-kinaz (PI3K) ve p53 proteinleri dahil olmak üzere bir dizi başka sinyal yolu ve aracı tarafından da otofaji indüklenebilir ve düzenlenebilir. Atg13 ve FIP200'ün fosforilasyonundan sonra pre-otofagozomal membran formasyonu meydana gelir (He ve Klionsky 2009).

Sindirilecek olan maddelerin tanınmasında spesifik reseptör proteinleri rol oynar. Ökaryotlarda p62/sekestozom 1 (SQSTM1), ubiquitinle ilişkili bölge (ubiquitin associated-UBA) ve mikrotübülle ilişkili protein 1 hafif zincir 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3-LC3) aracılığı ile tek veya çok zincirli ubiquitini bağlayarak otofaji için seçici hale getirir (Björkøy ve ark 2005, Pankiv ve ark 2007, He ve Klionsky 2009).

Otofagozom oluşumunda başlangıçta, PtdIns3K Vps34 (vacuolar protein sorting-34), p150, Barkor (Atg14) ve Beclin 1(Atg6)'dan oluşan sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz (PtdIns3K) kompleksinin oluşması gerekmektedir. Beclin-1, otofagozom oluşumundaki rolü nedeniyle otofaji için olmazsa olmazlardandır. Beclin-1'in otofajideki işlevi Bcl-2 tarafından düzenlenir. Enerji bakımından zengin koşullar altında Bcl-2, Beclin 1'i inhibe ederek otofajiyi engeller (Pattingre ve ark 2005). Bcl-2'nin bu rolü hücrenin apoptoza mı yoksa otofajiye mi gideceğinin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir (Hsieh ve ark 2009). Otofagozom oluşmaya başladıktan sonra mikrotübüllerle ilişkili sitozolik protein LC3 (MAP-LC3), fosfatidiletanolamin'e konjuge edilmek üzere ATG4, ATG5, ATG7 ve ATG12 tarafından sırayla işlenir ve daha sonra otofagozomun hem iç hem de dış zarının çift katmanına yerleştirilir. LC3'ün vakuoler formuna LC3II adı verilir. LC3, otofagozomun boyutunu kontrol etmede görevlidir (He ve Klionsky 2009, Fuzimoto ve ark 2021). Otofagozom henüz yapım aşamasındayken enzimatik reaksiyona uğrayacak otofaji substratı p62/sequestosome 1 (p62/SQSTM1) proteini tarafından bağlanarak otofagozomun lümeninde tutulur (Björkøy ve ark 2005, Fuzimoto ve ark

2021). Bu aşamadan sonra otofagozom ve lizozomlar birleşerek otolizozomları oluştururlar ve sindirme işlemi başlamış olur (Fuzimoto ve ark 2021). Sindirme işlemi tamamlandıktan sonra yine bir kısım Atg proteinleri ve enzimler sayesinde otolizozom bozulur ve içerik sitoplazmaya boşaltılır (He ve Klionsky 2009). Otofajiyi başlatabilecek sinyal yolları arasında besin yetersizliği, enerji eksikliği, stres, insülin/büyüme faktörü, hipoksi, oksidatif stres ve patojen enfeksiyonu sayılabilir. (He ve Klionsky 2009). DOX mitokondriyal fonksiyonu ve enerji üretim sürecini bozarak, ROS üretimine neden olarak otofajiyi indükler. DOX, stres seviyelerine, özellikle de kardiyomiyositlerde dozajına bağlı olarak koruyucu veya zararlı etki gösteren otofajiyi indükleyebilir.

Lu ve ark (2009), neonatal Sprague–Dawley ratların kalplerinden elde ettikleri hücre kültürlerine 24 saat boyunca uyguladıkları 1mg/L DOX tedavisi sonrası DOX'un kardiyomiyositlerde otofajiyi indüklediklerini bildirmişlerdir. Kobayashi ve ark (2010), neonatal Harlan Sprague-Dawley rat kalplerinden elde ettikleri hücre kültürlerine 18 saat boyunca uyguladıkları 1 µM DOX maruziyeti sonrası DOX'un otofajiyi arttırdığını ve memeli kalbi için önemli bir transkripsiyon faktörü olan GATA4'ün Beclin-1 ile etkileşime girerek DOX kaynaklı otofajiyi engellediğini bildirmişlerdir. Chen ve ark (2011), iki günlük Sprague-Dawley rat kalbinden elde ettikleri hücre kültürlerine 16 saat boyunca uyguladıkları 1 µM DOX sonucu otofajinin arttığını ve kalori kısıtlaması sonuçlarını taklit eden 2-deoksi- d -glikoz (2-DG) kullanımının DOX'a bağlı otofajiyi azalttığını ortaya koymuşlardır. Dimitrakis ve ark (2012), Wistar Albino rat kalplerinden elde ettikleri hücre kültürlerine uyguladıkları 10 µM DOX sonucu, özellikle 48 saatlik maruziyetten sonra LC3 miktarında artışının şekillendiğini ve dolayısıyla otofajinin arttığını, kardiyomiyositlerin normal protein degradasyonunun bozulduğunu ve otofagosomların biriktiğini tespit etmişlerdir. Xu ve ark (2012), neonatal ratların ventriküllerinden elde edilen hücre kültürlerine 18 saat boyunca uyguladıkları 1 µM DOX'a bağlı meydana gelen kardiyotoksisite sonucunda Beclin-1 ekspresyonunun artışı sonrası otofajinin arttığını ve resveratrol'ün DOX kaynaklı kardiyomiyosit ölümünü antagonize ettiğini bildirmişlerdir. Ying-Yu ve ark (2015) tarafından 8 haftalık erkek farelere (2 mg/kg, günde 7 gün, IP) ve embriyonik rat kalbinden elde edilmiş kök hücrelerine (1 µM, 12 saat) uyguladıkları DOX sonucu farklı zaman periyotlarında kullanılan DOX'un kardiyomiyositlerde ROS artışına bağlı olarak LC3-II/LC3-I oranının ve Beclin-1 seviyesinin artmasına bağlı olarak

otofajinin indüklendiği, ophiopogonin D adı verilen ve kardiyoprotektif etki gösteren bir antioksidanın kullanımının DOX'a bağlı ROS oluşumunu azalttığı ve otofajiyi azalttığı tespit edilmiştir. Ludke ve ark (2017) tarafından Sprague-Dawley rat kalplerinden elde edilmiş kardiyomiyositlere 24 saat boyunca uygulanan 10 μ M DOX'un ROS artışına bağlı olarak LC3-II miktarında artışla beraber otofajiyi arttırdığı, kullanılan vitamin C'nin ROS oluşumunu azalttığı ve otofajiyi baskılayarak DOX'un neden olduğu hasarı engellediği bildirilmiştir.

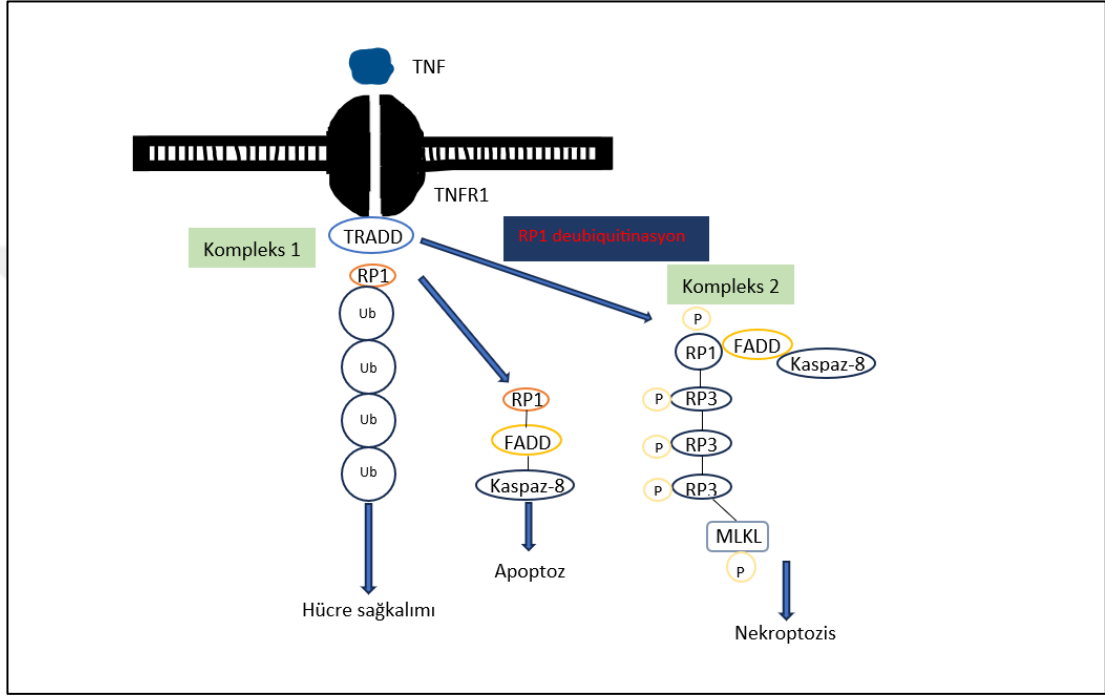
DOX'un kardiyomiyositlerde otofajiyi arttırdığını bildiren çalışmaların yanı sıra azalttığını bildiren çalışmalar da mevcuttur. Sishi ve ark (2013), ratlardan elde edilen kardiyak myoblastlara 24 saat boyunca uyguladıkları 3 μ M DOX tedavisi sonrası otofajinin azaldığını ve hatta TOR inhibitörü olan rapamisin'in otofajiyi arttırarak DOX kaynaklı kardiyotoksisiteyi azalttığını bildirmişlerdir. Kawaguchi ve ark (2012) yetişkin farelerde toplamda 20 mg/kg olacak şekilde üç gün aralıklarla uyguladıkları 10 mg/kg DOX sonrası DOX'un otofaji basamaklarından biri olan otofagozom oluşum sürecini bozduğunu bildirmişlerdir. Gu ve ark (2016) Sprague Dawley ratlar üzerinde (15 mg/kg) ve embriyonik rat kalbinden elde ettikleri hücre kültürlerine (2 μ M) uyguladıkları DOX tedavisi sonucu apoptozun indüklendiğini, koruyucu amaçla kullanılan resveratrolün AMPK'yi doza ve zamana bağlı bir şekilde aktive ederek, ULK1'in fosforilasyonuna/aktivasyonuna ve mTOR'un baskılanmasına neden olduğunu bunun sonucunda da otofajinin indüklendiğini ve DOX kardiyotoksisitesine karşı koruyucu etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Yine Cao ve ark (2017) embriyonik rat kalbinden elde ettikleri hücre kültürlerine uyguladıkları DOX tedavisi sonucu DOX'un kardiyomiyositlerde otofagozomlar üzerinden otofajik akış sürecini bozarak aşırı apoptozu indüklediğini ve Astragalus membranaceus'tan elde edilen Astragalus polisakkaritlerinin, AMPK/mTOR yolağını düzenleyip otofajinin indüklenmesini sağlayarak kardiyomiyositlerdeki hasarı azalttığını bildirmişlerdir.

1.3.4. Nekroptozis

Nekroptoz, mekanistik olarak apoptoza, morfolojik olarak nekroza benzerlik gösteren fakat mekanizmasal ve biyokimyasal açıdan nekroz ve apoptozdan farklı bir programlı hücre ölümü şeklidir. Apoptoz engellendiğinde aktive olan hücresel kendi kendini yok etme süreci olan nekroptoz, kelime olarak ilk defa 2005 yılında

tanımlanmıştır (Degterev ve ark 2005, Ma ve ark 2023). Nekroptoz ilk olarak, yalnızca zVAD-florometil keton gibi bir pan-kaspaz inhibitörünün varlığında TNF ile indüklenebilen kaspazdan bağımsız hücre ölümü olarak kabul edilmiştir (Vercammen ve ark 1998, Linkermann ve Green 2014). Nekroptoz, TNF reseptör süper ailesi (FasL, TNF α , TRAIL vb.) TLR'ler ve interferon reseptörleri vb. apoptozu indükleyen reseptörler tarafından indüklenebilir (Degterev ve ark 2014, Pasparakis ve Vandenabeele 2015). Genel olarak, bu reseptörlerin ligandları veya çeşitli stres faktörleri, kaspaz-8'in aktivasyonu yoluyla dışsal apoptozu tetikleyebilmektedirler. Kaspaz-8, nekroptozun başlatılması için gerekli olan RIPK1 ve RIPK3 proteinlerinin fonksiyonunu inhibe edebilir. Bu nedenle nekroptozun başlatılması kaspaz-8'in ekspresyonuna ve aktivitesine bağlıdır (Newton ve ark 2019). Kaspaz-8, dolayısıyla da apoptozun dışsal yolu baskılandığında ise RIPK1 ve RIPK3 aktive olur ve nekroptoz başlatılır (Han ve ark 2021). RIP1'in ubiquitinasyonu sonucu da hücre sağ kalımı gerçekleşir ve apoptoz veya nekroptoz şekillenmez (Şekil 1.3.) (Christofferson ve ark 2014). TNF'nin neden olduğu nekroptoz sırasında RIPK1, karışık soy kinaz alanı benzeri proteinin (Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein/MLKL) oligomerizasyonunu ve fosforilasyonunu destekleyen nekrozomlar oluşturmak için RIP homotipik etkileşim motifi (RHIM) aracılığıyla RIPK3'ü bağlar ve MLKL'nin aktivasyonu için amiloid benzeri bir yapı oluşturulur (Chan ve ark 2015). RIP3 MLKL'yi fosforile ederek MLKL'nin plazma membranına translokasyonunu uyarır (Sun ve ark 2012, Cai ve ark 2014, Chan ve ark 2015). MLKL'nin plazma membranının rupturunu indüklemeye yolu tartışmalı olsa da MLKL'nin direkt membran fosfolipidlerine bağlanarak membran bütünlüğünü bozduğu ya da kalsiyum veya sodyum iyon kanallarını bozarak hücrenin nekroptozuna sebep olduğu düşünülmektedir (Cai ve ark 2014, Chen ve ark 2014, Dondelinger ve ark 2014, Wang ve ark 2014, Chan ve ark 2015). Plazma membranının bütünlüğü ve işlevi bozulduğunda hücreden hücre dışına hasarla ilişkili moleküller (Damage-Associated Molecular Patterns-DAMP)'in salınımı gerçekleşir. Salınan DAMP'ler, bağışıklık hücreleri üzerindeki pattern tanıma reseptör (Pattern Recognition Receptors-PRR)'ler tarafından tanınır ve bunun sonucunda inflamatuvar yanıt meydana gelir. Bu inflamatuvar yanıt, ölü hücrelerin temizlenmesine ve doku onarım süreçlerinin başlatılmasına katkıda bulunmakla beraber aşırı veya uzun süreli inflamasyon, doku hasarına ve/veya çeşitli hastalıkların patogenezeine katkıda bulunabilir (Park ve ark 2023). Yapılan çalışmalar nekroptozun, nörodejeneratif hastalıklar, viral

enfeksiyonlar, iskemi-reperfüzyon hasarı ve kanser dahil olmak üzere birçok hastalığın patogeneğinde rol oynadığını göstermektedir (Gong ve ark 2019, Yuan ve ark 2019, Liu ve ark 2021, Maslov ve ark 2022, Park ve ark 2023). Nekroptozun, bir RIP1 inhibitörü olan nekrostatin-1 (Necrostatin-1/Nec-1) ve MLKL inhibitörü olan nekrosülfonamid (Necrosulfonamide/NSA) ile inhibe edilebildiği bildirilmiştir (Kaiser ve ark 2011, Sun ve ark 2012, Linkermann ve Green 2014).



Şekil 1.3. TNF aracılı nekroptoz.

Shipra ve ark (2023) farelere tek doz 10 mg/kg IP olarak uygulanan DOX'un kardiyomiyositlerde oksidatif stres ve nekroptozu neden olduğunu bildirmişlerdir. Zhang ve ark (2023) tarafından farelere 6 gün boyunca gün aşırı 2,5 mg/kg IP olarak uygulanan DOX sonucunda RIP1, RIP3 ve MLKL ekspresyonunda artışa bağlı nekroptozun indüklendiği belirtilmiştir. Yu ve ark (2020) da farelere 3 gün boyunca gün aşırı 10 mg/kg IP olarak uyguladıkları DOX'un kardiyomiyositlerde nekroptozu arttırdığını bildirmişlerdir.

1.3.5. Ferroptozis

Ferroptoz nispeten yeni keşfedilmiş bir hücre ölümü şeklidir. Dolma ve ark (2003) RAS eksprese eden kanser hücreleri üzerinde seçici olarak öldürücü etkiye sahip yeni bir bileşik olan erastin'i keşfetmiş ancak hücre ölümü şeklinin daha önce görülenden farklı olduğunu belirlemişlerdir. Bu hücre ölüm şeklinde DNA

fragmentasyonu, çekirdekte morfolojik değişiklikler ve kaspaz aktivasyonunun olmadığı, kaspaz inhibitörleri ile tersine çevrilemediği tespit edilmiştir. Yang ve Stockwell (2008) bu hücre ölümü modelinin demir şelatlama maddeleri tarafından inhibe edilebileceğini bulmuşlardır. Dixon ve ark (2012) erastin'in RAS mutasyonlu kanser hücrelerini öldürdüğü mekanizmayı incelerken bu hücre ölümünü “ferroptoz” olarak adlandırmışlardır. Morfolojik olarak, ferroptozun esas olarak hücrelerde mitokondri hacminin azalması, çift katmanlı membran yoğunluğunun artması ve mitokondriyal kristallerin azalması veya kaybolması ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Mitokondride meydana gelen bu değişikliklerin dışında çekirdeğin boyutu normaldir, hücre zarı sağlam kalır ve kromatinde yoğunluk meydana gelmez. Biyokimyasal olarak hücre içi glutatyon (GSH)'nın tükendiği ve glutatyon peroksidaz 4'ün (GPX-4) aktivitesinin azaldığı belirtilmiştir (Dixon ve ark 2012, Li ve ark 2020). Bunun sonucunda lipid peroksitler GPX4 ile katalize edilen indirgeme reaksiyonu ile metabolize edilemez ve Fe^{2+} , lipidleri Fenton benzeri bir şekilde oksitleyerek büyük miktarda ROS oluşumuna neden olur ve buna bağlı olarak hücre ölümü şekillenir (Dixon ve ark 2012).

Ferroptotik hücre ölümüne, diğer hücre ölümü türlerinden farklı hücre morfolojisi, metabolizması ve protein ekspresyonundaki bazı değişiklikler eşlik eder. Ferroptozda hücreler, hücre ölümünden önce nekrotik hücrelere benzer şekilde karakteristik yuvarlak bir şekil alır, ancak sitoplazmik şişkinlik ve organel şişmesi veya plazma zarı yırtılması yoktur. Çekirdekler, apoptozda olduğu gibi yoğunlaşmaz ve hücreler kromatin marjinasyonu, plazma zarı taşması veya apoptotik cisimciklerin oluşumu olmadan yapısal bütünlüğünü korur (Dixon ve ark 2012). Ayrıca, otofajik hücrelerde görülen çift zarla kaplı kesecikler ve piroptozda görülen yoğun kabarcıklaşma, plazma zarı bütünlüğünün kaybı gibi morfolojik özellikler ferroptotik hücrelerde gözlenmez (Dixon ve ark 2012, Liang ve ark 2019). Ferroptozun tek ayırt edici morfolojik özelliği, yukarıda da bahsedildiği gibi artan zar yoğunluğuyla normalden daha küçük görünen mitokondridir (Dixon ve ark 2012, Yan ve ark 2021).

Ferroptoz'da birçok mekanizma rol oynar. Daha önce de bahsedildiği gibi erastin, onkogenik RAS mutasyon hücre hatlarında ferroptozu indükleyen moleküller arasındadır. Erastin hedeflerinin araştırılması, sistein metabolizmasını ferroptoz başlangıcına bağlar. Glutamat-sistein antiport sistemi x(c)(-) [System x(c)(-)] erastin

kaynaklı ferroptoz sırasında erestinin en önemli hedefidir. Sistem x(c)(-), sisteinin ana formu olan sistin'i, 1:1 oranında glutamat değişimi yoluyla hücrelere taşır. Sistem x(c)(-)'nin inhibisyonu hücresel sisteini yok eder ve glutatyon ile değişimi gerçekleşmez (Conrad ve Sato 2012). Glutatyon bütün vücutta hücresel antioksidan savunmada çok önemli bir rol oynar. Glutatyonun tükenmesi, lipit kaynaklı ROS birikmesine, protein veya membran hasarına ve nihayetinde ferroptotik hücre ölümüne yol açar (Martin ve Teismann 2009, Xu ve ark 2019).

Glutatyon peroksidaz-4 (GPX-4) lipit peroksitlerin toksisitesini önleyen ve plazma membranındaki lipit katmanlarının homeostazisini koruyan enzimdir (Maiorino ve ark 2018). RSL-3 (RAS-selective lethal-3) GPX4 ile kovalent bağ kurarak GPX4'ün aktivitesini inhibe eder ve lipid peroksit birikimine yol açarak ferroptozu indükler (Dixon ve ark 2012, Xu ve ark 2019).

Çoklu doymamış yağlar olan PUFA (Polyunsaturated Fat)'lar hücreler için özellikle membranlarda oldukça önemli olmakla beraber hücre içi ROS tarafından oksitlenebilir ve ferroptozun indüklenmesine sebep olan lipit peroksitleri açığa çıkarabilirler (Richard ve ark 2008).

Demir, DNA sentezi, hücre döngüsünün ilerlemesi, anjiyogenez gibi birçok olayda yer alan enzimin temel bileşeni olarak görev yapan önemli bir elementtir. Ancak redoks döngüsü yoluyla Fenton reaksiyonlarına katılır ve ROS üretimine neden olur. Ferroptoz için serbest demir varlığı gereklidir (Minotti ve Aust 1987, Winterbourn 1995, Xu ve ark 2019).

1.3.6. mPTP aracılı programlı hücre ölümü

Mitokondriyal geçirgenlik geçişi (mPT), Ca^{2+} ya bağımlı ve boyutu 1.5 kDa'ya kadar olan moleküllerin difüzyonuna izin veren, iç mitokondriyal membran geçirgenliğini tanımlar (Bernardi ve ark 2023). mPT'yi mitokondriyal mega kanal veya çoklu iletken kanal olarak adlandırılan mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneği (mPTP) sağlar. mPTP ilk olarak 1979'da Hunter ve Haworth (1979) tarafından keşfedilmiştir. mPTP'nin patolojik açılması, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybına, ATP sentezinin durmasına, mitokondriyal matriksin şişmesine ve mitokondriyal membran yırtılmasına yol açtığı bildirilmiştir (Wu ve ark 2022). mPTP'nin açılması, mitokondri iç zarının geçirgenliğini 1,5 kDa'ya kadar

arttırır, bu da organel şişmesine ve mitokondriyal depolarizasyona yol açar. mPTP açılmasının ana tetikleyicisinin fosfat varlığında matriks kalsiyumu olduğu bildirilmiş ancak aktive edici konsantrasyonlarının başka birkaç faktöre bağlı olduğu belirtilmiştir (Kinnally ve ark 2011). ADP gibi adenin nükleotidlerinin birikimi, yüksek negatif membran potansiyeli, düşük matriks pH'sı, magnezyum ve stronsiyum gibi diğer iki değerlikli katyonlar dahil olmak üzere çeşitli mPTP inhibitörlerinden birinin varlığında mPTP'nin açılabilmesi için daha yüksek kalsiyum seviyelerinin gerekli olduğu ancak adenin nükleotidlerinin tükenmesi veya kalsiyum alımından sonra membran potansiyelini depolarize etmek için bir mitokondriyal ayrıştırıcının eklenmesi durumunda mPTP aktivasyonu için gereken kalsiyum seviyelerinin daha düşük olduğu bildirilmiştir (Kinnally ve ark 2011). mPTP'nin geri dönüşümlü kapanması ise ADP, magnezyum ve siklosporin A (CsA) eklenmesiyle ya da kalsiyumun çıkarılması ile meydana gelir (Kinnally ve ark 2011). Siklofilin-D (CsD), mPTP'nin bilinen aktivatörüdür. CsD'den yoksun mitokondri, kalsiyum kaynaklı bir geçirgenlik geçişine maruz kalabilir ancak bu olay daha yüksek kalsiyum konsantrasyonları gerektirir (Broekemeier ve Pfeiffer 1989, Broekemeier ve ark 1992, Kinnally ve ark 2011). mPTP'nin geçici olarak açılması veya titreşmesi sırasında belirli hücre içi sinyallere yanıt olarak geçici membran potansiyeli değişikliklerine yol açabilir (Kinnally ve ark 2011). mPTP geçici olarak açıldığında ya da titreştiğinde sitozol ve mitokondriyal matriks arasında kalsiyumun indüklediği kalsiyum salınımının mitokondriyal versiyonunu başlatarak, nispeten normal koşullar altında mitokondriyal Ca^{2+} çıkışı sağlayabilir (Ichas ve ark 1997, Jouaville ve ark 1998, Gunter ve Sheu 2009, Kinnally ve ark 2011). Ayrıca mPTP'nin kısa süreliğine açılması, geçici bir mitokondriyal depolarizasyona ve ROS üretiminde kısa bir artışa neden olur ve mPTP'nin ROS artışıdaki rolünü ortaya çıkarır ki mPTP'nin tekrar tekrar titreşmesi ROS artışı nedeniyle mPTP'nin sürekli açılmasına ve hücrenin ölümüne neden olabilir (De Giorgi ve ark 2002, Kinnally ve ark 2011). mPTP'nin hücre ölümünde önemli bir rol oynadığı 2000'li yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. 1990'lı yıllarda apoptozun bazı formlarının bazı porların inhibitörü olarak bilinen CsA kullanımı ile baskılandığı bildirilmiştir (Crompton 2003, Green ve Kroemer 2004). Yine bir antiapoptotik bileşik olan Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu sonucu Ca^{2+} 'nin baskılanmasıyla da mPTP'nin apoptozdaki rolü desteklenmiştir (Murphy ve ark 1996, Kinnally ve ark 2011). Bunun yanı sıra mPTP aktivatörü olan CsD eksikliği

bulunan hücrelerde apoptozun ne dışsal ne de içsel yolları değişmemiştir (Halestrap 2006, Kinnally ve ark 2011).

1.3.7 Piroptosis

Piroptosis, Kaspaz-1'in aracılık ettiği ve yangıyla seyreden bir programlı hücre ölümü şeklidir (Bergsbaken ve ark 2009, Park ve ark 2023). Piroptosis PPR'ler tarafından inflamazomu tetikleyen DAMP ve patojen ilişkili moleküler patern (Pathogen-Associated Molecular Patterns-PAMP)'lere cevap olarak başlatılır (Amarante-Mendes ve ark 2018). İnflamazom; PRR'ler, adaptör proteinler ve kaspaz-1'den oluşan bir protein kompleksidir ki bu kompleks plazma membranındaki gasdermin porları tarafından indüklenen piroptosisi başlatır. Kaspaz-1 ayrıca interlökin-1 beta (IL-1 β) ve interlökin-18 (IL-18) aktivitesini de başlatarak proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasına ve immün sistem hücrelerinin hasarlı bölgeye gelmesine sebep olur (Kordes ve ark 2011, Lopez-Castejon ve Brough 2011).

Piroptoz morfolojik ve mekanik olarak diğer hücre ölümü formlarından farklıdır. Kaspaz 1 bağımlılığı, piroptozun tanımlayıcı bir özelliğidir. Kaspaz 1 apoptozda rol oynamaz ve kaspaz 1 eksikliği olan farelerde apoptozda herhangi bir anormallik olmadığı ve farelerin normal şekilde geliştiği bildirilmiştir (Kuida ve ark 1995, Li ve ark 1995, Bergsbaken ve ark 2009). Piroptoz'da mitokondride herhangi bir değişiklik meydana gelmez ve apoptozu indükleyen sitokrom c salınımı olmaz (Cervantes ve ark 2008, Bergsbaken ve ark 2009).

1.3.8. Alkaliptosis

Alkaliptoz; sodyum hidroksit ve amonyak gibi yüksek pH'lı ajanlara maruz kalmanın tetiklediği, Song ve ark (2018) tarafından keşfedilen programlı hücre ölüm şeklidir. JTC-801, bilimsel araştırmalarda kullanılan bir opioid türü analjezik ilaçtır (Shinkai ve ark 2000). Yapılan çalışmalarda JTC-801'in böbrek karsinomlarında, pankreas kanserlerinde, prostat kanserinde, melanomda ve merkezi sinir sistemi kanser hücre hatlarında kanser hücreleri üzerinde öldürücü etki gösterdiği bildirilmiştir (Song ve ark 2018, Liu ve ark 2020). Ayrıca, JTC-801'in toksisitesi normal hücrelerde ve dokularda gözlenmemiştir (Liu ve ark 2020). JTC-801'in antikanser aktivitesinin alkaliptosisin indüklemesine bağlı olduğu ancak apoptoz, nekroptoz, ferroptoz ve otofajiye bağlı hücre ölümlerini inhibe eden ilaçların JTC-801'in indüklediği alkaliptoz

üzerinde etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Song ve ark 2018). Hücre içi pH'nın düştüğü durumlarda apoptoz, nekroptoz ve otofajinin görüldüğü ancak JTC-801'in hücre içi pH'yı yükselterek alkaliptoza neden olduğu bildirilmiştir (Furlong ve ark 1997, Nakamura ve ark 1997, Wang ve ark 2015). JTC-801, nükleer faktör-kappa B (nuclear factor-kappa B-NF- κ B)'nin aktivasyonuna neden olur (Song ve ark 2018). JTC-801'nin neden olduğu NF- κ B'nin yukarı regülasyonu karbonik anhidraz-9 (carbonic anhydrase-9 -CA9)'un aşağı regülasyonuna neden olur ve böylece hücrede alkaliptoz başlatılır (Song ve ark 2018). CA9, hücre içi pH seviyelerinin düzenlenmesinde rol oynayan karbonik anhidraz ailesinin bir üyesidir (Liu ve ark 2020). Que ve ark (2023) yaptıkları çalışmada asil-koenzim A sentetaz kısa zincirli aile üyesi-2 (Acyl-coenzyme A synthetase short-chain family member 2- ACSS-2)'nin de NF- κ B'yi aktive ettiğini ve böylece alkaliptozu indüklediğini bulmuşlardır.

1.3.9. Paraptozis

İlk olarak Sperandio ve ark (2000) tarafından ortaya konan paraptozis kelimesi “yanında”, “etrafında” anlamına gelen “para” ile apoptoz kelimelerinin birleşiminden meydana gelir. Bunun sebebi hücre içinde paraptozun apoptozla beraber indüklenmesidir. Apoptozun aksine kaspazlarla aktive edilmeyen ve DNA fragmentasyonuna neden olmayan paraptoz hücrede tipik olarak mitokondri ve endoplazmik retikulum (ER)'da şişmeye neden olmakla ve sitoplazmada vakuolizasyon oluşturmakla karakterize olduğu bildirilmiştir (Allen ve ark 2008). Proteazomal inhibisyon, iyon dengesizliği gibi nedenlerle indüklenabilen paraptoz, ER lümeninde hatalı katlanmış proteinlerin birikmesi ve hücre içinde ozmotik basıncın artmasıyla ER ve mitokondri şişmesine neden olur bunun sonucunda da büyük sitoplazmik vakuoller meydana gelir (Kim ve ark 2020, Park ve ark 2023).

1.3.10. Metuozis

Yunanca “methuo” kelimesinden türetilen metuozis, meydana geldiği hücrenin sitoplazmasındaki vakuolizasyonlarla karakterizedir. İlk olarak Overmeyer ve ark (2008) tarafından tanımlanan metuozis, hücre içinde makropinozom birikmesine yol açarak sitoplazmada vakuolizasyona neden olur. Bu vakuoller makropinozomların birikmeye devam etmesiyle büyür ve nihayetinde hücre zarını patlatarak hücrenin

ölümüne sebep olur. 2008 yılında keşfedilmesine rağmen metuoosisin moleküler mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır (Park ve ark 2023).

1.4. p21

Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1 olarak da bilinen p21, sikline bağımlı kinazların aktivitesini inhibe ederek hücre siklusunu durduran bir proteindir (Dutto ve ark 2015). İlk olarak bir tümör baskılayıcı ve sikline bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü olarak keşfedilen p21, hücreler DOX gibi hücre toksisitesine ve DNA hasarına neden olan ajanlara maruz kaldığında, hücre bölünmesinin durdurulmasına aracılık etmede önemli bir rol oynar (el-Deiry ve ark 1993, el-Deiry ve ark 1994). p21'in aşırı ekspresyonu hücre bölünmesinde G1-, G2- veya S fazının durmasıyla sonuçlandığı gösterilmiştir (Ogryzko ve ark 1997, Niculescu ve ark 1998, Radhakrishnan ve ark 2004, Gartel ve Radhakrishnan 2005). Tersine, p21 eksikliği olan hücreler DNA hasarı olsa bile hücre siklusu duraklamaz (Gartel ve Radhakrishnan 2005). p21'in hücre döngüsü üzerindeki bu baskılayıcı etkisi çekirdekte bulunduğu geçerlidir. p21 sitoplazmada lokalize olduğunda apoptozu inhibe ederek ve hücre çoğalmasını kolaylaştırarak bir onkogen gibi davranır (Cazzalini ve ark 2010, Cmielová ve Rezáčová 2011). Bilindiği gibi hücrenin bölünme siklusunda G1'den S fazına ilerleme G1 siklinlerin kontrolü altındadır. p21, N-terminal alanlarıyla etkileşime girerek veya CDK1 ve CDK2'nin fosforilasyonuna müdahale ederek CDK aktivitesini inhibe edebilir (Dutto ve ark 2015). Ayrıca p21, siklin E ve siklin A/CDK2 aktivitesini inhibe ederek de G1'in durdurulmasına katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Brugarolas ve ark 1999). p21 hücre siklusunu G0'da durdurarak da hücre siklusunun geri dönüşümlü olarak durmasına neden olabilir, bu özelliği ile p21, anormal hızda DNA bölünmesinin önüne geçerek genomu korur (Spencer ve ark 2013, Dutto ve ark 2015). p53 ile beraber p21, hücre siklusunun kalıcı olarak durmasına neden olarak hücre yaşlanmasına da neden olabilir (Herbig ve Sedivy 2006, Romanov ve ark 2012). Bunun yanında p21'in p53'ten bağımsız bir şekilde ekspresyonunun, iki ana mekanizma yoluyla antiapoptotik aktivite gösterdiği bulunmuştur (Gartel ve Tyner 2002). p21 apoptoza iki şekilde engel olabilir; pro-apoptotik düzenleyici proteinlerle etkileşime girerek bu proteinlerin inhibisyonu yoluyla ya da CDK'lerin kaspaz bağımlı aktivasyonunu hedefleyerek kromatin yoğunlaşması, yapışma kaybı ve hücre büzülmesi gibi apoptotik olayların inhibisyonu yoluyla (Jänicke ve ark 2007). Paradoksal olarak p21, TNF ölüm reseptörleri ailesinin aktivasyonuna bağlı yollar

aracılığıyla ekstrinsik apoptozu ya da pro-apoptotik gen olan BAX'ın yukarı yönlü regülasyonu ile intrinsik apoptozu indükleyebilir (Gartel 2005). p21'in bu çift yönlü davranışı daha önce de anlatıldığı gibi büyük oranda p21'in lokalizasyonuna bağlıdır. p21 sitoplazmada olduğunda pro-kaspaz 3'ü ve stres kaynaklı kinaz aktivasyonunu bloke ederek apoptozu inhibe edebilir (Dutto ve ark 2015).

Çoğu DNA'ya zarar veren ajan veya ROS indükleyicisi gibi DOX da hücre sel düzeyde stres tepkisini ortaya çıkararak p21 geninin ekspresyonunu indükler. Kardiyomiyositler çoğunlukla proliferatif olmayan hücreler olmalarına rağmen, miyokard enfarktüsü gibi çeşitli kalp hastalıklarında yüksek p21 seviyeleri gözlemlenmiştir (Kuhn ve ark 2007). Terrand ve ark (2011), normal ve p21 geni devre dışı bırakılmış farelerde 5 hafta boyunca haftada iki kez 4 mg/kg DOX uyguladıkları çalışmada normal farelerin miyokardında p21 ekspresyonunda artış ve buna bağlı kardiyotoksisite tespit ettiklerini ancak p21 geni devre dışı bırakılmış farelerde kardiyotoksisite gelişmediğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada araştırmacılar, normal farelerin kalplerinde histopatolojik olarak kardiyomiyosit boyutunun arttığını gösteren uzun çekirdekler, intrasitoplazmik vakuoller ve miyofilamentlerde düzensizlik belirlemişlerdir. Huang ve ark (2021) tarafından toplamda 15 mg/kg olacak şekilde iki hafta boyunca 2,5 mg/kg DOX uygulanan farelerin kalplerinde p21 ekspresyonunun önemli ölçüde artmış olduğu belirtilmiştir.

1.5. TNF- α

Kaşeksin olarak da bilinen Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), akut faz sitokinleri altında bulunan, doku hasarı, inflamasyon gibi durumlarda ekspresyonu artan, başta makrofajlar olmak üzere monosit, lenfosit, mast hücreleri, nötrofiller ve hatta fibroblast, endotel hücreleri gibi hücrelerden salınan bir sitokindir (Idriss ve Naismith 2000). TNF- α 'nın varlığına dair ilk ipuçları, Coley (1893) tarafından şiddetli bakteriyel enfeksiyona maruz kalan kanser hastalarının tümörlerinde ara sıra küçülme yaşandığının gözlemlenmesiyle ortaya çıkmıştır. Carswell ve ark (1975) tarafından farelerdeki sarkomlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda "Tümör Nekroz Faktörü" (TNF- α) olarak adlandırılan bir proteinin, retiküloendotelial sistemlerinin uyarılması ve bakteri lipopolisakkaritlerinin varlığında hayvanların dolaşımına salındığı ortaya çıkmıştır ve TNF- α ilk kez literatürde geçmiştir (Idriss ve Naismith 2000). Yapısına 212 aminoasidin katıldığı TNF- α başlangıçta transmembran proteini olarak

retilmekte çözünür homotrimerik sitokin formuna metalloproteaz TNF alfa dntrc enzim olan ADAM17 tarafından dntrlmektedir (Locksley ve ark 2001). TNF- α 'nın farklı hücre tiplerinde ve farklı konsantrasyonlarda değişik etkileri ortaya çıkabilir. Örneğin düşük konsantrasyonlarda organizmadaki savunma sisteminin aktivasyonunu sağlarken yüksek konsantrasyonlarda şiddetli inflamasyona ve doku hasarına neden olabileceği bildirilmiştir (Idriss ve Naismith 2000, Locksley ve ark 2001). Bunun yanında TNF- α 'nın konsantrasyonu, etkilediği hücre çeşidi, etkilenen bölgedeki reseptör oranı gibi etkenler de meydana gelen yanıtın fizyolojik ya da patolojik olmasını etkiler (Idriss ve Naismith 2000, Locksley ve ark 2001).

TNF- α 'nın kalp üzerinde de ciddi patolojik etkileri ortaya çıkabilir. Sürekli TNF maruziyeti miyokardiyal kontraksiyon ve damar düz kas kasılınabilirliğini inhibe edebilir (Hanna ve Frangogiannis 2020). Yapılan birçok çalışmada miyokardiyal disfonksiyonun patogenezinde inflamatuvar sitokinlerin önemli rolü olduğu ortaya çıkarılmıştır (Sanders-van Wijk ve ark 2015, Hanna ve Frangogiannis 2020). Kalpte kardiyomiyositlerle beraber vasküler endotelyal hücreler, makrofajlar ve mast hücreleri gibi birçok farklı hücre tipi TNF- α ekspresyonunda artıa neden olabilir (Shioi ve ark 1996, Kapadia ve ark 1997, Frangogiannis ve ark 1998, Hanna ve Frangogiannis 2020). Kubota ve ark (1997), Bryant ve ark (1998) ve Janczewski ve ark (2003) yaptıkları çalışmalarda yüksek oranda eksprese edilen TNF- α 'nın farelerde kardiyak dilatasyona neden olduğunu bulmuşlardır. Kardiyomiyositlerde TNF- α , Ca²⁺ homeostazisini bozarak nekroza ve apoptoza neden olabilir (Haudek ve ark 2007).

Hafez ve Hassanein (2022) tarafından ratlara tek doz 9 mg/kg IP olarak DOX verilmesinden sonra ROS aracılı TNF- α ekspresyonunun ve apoptozun arttığı ortaya konulmuştur. Ibrahim Fouad ve Ahmed (2022) ratlara tek doz 20 mg/kg olarak uyguladıkları DOX sonucu TNF- α ile beraber NF- κ B, iNOS ve IFN- γ ekspresyon düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir. Zha ve ark (2023) farelere toplamda 15 mg/kg olacak şekilde gnaırı 3 mg/kg olarak uyguladıkları DOX tedavisi sonucunda farelerde yüksek oranda TNF- α , IL-1 β ve IL-18 gibi inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunda artış olduğunu ve bunun kalp hasarıyla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

TNF- α seviyelerinin DOX uygulaması sonucu arttığını ve bunun sonucunda kalp hasarının meydana geldiğini bildiren çalışmaların yanında DOX uygulamaları

sonrası TNF- α 'nın ekspresyon seviyelerinin düştüğünü ve bu seviyeleri yükselten tedavilerin uygulanması sonucu DOX kardiyotoksitesine karşı koruyucu etki gösterdiğini bildiren çalışmalar da mevcuttur. Xu ve ark (2008) neonatal rat kardiyomiyositlerinden elde edilen hücre kültürlerine 0.1–1 μ M oranlarında DOX uyguladıkları çalışmada 1 μ M-1 nM oranında uyguladıkları Ghrelin sonucu Ghrelin'in TNF-alfayı zamana ve doza bağlı bir şekilde yukarı doğru düzenlediğini tespit etmişlerdir. Bunun yanında Ghrelin'in apoptoz ve malondialdehit (MDA), laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitesi gibi oksidatif stres biyo belirteçlerini de önemli ölçüde azalttığını, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi anti-oksidatif enzim aktivitesini arttırdığını bildirmişlerdir.

1.6. eNOS

Furchgott ve Zawadzki (1980) tarafından neredeyse yarım asır önce ilk defa bahsedilen nitrik oksit sentazlar (NOS) vücutta birçok dokuda bulunan, L-argininden nitrik oksit (NO) üretimini katalize eden enzim ailesidir. Memelilerde nöronal NOS (nNOS veya NOS-1), indüklenebilir NOS (iNOS veya NOS-2) ve endotelial NOS (eNOS veya NOS-3) olmak üzere üç formu vardır. eNOS ve nNOS yapısal, iNOS ise kalsiyuma duyarlı, indüklenebilir formdur (Wang ve ark 2020).

eNOS adından da anlaşılacağı üzere kan damarlarının endotelial tabakasının yanı sıra kardiyomiyositlerde, böbrek tübül hücrelerinde, hava yolları epitellerinde bulunur. eNOS'tan kaynaklı NO kan basıncını düzenlemenin yanı sıra lökosit adezyonu ve trombosit agregasyonunun baskılanmasını da sağlar. Bu enzimin eksikliğinde veya bozukluğunda endotel disfonksiyonun meydana geleceği ve hem pulmoner hem de sistemik hipertansiyonun ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (Gielis ve ark 2011). eNOS'tan kaynaklı NO'nun bu etkisi guanilat siklaz tarafından siklik guanozin monofosfat (cyclic guanosine monophosphate-cGMP) üretimi aracılığıyla hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun azalmasına, damar düz kas tabakasının gevşemesine ve meydana gelen vazodilatasyon sonucu kan basıncının azalmasına neden olur (Gielis ve ark 2011). eNOS plazma membranında bulunan sarkolemmal kaveolayı (hücre zarının hücre içine doğru yaptığı girinti) hedef alır (Wang ve ark 2020).

Her eNOS monomeri iki uçlu bir yapıya sahiptir. N-ucu, oksijenazın yanı sıra hem demiri ve l-arginin bağlanma bölgesi olan tetrahidrobiopterin (BH4)'i barındırır. l-Arginin, hem grubu ve BH4 enzim dimerizasyonunu destekleyerek aktif dimerik

formun stabilizatörü olarak görev yapar (Klatt ve ark 1996, Venema ve ark 1997). C-terminali, flavin adenin dinükleotid (FAD) ve flavin mononükleotid (FMN) adı verilen iki flavin ile NADPH için bağlanma bölgelerine sahip redüktaz bölgesidir. Her monomerin flavin bölgesinde NADPH'nin NADP⁺'ya oksidasyonu yoluyla elektronlar açığa çıkarılır. Bu elektronlar oksijenaz alanının prostetik hem demirine teker teker aktarılır ve böylece moleküler oksijenin (O₂) O₂⁻'ye indirgenmesi gerçekleşir. N-ucuna bağlı l-arginin daha sonra NO'ya ve yan ürün l-sitruline dönüştürülür. Oksijenaz, bir inhibitör kalmodulin (CaM) bağlanma alanı ile redüktaz alanına bağlanır (Hemmens ve Mayer 1998, Gielis ve ark 2011).

Endotel hücreleri, VEGF ve trombin gibi hücre içi kalsiyumu harekete geçiren otokoidlere yanıt olarak NO salgılarlar. eNOS'un aktivasyonunda, salınan kalsiyumun kalmodulin'e bağlanması ve kalsiyum/CaM kompleksinin, NO sentezini stimüle eden enzimdeki CaM bölgesine bağlanması elzemdir. NO salınımının en önemli stimüle edicisi shear stres olarak adlandırılan kan akış geriliminin meydana gelmesidir (Sessa 2005). Damarlardaki endotel hücrelerinin shear strese maruz kalması sonucu NO salınımında bir artış meydana gelir ve böylece damarlarda vazodilatasyon şekillenir (Sessa 2005). Shear stresi kaynaklı NO salınımı hücre içi kalsiyum artma/azalma döngüsünden bağımsızdır. Hücre içi kalsiyumun şelasyonu, shear stresi tarafından stimüle edilen NO üretim ve salınım hızını etkilememekle beraber kalmodulin antagonistlerinin, bradikinin kaynaklı NO salınımını bloke edebileceği ancak shear stresinin neden olduğu NO salınımını bloke edemeyeceği bildirilmiştir (Kuchan ve Frangos 1994, Fleming ve ark 1998, Sessa 2005). Ayrıca CaM, NOS'un protein inhibitörü (Protein inhibitor of NOS-PIN), eNOS'un fosforilasyonu, ısı şoku protini 90 (Heat-shock protein 90-Hsp90)'da NO'nun regülasyonunda rol oynar (Gielis ve ark 2011).

DOX metabolitlerinden semikinon oluşumunda da anlatıldığı üzere DOX eNOS redüktaz enzimine bağlanarak semikinon radikalının oluşumunu indükleyip ROS üretimini artırarak dolaylı yoldan kardiyotoksisteye sebep olur. nNOS, iNOS ve eNOS arasında DOX'a karşı en fazla affinitesi olan eNOS'tur (Neilan ve ark 2007). Ayrıca DOX, eNOS redüktaz enzimine bağlandığında süperoksit serbest radikalleri ve nitrik oksit seviyelerinde dengesizlik meydana gelir. Nitrik oksit seviyesinde azalma, süperoksit seviyelerinde ise artışa sebep olan bu reaksiyon sonucu da kardiyotoksisteye

ortaya çıkar (Rawat ve ark 2021). Genel olarak eNOS'un DOX'a bağı kardiyotoksisiteye karşı kardiyoprotektif olduğu bilinmektedir ancak Neilan ve ark (2007) tarafından normal fare ve eNOS knockout (eNOS-KO) farelere uygulanan tek doz 20 mg/kg DOX sonucu eNOS-KO farelerin normal farelere göre daha iyi kalp fonksiyonu ve daha az ölüm gösterdikleri bildirilmiştir. Huang ve ark (2021), beş hafta boyunca haftada 4 mg/kg olarak uyguladıkları DOX kardiyotoksisitesine karşı fenofibrat'ın Akt/eNOS yolunun aktivasyonunu sağladığı böylece kardiyak fonksiyonu ve kardiyak yapıyı koruduğu, L-NAME aracılığıyla eNOS inhibisyonunun ise fenofibrat'ın koruyucu etkisini ortadan kaldırdığını bildirmişlerdir. Bu çalışmalar eNOS'un DOX'a bağı kardiyotoksisiteye etkisinin akut ya da kronik ilaç maruziyetine göre değiştiğini düşündürmektedir. He ve ark (2019) farelere 24 saat boyunca 1 µM DOX sonrası DOX'un eNOS ekspresyonu ve eNOS fosforilasyonunu, dolayısıyla da NO sentezini azalttığını bildirmişlerdir. Munir ve ark (2023) ratlara gün aşırı 6 gün boyunca 2,5 mg/kg olarak uyguladıkları DOX sonucu DOX'un eNOS, VEGF ve NFkB-1 gibi biyobelirteçlerin ekspresyonunu azalttığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmanın amacı; neoplastik hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılan DOX'un erkek ratlara farklı dozlarda verilerek oluşturulacak kalp dokusu hasarında apoptozis, otofaji, (nekroz/nekroptoz), hücre yaşlanması ve endotel hasarı rollerini araştırmak ve kanser tedavisinde kullanılan bu önemli kemoterapötik ajanın daha güvenilir bir şekilde kullanılabilmesi adına literatüre ve sonraki çalışmalara katkı yapabilmektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Etik Kurulunun **22.11.2021** tarihli ve **2021-60** sayılı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı'yla onaylanmıştır.

2.1. Gereç

2.1.1. Hayvan materyali

Çalışmada 30 adet 12 haftalık erkek Wistar albino rat kullanılmıştır. Deney hayvanları Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilmiştir.

2.1.2. Kimyasallar

Çalışmada kimyasal olarak; doxorubicin (Adrimisin-SABA, Türkiye), formaldehit (ISOLAB, Almanya), ketamin (Ketasol-Richter ilaç, Macaristan), ksilazin (Rompun-Bayer ilaç, Almanya), absolute alkol (ISOLAB, Almanya), ksilen (TEKKİM, Almanya), kloroform (ISOLAB, Almanya) ve parafin (TEKKİM, Türkiye) kullanılmıştır.

2.1.3. Cihazlar

Otomatik doku takip cihazı (Leica TP 1020, Almanya), parafin dispanseri (Lipshaw, ABD), buzdolabı (Bosch, Almanya), mikrotom cihazı (Leica RM-2125 RT, Almanya), etüv (Dedeoğlu, Türkiye), binoküler başlıklı mikroskop (Olympus, BX51, Japonya), mikroskoba uyumlu kamera (Olympus, EP50, Japonya), hava kabini (NUVE-LN 120, Türkiye), santrifüj cihazı (Hettich mikro 200, Almanya), vorteks karıştırıcı (BIOSAN-FVL-2400N, Türkiye), Thermal Cycler (BIO-RAD T100, ABD), RT-PCR cihazı (Roche LightCycler 96, İsviçre).

2.1.4. Kullanılan kitler ve primerler

SanPrep Column microRNA Miniprep Kit (BIO BASIC, ABD, katalog numarası: SK881) ve OneScript Plus Synthesis Kit (ABM, Canada, katalog numarası: G236). RT-PCR için kullanılan primerler ve dizinleri Tablo 2.1.'de sunulmuştur.

Tablo 2.1. Kullanılan primerlerin dizinleri

Primer	Primer Dizini 5'-3'
b-actin	F: 5'-GGCCACAATGGCTGACCATTC -3' R: 5'-AAGGTGACAGCATTGCTTC-3' (De Miglio ve ark 2000).
Bcl-2	F: 5'-GCAGCTTCTTTCCCGGAAGGA -3' R:5'-AGGTGCAGCTGACTGGACATCT-3' (Abdel-Daim ve ark 2017)
Caspase-3	F: 5'-GGTATTGAGACAGACAGTGG-3' R:5'-CATGGGATCTGTTTCTTTGC-3' (Wu ve ark 2015)
TNF alfa	F:5'-GTCGTAGCAAACCACCAAGC-3' R:5'-TGTGGGTGAGGAGCACATAG-3' (Mariappan ve ark 2007)
p21	F:5'-TTGCACTCT GGTGTCTGAGC-3' R:5'-AATCTGTCAGGCTGGTCTGC-3' (Melo-Silveira ve ark 2014)
Beclin-1	F:5'-AGCACGCCATGTATAGCAAAGA-3' R:5'-GGAAGAGGGAAAGGACAGCAT-3' (El-Demerdash ve ark 2021)
eNOS	F:5'- CAACGCTACCACGAGGACATT -3' R:5'- CTCCTGCAAAGAAAAGCTCTGG -3' (Ding ve ark 2007)

2.1.5. Kullanılan diğer malzemeler

Çalışmada; uygun nekropsi seti, mikrotom bıçağı (Leica 819, Almanya), otomatik pipet seti (Axygen, ABD), otomatik pipet uçları (Axygen, ABD), 0,1 ml düz kapaklı 8'li tüp şeridi (Kirgen, ABD), mikrosantrifüj tüpleri (Kirgen, ABD), spin kolonlar (BIO BASIC, ABD), toplama tüpleri (BIO BASIC, ABD), elüsyon tüpleri (BIO BASIC, ABD,) kullanılmıştır.

2.1.6. Kullanılan program ve yazılımlar

Mikroskoba uyumlu kamera (Olympus, EP50, Japonya) yazılımı (Olympus, EPview 64 bit OS V1.4, Japonya), RT-PCR cihazı (Roche LightCycler 96, İsviçre)

yazılımı (LightCycler 96 yazılımı, İsviçre), istatistik programı (IBM SPSS Statistics 22, ABD)

2.2. Yöntem

2.2.1. Deneysel Dizayn ve Uygulamalar

Çalışma amacıyla Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinde uygun ortam oluşturuldu. Denemeye alınacak olan 30 adet erkek Wistar albino rat; kontrol grubunda 6, deneme gruplarında 8'er adet olacak şekilde rastgele dört gruba ayrıldı. Üç günlük alıştırma sürecinin ardından ratlar tartıldı ve kuyruk venlerinden kan örnekleri alındı, akabinde deneme prosedürüne geçildi. Gruplardaki tüm hayvanlara standart şekilde deney sonuna kadar ad libitum yem, su ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde aydınlatma, $22\pm3^{\circ}$ derece sıcaklık sağlandı (Şekil 2.1).

1. Grup (Kontrol grubu/K): Bu grupta bulunan ratlara deneyin ilk günü 12 ml/kg ip olarak serum fizyolojik uygulandı. 11'inci günde ötanazileri gerçekleştirildi.

2. Grup (Doxorubicin-Düşük doz/DOX-D): Bu grupta bulunan ratlara deneyin ilk günü tek doz 3 mg/kg ip DOX uygulandı. 8'inci gün ötanazileri gerçekleştirildi.

3. Grup (Doxorubicin-Yüksek doz/DOX-Y): Bu grupta bulunan ratlara deneyin ilk günü tek doz 12 mg/kg ip DOX uygulandı. 8'inci gün ötanazileri gerçekleştirildi.

4. Grup (Doxorubicin-Kümülatif doz/DOX-K): Bu grupta bulunan ratlara deneyin ilk gününde başlayarak 1. 24. 48. ve 72. saatlerde olmak üzere 3 mg/kg dozunda ip DOX (toplam 12 mg/kg) uygulandı. 11'inci gün ötanazileri gerçekleştirildi.



Şekil 2.1. Deney hayvanlarının gruplara ayrılması ve uygun koşulların sağlanması

2.2.2. Nekropsi, Makroskopik Muayene ve Örnekleme

Son DOX dozu uygulamasından bir hafta sonra (DOX-D ve DOX-Y grupları için 8'inci gün, Kontrol ve DOX-K grupları için 11'inci gün) tüm ratlar tartılarak her bir rata sedasyon amacıyla 70 mg/kg ketamin (im) ve 10 mg/kg ksilazin (im) uygulandı. Ratların sedasyona girdiklerine emin olunduktan sonra dekapitasyon yöntemi ile ötanazi uygulandı. Daha sonra usulüne uygun olarak nekropsileri yapıldı ve kalpleri çıkartıldı (Feldman ve Seely 1988) (Deney gruplarından rastgele 2'şer hayvan seçilerek çalışma dışı bırakıldı). Tüm gruplarda 6'şar hayvanın kalbi materyal olarak değerlendirildi. Her bir deney hayvanına ait kalp tartıldıktan sonra makroskopik olarak incelendi. Makroskopik inceleme tamamlandıktan sonra kalbin sağ ve sol ventrikül duvarları ile interventriküler septumu içerecek şekilde apeksinden alınan örnekler karyotüplere alınarak önce sıvı azot içeren azot tankına alındı ve PCR analizleri yapılana kadar -80 °C'de saklandı. Sağ-sol atriyum ve ventrikül duvarları, interventriküler septum, endokard ve epikardı içerecek şekilde parçalar alınarak %10'luk tamponlu formalin solüsyonu içine konuldu.

2.2.3. Histopatolojik Muayene

Formolde 24 saat tespit edilen kalp örnekleri trimleme işleminden sonra doku takip kasetlerine alındı ve formalin solüsyonları yenilenerek 24 saat boyunca ikinci tespit sağlandı. Tespit işlemi tamamlanan doku örnekleri formalin solüsyonundan alınarak 24 saat akan çeşme suyunda yıkandı. Yıkaması tamamlanan dokular otomatik doku takip cihazına alınarak dereceli alkol (%70, %80, %90, %96 ve absolut alkol), ksilol, ksilol-parafin ve parafin serilerinden geçirildi. Son olarak doku örnekleri blok parafine gömülerek mikrotom kesimine hazır hale getirildi (Şekil 2.2). Donmuş parafin bloklardan mikrotom cihazı ile lamlara 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen-Eozin (HE), Masson's trikrom (MT) ve Dominici boyama yapıldı (Gridley 1957, Luna 1968). Boyama işleminin ardından lamelle kapatılan preparatlar binoküler başlıklı ışık mikroskopunda incelendi ve kamera ile fotoğrafları çekildi.



Şekil 2.2. Dokulardan parafin blokların hazırlanması.

Histopatolojik bulguların skorlandırılması

Histopatolojik bulguları değerlendirmek amacıyla; sağ ve sol ventrikül duvarları, interventriküler septum ve her iki atriyum sırasıyla X4, X10, X20, X40 ve X100 objektifler altında incelendi. Histopatolojik olarak; atrium ve miyokardda (sağ ventrikül duvarı, sol ventrikül duvarı, interventriküler septum) intrasitoplazmik vakuolizasyon, dejenerasyon, nekroz, yangı, fibrozis ve kanama bulguları değerlendirildi. Lezyonların şiddetini ve yaygınlığını belirlemek amacıyla her bir parametre için değerlendirme tablolarında (Tablo 2.2-2.5.) belirtildiği şekilde yapıldı. Değerlendirme amacıyla sağ ve sol ventrikül duvarları ile interventriküler septumda X40 objektifte 6 farklı alan taranarak lezyonlar skorlandı ve ortalamaları alındı.

Tablo 2.2. Dejenerasyon için histopatolojik skorum ve bu skorların açıklamaları

SKOR	SKOR TANIMI
-	Lezyon yok
+	Alanın 1/3'ünden az
++	Alanın 1/3'ü ve 1/2'si arasında
+++	Alanın yarısından fazla

Tablo 2.3. İntrasitoplazmik vakuolizasyon için histopatolojik skorum ve bu skorların açıklamaları

SKOR	SKOR TANIMI
-	Lezyon yok
+	1-2 hücrede intarsitoplazmik vakuol var
++	3-4 hücrede intrasitoplazmik vakuol var
+++	5 ve fazla hücrede intrasitoplazmik vakuol var

Tablo 2.4. Nekroz için histopatolojik skorum ve bu skorların açıklamaları

SKOR	SKOR TANIMI
-	Lezyon yok
+	1-5 hücrede nekroz var
++	6-10 hücrede nekroz var
+++	10'dan fazla hücrede nekroz var

Tablo 2.5. Kanama için histopatolojik skorum ve bu skorların açıklamaları

SKOR	SKOR TANIMI
-	Lezyon yok
+	Alanın 1/3'ünden az
++	Alanın 1/3'ü ve 1/2'si arasında
+++	Alanın yarısından fazla

2.2.4. Moleküler İnceleme

Nükleik asit ekstraksiyonu

RNA'nın elde edilmesi

Nekropsi sırasında alınıp -80 °C'de muhafaza edilen kalp örneklerinden SanPrep Column microRNA Miniprep Kit (Katalog numarası: SK881) kullanılarak üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde RNA izolasyonları gerçekleştirildi. Dokular parçalandıktan sonra her örnek için 1 ml miRNA Extractor eklenerek homojenizatör ile 30 saniye homojenize edildi. Homojenize edilmiş dokular oda ısısında 10 dakika

inkübe edildi. İnkübasyon sonrası dokulara 0,2 ml kloroform eklenerek 30 saniye vortekslendi ve 4 °C'de 10 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ortaya çıkan süpernatant (yaklaşık 540 µl) temiz 1,5 ml RNaz içermeyen santrifüj tüpüne aktararak, 1,5 hacim (genellikle 810 µl) %100 etanol eklenerek karıştırıldı. Çözelti Spin Column ile 2 dakika boyunca 12.000 rpm'de çevrilerek sıvı kısım uzaklaştırıldı. Kalan kısım Spin Column ile 30 saniye 12.000 rpm'de bir kere daha çevrildi ve kalan sıvı kısım tekrar uzaklaştırıldı. Kolon yeni bir 1,5 ml santrifüj tüpüne yerleştirildikten sonra 30-50 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 2 dakika boyunca bekletildi. Bu işlem sonrası 30 saniye boyunca 12.000 rpm'de santrifüj edilen tüplerden elüsyonu yapılmış RNA solüsyonu elde edildi. Elde edilen RNA'lar -80 C de saklandı.

cDNA'nın elde edilmesi

Doku örneklerinden SanPrep Column microRNA Miniprep Kit ile izole edilen RNA'lardan OneScript Plus Synthesis Kit (abm, katalog numarası: G236) kullanılarak üretici firmanın tavsiye ettiği yöntem ile cDNA'lar elde edildi. Her gruptan alınan doku örneklerinden elde edilen RNA ürünlerinden 10 µl alınarak, 5X RT buffer 4 µl, dNTP 1 µl, Random primers 1 µl, OneScript Plus RTase 1 µl ve distile su 3 µl olmak üzere toplam volüm 20 µl olacak şekilde cDNA karışımı hazırlandı. Hazırlanan karışım BIO-RAD T100 Thermal Cycler ile 55° C'de 15 dakika, 85° C'de 5 dakika süreyle inkübe edilerek cDNA'lar elde edildi.

Real time PCR

Real time PCR, Roche LightCycler 96 cihazında gerçekleştirildi. Bu amaçla ABM BlasTaq™ 2X PCR MasterMix (ABM, Kanada, katalog numarası: G891) kullanıldı. Çalışmada araştırılacak ekspresyonlar için Tablo 2.1.'de verilen primer dizileri kullanıldı. Araştırılacak her bölge için reaksiyon karışımı, SYBR Green MasterMiks kullanılarak Tablo 2.6'da belirtildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 2.6. Reaksiyon karışımı hazırlama prosedürü

Reaksiyon karışımı	Miktar
Master mix	10 µl
Primer F	0,5 µl
Primer R	0,5 µl
dH ₂ O	4 µl
Toplam hacim	15 µl

Araştırılacak her bir gen için ayrı ayrı reaksiyon karışımı hazırlandı. Her bir örnek için kapillere 15µl reaksiyon karışımı ve 5µl cDNA örneği ilave edildi. Reaksiyon koşulları Tablo 2.3.'te verildiği şekilde oluşturuldu.

Tablo 2.7. Kantitatif gerçek zamanlı PCR reaksiyon koşulları

	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Pre-inkübasyon	95 °C	3 dk	1
Amplifikasyon			40
-Denatürasyon	95 °C	15 sn	
-Annealing	60 °C	60 sn	
Soğutma	40 °C	30 sn	1

Çalışmada araştırılan genlerin ekspresyon seviyeleri için $\Delta\Delta C_t$ (Delta delta C_t) yöntemi ile analizi yapıldı. Her gen için ekspresyon düzeyleri çalışmada araştırılan her primer için elde edilen C_t değerinin, aynı dokuda b-actin için elde edilen C_t değerine oranlanmasıyla hesaplanmıştır (Pfaffl 2001, Pfaffl ve Hageleit 2001).

2.2.5. İstatistiksel İnceleme

Makroskobik, histopatolojik ve moleküler incelemeler için elde edilen parametrik veriler SPSS 22.0 istatistik programı One-Way ANOVA ve posthoc Duncan testi ile değerlendirildi. Elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart hata (mean $\pm$ SE) olarak sunuldu. $P < 0.05$ istatistiksel olarak önem sınırı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Makroskopik Bulgular

Deney başlangıcında ve nekropsi öncesi hayvanların tartılması sonucu elde edilen canlı ağırlık değerleri ve oransal farkları ile istatistiksel değerler Tablo 3.1 ve 3.2’de sunulmuştur. Yapılan değerlendirmeye göre, DOX-Y grubu ile DOX-K grubunun kontrol ve DOX-D gruplarından farklı olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Aynı zamanda DOX-Y ile DOX-K arasında da fark belirlenmiştir. Nekropsiler sırasında ve sonrasında yapılan makroskopik incelemede kalplerde ve kalbin büyük damarlarında herhangi bir makroskopik lezyona rastlanmadı. Nekropsi sonrası yapılan tartımlar sonucu ratların canlı ağırlıklarına göre kalplerin relatif ağırlıklarıyla gerçekleştirilen istatistiksel inceleme Tablo 3.3’de gösterildiği gibidir. Yapılan değerlendirmeye göre kalplerin relatif ağırlıkları arasında fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

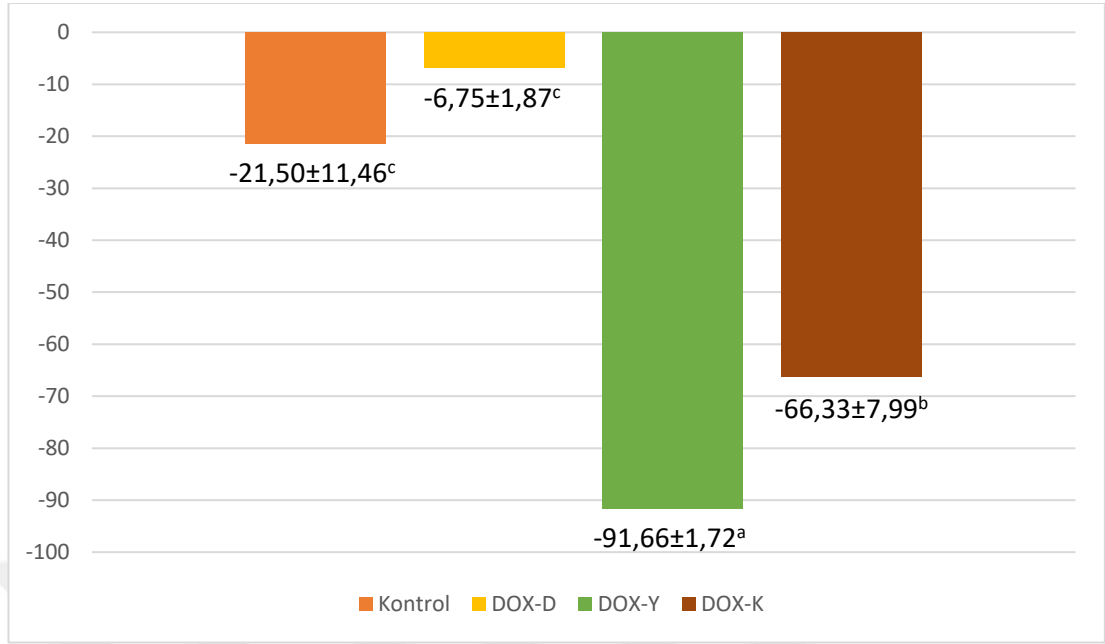
Tablo 3.1. Deneyde kullanılan hayvanların deney başlangıcı ve deney sonundaki gram (gr) cinsinden ağırlıkları.

	K	K	DOX-D	DOX-D	DOX-Y	DOX-Y	DOX-K	DOX-K
	ilk	son	ilk	son	ilk	son	ilk	son
1	332	332	445	444	411	316	380	316
2	390	342	438	434	378	288	374	314
3	364	336	347,5	336	353,5	266	338	292
4	473	494	348	342	357,5	270	354	292
5	330	308	433	420	362	270	362	300
6	300	248	277	272	326	228	322	218

Tablo 3.2. Gruplara göre ratların deney öncesi ve deney sonu ağırlıkları arasındaki ortalama farklar (gr).

Gruplar	Kontrol	DOX-D	DOX-Y	DOX-K
Ağırlık farkı	-21,50±11,46 ^c	-6,75±1,87 ^c	-91,66±1,72 ^a	-66,33±7,99 ^b

^{a, b, c} One-way ANOVA ve post-hoc Duncan testine göre satırdaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (p<0,001).



Grafik 3.1. Ratların ilk ağırlıkları ve son ağırlıkları arasındaki farkların istatistiklerinin grafiksel gösterimi.

Tablo 3.3. Nekropsiler sonrası ratların canlı ağırlıklarına göre kalplerin relatif ağırlıklarının grup bazında istatistikleri

Gruplar	Kontrol	DOX-D	DOX-Y	DOX-K
Relatif kalp ağırlıkları	0,338±0,021 ^a	0,406±0,061 ^a	0,388±0,028 ^a	0,33±0,035 ^a

^a One-way ANOVA ve post-hoc Duncan testine göre satırdaki ortak harfi taşıyan değerler arasındaki fark önemsizdir ($p>0,05$).

3.3. Histopatolojik Bulgular

24 kalp dokusu incelendiğinde aşağıdaki tablolarda (Tablo 3.4, 3.6, 3.8 ve 3.10) gösterilen skorlamalar ortaya çıkmıştır.

Kardiyomiyositlerde sitriasyon kaybı ve/veya sitoplazmada şişkinlikle karakterize bulgular dejeneratif değişiklik olarak değerlendirildi. Buna göre kontrol grubundaki deney hayvanlarının kalp kesitlerinde 2 ratta bireysel düzeyde, minimal dejeneratif değişiklikler dışında grup düzeyinde dejenerasyon gözlenmedi (Şekil 3.1, 3.2) DOX-D grubunda; sol ventrikül duvarında 3 ratta şiddetli, 2 ratta orta şiddette ve 1 ratta hafif düzeyde dejenerasyona ratlandı. DOX-D grubunda interventriküler septumlar incelendiğinde 3 ratta şiddetli derecede denerasyon görülürken 2 ratta orta

şiddette, 1 ratta ise hafif şiddette dejenerasyon belirlendi. Sağ ventrikül duvarlarında ise 4 ratta orta şiddette 2 ratta ise hafif şiddette dejenerasyon tespit edildi. DOX-Y grubunda; sol ventrikül duvarları incelendiğinde 5 ratta şiddetli, 1 ratta ise orta şiddette dejenerasyon belirlendi. İnterventriküler septumlar incelendiğinde 4 ratta şiddetli dejenerasyon görülürken 2 ratta orta şiddette dejenerasyon tespit edildi. Sağ ventrikül duvarlarında ise 5 ratta şiddetli derecede, 1 ratta ise hafif şiddette dejenerasyon belirlendi. DOX-K grubunda ise; sol ventrikül duvarları incelendiğinde 5 ratta şiddetli derecede dejenerasyon gözlenirken 1 ratta ise lezyona rastlanmadı. DOX-K grubunda interventriküler septumlar değerlendirildiğinde sol ventrikül duvarlarında olduğu gibi 5 ratta şiddetli dejenerasyon belirlenirken 1 ratta lezyon görülmedi. Sağ ventrikül duvarlarında ise 4 ratta şiddetli düzeyde dejenerasyon belirlendi. 1 ratta orta şiddette, dejenerasyona rastlanırken 1 ratta lezyon görülmedi (Tablo 3.4), (Şekil 3.10, 3.18, 3.19, 3.24).

Gruplar arasında dejenerasyon değerlendirildiğinde kontrol grubu ile deneme grupları arasında önemli fark belirlendi ($p<0,001$). Deneme grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde istatistiksel olarak fark olmamakla birlikte DOX-Y grup ortalamasının diğer grup ortalamalarına göre daha yüksek olduğu ve dejenerasyon açısından en çok etkilenen bölgenin tüm gruplarda sol ventrikül duvarı ile interventriküler septum olduğu bulundu (Tablo 3.5).

Tablo 3.4. Erkek ratlara farklı dozlarda uygulanan DOX sonrası kardiyomiyositlerde dejenerasyonun kalp bölümlerine göre histopatolojik olarak skorlanması

	DEJENERASYON		
	Sol ventrikül duvarı	İnterventriküler septum	Sağ ventrikül duvarı
K1	-	-	-
K2	+	-	-
K3	-	-	-
K4	-	-	-
K5	+	+	-
K6	-	-	-
DOX-D1	+++	+++	++
DOX-D2	+	+	+
DOX-D3	++	++	+
DOX-D4	++	++	++
DOX-D5	+++	+++	++
DOX-D6	+++	+++	++
DOX-Y1	+++	+++	+++
DOX-Y2	+++	+++	+++
DOX-Y3	+++	+++	+++
DOX-Y4	++	++	+
DOX-Y5	+++	+++	+++
DOX-Y6	+++	++	+++
DOX-K1	+++	+++	+++
DOX-K2	+++	+++	++
DOX-K3	-	-	-
DOX-K4	+++	+++	+++
DOX-K5	+++	+++	+++
DOX-K6	+++	+++	+++

Tablo 3.5. Erkek ratlara farklı dozlarda uygulanan DOX sonrası kardiyomiyositlerde dejenerasyonun istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	Dejenerasyon			
	Kontrol	DOX-D	DOX-Y	DOX-K
Sol ventrikül duvarı	0,33±0,21 ^b	2,33±0,33 ^a	2,83±0,40 ^a	1,22±0,50 ^a
İnterventriküler septum	0,16±0,16 ^b	2,33±0,33 ^a	2,66±0,21 ^a	2,50±0,50 ^a
Sağ ventrikül duvarı	0,16±0,16 ^b	1,83±0,16 ^a	2,66±0,33 ^a	2,33±0,49 ^a

^{a, b} One-way ANOVA ve post-hoc Duncan testine göre aynı satırdaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir ($p < 0,001$). Deneme grupları arasında ise fark yoktur ($p > 0,05$).

Kardiyomiyositlerde intrasitoplazmik vakuolizasyon skorlamasında; Kontrol grubuna ait hayvanların kalp kesitlerinde intrasitoplazmik vakuolizasyon gözlenmedi (Şekil 3.1, 3.2). DOX-D grubunda; sol ventrikül duvarları incelendiğinde 1 ratta şiddetli intrasitoplazmik vakuolizasyon gözlenirken 3 ratta orta şiddette, 2 ratta ise hafif şiddette intrasitoplazmik vakuolizasyon görüldü. İnterventriküler septumlar incelendiğinde 1 ratta şiddetli, 2 ratta orta, 3 ratta ise hafif şiddette intrasitoplazmik vakuolizasyona rastlandı. Sağ ventrikül duvarlarında ise 2 ratta orta şiddette 4 ratta hafif şiddette intrasitoplazmik vakuolizasyon belirlendi. DOX-Y grubunda; Sol ventrikül duvarlarında ve interventriküler septumlarda 3 ratta şiddetli, 3 ratta ise orta şiddette intrasitoplazmik vakuolizasyona rastlandı. DOX-Y grubunda sağ ventrikül duvarları incelendiğinde ise 6 ratta da orta şiddette intrasitoplazmik vakuolizasyon belirlenmiştir. DOX-K grubunda; sol ventrikül duvarları ve interventriküler septumlarda grubun tamamında şiddetli derecede intrasitoplazmik vakuolizasyon tespit edildi. Sağ ventrikül duvarlarında ise 4 ratta şiddetli, 2 ise ratta orta şiddette intrasitoplazmik vakuolizasyon belirlendi (Tablo 3.6), (Şekil 3.4, 3.5, 3.11, 3.20, 3.21).

Gruplar arasında intrasitoplazmik vakuolizasyon şiddeti değerlendirildiğinde, diğer gruplara oranla DOX-K grup ortalamasının daha yüksek olduğu ve intrasitoplazmik vakuolizasyon yönünden en çok etkilenen bölgenin sol ventrikül olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.7).

Tablo 3.6. Erkek ratlara farklı dozlarda uygulanan DOX sonrası kardiyomiyositlerde intrasitoplazmik vakuolizasyonun kalp bölümlerine göre histopatolojik olarak skorlanması

İNTRASİTOPLAZMİK VAKUOLİZASYON			
	Sol ventrikül duvarı	İnterventriküler septum	Sağ ventrikül duvarı
K1	-	-	-
K2	-	-	-
K3	-	-	-
K4	-	-	-
K5	-	-	-
K6	-	-	-
DOX-D1	++	++	+
DOX-D2	+	+	+
DOX-D3	+	+	+
DOX-D4	++	+	+
DOX-D5	+++	+++	++
DOX-D6	++	++	++
DOX-Y1	++	++	++
DOX-Y2	+++	+++	++
DOX-Y3	++	++	++
DOX-Y4	+++	+++	++
DOX-Y5	++	++	++
DOX-Y6	+++	+++	++
DOX-K1	+++	+++	+++
DOX-K2	+++	+++	++
DOX-K3	+++	+++	+++
DOX-K4	+++	+++	+++
DOX-K5	+++	+++	++
DOX-K6	+++	+++	+++

Tablo 3.7. Erkek ratlara farklı dozlarda uygulanan DOX sonrası kardiyomiyositlerde intrasitoplazmik vakuolizasyonun istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

İntrasitoplazmik vakuolizasyon				
	Kontrol	DOX-D	DOX-Y	DOX-K
Sol ventrikül duvarı	0,16±0,16 ^c	1,83±0,30 ^b	2,50±0,22 ^a	3,00±0,00 ^a
İnterventriküler septum	0,16±0,16 ^c	1,66±0,33 ^b	2,50±0,22 ^a	3,00±0,00 ^a
Sağ ventrikül duvarı	0,16±0,16 ^d	1,33±0,21 ^c	2,00±0,00 ^b	2,66±0,21 ^a

a, b, c, d One-way ANOVA ve post-hoc Duncan testine göre satırdaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (p<0,001).

Kardiyomiyositlerde nekroz yönünden yapılan histopatolojik skorlamaya göre; Kontrol grubuna ait deney hayvanlarının kalp kesitlerinde 2 ratta, minimal sayıda hücreler dışında grup düzeyinde nekroz gözlenmedi (Şekil 3.1, 3.2). DOX-D grubunda; sol ventrikül duvarları nekroz bakımından değerlendirildiğinde 1 ratta şiddetli, 3 ratta orta şiddette, 2 ratta ise hafif şiddette nekroz belirlendi. İnterventriküler septumlarda 1 ratta şiddetli, 3 ratta orta şiddette ve 2 ratta hafif şiddette nekroz tespit edildi. Sağ ventrikül duvarları incelendiğinde ise 1 ratta orta şiddette, 5 ratta hafif şiddette nekroza rastlandı. DOX-Y grubunda; sol ventrikül duvarları incelendiğinde 1 ratta şiddetli, 5 ratta orta şiddette nekroz belirlendi. İnterventriküler septumlarda 5 ratta orta şiddette 1 ratta ise hafif şiddette nekroz görüldü. Sağ ventrikül duvarları incelendiğinde ise 3 ratta orta şiddette, 3 ratta hafif şiddette nekroz tespit edildi. DOX-K grubunda ise; sol ventrikül duvarlarında 4 ratta şiddetli, 2 ratta orta şiddette nekroz görüldü. İnterventriküler septumlarda ise 5 ratta şiddetli, 1 ratta orta şiddette nekroz belirlendi. Sağ ventrikül duvarları incelendiğinde ise 4 ratta şiddetli, 2 ratta ise orta şiddette nekroz görüldü (Tablo 3.8.), (Şekil 3.3-3.6, 3.9, 3.12, 3.13, 3.18-3.22, 3.24).

Gruplar arasında nekroz şiddeti değerlendirildiğinde, DOX-K grubunun grup ortalamasının diğer gruplara göre daha yüksek olduğu ve nekroz yönünden en çok etkilenen bölgenin interventriküler septum olduğu bulunmuştur (Tablo 3.9.).

Tablo 3.8. Erkek ratlara farklı dozlarda uygulanan DOX sonrası kardiyomiyositlerde nekrozun kalp bölümlerine göre histopatolojik skorlaması

	NEKROZ		
	Sol ventrikül duvarı	İnterventriküler septum	Sağ ventrikül duvarı
K1	-	-	-
K2	+	-	-
K3	-	-	-
K4	-	-	-
K5	-	+	-
K6	-	-	-
DOX-D1	+	+	+
DOX-D2	+	+	+
DOX-D3	++	++	+
DOX-D4	++	++	+
DOX-D5	++	++	+
DOX-D6	+++	+++	++
DOX-Y1	++	++	+
DOX-Y2	+++	++	++
DOX-Y3	++	++	+
DOX-Y4	++	++	++
DOX-Y5	++	++	++
DOX-Y6	++	+	+
DOX-K1	++	+++	+++
DOX-K2	+++	+++	+++
DOX-K3	+++	+++	++
DOX-K4	++	++	++
DOX-K5	+++	+++	+++
DOX-K6	+++	+++	+++

Tablo 3.9. Erkek ratlara farklı dozlarda uygulanan DOX sonrası kardiyomiyositlerde nekrozun istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	Nekroz			
	Kontrol	DOX-D	DOX-Y	DOX-K
Sol ventrikül duvarı	0,16±0,16 ^c	1,83±0,30 ^b	2,16±0,16 ^{ba}	2,66±0,21 ^a
İnterventriküler septum	0,16±0,16 ^c	1,83±0,30 ^b	1,83±0,16 ^b	2,83±0,16 ^a
Sağ ventrikül duvarı	0,16±0,16 ^c	1,16±0,16 ^b	1,50±0,22 ^b	2,66±0,21 ^a

^{a, b, c} One-way ANOVA ve post-hoc Duncan testine göre satırdaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (p<0,001).

Kanama için yapılan skorlamaya göre: Kontrol grubundaki hayvanların kalp kesitlerinde kanama gözlenmedi (Şekil 3.1, 3.2) DOX-D grubunda; sol ventrikül duvarları, interventriküler septumlar ve sağ ventrikül duvarları incelendiğinde 1 ratta orta şiddette, 4 ratta hafif şiddette kanama belirlenirken 1 ratta kanamaya rastlanmadı. DOX-Y grubunda; sol ventrikül duvarları incelendiğinde 2 ratta şiddetli, 3 ratta orta şiddette 1 ratta ise hafif şiddette kanama belirlendi. İnterventriküler septumlar incelendiğinde 1 ratta şiddetli, 4 ratta orta şiddette 1 ratta ise hafif şiddette kanamaya rastlandı. Sağ ventrikül duvarlarında 4 ratta orta şiddette 2 ratta ise hafif şiddette kanama gözlemlendi. DOX-K grubunda yapılan histopatolojik skorlamaya göre; sol ventrikül duvarları ve interventriküler septumların incelemesinde bütün ratlarda hafif şiddette kanama belirlendi. Sağ ventrikül duvarlarında ise 4 ratta hafif şiddette kanama görülürken 2 ratta kanamaya rastlanmadı (Tablo 3.10), (Şekil 3.15, 3.18).

Kanama açısından gerçekleştirilen gruplar arası değerlendirmede DOX-Y grubunun grup ortalamasının diğer gruplara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Kanama yönünden en çok etkilenen bölgenin ise sol ventrikül duvarı ve interventriküler septum olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.11).

Tablo 3.10. Erkek ratlara farklı dozlarda uygulanan DOX sonrası kalpte kanamanın kalp bölümlerine göre histopatolojik olarak skorlanması

	KANAMA		
	Sol ventrikül duvarı	İnterventriküler septum	Sağ ventrikül duvarı
K1	-	-	-
K2	-	-	-
K3	-	-	-
K4	-	-	-
K5	-	-	-
K6	-	-	-
DOX-D1	+	+	+
DOX-D2	+	+	+
DOX-D3	+	+	+
DOX-D4	+	+	+
DOX-D5	++	++	++
DOX-D6	-	-	-
DOX-Y1	+	+	+
DOX-Y2	+++	++	++
DOX-Y3	++	++	+
DOX-Y4	+++	+++	++
DOX-Y5	++	++	++
DOX-Y6	++	++	++
DOX-K1	+	+	-
DOX-K2	+	+	+
DOX-K3	+	+	+
DOX-K4	+	+	+
DOX-K5	+	+	+
DOX-K6	+	+	-

Tablo 3.11. Erkek ratlara farklı dozlarda uygulanan DOX sonrası kalpte kanamanın istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	Kanama			
	Kontrol	DOX-D	DOX-Y	DOX-K
Sol ventrikül duvarı	0,16±0,16 ^c	1,00±0,25 ^b	2,16±0,30 ^a	1,00±0,00 ^b
İnterventriküler septum	0,16±0,16 ^c	1,00±0,25 ^b	2,00±0,25 ^a	1,00±0,00 ^b
Sağ ventrikül duvarı	0,16±0,16 ^c	1,00±0,25 ^b	1,66±0,21 ^a	0,66±0,21 ^{bc}

^{a, b, c} One-way ANOVA ve post-hoc Duncan testine göre satırdaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (p<0,001).

Ratların kalplerinde histopatolojik olarak skorlanan her üç anatomik bölgenin skorları her rat için ayrı ayrı toplanarak tek bir skor elde edildi ve elde edilen verilerden gerçekleştirilen istatistik Tablo 3.12’de sunuldu. Buna göre dejenerasyon açısından

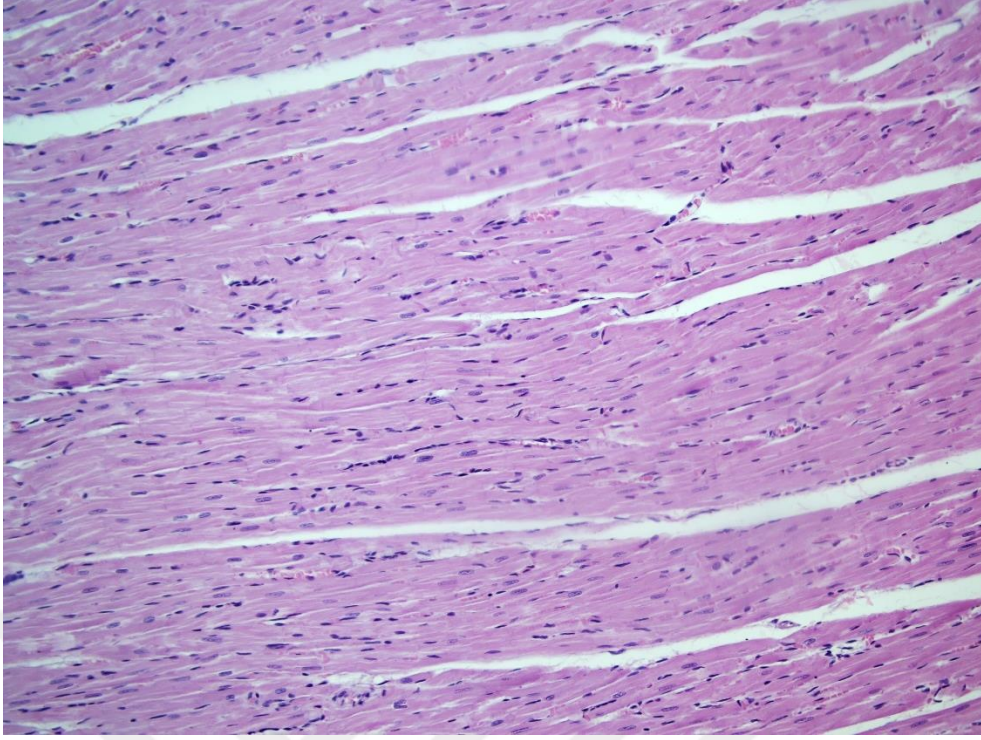
deneme gruplarının tamamı kontrol grubundan farklıyken deneme grupları arasında fark belirlenemedi. İntrasitoplazmik vakuolizasyon değerlendirildiğinde deneme gruplarının tamamının kontrol grubundan farklı olduğu ve en şiddetli lezyonların DOX-K grubunda olduğu görüldü. Nekrozun değerlendirilmesinde yine tüm deneme gruplarının kontrol grubundan farklı olduğu görülürken DOX-D ve DOX-Y grupları arasında fark bulunamadı, en şiddetli lezyonlar DOX-K grubunda belirlendi. Kanama değerlendirildiğinde ise yine tüm gruplar kontrol grubundan farklı görüldü. DOX-D ve DOX-K grupları arasında fark görülmezken en şiddetli kanama bulguları DOX-Y grubunda tespit edildi.

Tablo 3.12. Erkek ratlara farklı dozlarda uygulanan DOX sonrası kalpte meydana gelen histopatolojik lezyon skorlarının toplamalarının istatistiksel değerlendirilmesi.

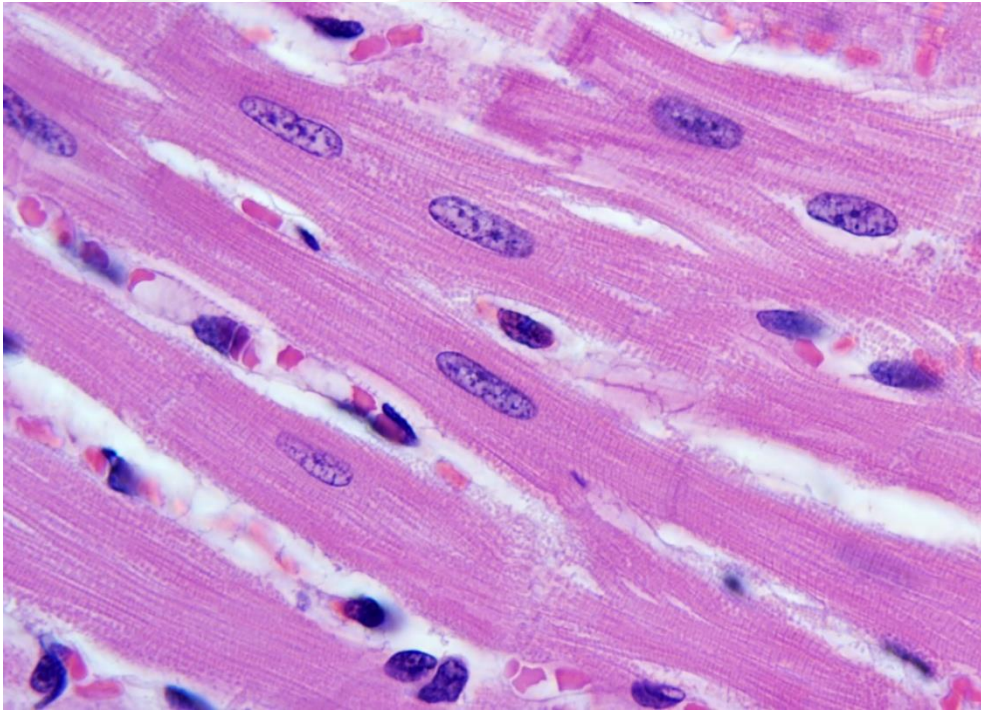
	Kontrol	DOX-D	DOX-Y	DOX-K
Dejenerasyon	0,66±0,49 ^b	6,50±0,80 ^a	8,16±0,65 ^a	7,33±1,47 ^a
İntrasitoplazmik vakuolizasyon	0,50±0,50 ^d	4,83±0,79 ^c	7,00±0,44 ^b	8,66±0,21 ^a
Nekroz	0,50±0,34 ^c	4,83±0,74 ^b	5,50±0,42 ^b	8,16±0,47 ^a
Kanama	0,50±0,50 ^c	3,00±0,77 ^b	5,83±0,70 ^a	2,66±0,21 ^b

a, b, c, d One-way ANOVA ve post-hoc Duncan testine göre satırdaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (p<0,001).

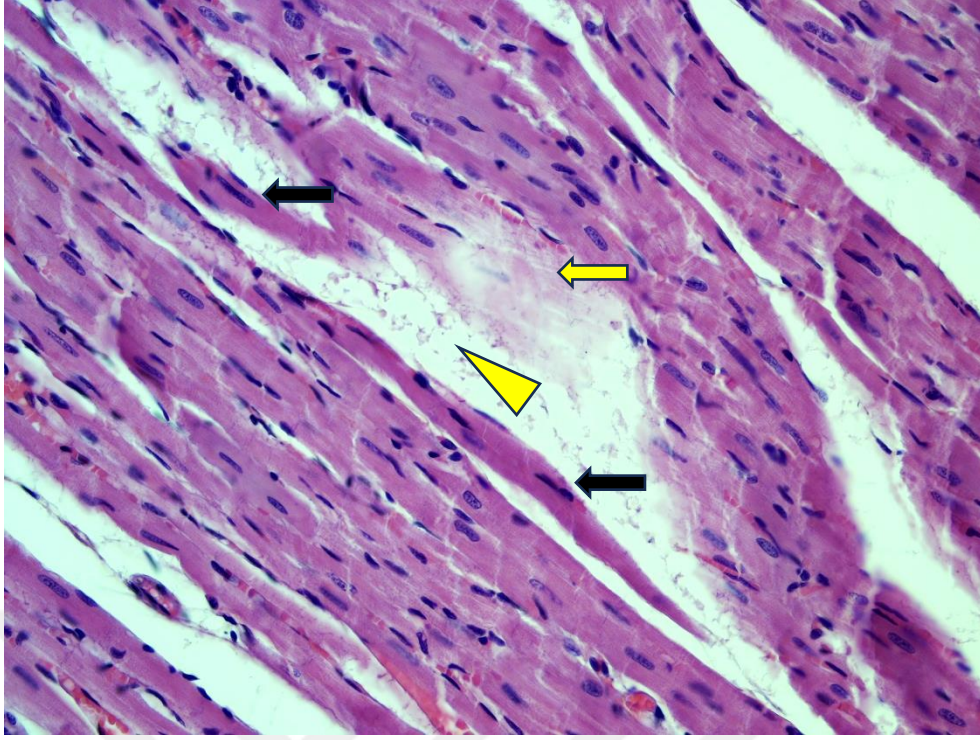
Bu bulguların yanı sıra kontrol grubu dışındaki tüm gruplarda bireysel düzeyde intersitisyel ödeme (Şekil 3.3, 3.11, 3.20), perivasküler mononükleer hücre (Şekil 3.9, 3.17, 3.23, 3.24) ve mast hücresi infiltrasyonlarına (Şekil 3.6, 3.7, 3.8, 3.16, 3.23, 3.24) rastlandı. Aynı zamanda özellikle DOX-Y grubunda olmak üzere yer yer hiperemi de belirlendi (Şekil 3.14, 3.23). Ayrıca özellikle DOX-K grubunda olmak üzere deneme gruplarında hafif şiddette fibroblast ve fibrosit aktivasyonu belirlendi. Bu bulguların yanı sıra DOX-K grubunda bulunan bir ratın kardiyomiyositlerinde perinükleer şişkinliğe rastlandı (Şekil 3.19).



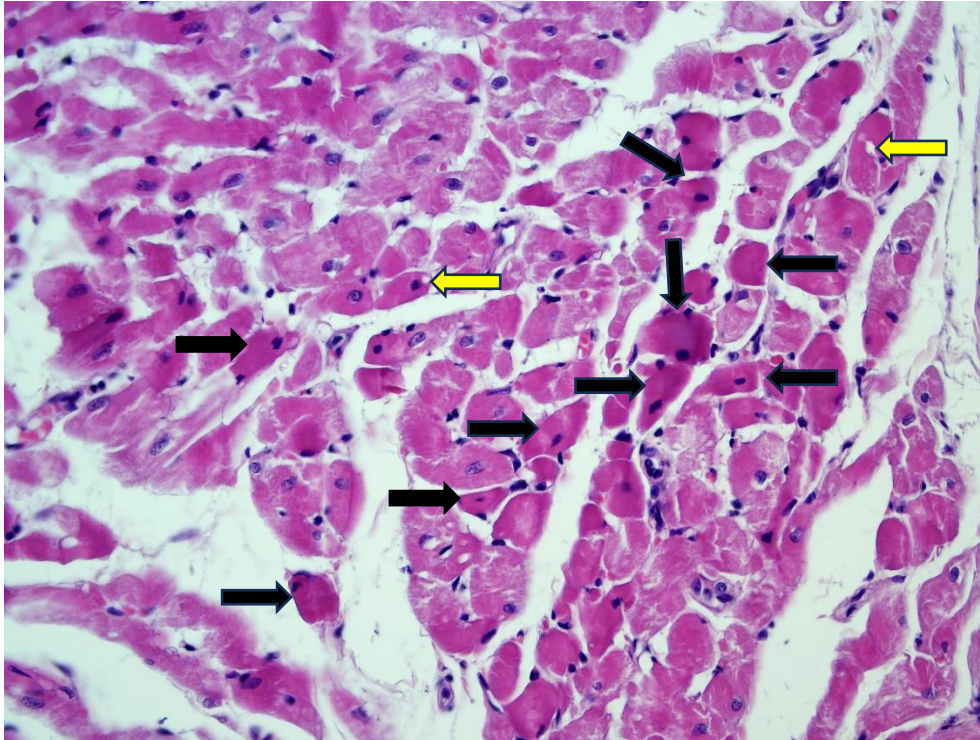
Şekil 3.1. Kontrol grubu, sol ventrikül; kalpte normal histolojik görünüm, orijinal büyütme x200, HE.



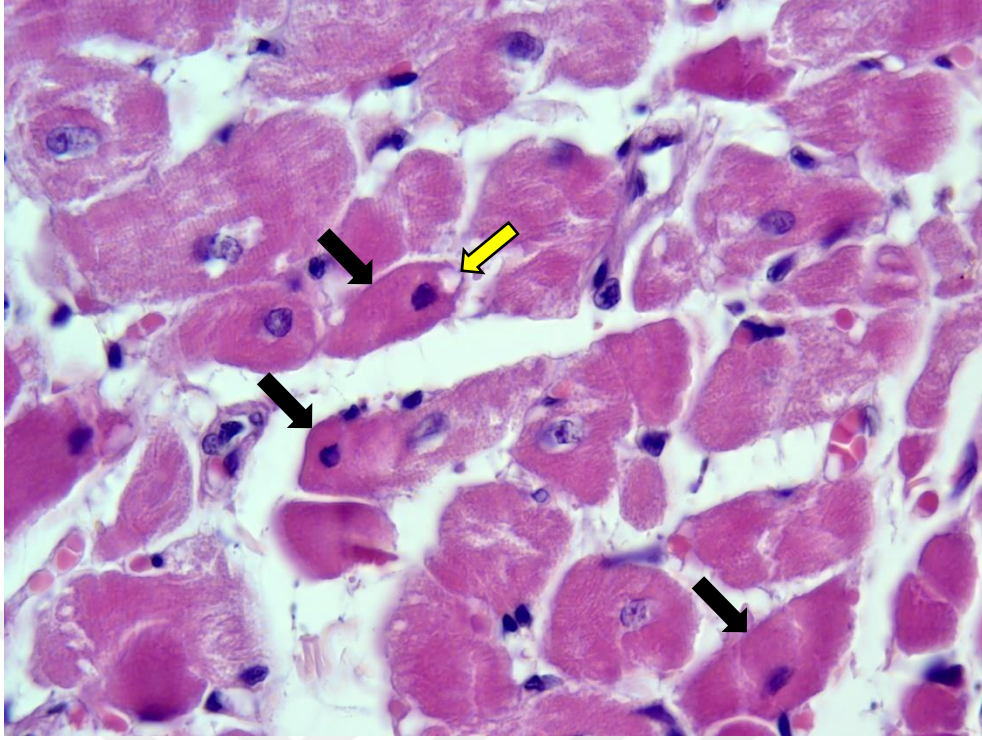
Şekil 3.2. Kontrol grubu, sol ventrikül; kalpte normal çizgilenme ve hücre yapısı, orijinal büyütme x1000, HE.



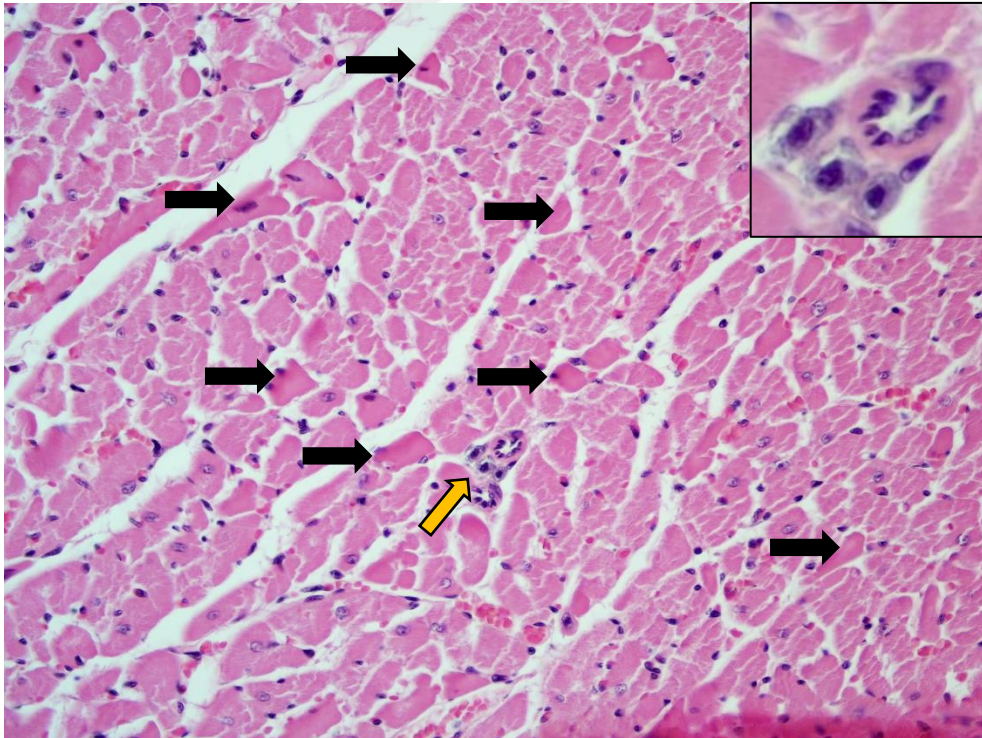
Şekil 3.3. DOX-D grubu, interventriküler septum; kalpte intersitisyumda ödem (ok başı), kas fibrillerinde disorganizasyon (sarı ok) ve nekroz (siyah oklar), orijinal büyütme x400, HE.



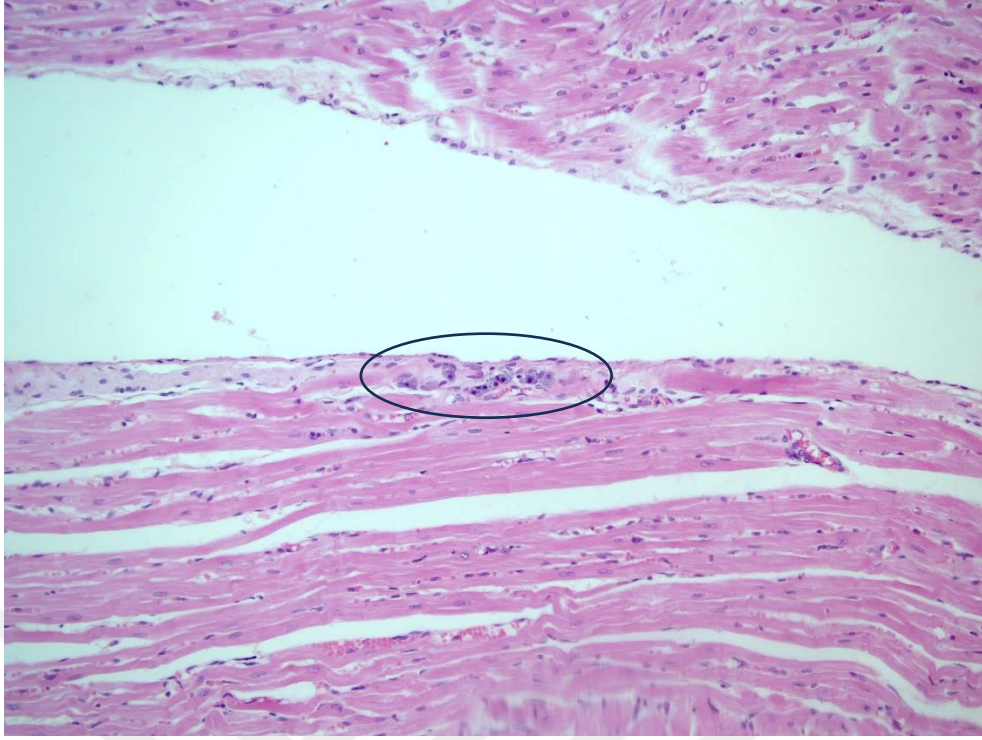
Şekil 3.4. DOX-D grubu, interventriküler septum; kalpte kas fibrillerinde orta şiddette nekroz (siyah oklar) ve hafif şiddette intrasitoplazmik vakuolizasyon (sarı oklar), orijinal büyütme, x400, HE.



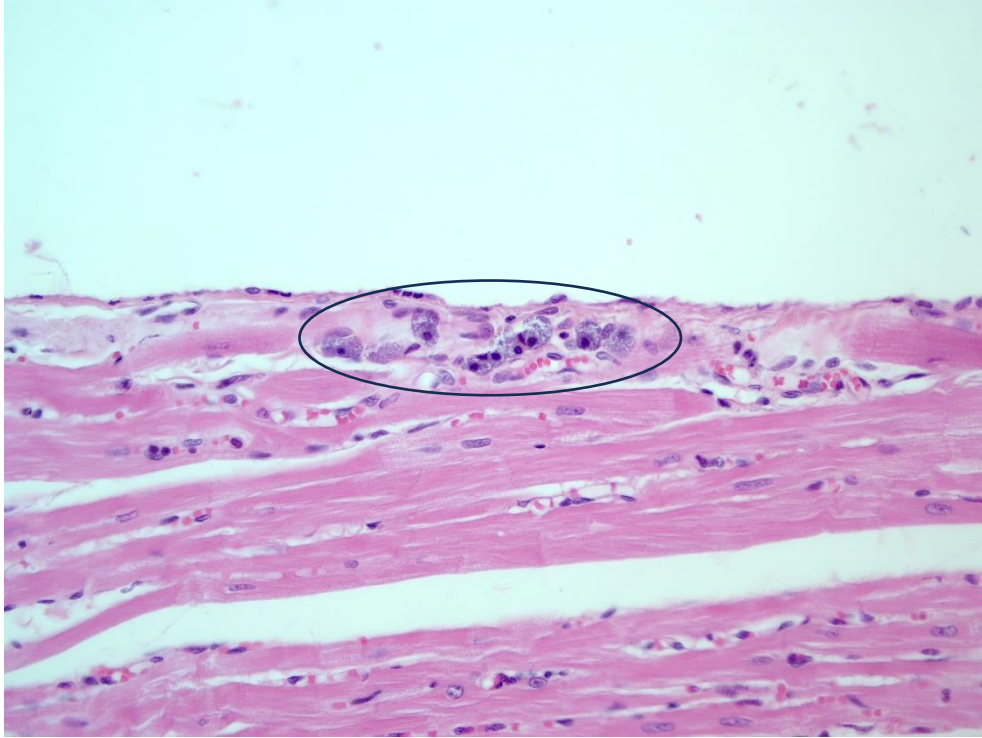
Şekil 3.5. DOX-D grubu, interventriküler septum; Şekil 3.4'ün büyütülmüş hali, kardiyomiyositlerde nekroz (siyah oklar) ve intrasitoplazmik vakuolizasyon (sarı ok), orijinal büyütme, x1000, HE.



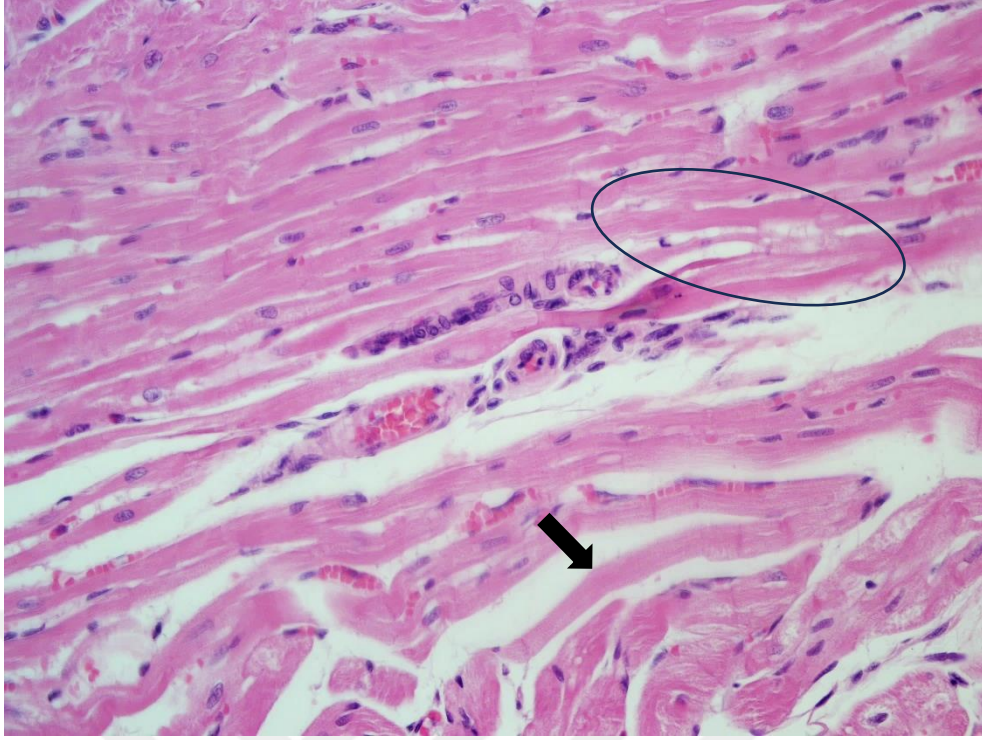
Şekil 3.6. DOX-D grubu, sol ventrikül duvarı; kardiyomiyositlerde orta şiddette nekroz (siyah oklar), perivasküler alanda mast hücreleri (turuncu ok, inset), orijinal büyütme, x400, HE.



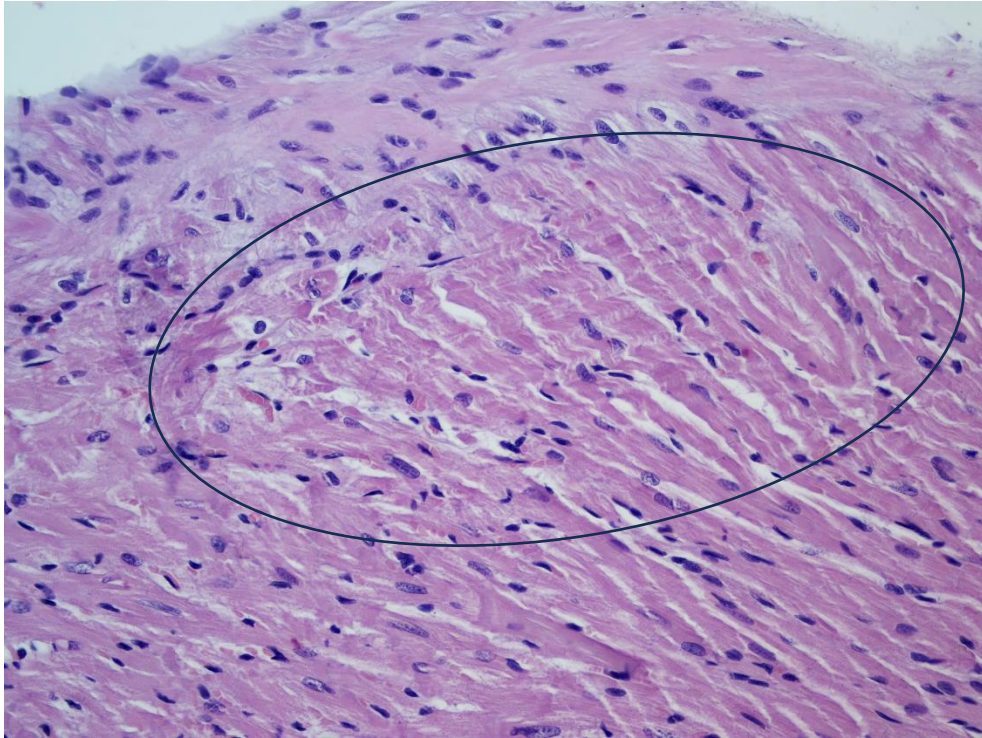
Şekil 3.7. DOX-D grubu, interventriküler septum; mast hücre infiltrasyonu (elips), orijinal büyütme, x200, HE.



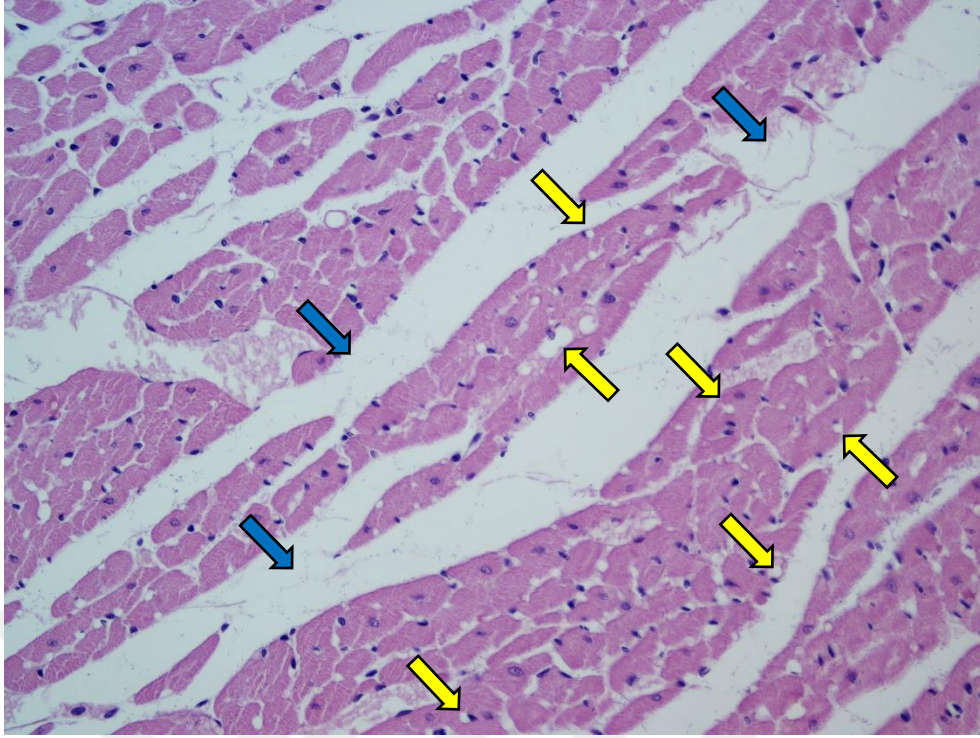
Şekil 3.8. DOX-D grubu, interventriküler septum; Şekil 3.7'nin büyütülmüş görünümü, orijinal büyütme, x400, HE.



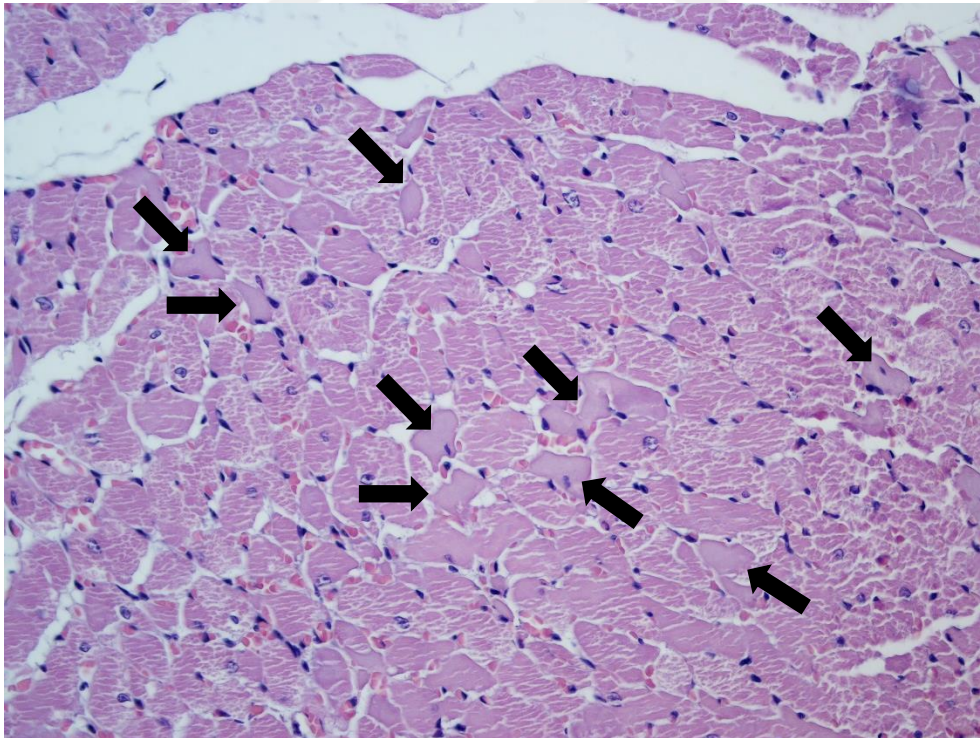
Şekil 3.9. DOX-D grubu, sağ ventrikül duvarı; perivasküler hücre infiltrasyonu, kas fibrillerinde nekroz (siyah ok) ve dejenerasyon (elips) orijinal büyütme, x400, HE.



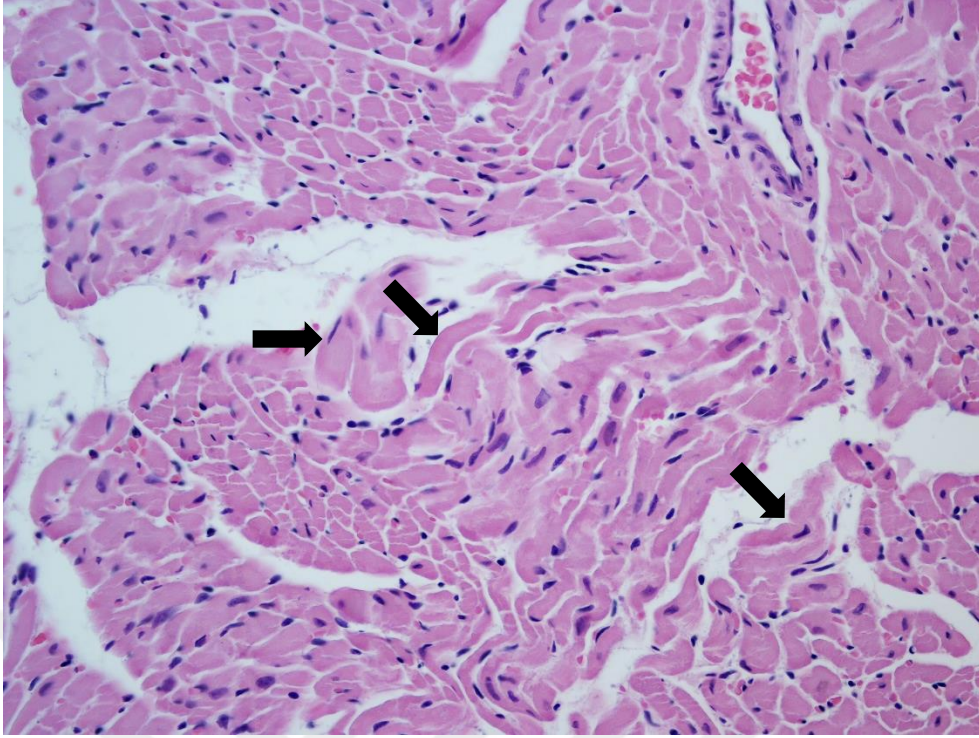
Şekil 3.10. DOX-Y grubu, sol ventrikül duvarı; kas fibrillerinde şiddetli dejenerasyon ve ödem (elips), orijinal büyütme, x400, HE.



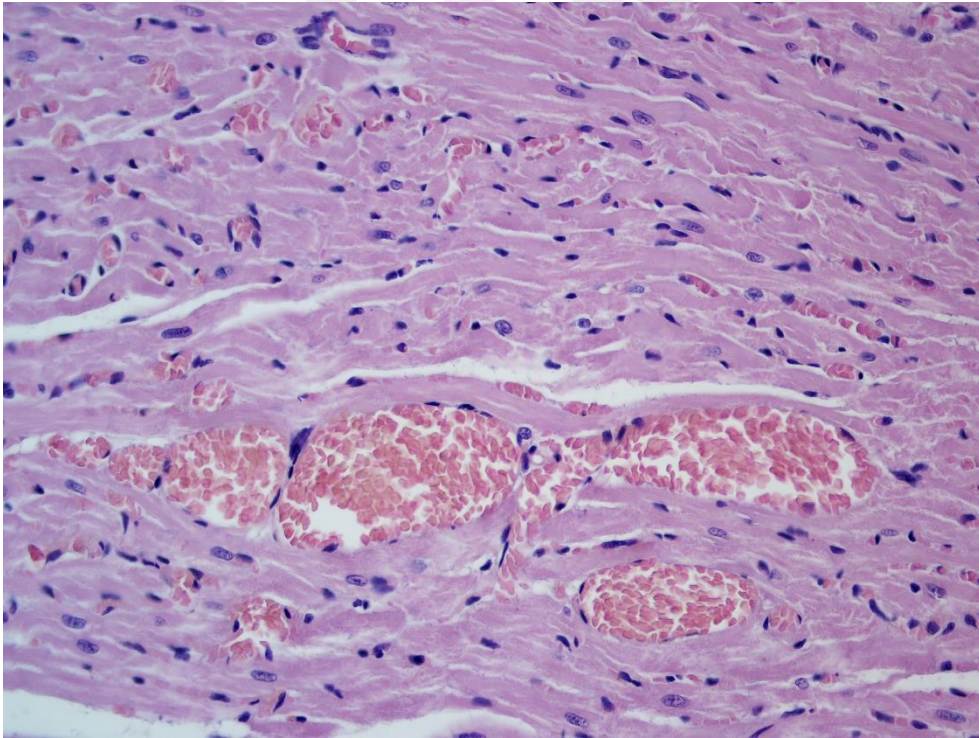
Şekil 3.11. DOX-Y grubu, sol ventrikül duvarı; kardiyomiyositlerde şiddetli intrasitoplazmik vakuolizasyon (sarı oklar), intersitisyumda ödem (mavi oklar), orijinal büyütme, x400, HE.



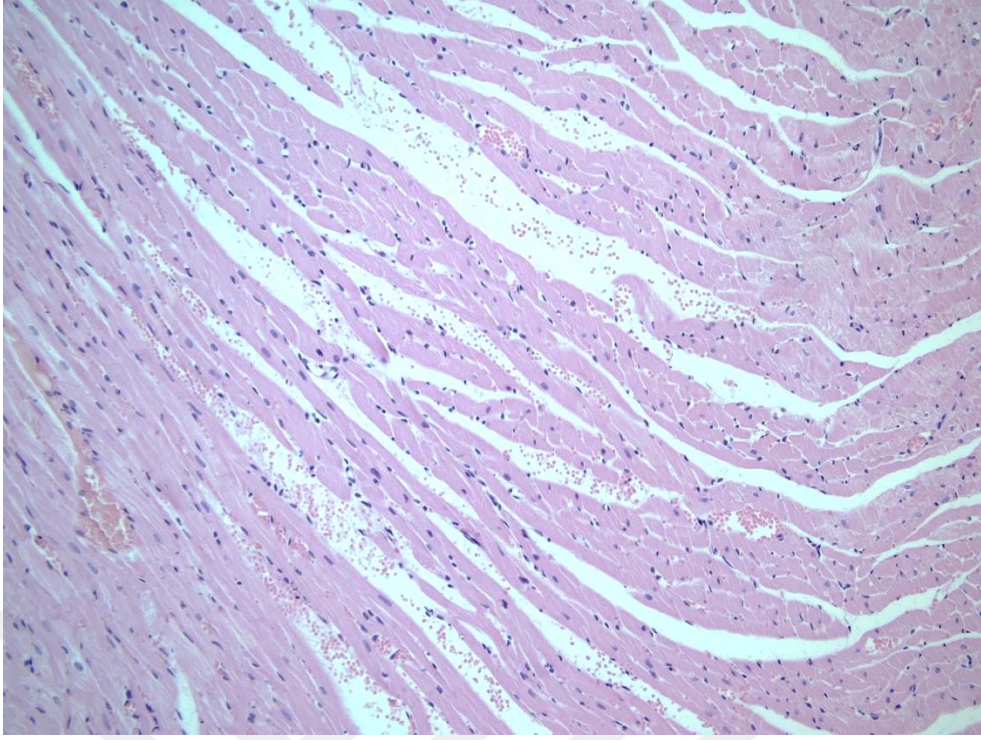
Şekil 3.12. DOX-Y grubu, interventriküler septum; kardiyomiyositlerde orta şiddette nekroz (siyah oklar), orijinal büyütme, x400, HE.



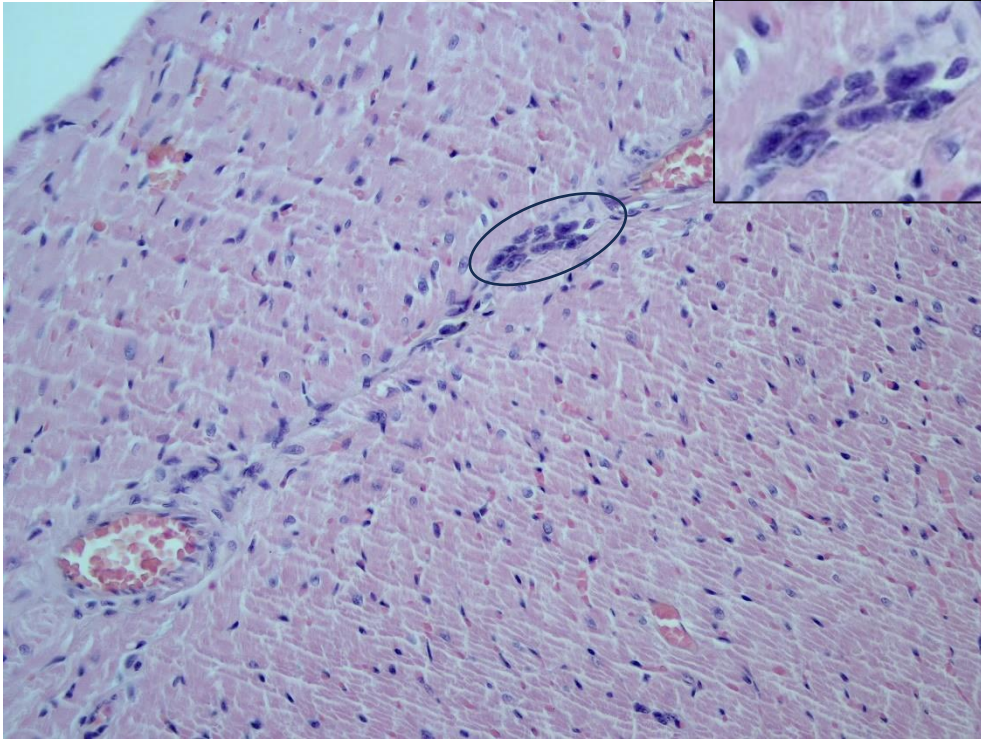
Şekil 3.13. DOX-Y grubu, sol ventrikül duvarı; kardiyomiyositlerde hafif şiddette nekroz (siyah oklar), orijinal büyütme, x400, HE



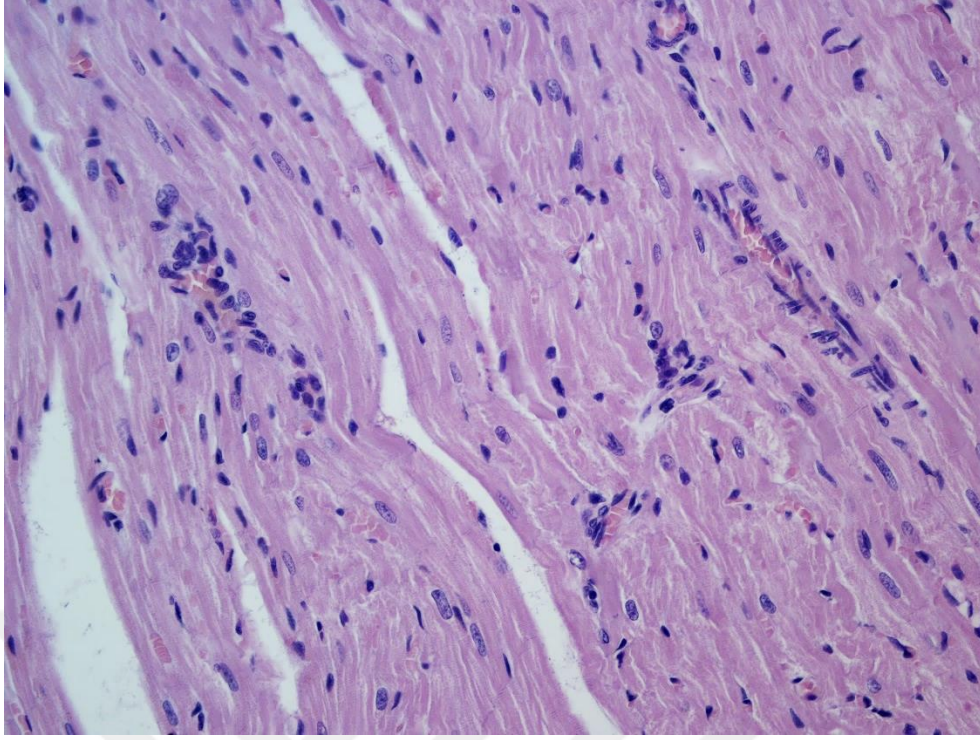
Şekil 3.14. DOX-Y grubu, sol ventrikül duvarı; hiperemi, orijinal büyütme, x400, HE.



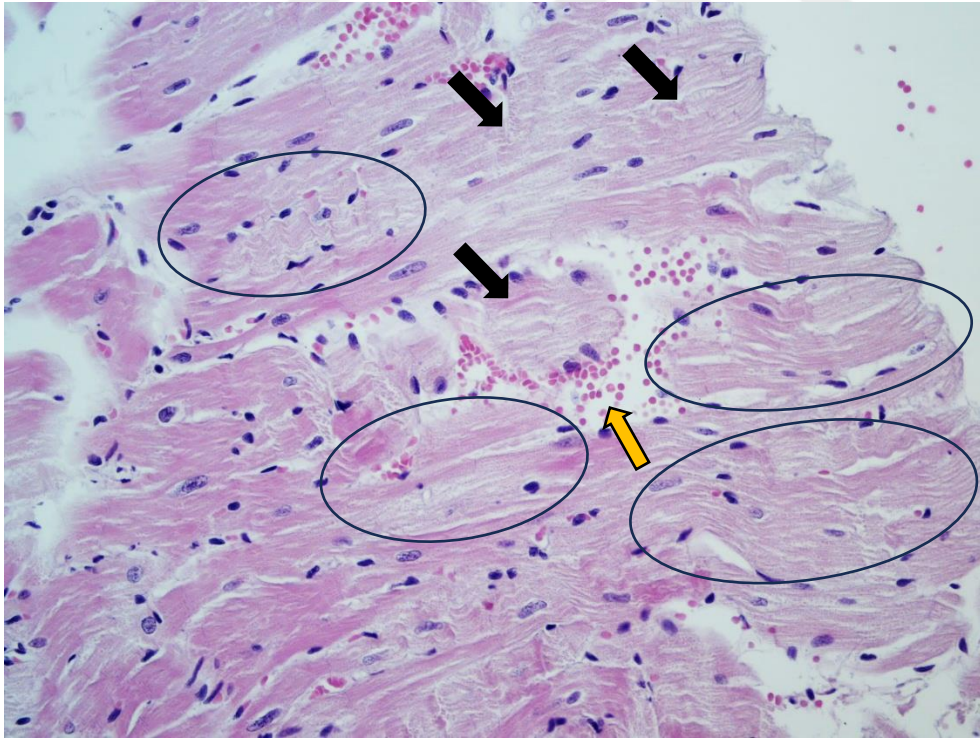
Şekil 3.15. DOX-Y grubu, sol ventrikül duvarı; şiddetli kanama, orijinal büyütme, x200, HE.



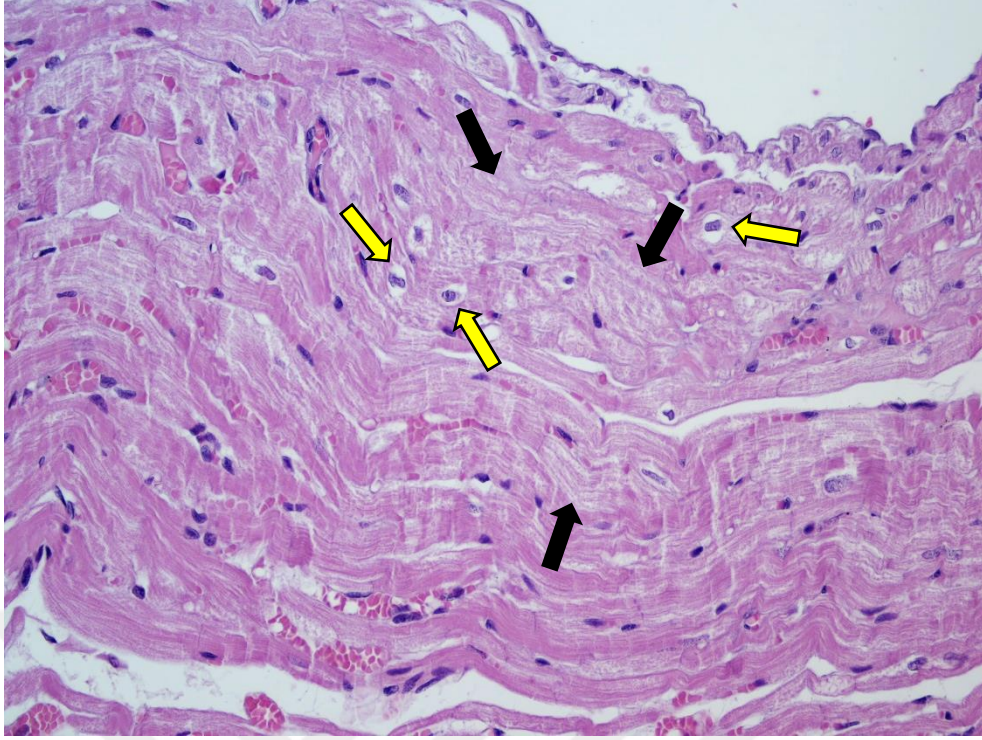
Şekil 3.16. DOX-Y grubu, interventriküler septum; perivasküler mast hücreleri (elips ve inset), orijinal büyütme, x400, HE.



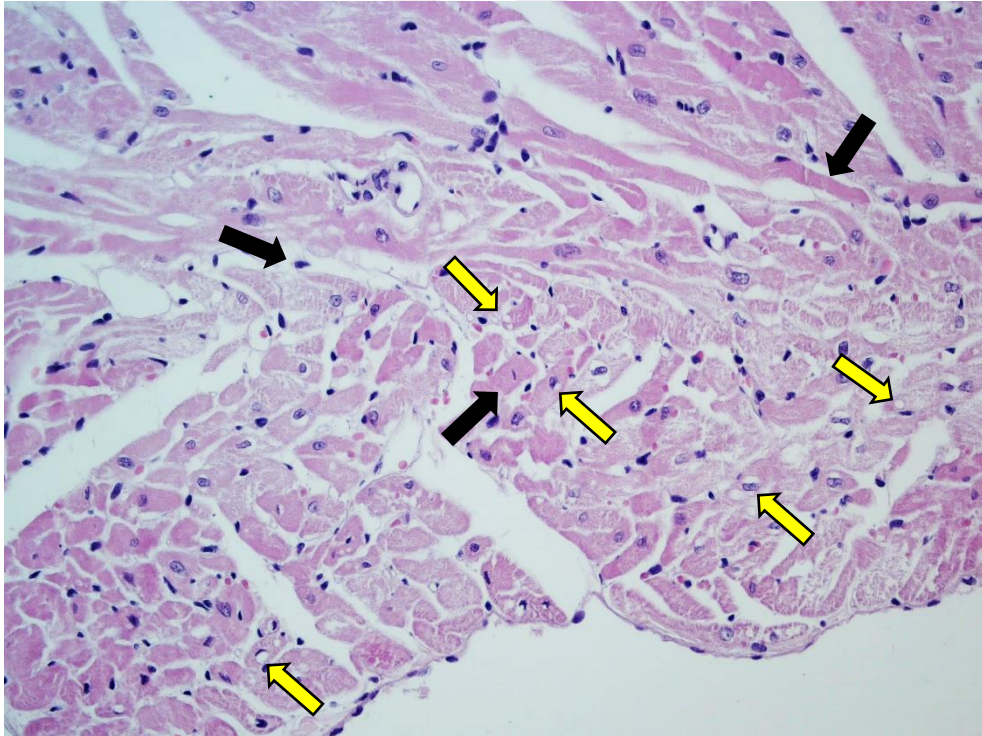
Şekil 3.17. DOX-Y grubu, sol ventrikül duvarı; perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu, orijinal büyütme, x400, HE.



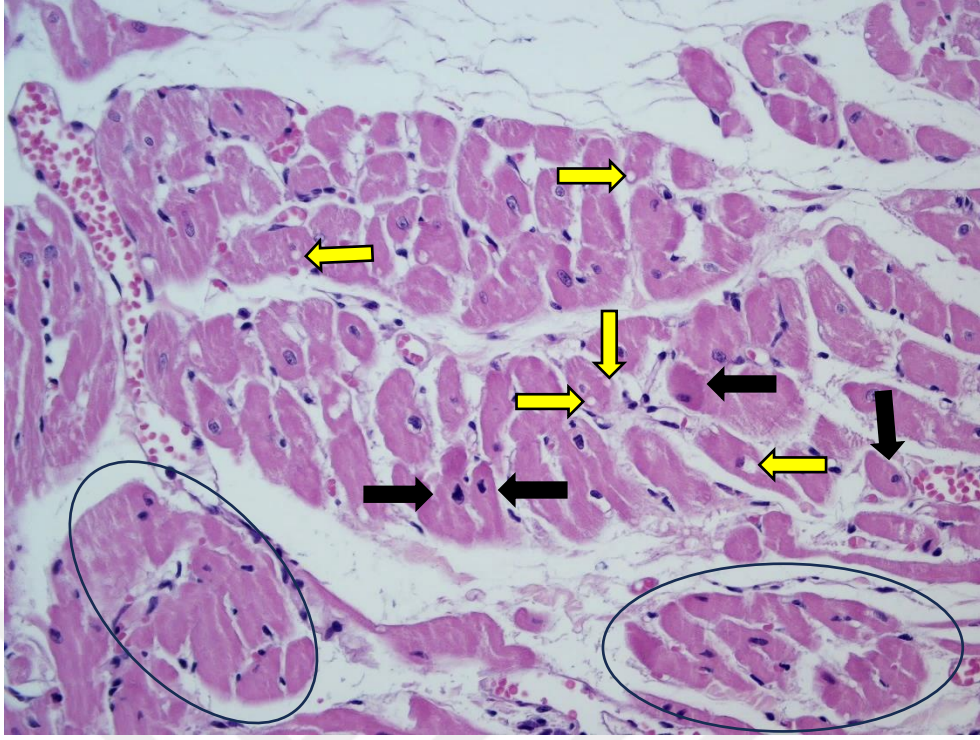
Şekil 3.18. DOX-K grubu, interventriküler septum; kas fibrillerinde şiddetli dejenerasyon (elipsler) ve şiddetli nekroz (siyah oklar), kanama (turuncu ok), orijinal büyütme, x400, HE.



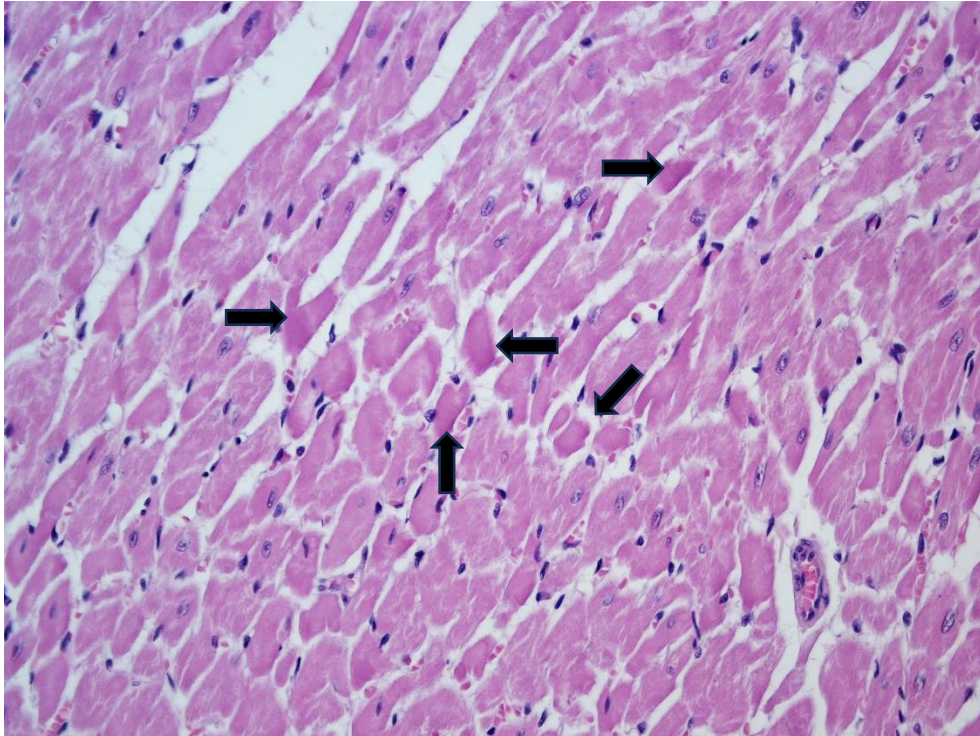
Şekil 3.19. DOX-K grubu, sağ ventrikül duvarı; kas fibrillerinde şiddetli dejenerasyon, şiddetli nekroz (siyah oklar) ve perinükleer şişkinlik (sarı oklar), orijinal büyütme, x400, HE.



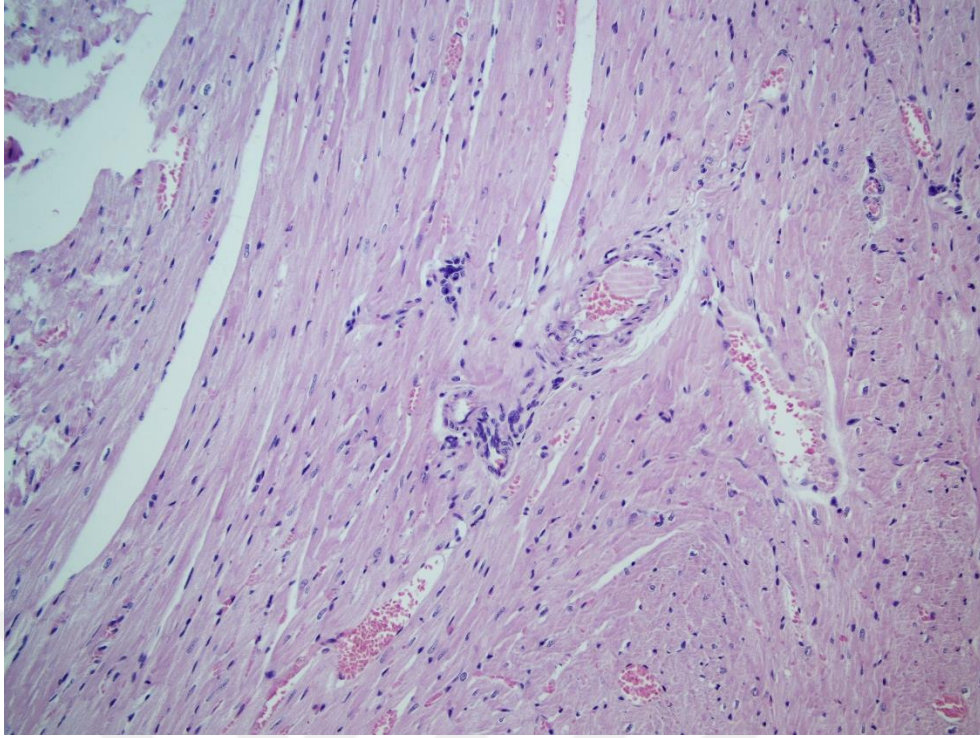
Şekil 3.20. DOX-K grubu, sol ventrikül duvarı; kardiyomiyositlerde şiddetli intrasitoplazmik vakuolizasyon (sarı oklar) ve nekroz (siyah oklar), orijinal büyütme, x400, HE.



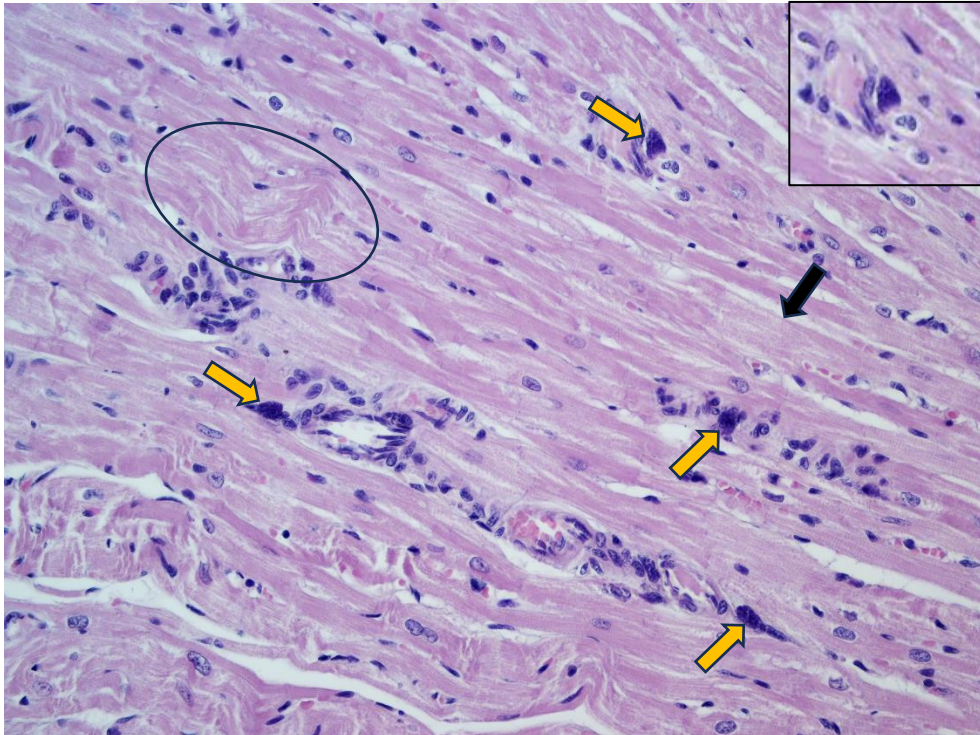
Şekil 3.21. DOX-K grubu, sol ventrikül duvarı; kardiyomiyositlerde şiddetli intrasitoplazmik vakuolizasyon (sarı oklar) ve şiddetli nekroz (elipsler, siyah oklar), ödem, x400, HE.



Şekil 3.22. DOX-K grubu, sol ventrikül duvarı; kardiyomiyositlerde orta şiddette nekroz (siyah oklar), orijinal büyütme, x400, HE.



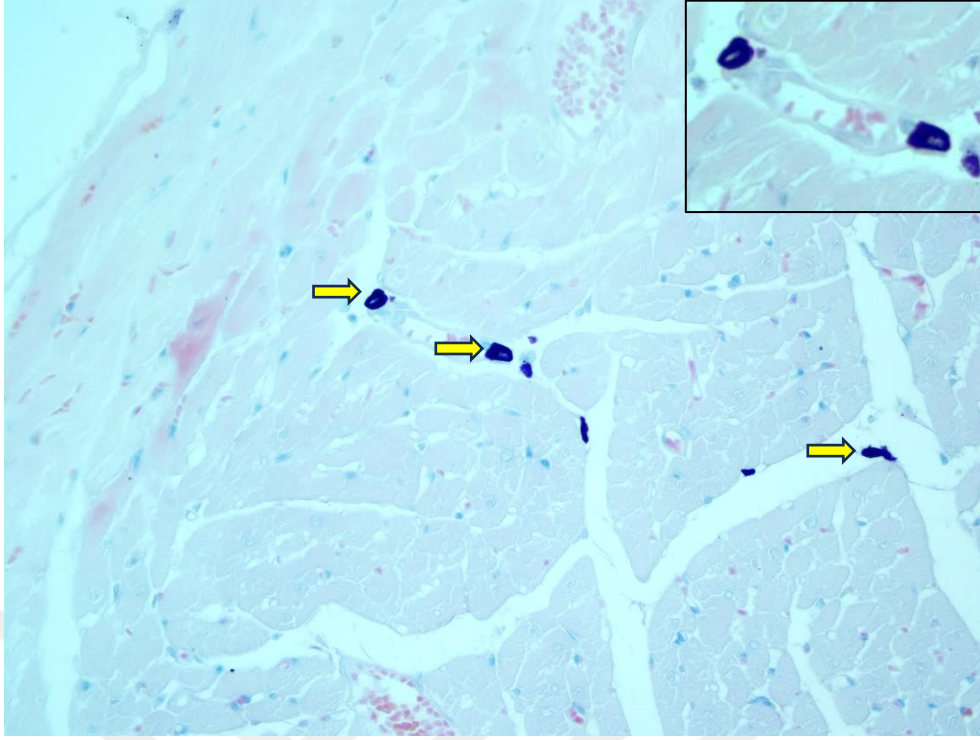
Şekil 3.23. DOX-K grubu, interventriküler septum; perivasküler mononükleer hücre ve mast hücresi infiltrasyonları ve hiperemi, orijinal büyütme, x200, HE.



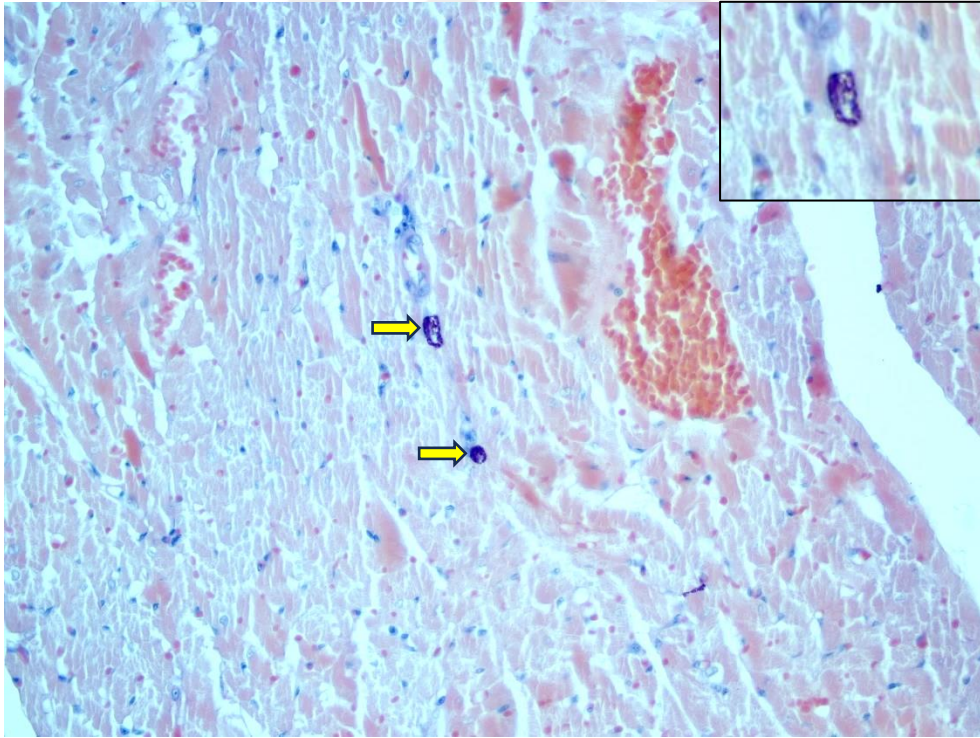
Şekil 3.24. DOX-K grubu, sağ ventrikül duvarı; perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu ve mast hücreleri (turuncu oklar, inset), dejenerasyon (elips), nekroz (siyah ok), orijinal büyütme, x400, HE.

Dominici boyama sonrası yapılan incelemede kontrol grubunda bulunan hayvanların kalplerinde mast hücrelerinin normal yapıda olduğu gözlenirken (Şekil 3.25), hem DOX-D grubunda (Şekil 3.26) hem DOX-Y (Şekil 3.27) grubunda hem de DOX-K (Şekil 3.28) grubundaki hayvanların kalplerinde bulunan mast hücrelerinin şekillerinin (yapısının) bozulduğu gözlemlendi.

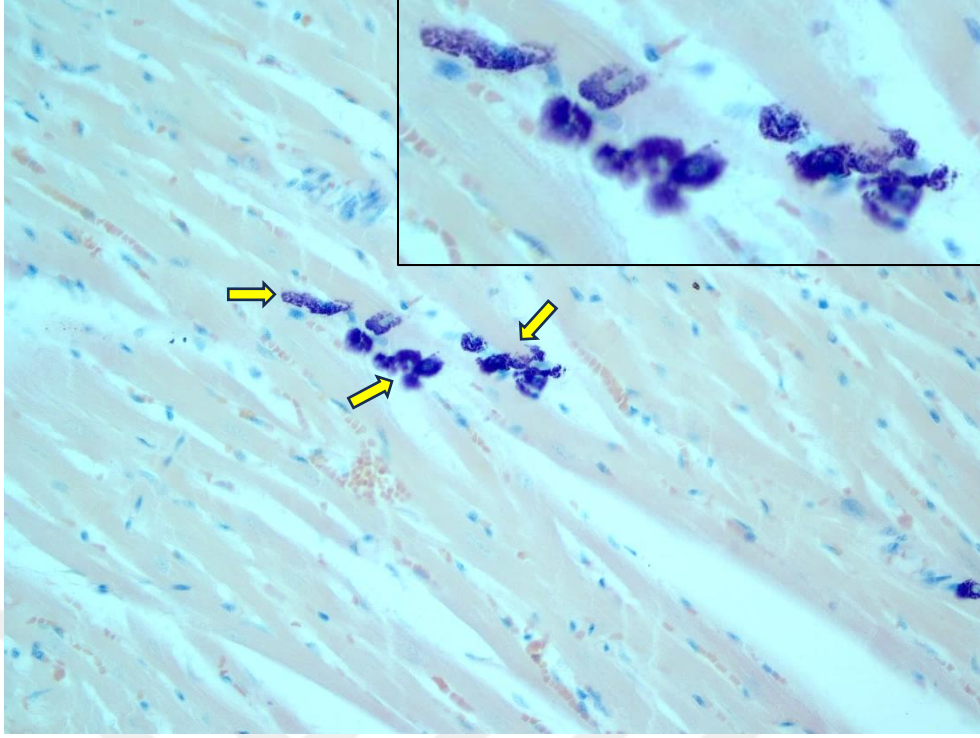




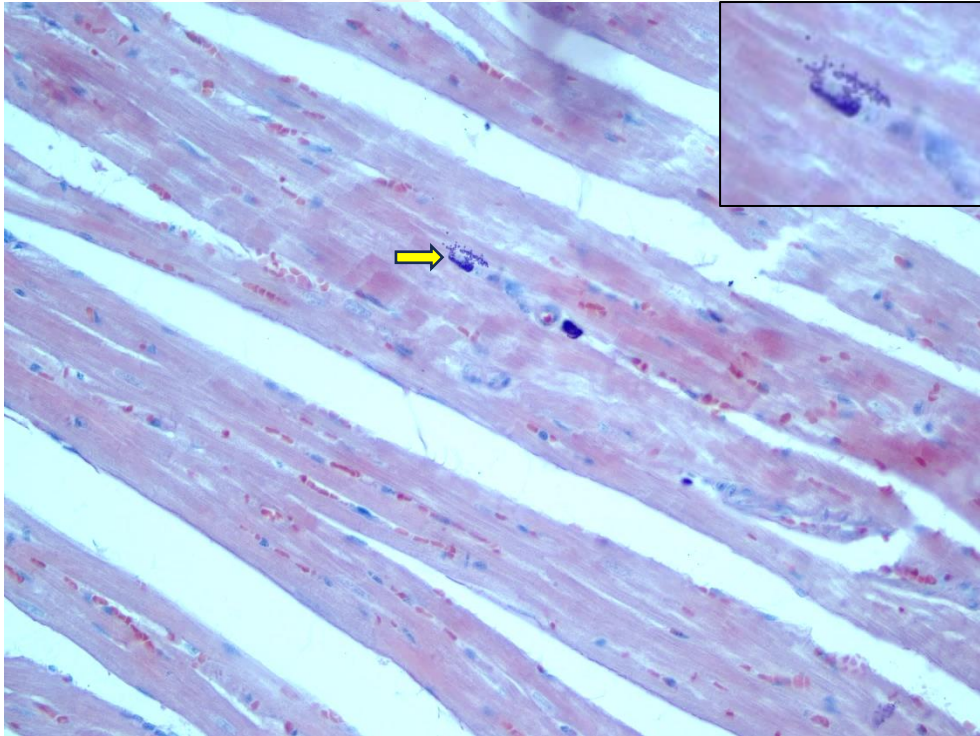
Şekil 3.25. Kontrol grubu, sol ventrikül duvarı; normal yapıda mast hücreleri (sarı oklar, inset), orijinal büyütme, x400, Dominici boyası.



Şekil 3.26. DOX-D grubu, sol ventrikül duvarı; mast hücrelerinde degranülasyon (sarı oklar, inset), orijinal büyütme x400, Dominici boyası.



Şekil 3.27. DOX-Y grubu, sol ventrikül duvarı; mast hücrelerinde degranülasyon (sarı oklar, inset), orijinal büyütme x400, Dominici boyası.



Şekil 3.28. DOX-K grubu, sol ventrikül duvarı; mast hücrelerinde degranülasyon (sarı ok, inset), orijinal büyütme x400, Dominici boyası.

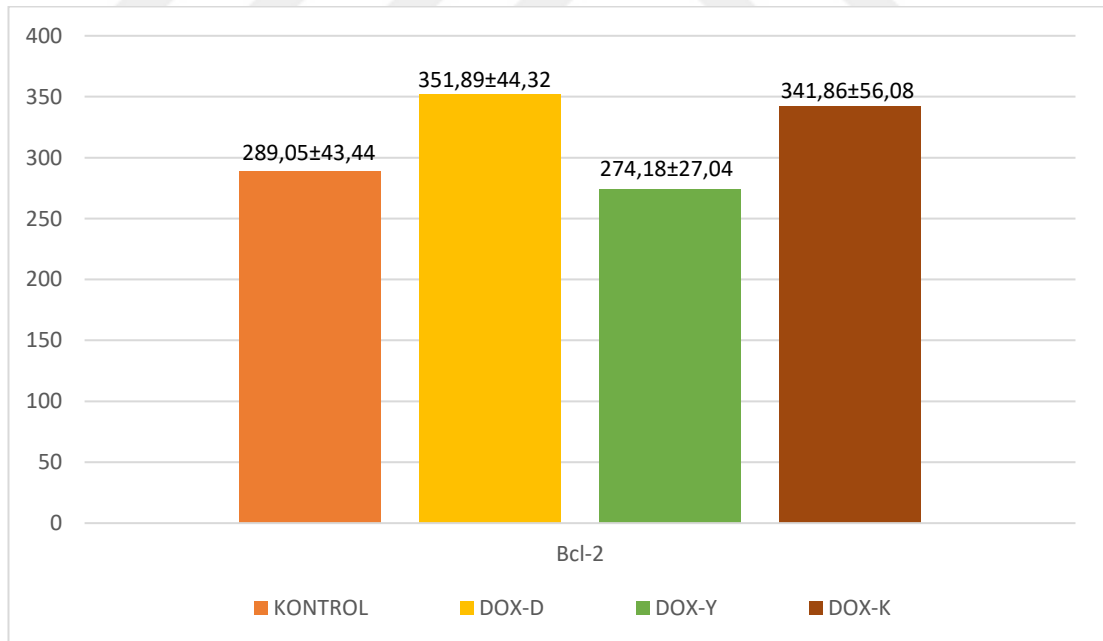
Masson'un trikrom boyaması sonucu kalpte fibrözis varlığının araştırılması amacıyla yapılan incelemelerde grupların hiçbirinde fibrozis bulgusuna rastlanmadı. Yapılan incelemelerde atriumlarda ve intramural damarlarda histopatolojik lezyona rastlanmadı.

3.2. Real Time-PCR Bulguları

Real Time-PCR ile kalplerin hem sol ventrikül duvarı hem interventriküler septum hem de sağ ventrikül duvarından alınan örnekler homojenize edilerek incelenmiştir. Her bir parametre için grup içi $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri kullanılarak istatistikler gerçekleştirilmiş ve aşağıda sunulmuştur.

3.2.1. Bcl-2

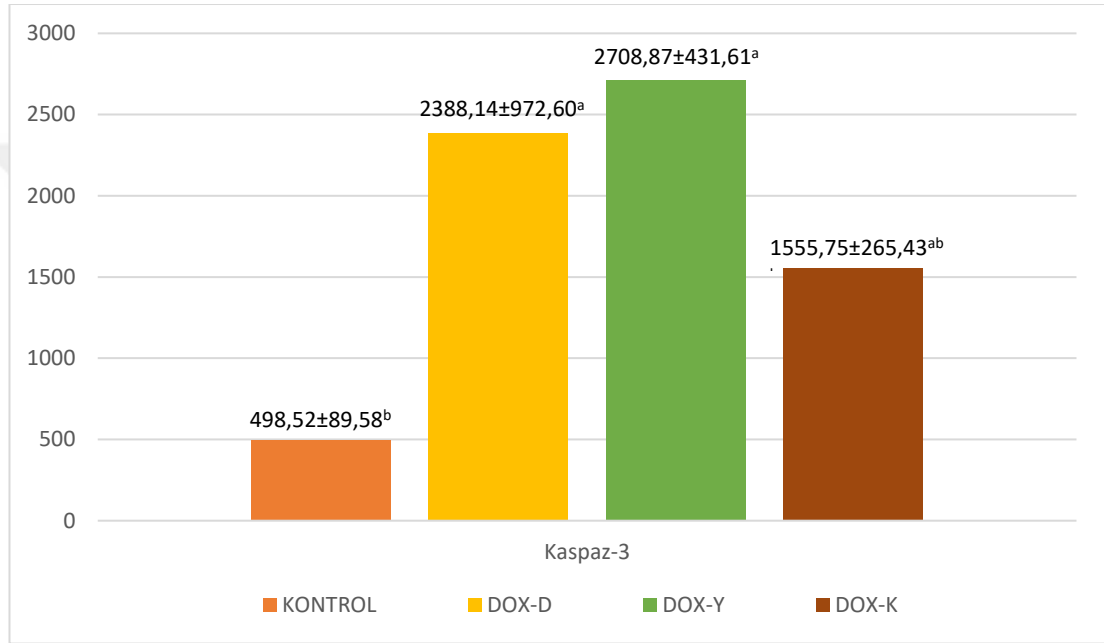
Real-Time PCR ölçümlerine göre Bcl-2 sonuçları Grafik 3.2.'de sunulmuştur. DOX-Y grubu diğer gruplara göre daha düşük ekspresyon seviyesi gösterirken en yüksek ekspresyon seviyesi DOX-D grubunda kaydedildi (Grafik 3.2). Bcl-2 yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı ($p>0,05$).



Grafik 3.2. RT-PCR sonuçlarına göre Bcl-2'nin gruplar arası dağılımı ve istatistiği ($p>0,05$).

3.2.2. Kaspaz-3

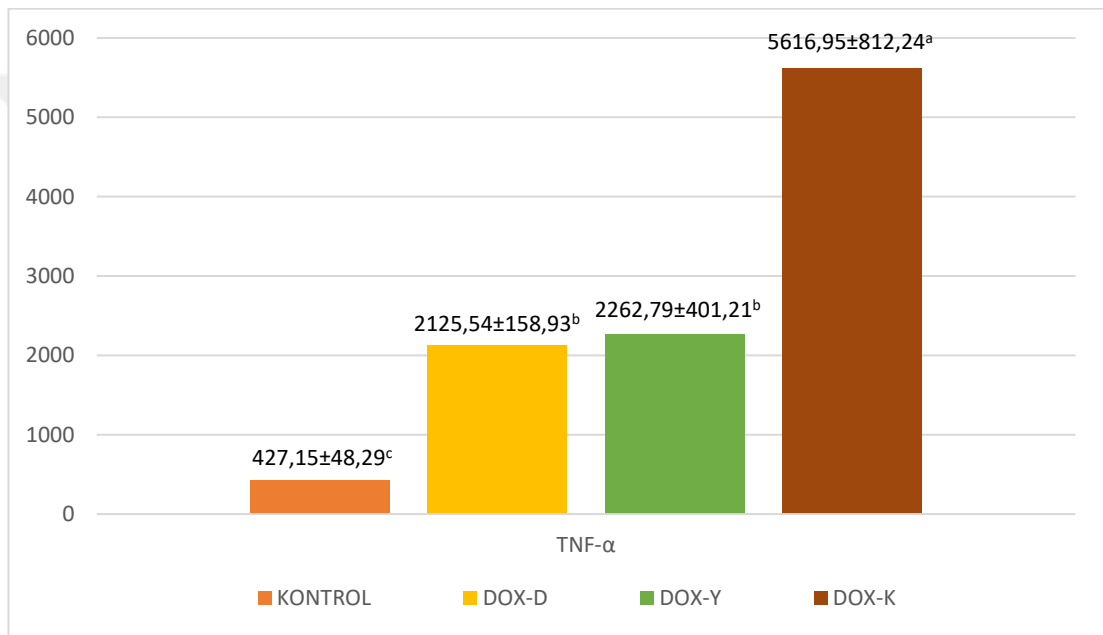
Real-Time PCR sonuçları Kaspaz-3 açısından incelendiğinde DOX-Y grubunun ekspresyon seviyelerinin diğer gruplara oranla yüksek olduğu belirlendi. DOX-Y'yi DOX-D ve DOX-K takip ederken en düşük kaspaz-3 oranının Kontrol grubunda olduğu görüldü (Grafik 3.3.). Kaspaz-3 için yapılan istatistiksel incelemede ise kontrol grubu ile DOX-Y ve DOX-D grubu arasında istatistiksel olarak fark bulundu ($p<0,05$). Kontrol grubu ile DOX-K arasında ise fark bulunamadı ($p>0,05$).



Grafik 3.3. RT-PCR sonuçlarına göre Kaspaz-3'ün gruplar arası dağılımı ve istatistiği.

3.2.3. TNF-alfa

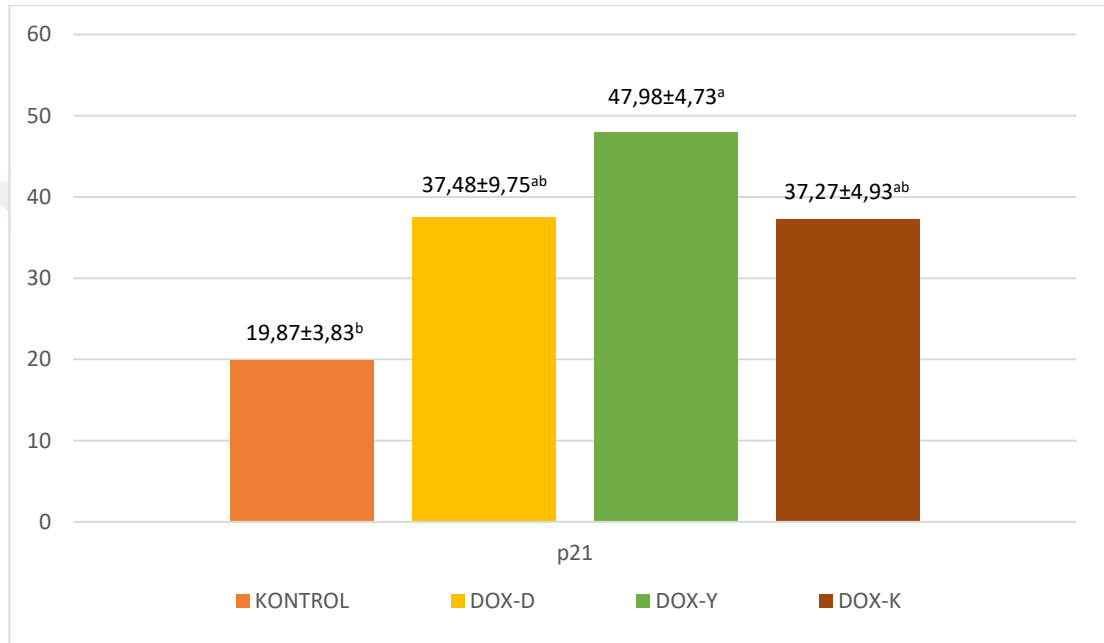
Real-Time-PCR sonuçları TNF-alfa açısından değerlendirildiğinde DOX-K grubunun ekspresyon seviyelerinin diğer gruplara göre açık ara daha yüksek olduğu tespit edildi. DOX-K grubunu DOX-Y ve DOX-D grubu takip ederken en düşük TNF-alfa ekspresyon seviyelerinin kontrol grubunda olduğu görüldü (Grafik 3.4.). TNF- α için; kontrol grubu ile DOX-D, DOX-Y ve DOX-K grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). DOX-D ve DOX-Y grupları arasında fark bulunmazken ($p>0,05$), her iki grubun DOX-K ile aralarında istatistiksel olarak fark olduğu belirlendi ($p<0,05$).



Grafik 3.4. RT-PCR sonuçlarına göre TNF-alfa'nın gruplar arası dağılımı.

3.2.4. p21

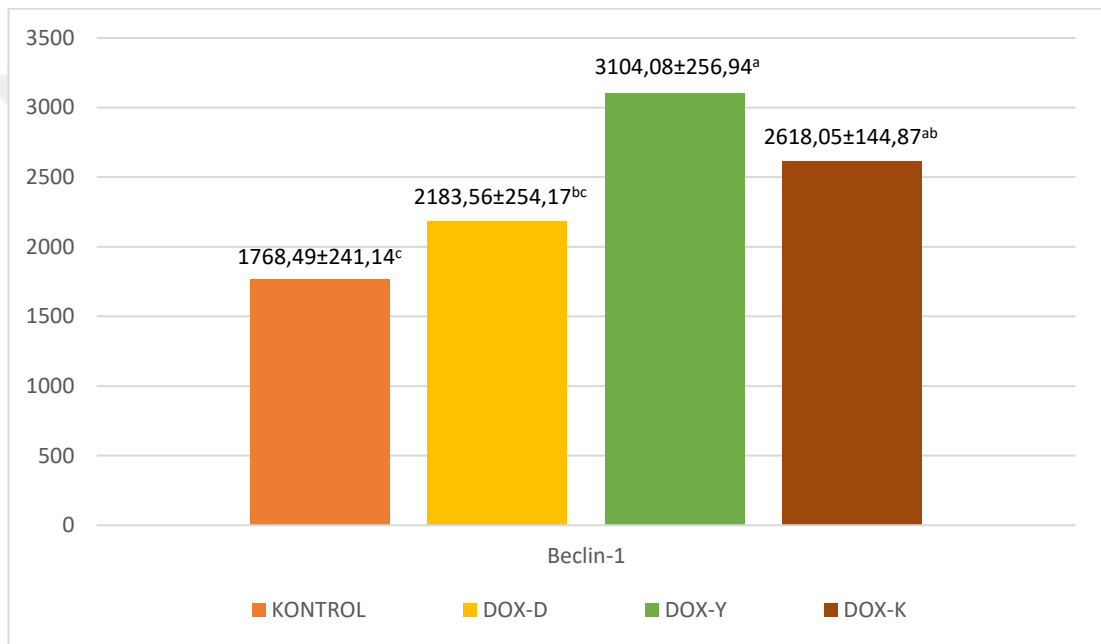
Real-Time-PCR sonuçları p21 açısından değerlendirildiğinde DOX-Y grubunun ekspresyon seviyelerinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu tespit edildi. En düşük p21 ekspresyon seviyelerinin ise kontrol grubunda olduğu görüldü (Grafik 3.5.). p21 için gerçekleştirilen istatistiksel incelemede; kontrol grubu ile DOX-K ve DOX-D grubu arasında anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0,05$) kontrol grubu ile DOX-Y grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).



Grafik 3.5. RT-PCR sonuçlarına göre p21'in gruplar arası dağılımı ve istatistiği.

3.2.5. Beclin-1

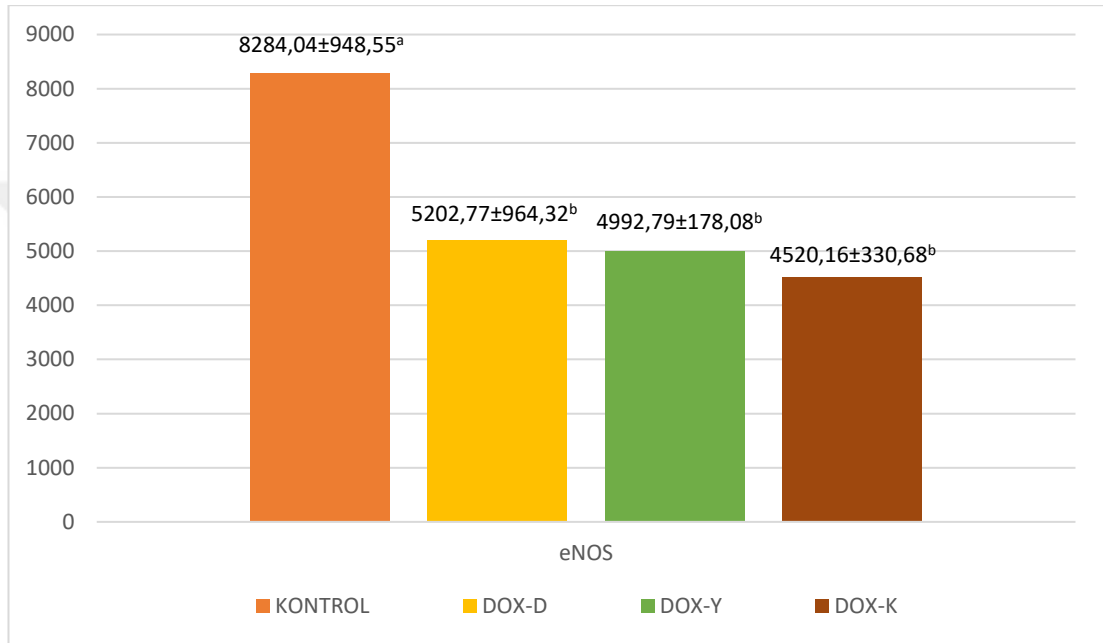
Real-Time-PCR sonuçları Beclin-1 açısından değerlendirildiğinde DOX-Y grubunun ekspresyon seviyelerinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu tespit edildi. DOX-Y grubunu DOX-K grubu takip ederken en düşük ekspresyon seviyelerinin kontrol grubunda olduğu görüldü (Grafik 3.6.). Beclin-1 açısından yapılan incelemede; kontrol grubu ile DOX-D arasında anlamlı bir fark bulunmazken kontrol grubu ile DOX-Y ve DOX-K arasında istatistiksel olarak fark bulundu ($p<0,05$). Ayrıca DOX-Y grubu ile DOX-D grubu arasındaki fark da önemliydi ($p<0,05$).



Grafik 3.6. RT-PCR sonuçlarına göre Beclin-1'in gruplar arası dağılımı ve istatistiği.

2.3.6. eNOS

Real-Time-PCR sonuçları eNOS açısından değerlendirildiğinde Kontrol grubunun ekspresyon seviyelerinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu tespit edildi. En düşük eNOS ekspresyon seviyelerinin ise DOX-K grubunda olduğu görüldü (Grafik 3.7.). eNOS yönünden yapılan istatistiksel incelemede ise kontrol grubu ile DOX-D, DOX-Y ve DOX-K grupları arasında istatistiksel olarak fark olduğu görüldü ($p<0,05$). Deneme grupları arasındaki fark ise önemsizdi ($p>0,05$).



Grafik 3.7. RT-PCR sonuçlarına göre eNOS'un gruplar arası dağılımı ve istatistiği.

Tablo 3.11. RT-PCR sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi

	Kontrol	DOX-D	DOX-Y	DOX-K
Bcl-2	289,05±43,44 ^a	351,89±44,32 ^a	274,18±27,04 ^a	341,86±56,08 ^a
Caspase-3	498,52±89,58 ^b	2388,14±972,60 ^a	2708,87±431,61 ^a	1555,75±265,43 ^{ab}
TNF-α	427,15±48,29 ^c	2125,54±158,93 ^b	2262,79±401,21 ^b	5616,95±812,24 ^a
p21	19,87±3,83 ^b	37,48±9,75 ^{ab}	47,98±4,73 ^a	37,27±4,93 ^{ab}
Beclin-1	1768,49±241,14 ^c	2183,56±254,17 ^{bc}	3104,08±256,94 ^a	2618,05±144,87 ^{ab}
eNOS	8284,04±948,55 ^a	5202,77±964,32 ^b	4992,79±178,08 ^b	4520,16±330,68 ^b

a, b, c, ab, bc One-way ANOVA ve post-hoc Duncan testine göre satırdaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir ($p<0,05$).

4. TARTIŞMA

Antrasiklinler olarak adlandırılan, geniş spektrumlu antibiyotikler sınıfında yer alan ve adriyamisin olarak da bilinen DOX uzun yıllardan beri hematopoietik, lenfoblastik, solid tümörler gibi bir çok neoplastik hastalıkta sıkça kullanılan etkili bir ilaçtır (Edwardson ve ark 2015). DOX'un neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanımını sınırlayan en önemli sebep akut, kronik ve gecikmiş tip kardiyotoksisitedir (Monsuez ve ark 2010). Oldukça etkili bir kemoterapötik ilaç olmasına rağmen, kardiyotoksik etkisi DOX'un kullanım alanlarını ve dozunu kısıtlamaktadır. Kardiyotoksik etkisi üzerine birçok çalışma yapılmış ve yapılmaya devam edilmektedir. Literatür özeti bölümünde de sunulduğu üzere DOX'un birçok farklı doz uygulamalarında da bu hasar ortaya konulmuştur (Podyacheva ve ark 2021). DOX'un yan etkileri sebebiyle oluşan kalp hasarını azaltmak amacıyla birçok çalışma bulunurken (Xu ve ark 2008, Yalçın ve ark 2010, Xu ve ark 2012, Wu ve ark 2015, Yu ve ark 2020, Zhang ve ark 2023), farklı dozlarda ve sürelerde verilen DOX'un hücre ölüm mekanizmalarını inceleyen bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Sunulan çalışmada DOX-D (tek doz 3 mg/kg), DOX-Y (tek doz 12 mg/kg) ve DOX-K (24 saat arayla 4 doz 3 mg/kg/ DOX) gruplarında DOX uygulaması sonrası oluşacak kalp dokusu hasarının hem histopatolojik hem de moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlandı. Bu maksatla moleküler incelemelerde apoptozis için; kaspaz-3 ve Bcl-2, otofaji için Beclin-1, nekroz/nekroptoz için TNF- α , hücre yaşlanması için p21 ve endotel hasarı için eNOS'un RT-PCR ile moleküler ölçümleri yapıldı.

DOX birçok kemoterapötik ajan gibi, kullanıldığı canlıda kaşeksiye neden olmaktadır. DOX kullanılarak gerçekleştirilen birçok çalışmada kaşeksi görüldüğü bildirilmiştir (Panjrath ve ark 2007, Xiang ve ark 2009, Arunachalam ve ark 2012, Dahlgren ve ark 2022). DOX'un bu etkisinin insülin duyarlılığını azaltma, adipogenezde azalma, hiperglisemiye tetikleme, hücrelere glikoz alımında azalma, lipolizi inhibe etme gibi yollarla ortaya çıktığı bildirilmiştir (Biondo ve ark 2016). Hayvanların deneye başlamadan önceki ve deney sonunda ötenazilerinden hemen önceki ağırlıkları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında kontrol grubu ile DOX-D grubu arasında fark bulunmazken, kontrol grubu ile DOX-Y ve DOX-K grupları arasındaki fark anlamlı bulundu. DOX-Y grubu ile DOX-K grubu arasında da fark belirlendi ve en yüksek fark DOX-Y grubundan elde edildi. Sunulan çalışma literatür ile benzerdir. DOX-Y ve DOX-K gruplarının ilk ağırlıkları ile son ağırlıkları

arasındaki farkın diğer gruplara oranla daha yüksek olması özellikle tek seferde verilen yüksek doz DOX ve tekrarlayan dozlarda uygulanan DOX'un canlı ağırlık kaybını daha fazla etkilediğini ortaya koymaktadır. Kalplerin relatif ağırlıklarıyla yapılan istatistiksel değerlendirmede ise gruplar arası fark bulunamadı. Benzer şekilde Ivanová ve ark (2012) ratlarda üç hafta boyunca toplamda 7 defa uyguladıkları 2,15 mg/kg DOX sonrası ratların vücut ağırlıklarının kontrol grubuna oranla daha düşük olduğunu ancak kalplerin ağırlıklarının kontrol grubuna göre bir fark göstermediğini bildirmişlerdir. Alherz ve ark (2022) farelere tek doz 20 mg/kg DOX uyguladıkları çalışmada kalp ağırlığının azaldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada kalplerin ağırlıklarında fark görülmemesinin nedeninin DOX uygulaması sonrası beklenen süre ile ilişkili olduğu düşünüldü.

Histopatolojik olarak DOX'un kalpte kardiyomiyositlerde fragmentasyon, miyofibriler atrofi ve dejenerasyon, intersitisyel ödem ve fibrozis, sitoplazmik vakuolizasyon, kardiyomiyositlerde hipertrofi, sitomegali, atrofi, nekroz, apoptoz, nötrofilik ve lenfoplazmasitik inflamasyon, makrofaj ve fibroblast artışı gibi bulgulara neden olabileceği bildirilmiştir (Billingham 1984, de Leeuw ve ark 2001, Takemura ve Fujiwara 2007, Cove-Smith ve ark 2014, Kang ve ark 2017, Karabulut ve ark 2021, Podyacheva ve ark 2021).

Bu çalışmada histopatolojik olarak kardiyomiyositlerde dejenerasyon, vakuolizasyon, nekroz, miyokartta kanama ve fibrözis parametreleri değerlendirildi. Dejenerasyon açısından bakıldığında istatistiksel olarak fark bulunmamakla birlikte histopatolojik olarak kontrol grubunda dejenerasyon minimal derecede belirlenirken DOX-Y grubunda diğer gruplara göre daha yüksek seviyede dejenerasyon skorlaması elde edildi. DOX-Y grubundan sonra ise en yüksek değerler DOX-K grubunda belirlendi. DOX-Y grubunda dejenerasyonun diğer gruplara oranla daha yüksek çıkması tek seferde yüksek oranda DOX kullanımının kardiyomiyositlerde daha fazla dejenerasyona yol açabileceği sonucunu ortaya koymuştur. Tekrarlayan dozlarda DOX kullanımının ise tek seferde verilen yüksek doz kadar olmasa da yine dejenerasyonu önemli oranda arttırdığı görülmüştür. Bu da DOX'un birikici etkisiyle de kardiyomiyositlerde şiddetli dejenerasyona neden olabileceğini, özellikle de DOX'un metabolizasyonu sırasında meydana gelen DOXol'ün birikme eğilimi nedeniyle bu etkinin ortaya çıkabileceğini düşündürmüştür. Dejenerasyonun gruplardaki toplam

skorlarıyla yapılan istatistiksel incelemede kontrol grubu ile diğer gruplar arasında önemli fark görülürken DOX-D, DOX-Y ve DOX-K arasında fark bulunamadı. Sol ventrikül duvarları, interventriküler septumlar ve sağ ventrikül duvarları dejenerasyon yönünden incelendiğinde yine kontrol grubu diğer gruplardan farklıken DOX-D, DOX-Y ve DOX-K arasında fark bulunamadı. Bu durum DOX'un doza ve süreye bağlı olmaksızın kalpte dejenerasyona yol açtığını göstermiştir. DOX maruziyeti sonucu kardiyomiyositlerde dejenerasyonu bildiren birçok çalışma mevcuttur (Sussman ve ark 1997, Takemura ve Fujiwara 2007, Podyacheva ve ark 2021). Bulgularımız bu yönüyle literatüre benzerdir.

Kardiyomiyositlerde intrasitoplazmik vakuolizasyon değerlendirildiğinde kontrol grubunda lezyon tespit edilmedi. DOX-K grubundan elde edilen intrasitoplazmik vakuolizasyon skorlaması diğer gruplarla karşılaştırıldığında daha yüksekti. DOX-K grubundan sonra en yüksek değer DOX-Y grubunda tespit edildi. Toplam skorlar üzerinden yapılan istatistiksel incelemede kontrol grubu ve diğer gruplar arasında bariz fark olduğu görüldü. Gruplar arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede ise yine bütün gruplar arasında fark anlamlıydı ve en yüksek değerler DOX-K grubunda tespit edildi. Sol ventrikül duvarı ve interventriküler septum için intrasitoplazmik vakuolizasyonun istatistiksel değerlendirmesinde DOX-K ve DOX-Y arasında fark bulunmazken sağ ventrikül duvarı için yapılan incelemelerde bütün gruplar arasında fark mevcuttu. İntrasitoplazmik vakuolizasyon DOX toksisitesinde birçok defa bildirilmiştir (Gava ve ark 2013, Miller ve Gal 2017, Podyacheva ve ark 2021). DOX kaynaklı kardiyomiyositlerde meydana gelen intrasitoplazmik vakuolizasyonun aslında hücredeki sarkoplazmik retikulumun hidropik dejenerasyonu ile meydana geldiği belirtilmiştir (Miller ve Gal 2017). Yapılan çalışmada kontrol grubu hariç diğer grupların tamamında, derecesi farklı da olsa intrasitoplazmik vakuolizasyonun görülmesi literatür ile uyumlu bulunmuştur. Kardiyomiyositlerde intrasitoplazmik vakuolizasyonun DOX-K grubunda daha yüksek düzeyde görülmesi tekrarlayan dozlarda DOX maruziyetinin daha fazla intrasitoplazmik vakuolizasyona neden olduğunu göstermiştir. Ivanová ve ark (2012) üç hafta boyunca 7 defa 2,15 mg/kg kümülatif olarak DOX uyguladıkları çalışmada son DOX dozundan sonraki hem 4'üncü haftada hem de 8'inci haftada kardiyomiyositlerde intrasitoplazmik vakuolizasyon belirlemişlerdir. Medeiros-Lima ve ark (2019) 12 haftalık ratlara 10 gün boyunca 1 mg/kg DOX uygulamış ve ratları son dozdan sonraki 1'inci, 2'nci 3'üncü

ve 4'üncü haftalarda ötenazilerini gerçekleştirdikten sonra bütün gruplardaki ratların kardiyomiyositlerinde intrasitoplazmik vakuolizasyona rastladıklarını hatta 4'üncü haftadan sonra vakuolizasyonun daha belirgin hale geldiğini bildirmişlerdir. Lončar-Turukalo ve ark (2015) ratlara 6 doz olacak şekilde 2,5 mg/kg DOX uyguladıkları çalışmada son dozdan sonraki 35'inci günde ötenazi edilen ratların kardiyomiyositlerinde intrasitoplazmik vakuolizasyon varlığını bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalara göre intrasitoplazmik vakuolizasyonun özellikle tekrarlayan doz kullanımından sonra ortaya çıktığı anlaşılmaktadır. Sunulan çalışmada, çalışma gruplarının tamamında görülse de özellikle DOX-K grubunda daha fazla intrasitoplazmik vakuolizasyon görülmesi literatür ile uyumludur. Gerçekleştirilen çalışmalarda son DOX dozundan sonraki 4'üncü hafta, 35'inci gün gibi uzun sürelerde intrasitoplazmik vakuolizasyonun görüldüğü bildirilmiştir. Bu çalışmada son DOX enjeksiyonundan sonraki 7'nci günde intrasitoplazmik vakuolizasyonların görülmesi tedaviden sonraki kısa sürelerde de intrasitoplazmik vakuolizasyonların görülebildiğini ortaya konmuştur.

Kardiyomiyositlerde nekroz bulguları değerlendirildiğinde kontrol grubunda sadece iki hayvanda minimal değerler görülürken en yüksek değerler DOX-K grubundan elde edildi. Çalışmada hem kalp kasının enine kesitlerinde hem de uzunlamasına kesitlerinde kardiyomiyositlerde nekroz belirlendi. Toplam skorlar üzerinden gerçekleştirilen istatistiksel değerlendirmede kontrol grubu ile diğer gruplar arasında bariz fark dikkati çekti ve DOX-K'nın diğer gruplardan farklı olduğu görülürken DOX-D ve DOX-Y arasında fark belirlenmedi. Sol ventrikül duvarları için istatistiksel olarak nekroz değerlendirildiğinde, DOX-K grubu ve DOX-Y grubu arasında fark bulunmazken DOX-K, DOX-D ve Kontrol grubundan farklıydı. İnterventriküler septumlarda ve sağ ventrikül duvarlarında nekroz değerlendirildiğinde yine DOX-K grubu ile kontrol grubu ve diğer gruplar arasındaki fark belirgindi. DOX-Y ve DOX-D grupları arasında fark bulunmazken her iki grup ile kontrol grubu arasında fark mevcuttu. Farklı dozlarda ve sürelerde uygulanan DOX'un kardiyomiyositlerde şiddeti değişen derecelerde nekroza sebep olabileceği birçok çalışmada ortaya konmuştur (Podyacheva ve ark 2021). DOX, DNA hasarı, hücre içi Ca^{2+} artışı, mitokondriyal hasar nedeniyle ATP üretiminde azalma, DNA interkalasyonu ve DNA hasarı sonrası PARP-1 ve H2A histon ailesi üyesi X'i (H2AX) aktive ederek NAD ve glikolizisi, dolayısıyla ATP üretimini inhibe etmesi gibi

nedenlerle kardiyomiyositlerde nekroza ve nekroptoza sebep olur (Meredith ve Dass 2016). Sunulan çalışmada özellikle kümülatif doz uygulanan DOX-K grubunda histopatolojik olarak nekrozun diğer gruplara oranla daha fazla görülmesi Rharass ve ark (2016)'nın da bildirdiği gibi uzun süreli DOX kullanımının daha fazla nekroza neden olduğunu ortaya koymuştur.

Histopatolojik olarak kanamaya DOX-Y grubunda daha fazla rastlandı. Bunu DOX-D grubunun takip ettiği tespit edildi. İstatistiksel olarak toplam skorlar üzerinden kalpte kanama değerlendirildiğinde tüm deneme gruplarının kontrol grubundan farklı olduğu, DOX-Y grubunun da diğer deneme gruplarından farklı olduğu tespit edildi. DOX-D ve DOX-K grupları arasında ise fark bulunamadı. Sol ventrikül duvarları, interventriküler septumlar ve sağ ventrikül duvarları ayrı ayrı kanama yönünden istatistiksel olarak değerlendirildiğinde de benzer sonuçlar görüldü. DOX-Y grubunda kanama skorlarının daha yüksek çıkması tek seferde verilen yüksek doz DOX'un düşük doz DOX ve tekrarlayan dozlara nazaran daha şiddetli kanama oluşturduğunu düşündürmüştür. Benzer şekilde DOX'a bağlı kanamanın doz artışına paralel olarak arttığını bildiren çalışmalar mevcuttur (Cove-Smith ve ark 2014, Kamel ve ark 2017, Kuzu ve ark 2018, Shati ve ark 2024).

Gerçekleştirilen çalışmada bu parametreler dışında fibrozis, intersitisyel ödem, nötrofilik ve lenfoplazmasitik infiltrasyon, makrofaj infiltrasyonu gibi parametreler de değerlendirilmiştir. Histopatolojik olarak fibrozis değerlendirildiğinde Hematoksilen-Eozin ve Masson'un trikrom boyamalarında kontrol grubuyla birlikte hiçbir grupta fibroze rastlanmamıştır. Bu durum DOX'un maruziyet süresi ile ilişkilendirilmiştir. Kalpte fibrozisin genellikle 7'nci günden sonra ortaya çıktığı bildirilmiştir (Frangogiannis 2021). Çalışmada son DOX enjeksiyonundan sonra nekropsi yapılmasına kadar beklenen süre 168 saattir. Histopatolojik değerlendirmede özellikle DOX-K grubunda her ne kadar fibrosit ve fibroblast aktivasyonu olsa da, bağ doku oluşumunun meydana gelmesi için yeterli sürenin oluşmadığı düşünülmüştür. Nekropsi için beklenen 168 saat fibrozisin meydana gelmesi için yeterli bir süre olmadığı gibi akut bir reaksiyon olan intersitisyel ödemin görülebilmesi için de uzun bir süredir. Gruplardaki bazı hayvanlarda bireysel düzeyde intersitisyel ödeme rastlansa da grup bazında bir değişiklik görülmedi. Bunun yanı sıra yangı hücrelerinin infiltrasyonu bakımından çalışmamız değerlendirildiğinde özellikle perivasküler

alanlarda olmak üzere yer yer ve sınırlı düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonlarına rastlanmıştır.

Erkeklerde dişilere oranla daha fazla kardiyak hastalık görüldüğü daha önce bildirilmiştir (William Dec 2003, Thom ve ark 2006, Frisancho-Kiss ve ark 2007). Bunun nedeninin mast hücrelerinin yüzeyinde bulunan testosteron reseptörlerinin uyarılmasının, mast hücrelerinin ve makrofajların çoğalmasını arttırması, histamin salınımını hızlandırması ve proinflamatuvar sitokinlerin konsantrasyonlarını arttırması olduğu belirtilmiştir (Lu ve ark 2012). Bu çalışmanın yetişkin erkek ratlar üzerinde gerçekleştirilmesinin sebebi erkeklerde kalp hastalıkları ve bu hastalıkların şiddetinin daha fazla olmasıdır. Zhang ve ark (2014) cinsiyetin DOX kardiyotoksitesisi üzerindeki etkisini araştırmak için gerçekleştirdikleri çalışmada DOX maruziyetinden sonra erkek hayvanların kalp dokularında histopatolojik olarak mast hücresi sayısında artış ve mast hücrelerinde degranülasyon gözlediklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da kontrol grubundaki hayvanların kalplerinde bulunan mast hücrelerinde degranülasyona rastlanmazken özellikle DOX-Y ve DOX-K grubunda daha belirgin olmak üzere deneme gruplarında mast hücrelerinde degranülasyon ve sayıca artış gözlemlendi. Bu durumun kalp hasarında artışa ve yangısal sürecin ilerlemesine sebep olabileceği değerlendirildi.

Apoptozda anti-apoptotik genlerden biri olan Bcl-2, BAX ve BAK gibi pro-apoptotik genleri baskılayarak apoptozu önler (Hardwick ve Soane 2013). Yaptığımız çalışmada RT-PCR ile elde edilen sonuçlar, literatürde bahsedilen DOX maruziyeti sonrası Bcl-2 ekspresyon seviyelerinin düştüğünü bildiren çalışmalarla kısmen benzerlik göstermektedir. Her ne kadar istatistiksel olarak fark olmasa da yüksek doz DOX uygulanan DOX-Y grubunda Bcl-2 ekspresyon seviyeleri kontrol grubunun altına düşmüştür. Ancak DOX-D ve DOX-K gruplarında Bcl-2 ekspresyon seviyeleri kontrol grubunun üzerinde kalmıştır. Böyle bir farkın ortaya çıkmasında Bcl-2'nin sadece apoptozla ilişkili bir gen olmayıp, otofaji ve hücre yaşlanması gibi diğer biyokimyasal olaylarla da ilişkili olmasının etkisinin olduğu düşünülmüştür. Bcl-2 oranının en düşük olduğu DOX-Y grubunda Beclin-1 ve p21 oranının yüksek olması bu düşüncüyü güçlendirmektedir. Nitekim Jänicke ve ark (2007) ile Kim ve ark (2017), Bcl-2 ve p21 arasındaki etkileşimi ortaya koyarken, Pattingre ve ark (2005) ile Hsieh ve ark (2009) da Bcl-2 ve Beclin-1 arasındaki ilişkiyi göstermişlerdir. Aynı zamanda

çalışmamızda son DOX dozundan sonra nekropsilerin yapılmasına kadar beklenen süre boyunca özellikle DOX-D ve DOX-K grubunda Bcl-2 ekspresyonunun artmış olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda en düşük Bcl-2 ekspresyon seviyelerinin DOX-Y grubunda görülmesi, aynı zamanda en yüksek kaspaz-3 oranının da DOX-Y grubunda tespit edilmesi tek seferde verilen yüksek doz DOX'un kardiyomiyositlerde apoptoza neden olduğunu, Bcl-2'nin de bunu baskılamada yetersiz kaldığını ortaya koymuştur. Buradan hareketle yüksek doz DOX'un Bcl-2 ekspresyonunu baskılayarak apoptozu indüklemiş olabileceği değerlendirilmiştir.

CASP3 geni tarafından kodlanan ve CPP32 olarak da bilinen kaspaz-3, ekstrinsik apoptozun indüklenmesiyle kaspaz-8 tarafından, intrinsik apoptozun indüklenmesiyle kaspaz-9 tarafından aktif hale getirilen efektör kaspazlardan biridir (Eskandari ve Eaves 2022). DNA hasarı, mitokondri hasarı, hipoksi, ROS birikimi gibi sebeplerle başlatılabilen apoptozun belirteçlerinden olan kaspaz-3'ün çalışmamızda yer alan deneme gruplarında kontrol grubuna göre yüksek çıkması DOX uygulaması sonrası kaspaz-3 ekspresyonunun ve apoptozun arttığını ortaya koyan diğer çalışmalarla (Kalivendi ve ark 2001, Kim ve ark 2006, Gu ve ark 2016, Akolkar ve ark 2017, Zhao ve Zhang 2017) uyumludur. Yapılan çalışmada kaspaz-3 oranının DOX-Y grubunda daha yüksek seviyede olması ratlarda tek seferlik yüksek dozda uygulanan DOX'un apoptozu indükleyerek kardiyotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Rharass ve ark (2016) hücre kültürlerinde 2 µM DOX'un 2 saatlik ve 24 saatlik maruziyetleri sonucunda kısa süreli maruziyetlerde daha çok apoptozun, uzun süreli maruziyetlerde ise nekrozun indüklendiğini, bunun sebebinin uzun süreli maruziyetlerde DOX'un DNA'ya daha yüksek oranda bağlanması ve daha fazla DNA hasarına sebep olması, kısa süreli maruziyetlerde ise mitokondri hasarının ön planda olması olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda RT-PCR sonuçlarına göre tek doz DOX uygulanan DOX-Y ve DOX-D gruplarında kaspaz-3 oranlarının yüksek olması, 24 saat arayla 4 sefer DOX uygulanan DOX-K grubunda ise düşük kaspaz-3 ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi, Rharass ve ark (2016)'ın da belirttiği gibi tek doz DOX uygulanan gruplarda mitokondriyal hasarın, tekrarlayan dozlarda ise DNA hasarının geliştiğini düşündürmüştür.

Hücre içi organellerin ve makromoleküllerin iki veya daha fazla sayıda membranla çevrilerek veziküller haline getirilmesi ve bu veziküllerin lizozomla

birleşip enzimlerle sindirilmesi olarak tanımlanan otofaji hem hücrenin korunmasında hem de hücrenin ölümünde rol oynayabilen bir süreçtir (Deter ve De Duve 1967, Mizushima ve ark 2008, Li ve ark 2021). Hücrede otofajinin meydana gelebilmesi için bazı koşullar gereklidir. Bu koşullar arasında başta besin ve enerji yetersizliği olmak üzere ROS artışı, toksik ajanlar gibi hücreyi strese sokacak etkenler sayılabilir (He ve Klionsky 2009). Yapılan çalışma sonucu elde edilen verilere göre kontrole en yakın olmak üzere DOX-D grubunda en düşük, DOX-Y grubunda en yüksek Beclin-1 seviyeleri ölçüldü. DOX-Y grubunu DOX-K grubu takip etti.

Hücrede otofaji sırasında otofagozom oluşumunda temel rol üstlenen Beclin-1, otofajinin temel faktörüdür (He ve Klionsky 2009). Otofaji, ökaryotik hücrelerin organellerini ve uzun ömürlü proteinleri dönüştürdüğü, hücrel homeostazisin sağlandığı bir mekanizmadır. Normal kalp dokusunda azalan otofajik aktivitenin bazal kalp fonksiyonunu bozabileceği bildirilmiştir (Mizushima ve ark 2008). Ancak yüksek otofaji belirli koşullar altında kalp hasarına sebep olabilir. DOX yüksek miktarlarda uygulandığında mitokondri hasarı sebebiyle enerji açlığına ve bunun sonucunda otofajide artışa neden olabilir (Rabinovich-Nikitin ve ark 2023). Sunulan çalışmada DOX-Y grubunda Beclin-1 seviyelerinin yüksek çıkmış olması DOX'un mitokondriyal hasara sebep olması sonucu otofajinin indüklenmiş olduğu düşüncesini oluşturmuştur. Lu ve ark (2009), rat kalplerinden elde ettikleri kök hücreleri 24 saat boyunca 1 mg/L DOX'a maruz bıraktıktan sonra DOX'un mitokondriyal hasara bağlı olarak enerji yetersizliğine neden olduğunu bunun sonucunda da Beclin-1 ekspresyonunun artışıyla beraber otofajinin arttığını bildirmişlerdir. Kobayashi ve ark (2010), rat kalplerinden elde edilen hücre kültürlerine uyguladıkları 1 µM DOX'la beraber otofajik aktiviteyi rapamisin veya Beclin 1 ekspresyonu aracılığıyla indükleyerek DOX uygulaması sonrası meydana gelen otofajinin hücre ölümünü arttırdığını bildirmiş, otofajinin 3-Metiladenin (3-MA) veya Beclin 1 yıkımı ile inhibisyonunun, hücre ölümünü önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuşlardır. Chen ve ark (2011), rat kalbinden elde ettikleri hücre kültürlerine uyguladıkları 1 µM DOX sonucu DOX'un Atg5, Atg12 ve Bad ekspresyonunun artmasına, GATA4 ve Bcl2 ekspresyonunun ise azalmasına neden olarak otofajiyi indüklediğini, Bcl-2 seviyelerinin azalmasına bağlı olarak DOX'un otofaji yanında apoptozu da şiddetlendirdiğini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada Beclin-1 ekspresyon seviyelerinin yüksek olduğu DOX-Y grubunda aynı zamanda kaspaz-3 ekspresyon seviyelerinin yüksek olması, Bcl-2 ekspresyon seviyelerinin ise

diğer gruplardan düşük olması, Beclin-1'in DOX-Y grubunda Bcl-2'nin tükenmesine de neden olduğunu ve böylece apoptozu da şiddetlendirdiğini düşündürmüştür. Lu ve ark (2009), Dimitrakis ve ark (2012), Xu ve ark (2012), Ying-Yu ve ark (2015) ve Ludke ve ark (2017) farklı dozlarda ve sürelerde uyguladıkları DOX sonrası kardiyomiyositlerde otofajinin indüklendiğini bulmuşlardır. Bu çalışmada farklı doz ve sürelerde uygulanan DOX sonrası Beclin-1 ekspresyonunun tüm gruplarda kontrol grubundan daha yüksek çıkması DOX'un otofajiyi arttırdığını göstermiştir. Bu bulgular literatür ile benzerlik göstermektedir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde kontrol grubu ile DOX-Y ve DOX-K arasında fark bulunmuştur. Bu da sunulan çalışmada tek seferde verilen yüksek DOX dozunun ve tekrarlayan dozlarda uygulanan DOX'un tek seferde verilen düşük doz DOX'a göre otofajiyi daha çok arttırdığını göstermektedir.

DOX'un kalpte otofajiyi arttırdığını bildiren çalışmaların yanı sıra azalttığını belirten çalışmalar da mevcuttur (Kawaguchi ve ark 2012, Sishi ve ark 2013, Gu ve ark 2016, Cao ve ark 2017). Bu çalışmalarda DOX uygulaması sonrası otofajinin düştüğü, koruyucu/edici ajanlar yardımıyla otofajinin arttırıldığı ve DOX'a bağlı kardiyotoksisitenin azaltıldığı belirtilmiştir. Yapılan çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diğer grupların hepsinde Beclin-1 ekspresyon düzeylerine bakılarak otofajinin arttığı görülmektedir. Bu durum çalışmamızda uygulanan DOX dozlarının ve sürelerinin rat kalplerinde otofajiyi indüklediğini göstermiştir.

DOX'un genel olarak kardiyomiyositlerde otofajiyi artırarak kalp hasarına neden olduğunu ortaya koyan çalışmaların yanında DOX uygulamasından önce indüklenen otofajinin DOX toksisitesine karşı koruyucu etki gösterdiğini bildiren çalışmalar da mevcuttur. Bir çeşit iç saat olarak da bilinen sirkadiyen ritim memelilerde hipotalamustaki suprakiazmatik çekirdek tarafından kontrol edilen bir sistemdir (Bechtold ve Loudon 2013). 24 saatlik periyotlarda seyreden sirkadiyen döngünün insanlarda ve hayvanlarda gen ekspresyonlarını kontrol ederek bazı doku ve organları geçici olarak kontrol ettiği bildirilmiştir (Zhang ve ark 2014). Sirkadiyen döngüsü gereği bazı hayvanlar geceleri aktif gündüzleri ise dinlenme fazında (nocturnal) bulunurken insan gibi bazı canlılar da gündüzleri aktif geceleri ise dinlenme fazında (diurnal) bulunur (Cohen ve ark 2010). Bilindiği gibi rat, fare gibi bazı kemirgenler nocturnal memelilerdir (Silva ve ark 2023). Organizmada yenilenme

faaliyetlerinin dinlenme fazında gerçekleştiği bilinmektedir (Elkhenany ve ark 2018). Dinlenme fazında meydana gelen otofajik reaksiyonun aktif fazda uygulanan DOX'un toksisitesine karşı protektif etki gösterdiği bildirilmiştir (Rabinovich-Nikitin ve ark 2023). To ve ark (2003) DOX'un farelerin dinlenme fazında uygulandığında meydana getirdiği kardiyotoksitenin, aktif fazda uygulanmasında meydana getirdiği toksisiteden çok daha fazla olduğunu tespit etmiştir. Xu ve ark (2013) farelere üç gün arayla toplamda 20 mg/kg olacak şekilde 10 mg/kg IP DOX uygulamasından 7 gün önce ikişer gün arayla üç doz olmak üzere 6 mg/kg rapamisin uygulayarak otofajiyi indüklemişlerdir. Bunun sonucunda, DOX tedavisinden önce indüklenen otofajinin DOX kardiyotoksitesine karşı protektif etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada DOX uygulamaları gündüz saatlerinde (12.00-13.00 arası), ratların dinlenme fazlarında uygulanmıştır. Elde edilen veriler bu yönüyle literatür ile benzerdir. Bu sonuçlara dayanarak DOX'un uygulanacağı canlının sirkadyen ritmine göre, dinlenme fazında aktive olan otofajinin aktif fazda uygulanan DOX toksisitesine karşı koruyucu etki göstereceği göz önünde bulundurularak DOX'un aktif fazda uygulanmasının daha uygun olacağı önerilebilir.

TNF- α , organizmada inflamasyon, doku hasarı gibi olaylarda makrofajlar, mast hücreleri, monositler, fibroblastlar gibi birçok hücre tarafından sentezlenen bir akut faz sitokindir (Idriss ve Naismith 2000). Düşük dozlarda sentezlendiğinde organizmadaki immün sistemi aktive ederken yüksek dozlarda ve uzun süreli salınımı doku hasarına ve şiddetli inflamasyona neden olabilir (Idriss ve Naismith 2000). TNF- α 'ya sürekli maruziyetin kalp üzerinde miyokardiyal kontraksiyon inhibisyonu gibi ciddi etkileri ortaya çıkarabileceği bildirilmiştir (Hanna ve Frangogiannis 2020). Yüksek TNF- α ekspresyonunun kalpte dilatasyona neden olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (Kubota ve ark 1997, Bryant ve ark 1998, Janczewski ve ark 2003). Kalpte TNF- α 'nın yüksek ekspresyonu sonucu Ca^{2+} homeostazisi bozularak nekroza, nekroptoza ve apoptoza neden olabilir (Haudek ve ark 2007, Hafez ve Hassanein 2022). DOX'un kalpte neden olduğu oksidatif stres, özellikle TNF- α , NF- κ B gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu artırır (Hafez ve Hassanein 2022). Bu çalışmada RT-PCR sonuçlarına göre, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kalan grupların tamamında TNF- α ekspresyon seviyelerinin artmış olduğu görüldü. Özellikle DOX-K grubunda eksprese edilen TNF- α seviyesi diğer gruplara oranla oldukça yüksekti. Bunun sebebinin tekrarlayan dozlarda DOX kullanımına bağlı uzun

sürekli TNF- α ekspresyonunun olduğu düşünöldü. DOX-K grubundan sonra ek yüksek seviyede TNF- α ekspresyonu DOX-Y grubunda ölçöldü. İstatistiksel olarak değeriendirildiğinde kontrol grubu ile diğeri gruplar arasında fark bulundu. Gruplar arası değeriendirmede DOX-K grubu, diğeri grupların tamamından farklıyken DOX-D grubu ve DOX-Y grubu arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Hafez ve Hassanein (2022), Ibrahim Fouad ve Ahmed (2022) ve Zha ve ark (2023) farklı doz ve sürelerde uyguladıkları DOX sonucu yüksek oranda TNF- α ekspresyonunun meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Gerçekleştirilen çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diğeri grupların tamamında TNF- α seviyelerinin yüksek çıkmış olması literatür ile benzerlik göstermektedir.

TNF- α 'nın apoptozu indükleyebileceği belirtilmiştir (Hafez ve Hassanein 2022). Ortak noktaları olsa da nekroz ve apoptozdan farklı bir hücre ölüm şekli olan nekroptoz, kaspaz inhibisyonu yoluyla apoptozun engellenmesi sonucu TNF ile indüklenabilen programlı hücre ölümü olarak tanımlanmıştır (Vercammen ve ark 1998). Nekroptozun TNF- α , FasL gibi ölüm reseptörleri aracılığı ile başlatılabileceği bildirilmiştir (Degterev ve ark 2005, Pasparakis ve Vandenabeele 2015). Aynı reseptörler kaspaz-8 aracılığı ile ekstrinsik apoptozu da indüklerler. Kaspaz-8'in, nekroptoz mekanizmasında gerekli olan RIPK1 ve RIPK3 proteinlerini inhibe ederek nekroptozu önlediği, kaspaz-8 inhibe edildiğinde ise RIPK1 ve RIPK3'nin aktive edilerek nekroptozun indüklendiği bildirilmiştir (Han ve ark 2021). Shipra ve ark (2023), Zhang ve ark (2023) ve Yu ve ark (2020) farelere farklı doz ve sürelerde uyguladıkları DOX sonucu kardiyomiyositlerde nekroptozun arttığını ortaya koymuşlardır. Sunulan çalışmada, elde edilen RT-PCR sonuçlarına göre TNF- α ekspresyon seviyesinin en yüksek olduğu DOX-K grubunda kaspaz-3 ekspresyon seviyelerinin kontrol grubundan sonra en düşük seviyede olması TNF- α 'nın tekrarlayan DOX maruziyeti sonrası apoptozu değil, nekroz/nekroptozu indüklediğini düşündürmüştür.

TNF- α 'nın DOX maruziyeti sonrası arttığını bildiren çalışmaların yanında azaldığını bildiren bir çalışma da mevcuttur (Xu ve ark 2008). Ancak bu çalışmada RT-PCR sonuçlarına göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm deneme gruplarında TNF- α seviyeleri yüksek çıkmıştır.

Sikline bağımlı kinazların aktivitesini inhibe ederek hücre siklusunu durduran ve Sikline bağımlı kinaz inhibitörü-1 olarak da bilinen p21, özellikle DNA hasarının mevcut olduğu ve hücre toksisitesinin bulunduğu durumlarda hücre bölünmesini G1-, G2- veya S fazlarında duraklatan bir proteindir (Radhakrishnan ve ark 2004, Dutto ve ark 2015). p21'in hücre içindeki lokalizasyonu oldukça önem arz etmektedir. Çekirdekte bulunduğu hücre döngüsünü duraklatma yönünde fonksiyon gösterirken, sitoplazmada lokalize olduğunda apoptozu inhibe edebilir ve hücre hasarlı olsa bile çoğalmasını kolaylaştırabilir (Cazzalini ve ark 2010, Cmielová ve Rezáčová 2011). p21'in hücre siklusunu geçici duraklatmanın yanında kalıcı olarak da duraklatarak hücre yaşlanmasına neden olabileceği bildirilmiştir (Herbig ve Sedivy 2006, Romanov ve ark 2012). Yine p21'in, TNF reseptörlerinin aktivasyonu aracılığıyla ekstrinsik apoptozu, pro-apoptotik gen BAX'ı yukarı regülasyonu ile de intrinsik apoptozu indükleyebileceği belirtilmiştir (Gartel ve Tyner 2002). DOX hücrede ROS birikimiyle beraber DNA'ya da hasar verir. Genel kanı olarak kardiyomiyositlerin çoğalmadığı bilinse de kalbin bazı hastalıklarında yüksek p21 ekspresyon seviyeleri görülmüştür (Kuhn ve ark 2007). Çalışmamızda RT-PCR sonuçlarına dayanarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek p21 ekspresyon seviyelerinin DOX-Y grubunda olduğu görülmüştür. Bu durum tek seferde verilen yüksek doz DOX'un daha fazla DNA hasarına neden olduğunu düşündürmüştür.

Terrand ve ark (2011) farelerde 5 hafta boyunca haftada iki kez 4 mg/kg DOX uygulanan çalışmada DOX'un kardiyomiyositlerde p21 ekspresyon seviyelerinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Huang ve ark (2021) iki hafta boyunca 2,5 mg/kg DOX uygulanan farelerin kardiyomiyositlerinde p21 ekspresyonunun önemli ölçüde artmış olduğunu ortaya koymuşlardır. Yapılan çalışmada p21 ekspresyonunun tüm deneme gruplarında artması literatür ile uyumludur. RT-PCR sonuçlarına göre p21 ekspresyon seviyeleri en yüksek olan DOX-Y grubunda DNA ve hücre hasarının daha fazla olduğu değerlendirilmiştir. Yine kaspaz-3 ve Beclin-1 ekspresyon seviyelerinin de DOX-Y grubunda yüksek olması, meydana gelen hücre hasarının hem apoptoz hem de otofaji ile giderilmeye çalışıldığını göstermiştir. DOX-K grubunda ise p21 seviyelerinin neredeyse DOX-D kadar olması, ancak DOX-K grubunda düşük kaspaz-3 ekspresyon seviyelerinin görülmesi, DOX-K grubunda p21'in sitoplazmada konumlanmış olabileceğini ve bu durumda apoptozu baskıladığını düşündürmüştür.

Nitrik oksit sentazlar (NOS) ailesi altında bulunan eNOS, kan damarlarının endotelial tabakası başta olmak üzere kardiyomiyositler, böbrek tübüler hücreleri gibi birçok hücreden eksprese edilmektedir (Furchgott ve Zawadzki 1980, Wang ve ark 2020). Kan basıncını düzenlemenin yanı sıra lökosit adezyonu ve trombosit agregasyonunun baskılanması gibi fonksiyonlardan sorumlu olan eNOS'un eksikliğinde endotel disfonksiyon, pulmoner ve sistemik hipertansiyon gibi patolojik durumların ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (Gielis ve ark 2011). eNOS'tan kaynaklı NO, hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun azalması, damar düz kas tabakasının gevşemesi, kan basıncının azaltılması gibi fonksiyonlara aracılık eder (Gielis ve ark 2011). DOX'un metabolitlerinden olan semikinonların oluşumunun bir mekanizmasının da, DOX'un eNOS redüktaz enzimine bağlanması sonucu meydana geldiği bildirilmiştir (Edwardson ve ark 2015). Semikinon oluşumu sonrası hücrede yüksek miktardaki ROS artışı ortaya çıkar (Edwardson ve ark 2015). Bunun yanı sıra DOX, eNOS redüktaz enzimine bağlandığında sadece semikinon oluşumu değil aynı zamanda süperoksit serbest radikalleri ve nitrik oksit seviyelerinde dengesizlik de açığa çıkar. NO düzeyindeki azalma sonucu da kardiyotoksitenin ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (Rawat ve ark 2021). He ve ark (2019), Huang ve ark (2021) ve Munir ve ark (2023) ratlarda ve farelerde farklı doz ve sürelerde kullandıkları DOX sonrası kardiyomiyositlerde eNOS ekspresyon seviyelerinin düştüğünü ve eNOS'un DOX toksisitesine bağlı meydana gelen toksisiteyi azalttığını bulmuşlardır. Gerçekleştirilen çalışmada elde edilen RT-PCR sonuçlarına göre kontrol grubuyla karşılaştırıldığında diğer grupların tamamında eNOS ekspresyon oranının düştüğü tespit edilmiştir. Bu haliyle çalışmamız literatürle uyumlu bulunmuştur. eNOS ekspresyonunun özellikle DOX-K grubunda en düşük seviyede olması tekrarlayan dozlarda, eNOS ekspresyonunun daha fazla etkilendiğini ortaya koymuştur.

Bu çalışmada RT-PCR ile ancak bazı hücre ölüm mekanizmalarına bakılabilmektedir. Bu hücre ölüm mekanizmalarının dışında kalan bazı hücre ölüm şekillerinin de uygulanan DOX tedavisi sonrası meydana gelmiş olabileceğini öngörmekteyiz. DOX'un apoptoz, otofaji gibi ölüm mekanizmalarının yanı sıra; hücre içinde Fe-DOX kompleksi oluşturarak ROS oluşumuna neden olduğu ve mitokondrilerde demir birikimine bağlı olarak ferroptozu yol açtığı bilinmektedir (Dixon ve ark 2012). Çalışmamızda her ne kadar TNF- α aracılı nekroptoz değerlendirilmeye çalışılsa da nekroptozda temel işlev gören RIPK1 ve RIPK3

ekspresyon düzeylerine bakılamamıştır. DOX maruziyeti sonrası meydana gelen intrasitoplazmik vakuolizasyonların, programlı hücre ölüm yollarından paraptoz ve metuozezin de karakteristik bulguları olması, sunulan çalışmadaki bu bulgularınparaptoz ve/veya metuozeze sonucu da meydana gelebileceği düşüncesini doğurmuştur. Ancak literatür incelendiğinde DOX ve paraptoze ile DOX ve metuozeze arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalara rastlanılmamıştır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada istatistiksel olarak fark bulunmasa da en şiddetli dejenerasyon bulguları DOX-Y grubunda görülürken kontrol grubu dışında kalan gruplarda en hafif lezyonlar DOX-D grubunda gözlenmiştir. İntrasitoplazmik vakuolizasyon değerlendirildiğinde en şiddetli lezyonlar DOX-K ve DOX-Y grubunda belirlenmiştir. En düşük istatistiksel değerler ise kontrol grubundan sonra DOX-D grubunda kaydedilmiştir. Histopatolojik olarak nekroz değerlendirildiğinde yine en şiddetli bulgular DOX-K grubunda, en hafif lezyonlar ise kontrol grubundan sonra yine DOX-D grubunda kaydedilmiştir. Kanama değerlendirildiğinde en şiddetli kanama bulguları DOX-Y grubunda kaydedilirken en hafif kanama bulguları ise kontrol grubundan sonra DOX-K grubunda tespit edildi.

Sunulan çalışmada en düşük Bcl-2 ekspresyon seviyesi DOX-Y grubunda, en yüksek kaspaz-3 ekspresyon seviyesi DOX-Y grubunda, en yüksek TNF- α ekspresyonu DOX-K grubunda, en yüksek p21 ekspresyonu DOX-Y grubunda, en yüksek Beclin-1 ekspresyon seviyesi DOX-Y grubunda en düşük eNOS ekspresyonu ise DOX-K grubunda kaydedildi.

Yapılan çalışma sonucu DOX'un neden olduğu kardiyotoksitenin çok yönlü olduğu, meydana gelen hasarın şiddeti farklı olsa da doz ve süreden bağımsız olarak DOX'un aynı anda apoptoz, otofaji, nekroz/nekroptoz, hücre yaşlanması ve endodotel hasarına sebep olabileceği sonucuna varılmıştır.

İnsan ve hayvanlardaki kanserlerde sıklıkla kullanılan DOX'un birçok kanserin tedavisinde güvenle kullanılmasının önünde engel olarak görülen kardiyotoksitenin mekanizmaları daha iyi anlaşıldığında, bu mekanizmaların baskılanması ve/veya engellenmesi ile DOX'un daha etkin kullanımının önü açılabilir. Bu sebeple DOX'un neden olduğu kardiyotoksitenin hücresel düzeyde etkileri ve bu etkilerin sebepleri daha iyi araştırılmalı, meydana gelen kardiyotoksitenin hafifletilmesi veya ortadan kaldırılması için yöntemler geliştirilmeye çalışılmalıdır. Sunulan çalışmada DOX-D grubunda diğer gruplara oranla daha az histopatolojik lezyonun görülmesi tek seferde verilen düşük doz DOX'un tek seferde uygulanan yüksek doz DOX ve kümülatif dozlarda uygulanan DOX'a göre daha güvenli olduğunu göstermiştir. Ancak tek seferlik düşük doz uygulamasının tedavideki etkinliği tartışılabilir. Çalışmada tek seferde uygulanan yüksek doz DOX sonucu kalpte hem histopatolojik düzeyde hem

de moleküler düzeyde ciddi hasarın meydana gelebileceği görülmüştür. Bu sebeple mümkün olduğunca tek seferde yüksek doz DOX uygulamasından kaçılması kanaatine varılmıştır. Yine çalışmada tekrarlayan dozlarda uygulanan DOX sonucu tek seferde uygulanan yüksek doz DOX etkisi kadar olmasa da histopatolojik ve moleküler düzeyde kardiyomiyosit hasarı ortaya çıkmıştır.

Bu çalışmada farklı doz ve sürelerde uygulanan DOX kardiyotoksitesine bağlı meydana gelen ve moleküler düzeyde bakılan apoptoz, otofaji, nekroz/nekroptoz, endotel hasarı gibi mekanizmaların yanı sıra başta nekroptoz ve ferroptoz olmak üzere diğer hücre ölüm yolları da daha iyi araştırılmalıdır. Özellikle hücre sitoplazmasında vakuolizasyonlar ile karakterize olan paraptosis ve metuoysisin, DOX maruziyeti sonrası kardiyomiyositlerde görülen intrasitoplazmik vakuolizasyonların sebebi olabileceği düşünülmüştür ancak bu yönde yapılan çalışmalara rastlanılmamıştır. Bu nedenle DOX kardiyotoksitesinin paraptosis ve metuoysis yönünden de değerlendirilmesi önerilmektedir. Ayrıca çalışmada farklı sürelerde ve dozlarda uygulanan DOX'un hem histopatolojik olarak hem de moleküler olarak ortaya konulan hasar mekanizmalarının, bundan sonraki çalışmalarda kanser modelleri üzerinde ve koruyucu ajanlarla birlikte kullanılarak yeniden değerlendirilmesi ve özellikle veteriner hekimliğinde en uygun DOX uygulama yönteminin belirlenmeye çalışılması önerilir.

6. KAYNAKLAR

- Abdel-Daim MM, Kilany OE, Khalifa HA, Ahmed AAM, 2017. Allicin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Cancer Chemother Pharmacol*, 80, 4, 745-53.
- Ahmad S, Panda BP, Kohli K, Fahim M, Dubey K, 2017. Folic acid ameliorates celecoxib cardiotoxicity in a doxorubicin heart failure rat model. *Pharm Biol*, 55, 1, 1295-303.
- Akolkar G, da Silva Dias D, Ayyappan P, Bagchi AK, Jassal DS, Salemi VMC, Irigoyen MC, De Angelis K, Singal PK, 2017. Vitamin C mitigates oxidative/nitrosative stress and inflammation in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 313, 4, H795-h809.
- Alherz FA, El-Masry TA, Negm WA, El-Kadem AH, 2022. Potential cardioprotective effects of Amentoflavone in doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 154, 113643.
- Allen TC, Cagle PT, Popper HH, 2008. Basic concepts of molecular pathology. *Arch Pathol Lab Med*, 132, 10, 1551-6.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J, 1996. Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell*, 87, 2, 171.
- Amarante-Mendes GP, Adjemian S, Branco LM, Zanetti LC, Weinlich R, Bortoluci KR, 2018. Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Front Immunol*, 9, 2379.
- Arunachalam S, Kim S-Y, Kim M-S, Yi H-K, Yun B-S, Lee D-Y, Hwang P-H, 2012. Adriamycin inhibits adipogenesis through the modulation of PPAR γ and restoration of adriamycin-mediated inhibition of adipogenesis by PPAR γ over-expression. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 22, 7, 540-6.
- Bachur NR, 1979. Anthracycline antibiotic pharmacology and metabolism. *Cancer Treat Rep*, 63, 5, 817-20.
- Baehrecke EH, 2005. Autophagy: dual roles in life and death? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 6, 505-10.
- Bains OS, Grigliatti TA, Reid RE, Riggs KW, 2010. Naturally occurring variants of human aldo-keto reductases with reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin. *J Pharmacol Exp Ther*, 335, 3, 533-45.
- Bechtold DA, Loudon ASI, 2013. Hypothalamic clocks and rhythms in feeding behaviour. *Trends in Neurosciences*, 36, 2, 74-82.
- Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT, 2009. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*, 7, 2, 99-109.
- Bernardi P, Gerle C, Halestrap AP, Jonas EA, Karch J, Mnatsakanyan N, Pavlov E, Sheu S-S, Soukas AA, 2023. Identity, structure, and function of the mitochondrial permeability transition pore: controversies, consensus, recent advances, and future directions. *Cell Death & Differentiation*, 30, 8, 1869-85.
- Billingham M, (1984). Evaluation of anthracycline cardiotoxicity: predictive ability and functional correlation of endomyocardial biopsy. *Cancer Treat Symp.* **3**: 71-6.
- Biondo LA, Lima Junior EA, Souza CO, Cruz MM, Cunha RD, Alonso-Vale MI, Oyama LM, Nascimento CM, Pimentel GD, Dos Santos RV, Lira FS, Rosa Neto JC, 2016. Impact of Doxorubicin Treatment on the Physiological Functions of White Adipose Tissue. *PLoS One*, 11, 3, e0151548.
- Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T, 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, 171, 4, 603-14.
- Brenner D, Blaser H, Mak TW, 2015. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nature Reviews Immunology*, 15, 6, 362-74.

- Broekemeier KM, Carpenter-Deyo L, Reed DJ, Pfeiffer DR, 1992. Cyclosporin A protects hepatocytes subjected to high Ca²⁺ and oxidative stress. *FEBS Lett*, 304, 2-3, 192-4.
- Broekemeier KM, Pfeiffer DR, 1989. Cyclosporin A-sensitive and insensitive mechanisms produce the permeability transition in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 163, 1, 561-6.
- Brugarolas J, Moberg K, Boyd SD, Taya Y, Jacks T, Lees JA, 1999. Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after gamma-irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 3, 1002-7.
- Bryant D, Becker L, Richardson J, Shelton J, Franco F, Peshock R, Thompson M, Giroir B, 1998. Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation*, 97, 14, 1375-81.
- Buhl R. A review of structural features of the equine athletes heart: is a large heart an advantage for racing success. *AAEP PROCEEDINGS*, 6-10.
- Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, Chiang HC, Choksi S, Liu J, Ward Y, Wu LG, Liu ZG, 2014. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol*, 16, 1, 55-65.
- Cao Y, Shen T, Huang X, Lin Y, Chen B, Pang J, Li G, Wang Q, Zohrabian S, Duan C, Ruan Y, Man Y, Wang S, Li J, 2017. Astragalus polysaccharide restores autophagic flux and improves cardiomyocyte function in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncotarget*, 8, 3, 4837-48.
- Cappetta D, De Angelis A, Sapio L, Prezioso L, Illiano M, Quaini F, Rossi F, Berrino L, Naviglio S, Urbanek K, 2017. Oxidative Stress and Cellular Response to Doxorubicin: A Common Factor in the Complex Milieu of Anthracycline Cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 1521020.
- Cappetta D, Rossi F, Piegari E, Quaini F, Berrino L, Urbanek K, De Angelis A, 2018. Doxorubicin targets multiple players: A new view of an old problem. *Pharmacological Research*, 127, 4-14.
- Carswell E, Old LJ, Kassel R, Green S, Fiore N, Williamson B, 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72, 9, 3666-70.
- Cazzalini O, Scovassi AI, Savio M, Stivala LA, Prosperi E, 2010. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response. *Mutat Res*, 704, 1-3, 12-20.
- Cervantes J, Nagata T, Uchijima M, Shibata K, Koide Y, 2008. Intracytosolic *Listeria monocytogenes* induces cell death through caspase-1 activation in murine macrophages. *Cell Microbiol*, 10, 1, 41-52.
- Chan FK, Luz NF, Moriwaki K, 2015. Programmed necrosis in the cross talk of cell death and inflammation. *Annu Rev Immunol*, 33, 79-106.
- Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS, 2010. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*, 115, 2, 155-62.
- Chen K, Xu X, Kobayashi S, Timm D, Jepperson T, Liang Q, 2011. Caloric Restriction Mimetic 2-Deoxyglucose Antagonizes Doxorubicin-induced Cardiomyocyte Death by Multiple Mechanisms*. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 25, 21993-2006.
- Chen X, Li W, Ren J, Huang D, He WT, Song Y, Yang C, Li W, Zheng X, Chen P, Han J, 2014. Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Res*, 24, 1, 105-21.
- Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, Leeuwenburgh C, 2002. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Res*, 62, 16, 4592-8.
- Christofferson DE, Li Y, Yuan J, 2014. Control of Life-or-Death Decisions by RIP1 Kinase. *Annual Review of Physiology*, 76, 1, 129-50.

- Ciesielski HM, Nishida H, Takano T, Fukuhara A, Otani T, Ikegawa Y, Okada M, Nishimura T, Furuse M, Yoo SK, 2022. Erebosis, a new cell death mechanism during homeostatic turnover of gut enterocytes. *PLoS Biol*, 20, 4, e3001586.
- Clarke PG, Clarke S, 1996. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol (Berl)*, 193, 2, 81-99.
- Cmielová J, Rezáčová M, 2011. p21Cip1/Waf1 protein and its function based on a subcellular localization [corrected]. *J Cell Biochem*, 112, 12, 3502-6.
- Cohen GM, 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 326 (Pt 1), Pt 1, 1-16.
- Cohen R, Kronfeld-Schor N, Ramanathan C, Baumgras A, Smale L, 2010. The substructure of the suprachiasmatic nucleus: Similarities between nocturnal and diurnal spiny mice. *Brain Behav Evol*, 75, 1, 9-22.
- Coley WB, 1893. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: With a report of ten original cases. 1. *The American Journal of the Medical Sciences (1827-1924)*, 105, 6, 487.
- Conrad M, Sato H, 2012. The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system x (c) (-) : cystine supplier and beyond. *Amino Acids*, 42, 1, 231-46.
- Cookson BT, Brennan MA, 2001. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends in microbiology*, 9, 3, 113-4.
- Coşkun G, Özgür, H., 2011. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20, 3, 145-58.
- Cotter S, Kanki P, Simon M, 1985. Renal disease in five tumor-bearing cats treated with Adriamycin. *The Journal of the American Animal Hospital Association (USA)*.
- Cove-Smith L, Woodhouse N, Hargreaves A, Kirk J, Smith S, Price SA, Galvin M, Betts CJ, Brocklehurst S, Backen A, Radford J, Linton K, Roberts RA, Schmitt M, Dive C, Tugwood JD, Hockings PD, Mellor HR, 2014. An Integrated Characterization of Serological, Pathological, and Functional Events in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Toxicological Sciences*, 140, 1, 3-15.
- Crompton M, 2003. On the involvement of mitochondrial intermembrane junctional complexes in apoptosis. *Curr Med Chem*, 10, 16, 1473-84.
- Cuervo AM, 2004. Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem*, 263, 1-2, 55-72.
- D'Arcy MS, 2019. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43, 6, 582-92.
- Dahlgren D, Rosenqvist E, Hellström PM, Nygren P, Kullenberg F, Peters K, Sjöblom M, Lennernäs H, 2022. Evaluation and validation of chemotherapy-specific diarrhoea and histopathology in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 131, 6, 536-46.
- Danial NN, Korsmeyer SJ, 2004. Cell Death: Critical Control Points. *Cell*, 116, 2, 205-19.
- David KK, Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL, 2009. Parthanatos, a messenger of death. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14, 3, 1116-28.
- Davies KJ, Doroshov JH, 1986. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *J Biol Chem*, 261, 7, 3060-7.
- De Giorgi F, Lartigue L, Bauer MK, Schubert A, Grimm S, Hanson GT, Remington SJ, Youle RJ, Icha F, 2002. The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *Faseb j*, 16, 6, 607-9.
- de Leeuw N, Ruiter DJ, Balk AH, de Jonge N, Melchers WJ, Galama JM, 2001. Histopathologic findings in explanted heart tissue from patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy. *Transpl Int*, 14, 5, 299-306.
- De Miglio MR, Muroni MR, Simile MM, Calvisi DF, Tolu P, Deiana L, Carru A, Bonelli G, Feo F, Pascale RM, 2000. Implication of Bcl-2 family genes in basal and D-amphetamine-induced apoptosis in preneoplastic and neoplastic rat liver lesions. *Hepatology*, 31, 4, 956-65.

- Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J, 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*, 1, 2, 112-9.
- Degterev A, Zhou W, Maki JL, Yuan J, 2014. Chapter One - Assays for Necroptosis and Activity of RIP Kinases. In: *Methods in Enzymology*. Eds: Ashkenazi A, Wells JA, Yuan J: Academic Press, p. 1-33.
- Deter RL, De Duve C, 1967. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol*, 33, 2, 437-49.
- Dhingra R, Margulets V, Chowdhury SR, Thliveris J, Jassal D, Fernyhough P, Dorn GW, 2nd, Kirshenbaum LA, 2014. Bnip3 mediates doxorubicin-induced cardiac myocyte necrosis and mortality through changes in mitochondrial signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 51, E5537-44.
- Dimitrakis P, Romay-Ogando M-I, Timolati F, Suter TM, Zuppinger C, 2012. Effects of doxorubicin cancer therapy on autophagy and the ubiquitin-proteasome system in long-term cultured adult rat cardiomyocytes. *Cell and Tissue Research*, 350, 2, 361-72.
- Ding H, Aljofan M, Triggle CR, 2007. Oxidative stress and increased eNOS and NADPH oxidase expression in mouse microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol*, 212, 3, 682-9.
- Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B, 3rd, Stockwell BR, 2012. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149, 5, 1060-72.
- Dolma S, Lessnick SL, Hahn WC, Stockwell BR, 2003. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell*, 3, 3, 285-96.
- Dondelinger Y, Declercq W, Montessuit S, Roelandt R, Goncalves A, Bruggeman I, Hulpiau P, Weber K, Sehon CA, Marquis RW, Bertin J, Gough PJ, Savvides S, Martinou JC, Bertrand MJ, Vandenabeele P, 2014. MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates. *Cell Rep*, 7, 4, 971-81.
- Dorn GW, 2nd, 2009. Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling. *Cardiovasc Res*, 81, 3, 465-73.
- Dutto I, Tillhon M, Cazzalini O, Stivala LA, Prosperi E, 2015. Biology of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A: molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Archives of Toxicology*, 89, 2, 155-78.
- Edwardson DW, Narendrula R, Chewchuk S, Mispel-Beyer K, Mapletoft JP, Parissenti AM, 2015. Role of Drug Metabolism in the Cytotoxicity and Clinical Efficacy of Anthracyclines. *Curr Drug Metab*, 16, 6, 412-26.
- el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietsenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, et al., 1994. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res*, 54, 5, 1169-74.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B, 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75, 4, 817-25.
- El-Demerdash FM, El-Magd MA, El-Sayed RA, 2021. Panax ginseng modulates oxidative stress, DNA damage, apoptosis, and inflammations induced by silicon dioxide nanoparticles in rats. *Environ Toxicol*, 36, 7, 1362-74.
- Elkhenany H, AIOkda A, El-Badawy A, El-Badri N, 2018. Tissue regeneration: Impact of sleep on stem cell regenerative capacity. *Life Sciences*, 214, 51-61.
- Elmore S, 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 4, 495-516.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S, 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391, 6662, 43-50.

- Eskandari E, Eaves CJ, 2022. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *J Cell Biol*, 221, 6.
- Evans MJ, Eckert A, Lai K, Adelman SJ, Harnish DC, 2001. Reciprocal antagonism between estrogen receptor and NF-kappaB activity in vivo. *Circ Res*, 89, 9, 823-30.
- Feldman DB, Seely JC, 1988. *Necropsy Guide: Rodents and the Rabbit*, Taylor & Francis, p.
- Feoktistova M, Leverkus M, 2015. Programmed necrosis and necroptosis signalling. *The FEBS Journal*, 282, 1, 19-31.
- Fleming I, Bauersachs J, Fisslthaler B, Busse R, 1998. Ca²⁺-Independent Activation of the Endothelial Nitric Oxide Synthase in Response to Tyrosine Phosphatase Inhibitors and Fluid Shear Stress. *Circulation Research*, 82, 6, 686-95.
- Frangogiannis NG, 2021. Cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res*, 117, 6, 1450-88.
- Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, Spengler RN, Smith CW, Entman ML, 1998. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation*, 98, 7, 699-710.
- Frisancho-Kiss S, Davis SE, Nyland JF, Frisancho JA, Cihakova D, Barrett MA, Rose NR, Fairweather D, 2007. Cutting Edge: Cross-Regulation by TLR4 and T cell Ig Mucin-3 Determines Sex Differences in Inflammatory Heart Disease¹. *The Journal of Immunology*, 178, 11, 6710-4.
- Fuchs Y, Steller H, 2011. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 147, 4, 742-58.
- Furchgott RF, Zawadzki JV, 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, 5789, 373-6.
- Furlong IJ, Ascaso R, Lopez Rivas A, Collins MK, 1997. Intracellular acidification induces apoptosis by stimulating ICE-like protease activity. *J Cell Sci*, 110 (Pt 5), 653-61.
- Fuzimoto A, Isidoro C, Vidoni C, Ferraresi A, 2021. Targeting autophagy with natural products to prevent SARS-CoV-2 infection. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 12.
- Galluzzi L, Pedro B-S, Vitale I, Aaronson S, Abrams J, Adam D, Alnemri E, Altucci L, Andrews D, Annicchiarico-Petruzzelli M, 2015. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death & Differentiation*, 22, 1, 58-73.
- Gartel AL, 2005. The conflicting roles of the cdk inhibitor p21(CIP1/WAF1) in apoptosis. *Leuk Res*, 29, 11, 1237-8.
- Gartel AL, Radhakrishnan SK, 2005. Lost in Transcription: p21 Repression, Mechanisms, and Consequences. *Cancer Research*, 65, 10, 3980-5.
- Gartel AL, Tyner AL, 2002. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther*, 1, 8, 639-49.
- Gava FN, Zacché E, Ortiz EMG, Champion T, Bandarra MB, Vasconcelos RO, Barbosa JC, Camacho AA, 2013. Doxorubicin induced dilated cardiomyopathy in a rabbit model: An update. *Research in Veterinary Science*, 94, 1, 115-21.
- Gielis JF, Lin JY, Wingler K, Van Schil PEY, Schmidt HH, Moens AL, 2011. Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders. *Free Radical Biology and Medicine*, 50, 7, 765-76.
- Giorgio M, Pierantonio M, Emanuela S, Gaetano C, Luca G, 2004. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56, 2, 185.
- Glick D, Barth S, Macleod KF, 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology*, 221, 1, 3-12.
- Goffart S, von Kleist-Retzow JC, Wiesner RJ, 2004. Regulation of mitochondrial proliferation in the heart: power-plant failure contributes to cardiac failure in hypertrophy. *Cardiovasc Res*, 64, 2, 198-207.

- Golstein P, Kroemer G, 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32, 1, 37-43.
- Gong Y, Fan Z, Luo G, Yang C, Huang Q, Fan K, Cheng H, Jin K, Ni Q, Yu X, Liu C, 2019. The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Mol Cancer*, 18, 1, 100.
- Green DR, Kroemer G, 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305, 5684, 626-9.
- Gridley MF, 1957. *Manual of histologic and special staining technics*, Armed Forces Institute of Pathology, p.
- Gu J, Hu W, Song Z-p, Chen Y-g, Zhang D-d, Wang C-q, 2016. Resveratrol-induced autophagy promotes survival and attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity. *International Immunopharmacology*, 32, 1-7.
- Gunter TE, Sheu SS, 2009. Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca(2+) transport mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1787, 11, 1291-308.
- Hafez HM, Hassanein H, 2022. Montelukast ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity via modulation of p-glycoprotein and inhibition of ROS-mediated TNF- α /NF- κ B pathways. *Drug and Chemical Toxicology*, 45, 2, 548-59.
- Halestrap AP, 2006. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans*, 34, Pt 2, 232-7.
- Hallman BE, Hauck ML, Williams LE, Hess PR, Suter SE, 2019. Incidence and risk factors associated with development of clinical cardiotoxicity in dogs receiving doxorubicin. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33, 2, 783-91.
- Han JH, Park J, Kang TB, Lee KH, 2021. Regulation of Caspase-8 Activity at the Crossroads of Pro-Inflammation and Anti-Inflammation. *Int J Mol Sci*, 22, 7.
- Hanna A, Frangogiannis NG, 2020. Inflammatory Cytokines and Chemokines as Therapeutic Targets in Heart Failure. *Cardiovasc Drugs Ther*, 34, 6, 849-63.
- Hardwick JM, Soane L, 2013. Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, 2.
- Haudek SB, Taffet GE, Schneider MD, Mann DL, 2007. TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways. *J Clin Invest*, 117, 9, 2692-701.
- He C, Klionsky DJ, 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*, 43, 67-93.
- He H, Wang L, Qiao Y, Zhou Q, Li H, Chen S, Yin D, Huang Q, He M, 2019. Doxorubicin Induces Endotheliotoxicity and Mitochondrial Dysfunction via ROS/eNOS/NO Pathway. *Front Pharmacol*, 10, 1531.
- Hemmings B, Mayer B, 1998. Enzymology of nitric oxide synthases. *Nitric oxide protocols*, 1-32.
- Hengartner MO, Ellis R, Horvitz R, 1992. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature*, 356, 6369, 494-9.
- Hengartner MO, Horvitz HR, 1994. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell*, 76, 4, 665-76.
- Hennes AM, Theilen GH, Lewis JP, 1977. Clinical investigation of doxorubicin, daunomycin, and 6-thioguanine in normal cats. *Am J Vet Res*, 38, 4, 521-4.
- Herbig U, Sedivy JM, 2006. Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story. *Mech Ageing Dev*, 127, 1, 16-24.
- Hoffman RK, Kim BJ, Shah PD, Carver J, Ky B, Ryeom S, 2021. Damage to cardiac vasculature may be associated with breast cancer treatment-induced cardiotoxicity. *Cardiooncology*, 7, 1, 15.
- Holze C, Michaudel C, Mackowiak C, Haas DA, Benda C, Hubel P, Pennemann FL, Schnepf D, Wettmarshausen J, Braun M, Leung DW, Amarasinghe GK, Perocchi F, Staeheli P, Ryffel

- B, Pichlmair A, 2018. Oxeiptosis, a ROS-induced caspase-independent apoptosis-like cell-death pathway. *Nat Immunol*, 19, 2, 130-40.
- Hrdina R, Geršl V, Klimtová I, Šimůnek T, Macháčková J, Adamcova M, 2000. Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *Acta medica (Hradec Králové) / Universitas Carolina, Facultas Medica Hradec Králové*, 43, 75-82.
- Hsieh YC, Athar M, Chaudry IH, 2009. When apoptosis meets autophagy: deciding cell fate after trauma and sepsis. *Trends Mol Med*, 15, 3, 129-38.
- Huang C, Zhang X, Ramil JM, Rikka S, Kim L, Lee Y, Gude NA, Thistlethwaite PA, Sussman MA, Gottlieb RA, 2010. Juvenile exposure to anthracyclines impairs cardiac progenitor cell function and vascularization resulting in greater susceptibility to stress-induced myocardial injury in adult mice. *Circulation*, 121, 5, 675-83.
- Huang P, Bai L, Liu L, Fu J, Wu K, Liu H, Liu Y, Qi B, Qi B, 2021. Redd1 knockdown prevents doxorubicin-induced cardiac senescence. *Aging (Albany NY)*, 13, 10, 13788-806.
- Huang WP, Yin WH, Chen JS, Huang PH, Chen JW, Lin SJ, 2021. Fenofibrate attenuates doxorubicin-induced cardiac dysfunction in mice via activating the eNOS/EPC pathway. *Sci Rep*, 11, 1, 1159.
- Hunter DR, Haworth RA, 1979. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria: III. Transitional Ca²⁺ release. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 195, 2, 468-77.
- Ibrahim Fouad G, Ahmed KA, 2022. Curcumin Ameliorates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity and Hepatotoxicity Via Suppressing Oxidative Stress and Modulating iNOS, NF- κ B, and TNF- α in Rats. *Cardiovascular Toxicology*, 22, 2, 152-66.
- Ichas F, Jouaville LS, Mazat JP, 1997. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell*, 89, 7, 1145-53.
- Idriss HT, Naismith JH, 2000. TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique*, 50, 3, 184-95.
- Igney FH, Krammer PH, 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 2, 4, 277-88.
- Ivanová M, Dovinová I, Okruhlicová L, Tribulová N, Simončíková P, Barteková M, Vlkovičová J, Barančík M, 2012. Chronic cardiotoxicity of doxorubicin involves activation of myocardial and circulating matrix metalloproteinases in rats. *Acta Pharmacol Sin*, 33, 4, 459-69.
- Janczewski AM, Kadokami T, Lemster B, Frye CS, McTiernan CF, Feldman AM, 2003. Morphological and functional changes in cardiac myocytes isolated from mice overexpressing TNF-alpha. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284, 3, H960-9.
- Jänicke RU, Sohn D, Essmann F, Schulze-Osthoff K, 2007. The multiple battles fought by anti-apoptotic p21. *Cell Cycle*, 6, 4, 407-13.
- Jin Y, Penning TM, 2007. Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxication. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 263-92.
- Jouaville LS, Ichas F, Mazat JP, 1998. Modulation of cell calcium signals by mitochondria. *Mol Cell Biochem*, 184, 1-2, 371-6.
- Kaiser WJ, Upton JW, Long AB, Livingston-Rosanoff D, Daley-Bauer LP, Hakem R, Caspary T, Mocarski ES, 2011. RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature*, 471, 7338, 368-72.
- Kalivendi SV, Konorev EA, Cunningham S, Vanamala SK, Kaji EH, Joseph J, Kalyanaraman B, 2005. Doxorubicin activates nuclear factor of activated T-lymphocytes and Fas ligand transcription: Role of mitochondrial reactive oxygen species and calcium. *Biochemical Journal*, 389, 2, 527-39.
- Kalivendi SV, Kotamraju S, Zhao H, Joseph J, Kalyanaraman B, 2001. Doxorubicin-induced Apoptosis Is Associated with Increased Transcription of Endothelial Nitric-oxide Synthase: EFFECT OF ANTIAPOPTOTIC ANTIOXIDANTS AND CALCIUM*. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 50, 47266-76.

- Kalyanasundaram A, Li N, Hansen BJ, Zhao J, Fedorov VV, 2019. Canine and human sinoatrial node: differences and similarities in the structure, function, molecular profiles, and arrhythmia. *J Vet Cardiol*, 22, 2-19.
- Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y, 2000. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol*, 150, 6, 1507-13.
- Kamel M, Farouk L, Osman A, Khorshid O, Abdo M, 2017. Comparative Study of the Protective Effect of Metformin and Sitagliptin against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats. *Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics*, 06.
- Kang Y, Wang W, Zhao H, Qiao Z, Shen X, He B, 2017. Assessment of Subclinical Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in a Rat Model by Speckle-Tracking Imaging. *Arq Bras Cardiol*, 109, 2, 0.
- Kapadia SR, Oral H, Lee J, Nakano M, Taffet GE, Mann DL, 1997. Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor- α gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circ Res*, 81, 2, 187-95.
- Karabulut D, Ozturk E, Kaymak E, Akin AT, Yakan B, 2021. Thymoquinone attenuates doxorubicin-cardiotoxicity in rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35, 1, e22618.
- Kashou AH, Basit H, Chhabra L, 2017. Physiology, sinoatrial node.
- Kassner N, Huse K, Martin HJ, Gödtel-Armbrust U, Metzger A, Meineke I, Brockmöller J, Klein K, Zanger UM, Maser E, Wojnowski L, 2008. Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in the human liver. *Drug Metab Dispos*, 36, 10, 2113-20.
- Kawaguchi T, Takemura G, Kanamori H, Takeyama T, Watanabe T, Morishita K, Ogino A, Tsujimoto A, Goto K, Maruyama R, Kawasaki M, Mikami A, Fujiwara T, Fujiwara H, Minatoguchi S, 2012. Prior starvation mitigates acute doxorubicin cardiotoxicity through restoration of autophagy in affected cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 96, 3, 456-65.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR, 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 4, 239-57.
- Khalid N, Azimpouran M, 2024. Necrosis. In: StatPearls. Eds. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC., p.
- Khiati S, Dalla Rosa I, Sourbier C, Ma X, Rao VA, Neckers LM, Zhang H, Pommier Y, 2014. Mitochondrial Topoisomerase I (Top1mt) Is a Novel Limiting Factor of Doxorubicin Cardiotoxicity. *Clinical Cancer Research*, 20, 18, 4873-81.
- Kim E, Lee DM, Seo MJ, Lee HJ, Choi KS, 2020. Intracellular Ca²⁺ Imbalance Critically Contributes to Paraptosis. *Front Cell Dev Biol*, 8, 607844.
- Kim EM, Jung C-H, Kim J, Hwang S-G, Park JK, Um H-D, 2017. The p53/p21 Complex Regulates Cancer Cell Invasion and Apoptosis by Targeting Bcl-2 Family Proteins. *Cancer Research*, 77, 11, 3092-100.
- Kim SY, Kim SJ, Kim BJ, Rah SY, Chung SM, Im MJ, Kim UH, 2006. Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca²⁺ increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes. *Exp Mol Med*, 38, 5, 535-45.
- Kinnally KW, Peixoto PM, Ryu SY, Dejean LM, 2011. Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both? *Biochim Biophys Acta*, 1813, 4, 616-22.
- Kiyomiya K, Matsuo S, Kurebe M, 1998. Proteasome is a carrier to translocate doxorubicin from cytoplasm into nucleus. *Life Sci*, 62, 20, 1853-60.
- Kiyomiya K, Matsuo S, Kurebe M, 2001. Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex. *Cancer Res*, 61, 6, 2467-71.
- Klatt P, Pfeiffer S, List BM, Lehner D, Glatter O, Bächinger HP, Werner ER, Schmidt K, Mayer B, 1996. Characterization of Heme-deficient Neuronal Nitric-oxide Synthase Reveals a

- Role for Heme in Subunit Dimerization and Binding of the Amino Acid Substrate and Tetrahydrobiopterin (*). *Journal of Biological Chemistry*, 271, 13, 7336-42.
- Kluza J, Marchetti P, Gallego M-A, Lancel S, Fournier C, Loyens A, Beauvillain J-C, Bailly C, 2004. Mitochondrial proliferation during apoptosis induced by anticancer agents: effects of doxorubicin and mitoxantrone on cancer and cardiac cells. *Oncogene*, 23, 42, 7018-30.
- Kobayashi S, Volden P, Timm D, Mao K, Xu X, Liang Q, 2010. Transcription factor GATA4 inhibits doxorubicin-induced autophagy and cardiomyocyte death. *J Biol Chem*, 285, 1, 793-804.
- Kong CY, Guo Z, Song P, Zhang X, Yuan YP, Teng T, Yan L, Tang QZ, 2022. Underlying the Mechanisms of Doxorubicin-Induced Acute Cardiotoxicity: Oxidative Stress and Cell Death. *Int J Biol Sci*, 18, 2, 760-70.
- Kordes M, Matuschewski K, Hafalla JC, 2011. Caspase-1 activation of interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18 is dispensable for induction of experimental cerebral malaria. *Infect Immun*, 79, 9, 3633-41.
- Kristal O, Lana SE, Ogilvie GK, Rand WM, Cotter SM, Moore AS, 2001. Single Agent Chemotherapy with Doxorubicin for Feline Lymphoma: A Retrospective Study of 19 Cases (1994–1997). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15, 2, 125-30.
- Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP, Demetris AJ, Feldman AM, 1997. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α . *Circ Res*, 81, 4, 627-35.
- Kuchan MJ, Frangos JA, 1994. Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 266, 3, C628-C36.
- Kuhn DE, Roy S, Radtke J, Khanna S, Sen CK, 2007. Laser microdissection and capture of pure cardiomyocytes and fibroblasts from infarcted heart regions: perceived hyperoxia induces p21 in peri-infarct myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292, 3, H1245-53.
- Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, Flavell RA, 1995. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*, 267, 5206, 2000-3.
- Kuzu M, Kandemir FM, Yildirim S, Kucukler S, Caglayan C, Turk E, 2018. Morin attenuates doxorubicin-induced heart and brain damage by reducing oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 443-53.
- Larsen BD, Sørensen CS, 2017. The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond. *The FEBS Journal*, 284, 8, 1160-70.
- Lebrecht D, Kokkari A, Ketelsen UP, Setzer B, Walker UA, 2005. Tissue-specific mtDNA lesions and radical-associated mitochondrial dysfunction in human hearts exposed to doxorubicin. *J Pathol*, 207, 4, 436-44.
- Lebrecht D, Walker UA, 2007. Role of mtDNA lesions in anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovascular Toxicology*, 7, 2, 108-13.
- Levine B, Yuan J, 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*, 115, 10, 2679-88.
- Li J, Cao F, Yin HL, Huang ZJ, Lin ZT, Mao N, Sun B, Wang G, 2020. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis*, 11, 2, 88.
- Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, McDowell J, Paskind M, Rodman L, Salfeld J, et al., 1995. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell*, 80, 3, 401-11.
- Li P, Dong XR, Zhang B, Zhang XT, Liu JZ, Ma DS, Ma L, 2021. Molecular mechanism and therapeutic targeting of necrosis, apoptosis, pyroptosis, and autophagy in cardiovascular disease. *Chin Med J (Engl)*, 134, 22, 2647-55.

- Li X, Liang J, Qu L, Liu S, Qin A, Liu H, Wang T, Li W, Zou W, 2022. Exploring the role of ferroptosis in the doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity using a murine model. *Chemico-Biological Interactions*, 363, 110008.
- Liang C, Zhang X, Yang M, Dong X, 2019. Recent Progress in Ferroptosis Inducers for Cancer Therapy. *Adv Mater*, 31, 51, e1904197.
- Licata S, Saponiero A, Mordente A, Minotti G, 2000. Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. *Chem Res Toxicol*, 13, 5, 414-20.
- Licata S, Saponiero A, Mordente A, Minotti G, 2000. Doxorubicin Metabolism and Toxicity in Human Myocardium: Role of Cytoplasmic Deglycosidation and Carbonyl Reduction. *Chemical Research in Toxicology*, 13, 5, 414-20.
- Linkermann A, Green DR, 2014. Necroptosis. *N Engl J Med*, 370, 5, 455-65.
- Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD, Perez-Atayde AR, Sallan SE, Sanders SP, 1991. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *New England Journal of Medicine*, 324, 12, 808-15.
- Liu J, Kuang F, Kang R, Tang D, 2020. Alkalitosis: a new weapon for cancer therapy. *Cancer Gene Ther*, 27, 5, 267-9.
- Liu Y, Shoji-Kawata S, Sumpter RM, Jr., Wei Y, Ginet V, Zhang L, Posner B, Tran KA, Green DR, Xavier RJ, Shaw SY, Clarke PG, Puyal J, Levine B, 2013. Autosis is a Na⁺,K⁺-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 51, 20364-71.
- Liu Z, Nailwal H, Rector J, Rahman MM, Sam R, McFadden G, Chan FK, 2021. A class of viral inducer of degradation of the necroptosis adaptor RIPK3 regulates virus-induced inflammation. *Immunity*, 54, 2, 247-58.e7.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ, 2001. The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell*, 104, 4, 487-501.
- Lončar-Turukalo T, Vasić M, Tasić T, Mijatović G, Glumac S, Bajić D, Japunžić-Žigon N, 2015. Heart rate dynamics in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Physiological Measurement*, 36, 4, 727.
- Lopez-Castejon G, Brough D, 2011. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev*, 22, 4, 189-95.
- Lu H, Meléndez GC, Levick SP, Janicki JS, 2012. Prevention of adverse cardiac remodeling to volume overload in female rats is the result of an estrogen-altered mast cell phenotype. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302, 3, H811-7.
- Lu L, Wu W, Yan J, Li X, Yu H, Yu X, 2009. Adriamycin-induced autophagic cardiomyocyte death plays a pathogenic role in a rat model of heart failure. *International Journal of Cardiology*, 134, 1, 82-90.
- Ludke A, Akolkar G, Ayyappan P, Sharma AK, Singal PK, 2017. Time course of changes in oxidative stress and stress-induced proteins in cardiomyocytes exposed to doxorubicin and prevention by vitamin C. *PLoS One*, 12, 7, e0179452.
- Luna LG, 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. In: *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. Eds, p. xii, 258-xii, .
- Ma D, Wang X, Liu J, Cui Y, Luo S, Wang F, 2023. The development of necroptosis: what we can learn. *Cell Stress and Chaperones*, 28, 6, 969-87.
- Maghsoudi N, Zakeri Z, Lockshin RA, 2012. Programmed cell death and apoptosis--where it came from and where it is going: from Elie Metchnikoff to the control of caspases. *Exp Oncol*, 34, 3, 146-52.
- Mahoney PM, Hurst PR, McLeod BJ, McConnell MA, Thompson EG, 2003. Effect of oestradiol treatment on mast cell populations and microflora in the vaginal cul-de-sac of seasonally anoestrous brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*). *Reproduction*, 125, 5, 733-41.

- Maiorino M, Conrad M, Ursini F, 2018. GPx4, Lipid Peroxidation, and Cell Death: Discoveries, Rediscoveries, and Open Issues. *Antioxid Redox Signal*, 29, 1, 61-74.
- Majno G, Joris I, 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 146, 1, 3-15.
- Maltese WA, Overmeyer JH, 2014. Methuosis: nonapoptotic cell death associated with vacuolization of macropinosome and endosome compartments. *Am J Pathol*, 184, 6, 1630-42.
- Marechal X, Montaigne D, Marciniak C, Marchetti P, Hassoun SM, Beauvillain JC, Lancel S, Neviere R, 2011. Doxorubicin-induced cardiac dysfunction is attenuated by ciclosporin treatment in mice through improvements in mitochondrial bioenergetics. *Clin Sci (Lond)*, 121, 9, 405-13.
- Mariappan N, Soorappan RN, Haque M, Sriramula S, Francis J, 2007. TNF-alpha-induced mitochondrial oxidative stress and cardiac dysfunction: restoration by superoxide dismutase mimetic Tempol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293, 5, H2726-37.
- Martin HL, Teismann P, 2009. Glutathione--a review on its role and significance in Parkinson's disease. *Faseb j*, 23, 10, 3263-72.
- Maslov LN, Popov SV, Naryzhnaya NV, Mukhomedzyanov AV, Kurbatov BK, Derkachev IA, Boshchenko AA, Khaliulin I, Prasad NR, Singh N, Degterev A, Tomilova EA, Sapozhenkova EV, 2022. The regulation of necroptosis and perspectives for the development of new drugs preventing ischemic/reperfusion of cardiac injury. *Apoptosis*, 27, 9-10, 697-719.
- Mauldin GN, Matus RE, Patnaik AK, Bond BR, Mooney SC, 1988. Efficacy and Toxicity of Doxorubicin and Cyclophosphamide Used in the Treatment of Selected Malignant Tumors in 23 Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2, 2, 60-5.
- Maynard RL, Downes N, 2019. *Anatomy and histology of the laboratory rat in toxicology and biomedical research*, Academic Press, p.
- McDonough SP, Southard T, 2017. *Necropsy guide for dogs, cats, and small mammals*, John Wiley & Sons, p.
- Medeiros-Lima DJM, Carvalho JJ, Tibirica E, Borges JP, Matsuura C, 2019. Time course of cardiomyopathy induced by doxorubicin in rats. *Pharmacol Rep*, 71, 4, 583-90.
- Melo-Silveira RF, Fidelis GP, Viana RL, Soeiro VC, Silva RA, Machado D, Costa LS, Ferreira CV, Oliveira Rocha HA, 2014. Antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extract from a neglected agricultural product: corn cobs. *Molecules*, 19, 4, 5360-78.
- Menna P, Salvatorelli E, Gianni L, Minotti G, 2008. Anthracycline cardiotoxicity. *Anthracycline Chemistry and Biology II: Mode of action, clinical aspects and new drugs*, 21-44.
- Meredith A-M, Dass CR, 2016. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68, 6, 729-41.
- Merlet N, Piriou N, Rozec B, Grabherr A, Lauzier B, Trochu JN, Gauthier C, 2013. Increased beta2-adrenoceptors in doxorubicin-induced cardiomyopathy in rat. *PLoS One*, 8, 5, e64711.
- Mettler FP, Young DM, Ward JM, 1977. Adriamycin-induced cardiotoxicity (cardiomyopathy and congestive heart failure) in rats. *Cancer Res*, 37, 8 Pt 1, 2705-13.
- Miller LM, Gal A, 2017. Chapter 10 - Cardiovascular System and Lymphatic Vessels1. In: *Pathologic Basis of Veterinary Disease (Sixth Edition)*. Eds: Zachary JF: Mosby, p. 561-616.e1.
- Minotti G, Aust SD, 1987. The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids*, 44, 2-4, 191-208.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ, 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451, 7182, 1069-75.
- Mizutani H, 2007. [Mechanism of DNA damage and apoptosis induced by anticancer drugs through generation of reactive oxygen species]. *Yakugaku Zasshi*, 127, 11, 1837-42.

- Monsuez J-J, Charniot J-C, Vignat N, Artigou J-Y, 2010. Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. *International Journal of Cardiology*, 144, 1, 3-15.
- Muindi J, Sinha BK, Gianni L, Myers C, 1985. Thiol-dependent DNA damage produced by anthracycline-iron complexes. The structure-activity relationships and molecular mechanisms. *Mol Pharmacol*, 27, 3, 356-65.
- Mukhopadhyay P, Rajesh M, Bátkai S, Kashiwaya Y, Haskó G, Liaudet L, Szabó C, Pacher P, 2009. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 296, 5, H1466-83.
- Munir S, Hafeez R, Younis W, Malik MNH, Munir MU, Manzoor W, Razzaq MA, Pessoa LB, Lopes KS, Lívero F, Gasparotto Junior A, 2023. The Protective Effect of Citronellol against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats. *Biomedicines*, 11, 10.
- Murphy AN, Bredesen DE, Cortopassi G, Wang E, Fiskum G, 1996. Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 18, 9893-8.
- Nakamura N, Matsuura A, Wada Y, Ohsumi Y, 1997. Acidification of vacuoles is required for autophagic degradation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *The journal of biochemistry*, 121, 2, 338-44.
- Neilan TG, Blake SL, Ichinose F, Raher MJ, Buys ES, Jassal DS, Furutani E, Perez-Sanz TM, Graveline A, Janssens SP, Picard MH, Scherrer-Crosbie M, Bloch KD, 2007. Disruption of Nitric Oxide Synthase 3 Protects Against the Cardiac Injury, Dysfunction, and Mortality Induced by Doxorubicin. *Circulation*, 116, 5, 506-14.
- Newton K, Wickliffe KE, Dugger DL, Maltzman A, Roose-Girma M, Dohse M, Kórmúves L, Webster JD, Dixit VM, 2019. Cleavage of RIPK1 by caspase-8 is crucial for limiting apoptosis and necroptosis. *Nature*, 574, 7778, 428-31.
- Niculescu AB, 3rd, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI, 1998. Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol*, 18, 1, 629-43.
- Nohl H, Gille L, Staniek K, 1998. The Exogenous NADH Dehydrogenase of Heart Mitochondria Is the Key Enzyme Responsible for Selective Cardiotoxicity of Anthracyclines. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 53, 3-4, 279-85.
- Novotna R, Wsol V, Xiong G, Maser E, 2008. Inactivation of the anticancer drugs doxorubicin and oracin by aldo-keto reductase (AKR) 1C3. *Toxicol Lett*, 181, 1, 1-6.
- Novotney CA, Page RL, Macy DW, Dewhirst MW, Ogilvie GK, Withrow SJ, McEntee MC, Heidner GL, Allen SA, Thrall DE, et al., 1992. Phase I evaluation of doxorubicin and whole-body hyperthermia in dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med*, 6, 4, 245-9.
- O'Keefe DA, Sisson DD, Gelberg HB, Schaeffer DJ, Krawiec DR, 1993. Systemic Toxicity Associated With Doxorubicin Administration in Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 7, 5, 309-17.
- Ogilvie GK, Reynolds HA, Richardson RC, Withrow SJ, Norris AM, Henderson RA, Klausner JS, Fowler JD, McCaw D, 1989. Phase II evaluation of doxorubicin for treatment of various canine neoplasms. *J Am Vet Med Assoc*, 195, 11, 1580-3.
- Ogryzko VV, Wong P, Howard BH, 1997. WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol*, 17, 8, 4877-82.
- Ophhof T, 1988. The mammalian sinoatrial node. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1, 6, 573-97.
- Overmeyer JH, Kaul A, Johnson EE, Maltese WA, 2008. Active ras triggers death in glioblastoma cells through hyperstimulation of macropinocytosis. *Mol Cancer Res*, 6, 6, 965-77.
- Panjrath GS, Patel V, Valdiviezo CI, Narula N, Narula J, Jain D, 2007. Potentiation of Doxorubicin Cardiotoxicity by Iron Loading in a Rodent Model. *Journal of the American College of Cardiology*, 49, 25, 2457-64.

- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T, 2007. p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy*. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 33, 24131-45.
- Park W, Wei S, Kim B-S, Kim B, Bae S-J, Chae YC, Ryu D, Ha K-T, 2023. Diversity and complexity of cell death: a historical review. *Experimental & Molecular Medicine*, 55, 8, 1573-94.
- Pasparakis M, Vandenabeele P, 2015. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 517, 7534, 311-20.
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B, 2005. Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy. *Cell*, 122, 6, 927-39.
- Peters JH, Gordon GR, Kashiwase D, Acton EM, 1981. Tissue distribution of doxorubicin and doxorubicinol in rats receiving multiple doses of doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol*, 7, 1, 65-9.
- Pfaffl MW, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, 9, e45.
- Pfaffl MW, Hageleit M, 2001. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters*, 23, 4, 275-82.
- Podyacheva EY, Kushnareva EA, Karpov AA, Toropova YG, 2021. Analysis of Models of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Rats and Mice. A Modern View From the Perspective of the Pathophysiologist and the Clinician. *Frontiers in Pharmacology*, 12.
- Que D, Kuang F, Kang R, Tang D, Liu J, 2023. ACS2-mediated NF-κB activation promotes alkaliptosis in human pancreatic cancer cells. *Sci Rep*, 13, 1, 1483.
- Rabinovich-Nikitin I, Kirshenbaum E, Kirshenbaum LA, 2023. Autophagy, Clock Genes, and Cardiovascular Disease. *Canadian Journal of Cardiology*, 39, 12, 1772-80.
- Radhakrishnan SK, Feliciano CS, Najmabadi F, Haegerbarth A, Kandel ES, Tyner AL, Gartel AL, 2004. Constitutive expression of E2F-1 leads to p21-dependent cell cycle arrest in S phase of the cell cycle. *Oncogene*, 23, 23, 4173-6.
- Raju TS, 2019. Hydroxylation of Proteins. In: *Hydroxylation of Proteins. In Co²⁺ and Post-Translational Modifications of Therapeutic Antibodies and Proteins*. Eds, p. 119-31.
- Rawat PS, Jaiswal A, Khurana A, Bhatti JS, Navik U, 2021. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111708.
- Reiman RA, Mauldin GE, Mauldin GN, 2008. A comparison of toxicity of two dosing schemes for doxorubicin in the cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10, 4, 324-31.
- Rharass T, Gbankoto A, Canal C, Kurşunluoğlu G, Bijoux A, Panáková D, Ribou A-C, 2016. Oxidative stress does not play a primary role in the toxicity induced with clinical doses of doxorubicin in myocardial H9c2 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 413, 1, 199-215.
- Richard D, Kefi K, Barbe U, Bausero P, Visioli F, 2008. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacol Res*, 57, 6, 451-5.
- Robert J, Gianni L, 1993. Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. *Cancer surveys*, 17, 219-52.
- Romanov V, Pospelov V, Pospelova T, 2012. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 Waf1: contemporary view on its role in senescence and oncogenesis. *Biochemistry (Moscow)*, 77, 575-84.
- Sallustio BC, Boddy AV, 2021. Is there scope for better individualisation of anthracycline cancer chemotherapy? *British Journal of Clinical Pharmacology*, 87, 2, 295-305.
- Sanders-van Wijk S, van Empel V, Davarzani N, Maeder MT, Handschin R, Pfisterer ME, Brunner-La Rocca HP, 2015. Circulating biomarkers of distinct pathophysiological

- pathways in heart failure with preserved vs. reduced left ventricular ejection fraction. *Eur J Heart Fail*, 17, 10, 1006-14.
- Sawyer DB, Peng X, Chen B, Pentassuglia L, Lim CC, 2010. Mechanisms of anthracycline cardiac injury: can we identify strategies for cardioprotection? *Prog Cardiovasc Dis*, 53, 2, 105-13.
- Schirone L, D'Ambrosio L, Forte M, Genovese R, Schiavon S, Spinosa G, Iacovone G, Valenti V, Frati G, Sciarretta S, 2022. Mitochondria and Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy: A Complex Interplay. *Cells*, 11, 13.
- Schummer A, Wilkens H, Vollmerhaus B, Habermehl KH, Siller WG, Wight PAL, 1981. The anatomy of the domestic animals. Volume 3. The circulatory system, the skin and the cutaneous organs of the domestic mammals. [Translation from German into English], Berlin, Verlag Paul Parey., p.
- Seitz DE, Ezcurra JE, Guttman-Carlisle DL, 1995. Synthesis and chemical properties of a series of doxorubicin enaminomalonyl- β -alanine derivatives. *Tetrahedron Letters*, 36, 9, 1413-6.
- Sessa WC, 2005. Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100.
- Setoguchi A, Shizuta Y, Hosoe H, Narasaki H, Higashi M, Mishina N, Ogasawara M, Minami T, 2023. A case report of suspected cardiotoxicity in a cat following doxorubicin administration and review of literature on cardiotoxicity in dogs and cats. *J. Vet. Cardiol.*, 7, 1, 1-8.
- Shati AA, Eid RA, El-kott AF, Alqahtani YA, Shatoor AS, Ahmed Zaki MS, 2024. Curcumin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via suppressing oxidative Stress, preventing inflammation and apoptosis: Ultrastructural and computational approaches. *Heliyon*, 10, 5, e27164.
- Sheibani M, Azizi Y, Shayan M, Nezamoleslami S, Eslami F, Farjoo MH, Dehpour AR, 2022. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: An Overview on Pre-clinical Therapeutic Approaches. *Cardiovascular Toxicology*, 22, 4, 292-310.
- Shinkai H, Ito T, Iida T, Kitao Y, Yamada H, Uchida I, 2000. 4-Aminoquinolines: Novel Nociceptin Antagonists with Analgesic Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 24, 4667-77.
- Shioi T, Matsumori A, Sasayama S, 1996. Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. *Circulation*, 94, 11, 2930-7.
- Shipra, Tembhre MK, Hote MP, Bhari N, Lakshmy R, Kumaran SS, 2023. PGC-1 α Agonist Rescues Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy by Mitigating the Oxidative Stress and Necroptosis. *Antioxidants (Basel)*, 12, 9.
- Silva EHA, Santana NNM, Seixas NRM, Bezerra LLF, Silva MMO, Santos SF, Cavalcante JS, Leocadio-Miguel MA, Engelberth RC, 2023. Blue light exposure-dependent improvement in robustness of circadian rest-activity rhythm in aged rats. *PLoS One*, 18, 10, e0292342.
- Singh G, Kesharwani P, Kumar Singh G, Kumar S, Putta A, Modi G, 2024. Ferroptosis and its modulators: A raising target for cancer and Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 98, 117564.
- Sinha BK, Politi PM, 1990. Anthracyclines. *Cancer Chemother Biol Response Modif*, 11, 45-57.
- Sinibaldi F, Howes BD, Droghetti E, Polticelli F, Piro MC, Di Pierro D, Fiorucci L, Coletta M, Smulevich G, Santucci R, 2013. Role of Lysines in Cytochrome c-Cardiolipin Interaction. *Biochemistry*, 52, 26, 4578-88.
- Sishi BJN, Loos B, van Rooyen J, Engelbrecht A-M, 2013. Autophagy upregulation promotes survival and attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biochemical Pharmacology*, 85, 1, 124-34.
- Song X, Zhu S, Xie Y, Liu J, Sun L, Zeng D, Wang P, Ma X, Kroemer G, Bartlett DL, Billiar TR, Lotze MT, Zeh HJ, Kang R, Tang D, 2018. JTC801 Induces pH-dependent Death Specifically in Cancer Cells and Slows Growth of Tumors in Mice. *Gastroenterology*, 154, 5, 1480-93.

- Song Y, Buettner GR, 2010. Thermodynamic and kinetic considerations for the reaction of semiquinone radicals to form superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 6, 919-62.
- Song Z, Steller H, 1999. Death by design: mechanism and control of apoptosis. *Trends in cell biology*, 9, 12, M49-M52.
- Spencer SL, Cappell SD, Tsai FC, Overton KW, Wang CL, Meyer T, 2013. The proliferation-quiescence decision is controlled by a bifurcation in CDK2 activity at mitotic exit. *Cell*, 155, 2, 369-83.
- Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE, 2000. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 26, 14376-81.
- Speth PAJ, van Hoesel QGCM, Haanen C, 1988. Clinical Pharmacokinetics of Doxorubicin. *Clinical Pharmacokinetics*, 15, 1, 15-31.
- Steinberg BE, Grinstein S, 2007. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Science's STKE*, 2007, 379, pe11-pe.
- Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, Wang L, Yan J, Liu W, Lei X, Wang X, 2012. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*, 148, 1-2, 213-27.
- Sun Q, Luo T, Ren Y, Florey O, Shirasawa S, Sasazuki T, Robinson DN, Overholtzer M, 2014. Competition between human cells by entosis. *Cell Res*, 24, 11, 1299-310.
- Susaneck SJ, 1983. Doxorubicin therapy in the dog. *J Am Vet Med Assoc*, 182, 1, 70-2.
- Sussman MA, Hamm-Alvarez SF, Vilalta PM, Welch S, Kedes L, 1997. Involvement of phosphorylation in doxorubicin-mediated myofibril degeneration. An immunofluorescence microscopy analysis. *Circ Res*, 80, 1, 52-61.
- Taga I, Yamamoto K, Kawai H, Kawabata H, Masada K, Tsuyuguchi Y, 1987. The effects of intra-arterially injected adriamycin on microvascular anastomosis. *Journal of reconstructive microsurgery*, 3, 02, 153-8.
- Takemura G, Fujiwara H, 2007. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy: From the Cardiotoxic Mechanisms to Management. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 49, 5, 330-52.
- Tang D, Chen X, Kroemer G, 2022. Cuproptosis: a copper-triggered modality of mitochondrial cell death. *Cell Res*, 32, 5, 417-8.
- Terrand J, Xu B, Morrissy S, Dinh TN, Williams S, Chen QM, 2011. p21(WAF1/Cip1/Sdi1) knockout mice respond to doxorubicin with reduced cardiotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 257, 1, 102-10.
- Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD, Liu LF, 1984. Adriamycin-Induced DNA Damage Mediated by Mammalian DNA Topoisomerase II. *Science*, 226, 4673, 466-8.
- Thom T, Haase N, Rosamond W, Howard VJ, Rumsfeld J, Manolio T, Zheng Z-J, Flegal K, O'Donnell C, Kittner S, Lloyd-Jones D, Goff DC, Hong Y, Adams R, Friday G, Furie K, Gorelick P, Kissela B, Marler J, Meigs J, Roger V, Sidney S, Sorlie P, Steinberger J, Wasserthiel-Smoller S, Wilson M, Wolf P, 2006. Heart Disease and Stroke Statistics—2006 Update. *Circulation*, 113, 6, e85-e151.
- To H, Ohdo S, Shin M, Uchimaru H, Yukawa E, Higuchi S, Fujimura A, Kobayashi E, 2003. Dosing time dependency of doxorubicin-induced cardiotoxicity and bone marrow toxicity in rats. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 55, 6, 803-10.
- Trapani JA, Smyth MJ, 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*, 2, 10, 735-47.
- Treuting PM, Dintzis S, Montine KS, 2017. Comparative anatomy and histology: a mouse, rat, and human atlas, Academic Press, p. 163-189.
- Tsujimoto Y, 1989. Overexpression of the human BCL-2 gene product results in growth enhancement of Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 6, 1958-62.
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM, 1985. Involvement of the bcl-2 Gene in Human Follicular Lymphoma. *Science*, 228, 4706, 1440-3.

- Vásquez-Vivar J, Martasek P, Hogg N, Masters BSS, Pritchard KA, Kalyanaraman B, 1997. Endothelial Nitric Oxide Synthase-Dependent Superoxide Generation from Adriamycin. *Biochemistry*, 36, 38, 11293-7.
- Venema RC, Ju H, Zou R, Ryan JW, Venema VJ, 1997. Subunit Interactions of Endothelial Nitric-oxide Synthase: COMPARISONS TO THE NEURONAL AND INDUCIBLE NITRIC-OXIDE SYNTHASE ISOFORMS*. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 2, 1276-82.
- Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, Grooten J, Fiers W, Vandenabeele P, 1998. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med*, 187, 9, 1477-85.
- Wang G-X, Wang Y-X, Zhou X-B, Korth M, 2001. Effects of doxorubicinol on excitation-contraction coupling in guinea pig ventricular myocytes. *European Journal of Pharmacology*, 423, 2, 99-107.
- Wang H, Lu C, Tan Y, Xie J, Jiang J, 2014. Effect of adriamycin on BRCA1 and PARP-1 expression in MCF-7 breast cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol*, 7, 9, 5909-15.
- Wang H, Sun L, Su L, Rizo J, Liu L, Wang LF, Wang FS, Wang X, 2014. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Mol Cell*, 54, 1, 133-46.
- Wang H, Wang L, Xie Z, Zhou S, Li Y, Zhou Y, Sun M, 2020. Nitric Oxide (NO) and NO Synthases (NOS)-Based Targeted Therapy for Colon Cancer. *Cancers (Basel)*, 12, 7.
- Wang Y-Z, Wang J-J, Huang Y, Liu F, Zeng W-Z, Li Y, Xiong Z-G, Zhu MX, Xu T-L, 2015. Tissue acidosis induces neuronal necroptosis via ASIC1a channel independent of its ionic conduction. *Elife*, 4, e05682.
- Widmer RJ, Lerman A, 2014. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Glob Cardiol Sci Pract*, 2014, 3, 291-308.
- William Dec G, 2003. Introduction to clinical myocarditis. In: *Myocarditis: from bench to bedside*. Eds: Springer, p. 257-81.
- Winterbourn CC, 1995. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett*, 82-83, 969-74.
- Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M, Schlüter G, Schmidt A, Rosenberger A, Vonhof S, Bickeböller H, Toliat MR, Suk E-K, 2005. NAD (P) H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation*, 112, 24, 3754-62.
- Wu C, Zhao X, Zhang X, Liu S, Zhao H, Chen Y, 2015. Effect of Ginkgo biloba extract on apoptosis of brain tissues in rats with acute cerebral infarction and related gene expression. *Genet Mol Res*, 14, 2, 6387-94.
- Wu S, Ko Y-S, Teng M-S, Ko Y-L, Hsu L-A, Hsueh C, Chou Y-Y, Liew C-C, Lee Y-S, 2002. Adriamycin-induced Cardiomyocyte and Endothelial Cell Apoptosis: In Vitro and In Vivo Studies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34, 12, 1595-607.
- Wu T, Tong M, Chu A, Wu K, Niu X, Zhang Z, 2022. PM2.5-Induced Programmed Myocardial Cell Death via mPTP Opening Results in Deteriorated Cardiac Function in HFpEF Mice. *Cardiovascular Toxicology*, 22, 8, 746-62.
- Xiang P, Deng HY, Li K, Huang G-Y, Chen Y, Tu L, Ng PC, Pong NH, Zhao H, Zhang L, Sung RYT, 2009. Dexrazoxane protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy: upregulation of Akt and Erk phosphorylation in a rat model. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 63, 2, 343-9.
- Xu T, Ding W, Ji X, Ao X, Liu Y, Yu W, Wang J, 2019. Molecular mechanisms of ferroptosis and its role in cancer therapy. *J Cell Mol Med*, 23, 8, 4900-12.
- Xu X, Bucala R, Ren J, 2013. Macrophage migration inhibitory factor deficiency augments doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Journal of the American Heart Association*, 2, 6, e000439.

- Xu X, Chen K, Kobayashi S, Timm D, Liang Q, 2012. Resveratrol attenuates doxorubicin-induced cardiomyocyte death via inhibition of p70 S6 kinase 1-mediated autophagy. *J Pharmacol Exp Ther*, 341, 1, 183-95.
- Xu X, Lai Y, Hua ZC, 2019. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep*, 39, 1.
- Xu Z, Lin S, Wu W, Tan H, Wang Z, Cheng C, Lu L, Zhang X, 2008. Ghrelin prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity through TNF- α /NF- κ B pathways and mitochondrial protective mechanisms. *Toxicology*, 247, 2, 133-8.
- Yalçın E, Oruç E, Cavuşoğlu K, Yapar K, 2010. Protective role of grape seed extract against doxorubicin-induced cardiotoxicity and genotoxicity in albino mice. *J Med Food*, 13, 4, 917-25.
- Yan HF, Zou T, Tuo QZ, Xu S, Li H, Belaidi AA, Lei P, 2021. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. *Signal Transduct Target Ther*, 6, 1, 49.
- Yang WS, Stockwell BR, 2008. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. *Chem Biol*, 15, 3, 234-45.
- Ying-Yu Z, Chen M, Xin-Mu Z, Cai-Hua Y, Ming-Da W, Zhong C, Da-Chuan D, Yan-Hong G, Chang L, Zhao Z, 2015. Ophiopogonin D Attenuates Doxorubicin-Induced Autophagic Cell Death by Relieving Mitochondrial Damage In Vitro and In Vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 352, 1, 166.
- Yu X, Ruan Y, Huang X, Dou L, Lan M, Cui J, Chen B, Gong H, Wang Q, Yan M, Sun S, Qiu Q, Zhang X, Man Y, Tang W, Li J, Shen T, 2020. Dexrazoxane ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting both apoptosis and necroptosis in cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 523, 1, 140-6.
- Yuan J, Amin P, Ofengeim D, 2019. Necroptosis and RIPK1-mediated neuroinflammation in CNS diseases. *Nat Rev Neurosci*, 20, 1, 19-33.
- Zha W, Zhao Q, Xiao Y, Gan Y, Wei J, Yu M, Xu Y, Xu Q, Wu S, Yu W, 2023. Mitochondrial acid 5 rescues cardiomyocytes from doxorubicin-induced toxicity via repressing the TNF- α /NF- κ B/NLRP3-mediated pyroptosis. *Int Immunopharmacol*, 123, 110736.
- Zhang J, Knappton A, Lipshultz SE, Cochran TR, Hiraragi H, Herman EH, 2014. Sex-related Differences in Mast Cell Activity and Doxorubicin Toxicity: A Study in Spontaneously Hypertensive Rats. *Toxicologic Pathology*, 42, 2, 361-75.
- Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, Hughes ME, Hogenesch JB, 2014. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 45, 16219-24.
- Zhang S, Liu X, Bawa-Khalife T, Lu L-S, Lyu YL, Liu LF, Yeh ETH, 2012. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature Medicine*, 18, 11, 1639-42.
- Zhang X-J, Li L, Wang A-L, Guo H-X, Zhao H-P, Chi R-F, Xu H-Y, Yang L-G, Li B, Qin F-Z, Wang J-P, 2023. GSK2795039 prevents RIP1-RIP3-MLKL-mediated cardiomyocyte necroptosis in doxorubicin-induced heart failure through inhibition of NADPH oxidase-derived oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 463, 116412.
- Zhang YW, Shi J, Li YJ, Wei L, 2009. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 57, 6, 435-45.
- Zhao L, Zhang B, 2017. Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes. *Sci Rep*, 7, 44735.
- Zhu L, Lu L, Wang S, Wu J, Shi J, Yan T, Xie C, Li Q, Hu M, Liu Z, 2017. Chapter 11 - Oral Absorption Basics: Pathways and Physicochemical and Biological Factors Affecting Absorption. In: *Developing Solid Oral Dosage Forms (Second Edition)*. Eds: Qiu Y, Chen Y, Zhang GGZ, Yu L, Mantri RV. Boston: Academic Press, p. 297-329.
- Zong WX, Thompson CB, 2006. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev*, 20, 1, 1-15.

8. TURNİTİN RAPORU

RATLARDA DOXORUBICIN UYGULAMALARINDA KALP DOKUSU HASARININ MOLEKÜLER VE PATOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Yazar Zeynep Çelik Kenar

Gönderim Tarihi: 10-Haz-2024 12:15PM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 2399486695

Dosya adı: Zeynep_EL_K-tez_10.06.2024.docx (71.21M)

Kelime sayısı: 31718

Karakter sayısı: 196274

RATLARDA DOXORUBICIN UYGULAMALARINDA KALP DOKUSU HASARININ MOLEKÜLER VE PATOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLIK RAPORU

%**9**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**8**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**6**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%**3**

2

pdffox.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

3

acikerisim.istinye.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

4

acikerisim.nku.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

5

www.bilginyayinevi.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

adudspace.adu.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

<%**1**

7

acikerisim.erbakan.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

8

www.gecekitapligi.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

acikerisim.uludag.edu.tr