

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**DOKSORUBİSİN İLE KALP YETMEZLİĞİ
OLUŞTURULAN SIÇANLARDA TİMOKİNONUN
KARDİYOPROTEKTİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tanju MERCAN

DOKTORA TEZİ

2021-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

DOKSORUBİSİN İLE KALP YETMEZLİĞİ
OLUŞTURULAN SIÇANLARDA TİMOKİNONUN
KARDİYOPROTEKTİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Tanju MERCAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Semir ÖZDEMİR

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2018-3698 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2021-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyofizik Anabilim Dalı Biyofizik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 19/02/2021

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Semir ÖZDEMİR
Akdeniz Üniversitesi

.....

Üye : Prof. Dr. Nazmi YARAŞ
Akdeniz Üniversitesi

.....

Üye : Prof. Dr. Servet KAVAK
İzmir Bakırçay Üniversitesi

.....

Üye : Doç. Dr. Murathan KÜÇÜK
Akdeniz Üniversitesi

.....

Üye : Doç. Dr. Deniz AKPINAR
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi

.....

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Erol GÜRPINAR

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrencinin
Tanju MERCAN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Semir ÖZDEMİR

TEŞEKKÜR

Öncelikle, tez danışmanım Prof. Dr. Semir ÖZDEMİR'e projem boyunca rehberliği, teşviki ve desteği için teşekkür eder takdirlerimi sunmak isterim. Sizinle çalışmak bundan sonraki akademik hayatım için bana birçok şey kattı.

Bu çalışmamı hayata geçirmemde katkısı olan ve her aşamasında yardımlarını esirgemeyen başta Dr. Öğr. Üyesi Nihal ÖZTÜRK ERBOĞA'ya ve çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Orhan ERKAN ve Araş. Gör. Serkan USLU'ya,

Doktora eğitimim süresince bilgi ve birikimlerini aktaran Akdeniz Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı'nın değerli hocalarına,

Teknik olanakları ile bu çalışmanın belirli basamaklarının gerçekleşmesini sağlayan Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi çalışanlarına, Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına ve çalışmama maddi destek sağlayan Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine,

Hayatım boyunca her konuda yanımda olan, destekleyen, koşulsuz seven ve sevdiğim annem, babam ve kardeşlerime,

Son olarak hayatıma girdiğinden itibaren bana desteğini esirgemeyen canım eşim Araş. Gör. Tuğba KARAMAN MERCAN'a ve doktora tezimin son zamanlarında aramıza katılan oğlum Rüzgar MERCAN'a,

Teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada doksorubisin (DOX) kullanımının indüklediği kardiyolojik değişimler ve bu kardiyolojik değişimlere timokinon (TQ) uygulamasının etkileri incelenmiştir. Bu amaçla sıçan kalplerinden ventriküler miyositler izole edilerek elektrofizyolojik özellikleri incelenmiş ve muhtemel hücresel mekanizmalar araştırılmıştır.

Yöntem: DOX verilerek sıçanlarda kalp yetmezliği modeli oluşturuldu. 4 haftalık deney süresince DOX ve DOX+TQ gruplarına her seferinde 3 mg/kg olacak şekilde 5 kez intraperitoneal olarak DOX enjekte edildi. DOX+TQ ve KON+TQ gruplarına TQ (10 mg/kg) gavaj yoluyla verildi. 4 haftanın sonunda hayvanların kalplerinden izole edilen ventrikül miyositlerinden fraksiyonel kısalma, aksiyon potansiyeli (AP) ve AP'ye etkisi olabilecek L-tipi Ca^{+2} ve K^{+} kanallarının akımları kaydedildi. Western blot yöntemi ile protein ekspresyon seviyeleri belirlendi. Protein karbonil ve total antioksidan kapasitesinin (TAK) ölçümü kit ile yapıldı.

Bulgular: DOX grubunda sarkomer boyunda artma gözlemlenirken fraksiyonel kısalmanın azaldığı ve gevşeme süresinin uzadığı görüldü. Buna karşın TQ uygulamasının bu parametreleri düzelttiği görüldü. DOX ve DOX+TQ gruplarının AP repolarizasyon sürelerinde uzama olduğu, ancak bu uzamanın DOX grubunda anlamlı seviyeye ulaşmadığı görüldü. DOX grubunda Ca^{+2} kanal akımlarında artma görülürken TQ uygulamasının bu değişimi düzelttiği ve Ca^{+2} kanal kinetiklerini değiştirdiği görüldü. Potasyum akım genliklerinde herhangi bir değişiklik görülmezken, DOX grubunda kanal kinetiklerinin yavaşladığı bulundu. Protein ekspresyonlarına bakıldığında p-PLN/PLN ekspresyonunda DOX ve DOX+TQ grubunda artış görülürken SERCA, CAMKII, p-CAMKII ve prokaspaz-3 protein ekspresyon seviyelerinde azalma görüldü. NOX protein ekspresyonu, TAK ve protein karbonil seviyelerinde gruplar arasında herhangi bir fark görülmedi.

Sonuç: Çalışmamız sonunda DOX-indüklü kalp yetmezliğine ilişkin elektrofizyolojik anormallikleri TQ'nun tam anlamıyla önleyemediği gözlemlendi. Ayrıca, DOX'un ROS miktarını arttırmadığı ve TQ'nun da antioksidan seviyesini değiştirmedeği görüldü.

Anahtar Kelimeler: Doksorubisin, timokinon, kasılma, iyon kanalları, kalp yetmezliği

ABSTRACT

Objective: In this study, we examined the effect of thymoquinone (TQ) on cardiac changes induced by administration of doxorubicin (DOX). Therefore, electrophysiological properties and cellular mechanisms likely to affect these parameters were investigated in cardiomyocytes isolated from rat hearts.

Method: Heart failure model was performed by administering DOX. During 4-week experiment, DOX (3 mg/kg/each) was injected subcutaneously into DOX and DOX+TQ groups in 5 times. TQ (10 mg/kg) was administered to DOX+TQ and CON+TQ groups by gavage. At the end of 4 weeks, fractional shortening, action potential (AP), L-type Ca^{+2} , and K^{+} channel currents were recorded from isolated ventricular myocytes. Protein expression levels were measured by the Western blotting method. Protein carbonyl and total antioxidant capacity (TAC) were measured by kits.

Results: While an increase in sarcomere length and a decrease in fractional shortening was measured in the DOX group myocytes, the relaxation time was prolonged. TQ application improved these parameters significantly. There was a prolongation in AP repolarization time of DOX and DOX+TQ group myocytes, although in DOX group, the prolongation was not significant. While Ca^{+2} channel currents increased in DOX group, TQ application restored these changes and altered Ca^{+2} channel kinetics. While there was no change in K^{+} current amplitudes, channel kinetics were slower in the DOX group myocytes. When protein expressions were examined, p-PLN/PLN expression increased in DOX and DOX+TQ groups, while SERCA, CAMKII, p-CAMKII and procaspase-3 protein expression levels were decreased. There was no difference in NOX protein expression, TAC, and protein carbonyl levels between groups.

Conclusion: As a result, it was observed that TQ could not completely prevent the electrophysiological abnormalities associated with DOX-induced heart failure. Also, it was observed that DOX did not increase the amount of ROS and TQ did not alter the antioxidant level.

Key words: Doxorubicin, thymoquinone, contraction, ion channels, heart failure

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kardiyovasküler Sistem	3
2.1.1. Kalbin Yapısı	3
2.1.2. Kardiyak Döngü	3
2.2. Antrasiklinler	6
2.2.1. Doksorubisin	7
2.2.2. Doksorubisin Toksisitesi	8
Akut Kardiyotoksisite	8
Erken başlangıçlı Kronik Kardiyotoksisite	9
Geç Başlangıçlı Kronik Kardiyotoksisite	9
2.2.3. Kalp Yetmezliği	10
2.2.4. Kardiyotoksisite Mekanizmaları	10
Oksidatif Stres	11
DNA Hasarı	14
Demir Metabolizması	15
Hücre İçi Ca^{+2} Düzensizliği	16
Sarkomer Yapı Değişiklikleri	17
Apoptoz	17
	iii

2.3. Timokinon	18
2.3.1. Timokinonun Kimyasal Özellikleri	19
2.3.2. TQ'nun Toksisitesi	20
2.3.3. TQ'nun Tıbbi Özellikleri	20
Anti Diyabetik Etkisi	21
Anti Kanser Etkisi	21
Kardiyovasküler Hastalıklara Etkisi	23
3.GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması	25
3.2. Kardiyak Miyositlerin İzolasyonu	25
3.3. Elektrofizyolojik Kayıtlar	26
3.3.1. Kasılma Parametrelerinin Ölçülmesi	26
3.3.2. Aksiyon Potansiyelinin Ölçülmesi	26
3.3.3. L-tipi Ca^{+2} Akımlarının Ölçülmesi	27
3.3.4. Potasyum Akımlarının Ölçülmesi	28
3.3.5. Protein Ekspresyonlarının Analizi	29
3.3.6. Protein Karbonil Analizi	30
3.3.7. Total Antioksidan Kapasitesi Analizi	31
3.4. İstatiksel Analiz	33
4. BULGULAR	34
4.1. Deney Hayvanlarının Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri	34
4.2. Kasılma Parametreleri	37
4.3. Aksiyon Potansiyeli	39
4.4. L-Tipi Ca^{+2} Akımları	41
4.5. Potasyum Akımları	42
4.6. Protein Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	44
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	56

KAYNAKLAR

57

ÖZGEÇMİŞ

69



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1: İn vitro çalışmalarda TQ'nun toksik doz değerleri. Tablo (Almshawit, 2015) kaynaktan modifiye edilmiştir.

Tablo 3.1: Ürik Asit Standartlarının Hazırlanması

Tablo 4.1: Deney gruplarından ölçülen vücut ağırlıklarının ilk ve son değerleri ve yüzdelik değişimi. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi.



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Atriyum ve ventriküllerden uyarının iletilmesi için oluşan AP'lere iyonların katkıları gösterilmiştir. Kısaca, faz 0 kısmında voltaj bağımlı Na^+ kanalları açılarak içeriye Na^+ iyonlarının girişi başlatılır. Faz 1 kısmına gelindiğinde Na^+ kanalları inaktive olur ve Ca^{+2} kanalları ile geçici K^+ kanallarının aktivasyonu gerçekleşir. Faz 2 ya da diğer adıyla plato fazına gelindiğinde, içeri giren Ca^{+2} yükleri ile dışarı çıkan K^+ yükleri arasında bir eşitlik olur ve potansiyel değişmemektedir. Faz 3 kısmında artık Ca^{+2} kanalları inaktif duruma geçer ve farklı K^+ kanallarının devreye girmesiyle repolarizasyon evresine geçilmektedir. Son olarak faz 4 kısmında esas olarak K^+ kanalları tarafından kontrol edilen dinlenme fazıdır. Şekilde görüldüğü gibi her bir iyonun AP'ye zaman ve genlik olarak katkısı siyah gölgelendirme olarak verilmiştir. Şekil (Nerbonne ve Kass, 2005) kaynaktan revize edilmiştir.

Şekil 2.2: Doksorubisin, daunorubisin, epirubisin ve idarubisinin kimyasal yapısı. Şekil (McGowan ve ark., 2017) kaynaktan modifiye edilmiştir.

Şekil 2.3: Kümülatif doksorubisin dozuna bağlı olarak kalp yetmezliği gelişme riski. Şekil (Amadori, 2011) kaynaktan modifiye edilmiştir.

Şekil 2.4: DOX molekülünde süperoksit radikallerinin oluşumu. Doksorubisin, C-B halkalarında bitişik kinon-hidrokinon grupları içeren ve A halkasına glikozidik bir bağlantı ile bağlanan şeker daunosamin ile birleştirilmiş bir tetrasiklik halkadan oluşur. Hücrel oksidoredüktazların aracılık ettiği kinon kısmının bir elektron indirgemesi, oksijen molekülünü (O_2) süperoksit radikaline (O_2^-) indirgeyerek ana kinonu yeniden üreten bir semikinon radikalinin oluşmasıyla sonuçlanır. Bu, diğer ROS ve RNS oluşumuna yol açan bir reaksiyon kaskadını başlatır. Süperoksit dismutazlar O_2^- 'yi H_2O_2 'ye dönüştürebilir. O_2^- ve H_2O_2 , hidroksil radikali (OH) oluşturmak için Fe^{+2} veya diğer geçiş metali iyonları ile etkileşime girebilir. O_2^- ayrıca lipid peroksitler ve türetilmiş alkoksil ve peroksil radikalleri (ROOH , RO , ROO) oluşturan lipid peroksidasyonunu başlatabilir veya peroksinitrit (ONOO^-) oluşturmak için nitrik oksit (NO) ile reaksiyona girebilir.

Şekil 2.5: Doksorubisinin oksidatif strese katılımı ve moleküler sonuçları. Şekil (Renu ve ark., 2018) kaynaktan modifiye edilmiştir. AGEs, ileri glikasyon son ürünleri; Ang II, anjiyotensin II; Nrf2, Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2; ER, endoplazmik retikulum; NFκB, nükleer faktör-kappa B; MAPK, mitojenle etkinleşen protein kinaz; AMPK, AMP ile aktive olan protein kinaz.

Şekil 2.6: DOX, DNA'ya enterlakasyonu. A) TopIIβ DNA sentezini kolaylaştırmak için DNA süpersarımını gevşetir. B) DOX, DNA ile her iki DNA zincirinde G bazları aracılığıyla bir kompleks oluşturur ve TopIIβ aktivitesini ve DNA sentezini önler. Şekil (Mobaraki ve ark., 2017) kaynaktan modifiye edilmiştir.

Şekil 2.7: Çörek otunda bulunan uçucu olmayan yağındaki aktif ana maddeler. Şekil (Ramadan, 2007) kaynaktan modifiye edilmiştir.

Şekil 3.1: Sol ventrükül hücrelerinden kaydedilen aksiyon pontasiyeli eğrisi üzerinden ölçülen parametreler. APD₂₅, APD₅₀ ve APD₉₀ aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazının sırasıyla %25, %50 ve %90'ına düşmesi için gereken süreleri göstermektedir.

Şekil 4.1: 4 haftalık deney süresi sonunda gruplarda gözlemlenen sağ kalım yüzdelerinin değişimi

Şekil 4.2: Deney gruplarının haftalık ortalama kilo değerleri. Değerler ortalama ± SEM olarak verildi. Sırasıyla Kontrol, DOX, DOX+TQ, KON+TQ grupları için n=24, 23, 19, 18 hayvan. *p<0,05, Kontrol grubuna göre ve #p<0,05, DOX grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir.

Şekil 4.3: TQ uygulamasının kalp ağırlığına etkisi. A) Kalp ağırlığı, B) Kalp ağırlığının tibia uzunluğuna oranı, C) Kalp ağırlığının vücut ağırlığına oranı D) Ortalama kapasitans değerleri. Değerler ortalama ± SEM olarak verildi. Sırasıyla Kontrol, DOX, DOX+TQ, KON+TQ grupları için n=24, 23, 19, 18 hayvan, *p<0,05, Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir.

Şekil 4.4: Frekansı 1 Hz olan elektriksel alan uyarısı verilen kardiyomiyositlerden kaydedilen kısalma parametreleri. A) Her bir gruba ait kısalma traseleri. B) Dinlenim

durumda ölçülen sarkomer boyları. C) Fraksiyonel kısalma oranı. D) Kısalmanın maksimuma ulaşması için gereken süre (TP). E) Relaksasyonun %50'sine ulaşması için gereken süre. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. Sırasıyla Kontrol, DOX, DOX+TQ, KON+TQ grupları için n=51, 50, 47, 52 kardiyomiyosit, *p<0,05, Kontrol grubuna göre ve #p<0,05, DOX grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir.

Şekil 4.5: 1 Hz frekansında uyarılan hücrelerde ölçülen aksiyon potansiyeli parametreleri. A) Gruplar için örnek aksiyon potansiyeli kayıtları. B) Aksiyon potansiyeli genliğinin %25, %50 ve %90'ına düşene kadar geçen süre. C) Dinlenme membran potansiyeli. D) Aksiyon potansiyelinin tepe noktası. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. Sırasıyla Kontrol, DOX, DOX+TQ, KON+TQ grupları için n=18, 14, 15, 19 miyosit hücresi, *p<0,05, Kontrol grubuna göre ve #p<0,05, DOX grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir.

Şekil 4.6: Deney grupları için elde edilen L-tipi Ca^{+2} akımları. A) Her bir gruptan alınan ortalama akım değerlerinin potansiyele göre grafiği. B) Örnek L-tipi Ca^{+2} akım traseleri. C ve D) L-tipi Ca^{+2} kanalların kapanma kinetiklerinin sırasıyla yavaş ve hızlı zaman sabitleri. E) L-tipi Ca^{+2} kanallarından hücre içine giren Ca^{+2} miktarı. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. Sırasıyla Kontrol, DOX, DOX+TQ, KON+TQ grupları için n=14, 16, 14, 14 miyosit hücresi, *p<0,05, Kontrol grubuna göre ve #p<0,05, DOX grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir.

Şekil 4.7: Gruplara ait potasyum akım yoğunluğu I-V grafikleri ve zaman sabitleri. A) Tüm gruplar için I_{to} yoğunluğu ortalama traseleri. B) Her bir grup için I_{ss} yoğunluğu ortalama traseleri. C ve D) +70 mV'daki I_{to} 'lara ait sırasıyla yavaş ve hızlı zaman sabitleri. E) Her bir grup için I_{K1} yoğunluğu ortalama traseleri. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. Sırasıyla Kontrol, DOX, DOX+TQ, KON+TQ grupları için n=14, 17, 14, 13 miyosit, *p<0,05, Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir.

Şekil 4.8: Hücre içi Ca^{+2} düzenleyici proteinlerin western blot görüntüleri ve grafikleri. A) SERCA (110 kDa), B) p-PLB/PLB (24 kDa), C) CaMKII (50 kDa) ve D) p-CaMKII (50 kDa) protein ekspresyon miktarları. SERCA, CaMKII ve p-CaMKII GAPDH ile normalize edildi. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. Sırasıyla SERCA, p-PLN/PLN,

CaMKII, p-CaMKII ölçümleri için n=8, 8, 15, 11, *p<0,05, Kontrol grubuna göre ve #p<0,05, DOX grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir.

Şekil 4.9: Deney gruplarının oksidatif stres, antioksidan ve apoptoz parametreleri. A) NOX2 (55 kDa), B) Prokaspaz-3 (34 kDa) protein ekspresyon miktarları ve western blot görüntüleri. C) Tüm grupların ortalama antioksidan kapasitesi. D) Protein karbonil seviyeleri. Her bir protein ekspresyonu kendi GAPDH ekspresyonuna bölünerek normalize edildi. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. Sırasıyla NOX2, prokaspaz-3, TAK ve protein karbonil ölçümleri için n=6, 8, 10, 6, *p<0,05, Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir.

SİMGELER ve KISALTMALAR

AİK	: Antrasiklin İndüklü Kardiyotoksisite
AP	: Aksiyon Potansiyeli
APD _{25, 50, 90}	: AP repolarizasyon fazlarının %25, 50, 90 süreleri
ATP	: Adenozin Trifosfat
AV	: Atriyoventrikül
BSA	: Bovine Serum Albümin
CaMKII	: Ca ⁺² /Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz II
DİK	: DOX İndüklü Kardiyotoksisite
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DOX	: Dokсорubisin
eNOS	: Endotelyal NOS
GSH:	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GST	: Glutasyon S-Transferaz
HCl	: hHidroklorik Asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
IRP-1	: Demir Regülatör Protein 1
I _{Kr}	: Gecikmiş-Doğrultucu (Delayed Rectifier) Hızlı K ⁺ Akımı
I _{Ks}	: Gecikmiş-Doğrultucu Yavaş K ⁺ Akımı

I_{K1}	: Gecikmiş İçeriye-Doğrultucu (Inward Rectifier) K^+ Akımı
I_{ss}	: Kuyruk Akımı
I_{to}	: Geçici Dışa Yönelik Potasyum Akımları
K_{ir}	: İçeri Doğrultucu Potasyum Kanalları
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
NOX	: NADPH Oksidaz
NS	: Nigella Sativa
O_2^-	: Süperoksit Radikali
PLB	: Fosfolamban
PKA	: Protein Kinaz A
p-PLB	: Fosforile Fosfolamban
p-CaMKII	: Fosforile Ca^{+2} /Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz II
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RT_{50}	: Gevşemenin %50'sine İniş Süresi
RyR2	: Riyanodin Reseptörü 2
SA	: Sinoatriyal
SERCA	: Sarko/Endoplazmik Retikulum Ca^{+2} -ATPaz
SOD	: Süperoksit Dismutaz

SR	: Sarkoplazmik Retikulum
TAK	: Total Antioksidan Kapasitesi
TopII β	: Topoizomeraz II β
TP	: Kısılmanın Maksimuma Ulaşması İçin Gereken Süre
TQ	: Timokinon



1. GİRİŞ

Günümüzde kanser hastalığı çok sık görülmekte ve ölümlerin önemli bir kısmı kanser yüzünden olmaktadır. Kemoterapötik bir ajan sınıfı olan antrasiklinler lösemi, meme kanseri, rahim kanseri, akciğer kanseri gibi birçok farklı kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Antrasiklinler, şimdiye kadar kanser tedavisinde kullanılan en etkili ajanlardan olup, diğer kemoterapötik ajan türlerine göre daha fazla kanser türüne karşı etkilidirler (Minotti ve ark., 2004). Buna karşılık kanser tedavisi sırasında bu ajanlar istenmeyen toksik etkiler gösterebilmektedir. Bu durum antrasiklinlerin kullanımını sınırlamaktadır (Yeh ve Bickford, 2009). Antrasiklin ailesinden olan doksorubisin (DOX), modern onkolojide en güçlü ve en sık kullanılan kemoterapötik ajanlardan biridir. Ne yazık ki, bu yüksek etkili maddenin klinik kullanımı, aritmiler, akut ve geç başlangıçlı toksik kardiyomiyopati gibi kardiyotoksik yan etkilerinin olmasından dolayı sınırlandırılmıştır (Lipshultz ve ark., 1991; Wouters ve ark., 2005). DOX'un sarkoplazmik retikulumdan (SR) Ca^{+2} sızıntısına sebep olduğu bilinmektedir. (Abramson ve ark., 1988). Bu sızıntıdan dolayı sistolik Ca^{+2} konsantrasyonu azalırken, diyastolik Ca^{+2} konsantrasyonu artmaktadır (Sag ve ark., 2011). Bu şekilde Ca^{+2} konsantrasyonunun azalması klinik olarak gözlenen kalp yetmezliğine katkıda bulunmaktadır. Reaktif oksijen türleri (ROS), DOX'un kardiyotoksik yan etkilerinin gelişiminde kritik rol oynamaktadır (Kim ve ark., 2006; Timolati ve ark., 2006). Fizyolojik gerilme sırasında, kardiyovasküler sistem içindeki en önemli ROS kaynaklarından biri olan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz (NOX) aktive olmaktadır. Transvers tübüllerdeki gerilimle aktive olan NOX, ryanodin reseptörü 2'nin (RyR2) lokal olarak aktivasyonu ile sonuçlanan farklı bir spatio-temporal tarzda ROS üretir. Bu, kalpteki temel olaylardan biri olan SR'dan Ca^{+2} salınımı için gerekli olan Ca^{+2} kıvılcımlarının oluşmasını tetikler. RyR2'lerin bu esnemeye bağlı ince ayarlama yapmaları sağlıklı kardiyomiyositlerde Ca^{+2} sinyal duyarlılığını artırsa da patolojik durumlarda Ca^{+2} kıvılcımlarının aritmojenik Ca^{+2} dalgalarını tetiklemesini sağlar (Prosser ve ark., 2011). Oksidize Ca^{+2} /Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz II (CaMKII) veya oksidize protein kinaz A, RyR2'yi fosforile ederek diyastolik Ca^{+2} sızıntısını artırır. Artan diyastolik Ca^{+2} sızıntısı sonucunda, SR Ca^{+2} miktarı azalır. Bu durumda, Ca^{+2} transientlerinin genliklerinde ve kontraktilitede azalma

görülmektedir. ROS, sarko/endoplazmik retikulum Ca^{+2} -ATPazın (SERCA) adenozin trifosfat (ATP) bağlanma yerlerine doğrudan müdahale ederek fonksiyonunu azaltmaktadır. SERCA fonksiyonundaki bu azalma, SR Ca^{+2} içeriğinin ve Ca^{+2} transient genliğinin azalmasına neden olur (Köhler ve ark., 2014). Hücrelerde oluşan ROS'ların meydana getirdiği hasarları minimuma indirmeye veya yok etmeye yarayan savunma sistemleri bulunmaktadır. Hücrenin kendi savunma sistemi olduğu gibi dışarıdan alınan besinlerle de hücre bunu sağlayabilmektedir.

Çörek otu bitkisinde bulunan (Farkhondeh ve ark., 2017) timokinon (TQ) ile yapılan çalışmalarda antimikrobiyal, antiparazitik, antitümör, anti diyabetik, antioksidan, dermatolojik, anti-inflamatuar, metabolik sendrom, aterogenez, kardiyak kütlesi ve kontraktilite anormallliği, trombosit agregasyonu, kalp hızı, kan basıncı bozukluğu ve kardiyotoksisite gibi hastalıklarda terapötik etkileri yaygın şekilde gösterilmektedir (Alenzi ve ark., 2010; Gholamnezhad ve ark., 2016; Periasamy ve ark., 2016, Shabana ve ark., 2013). DOX verilerek kardiyak toksisite oluşturulan sıçanlarda TQ verilerek ROS'un azaltıldığı gösterilmiştir (Nagi ve Mansour, 2000). DOX'un oksidan ve antioksidan sistemleri değiştirdiği ve bunun da histopatolojik değişimlere sebep olduğu tespit edilmiştir. TQ uygulamasının DOX-indüklü kardiyotoksisite modelinde artmış olan ANP ve NT-proBNP düzeylerinde iyileşme sağladığı (Karabulut ve ark., 2021) ve DOX ile kanda artan AST, ALT, CK-MB, ve LDH seviyelerinde TQ uygulaması ile iyileşme olduğu gösterilmiştir (Alam ve ark., 2018). Diğer bir çalışmada DOX indüklü kalp hasarına TQ'nun sol ventrikül fonksiyonunu iyileştirerek, miyokardiyal fibroz baskılayarak ve apoptozu önleyerek, DOX'un kalbe verdiği hasarı TQ'nun azalttığı gösterilmiştir (Pei ve ark., 2018). Bu bulgular ışığında TQ'nun DOX'un neden olduğu hasarlara karşı kardiyoprotektif etkisinin olduğu ileri sürülmektedir. Çalışmamızda, 1) DOX uygulanarak oluşturulan kalp yetmezliği modelinde TQ uygulamasının kalbin kontraktil aktivitesi, aksiyon potansiyeline (AP) ve olası iyonik akımlara etkisi araştırılıp, 2) moleküler düzeyde oksidatif stres ve Ca^{+2} regülasyonundan sorumlu proteinlerdeki değişikliklerin bu etkilerdeki rolünün araştırılması hedeflenmiştir. Özetle projemiz sonucunda temel olarak, DOX ile oluşturulan kalp yetmezliği modelinde TQ uygulamasının kardiyoprotektif bir etkiye sahip olup olmadığının moleküler mekanizmalarıyla birlikte kapsamlı bir şekilde gösterilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kardiyovasküler Sistem

Kardiyovasküler sistem, merkezinde kalbin olduğu ve damarlardan oluşan kapalı bir dolaşım sistemidir. Ortalama bir insan vücudunda yaklaşık beş litre kan bulunmaktadır. Vücuttaki bu kan vasküler sistem içerisinde dolaşarak organlara yeterli miktarda oksijen ve besin sağlarken aynı zamanda dokulardaki atık ürünleri de toplamaktadır. Kardiyovasküler sistem ayrıca hormonların gerekli organlara taşınmasından da sorumludur. Bundan dolayı yaşamın sürdürülebilmesi için kardiyovasküler sistem çok önemlidir. Nitekim embriyonik gelişim sırasında gelişen ilk fonksiyonel organ kalptir (Rossant ve Howard, 2002).

2.1.1. Kalbin Yapısı

Kalp, dört odacıktan oluşan ve bağlantılı olduğu damar ağı ile birlikte vücut için hayati önem taşıyan oksijen ve besin kaynaklarının taşınmasını sağlayan organdır. Kalp, septal duvar tarafından sağ ve sol kısım olmak üzere ikiye ayrılır ve her bölgede bir tane atriyum ve bir tane de ventrikül bulunmaktadır. Kalbin sol tarafı oksijenden zengin kanı vücuda pompalarken (sistemik dolaşım), sağ tarafı ise vücuttan gelen oksijenden fakir kanı akciğerlere göndererek kanın oksijenlenmesini sağlamaktadır (pulmoner dolaşım).

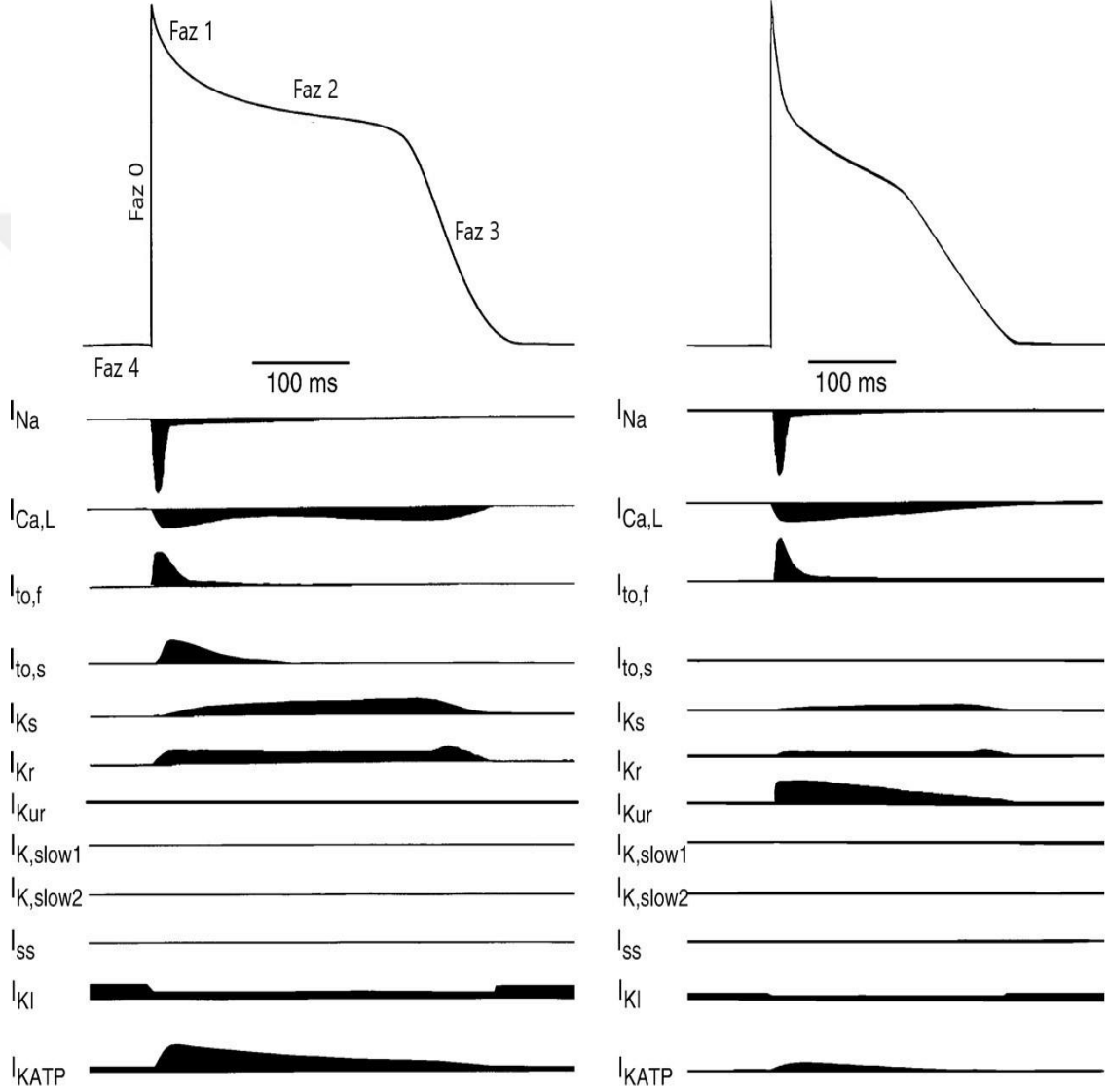
2.1.2. Kardiyak Döngü

Normal bir kalbin sağ ve sol kısımları senkronize olarak kan pompalamaktadır. Kanın pompalandıktan sonra kalbin aynı noktasına gelmesine kardiyak döngü denilmektedir. Kardiyak döngü sistol ve diyastol aşamalarından oluşmaktadır. Sistol, ventriküllerin kasılıp kanı ventriküllerden dışarıya pompalama aşamasıyken; diyastol, ventriküllerin gevşemeye başlamasıyla atriyumlardan ventriküllere kanın dolma aşamasıdır. Kalpte özel olarak gelişmiş kendi kendine uyarı üretebilen özel noktalar bulunmaktadır. Fizyolojik bir kalpte frekansı en yüksek olan sinoatriyal (SA) düğüm uyarının başlangıç noktasıdır. SA düğümünden başlayan uyarı atriyumlar boyunca ilerler ve atriyumların kasılması sonucunda her iki atriyumda bulunan kan ventriküllere boşalır. Daha sonra uyarı atrioventriküler (AV) düğüme gelir ve buradan AV düğümünün uzantısı olan his demeti aracılığıyla

ventriküllere ulaşır. Ventriküllere gelen uyarı sonucu ventriküller kasılarak içinde muhafaza ettiği kanı vücuda ve akciğerlere gönderir.

Kalp üzerinde oluşan uyarının iletilmesini sağlayan bu potansiyel değişikliğe AP denir. AP'nin oluşmasında görev alan başlıca iyonlar Na^+ , K^+ ve Ca^{+2} 'dur (Şekil 2.1). Hücreye gelen uyarı sonucunda Na^+ kanalları aktivasyonunun ardından hızlı bir şekilde AP'yi başlatmaktadır (Faz 0). Daha sonra AP'de görülen hızlı inişten sorumlu geçici-dışa doğru K^+ akımları (I_{to}) devreye girer ve hücre repolarize olmaya başlar. Bu evreye faz 1 evresi denilmektedir. İki farklı I_{to} akım türü tanımlanmıştır. Bunlar hızlı I_{to} ($\text{I}_{\text{to,f}}$), ve yavaş I_{to} ($\text{I}_{\text{to,s}}$) olarak adlandırılmaktadır (Xu ve ark., 1999). Kardiyak AP'yi diğer AP'lerden ayıran en önemli özellik, uzun bir plato fazının olmasıdır. Voltaj kapılı Ca^{+2} kanallarının aktivasyonu ile oluşan bu evreye faz 2 denilmektedir. Bu evrede aktif olmuş Ca^{+2} kanallarından giren Ca^{+2} iyonları uyarılma-kasılma çiftlenimini tek başına tetiklemek için yeterli değildir. Hücrenin membranında bulunan voltaj kapılı Ca^{+2} kanallardan giren Ca^{+2} iyonları SR'daki RyR2'ye bağlanarak SR içerisinde bulunan depolanmış Ca^{+2} iyonlarının hücre içine boşalmasını sağlamaktadır. Buna Ca^{+2} bağımlı Ca^{+2} salınımı denilmektedir. Hücre içinde artan Ca^{+2} konsantrasyonu ile Ca^{+2} troponine bağlanır. Bu bağlanma sonucunda troponinde konformasyonel bir değişiklik olur ve bu değişiklik ile aktin molekülündeki miyozin bağlanma noktaları açığa çıkar. Böylelikle aktin-miyozin birbirlerine bağlanır. Bu şekilde kasılma meydana gelir (Bers, 2002). Plato fazından sonra hücre tekrar dinlenim durumuna geçeceği potansiyel seviyesine doğru ilerler. Bu aşamaya faz 3 denir. Ca^{+2} kanallarının inaktivasyonu ile baskın hale gelen K^+ kanalları hücreyi dinlenim durumuna getirmekte önemli rol oynamaktadır. Birden fazla K^+ kanalı bu fazda görev almaktadır. Bunlar gecikmiş-doğrultucu (delayed rectifier) hızlı K^+ akımı (I_{Kr}), gecikmiş-doğrultucu yavaş K^+ akımı (I_{Ks}) ve gecikmiş içeriye-doğrultucu (inward rectifier) K^+ akımı (I_{K1}) olarak adlandırılır (Roden, 1998). Bu kanalların repolarizasyon evresine katkılarını canlının türü, parasempatik ve sempatik girdiden gelen etkiler ve kalp hızı gibi faktörler belirlemektedir. I_{K} bileşenlerinin diğer K^+ akımlarından farkı aktivasyonun nispeten geç olmasıdır. Faz 3 repolarizasyon evresinin bitiminde hücrenin dinlenim durumuna geri döndüğü evreye faz 4 evresi denilmektedir. Bu evre kalpte diyastol sürecine denk gelmektedir. Bu evrede normal şartlarda çoğu voltaj kapılı kanalların kapalı olmasından dolayı çok az iyon hareketi görülmektedir.

Dinlenme membran potansiyeli, K^+ denge potansiyeline yakın olmasından dolayı, yani K^+ kanallarının geçirgenliği Na^+ ve Ca^{+2} kanallarından daha büyüktür. Miyositin tipine göre dinlenme membran potansiyeli -60 ile -90 mV arasında değişmektedir (Whalley ve ark., 1995; Grunnet, 2010).



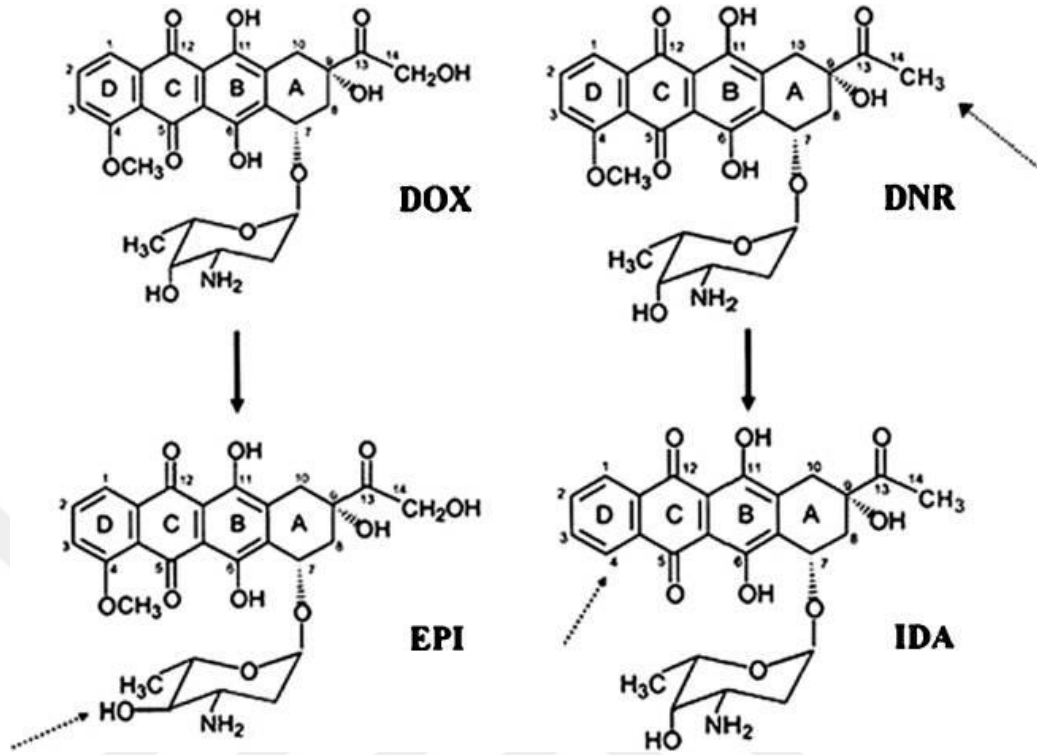
Şekil 2.1: Atriyum ve ventriküllerden uyarının iletilmesi için oluşan AP'lere iyonların katkıları gösterilmiştir. Kısaca, faz 0 kısmında voltaj bağımlı Na^+ kanalları açılarak içeriye Na^+ iyonlarının girişi başlatılır. Faz 1 kısmına gelindiğinde Na^+ kanalları inaktive olur ve Ca^{+2} kanalları ile geçici K^+ kanallarının aktivasyonu gerçekleşir. Faz 2 ya da diğer adıyla plato fazına gelindiğinde, içeri giren Ca^{+2} yükleri ile dışarı çıkan K^+ yükleri arasında bir eşitlik olur ve potansiyel değişmemektedir. Faz 3 kısmında artık Ca^{+2} kanalları inaktif duruma geçer ve farklı K^+ kanallarının devreye girmesiyle repolarizasyon evresine geçilmektedir. Son olarak faz 4 kısmında esas olarak K^+ kanalları tarafından kontrol edilen dinlenme fazıdır. Şekilde görüldüğü gibi her bir iyonun AP'ye zaman ve genlik olarak katkısı siyah gölgelendirme olarak verilmiştir. Şekil (Nerbonne ve Kass, 2005) kaynaktan revize edilmiştir.

2.2. Antrasiklinler

Antrasiklinler sitotoksik antibiyotikler olmasına rağmen toksisitesi yüksek olmasından dolayı antibiyotik olarak kullanılmamaktadır (Rahman ve ark., 2007). Bununla birlikte tümör tedavisi için şimdiye kadar bulunan en efektif ilaçlardan birisidir. 50 yılı aşkın süredir kullanılan antrasiklinler günümüzde katı tümörler, yumuşak doku sarkomlar ve hematolojik maligniteler gibi birçok kanser türlerine iyi gelmektedir. Fakat son yıllarda kanserin moleküler temelini anlaşılmaması kanser kemoterapisinde avantaj sağlıyor olmasına ve birçok ilacın kanser tedavisinde ve hasta sağ kalımında gelişim gösteriyor olmasına rağmen, bu ilaçların yararlarının yanında özellikle kardiyovasküler sistem üzerinde gösterdiği zararlarından dolayı kullanımı konusunda bir dengenin gözetildiği anlaşılmaktadır (Hahn ve ark., 2014; Ewer ve Ewer, 2015).

İlk antrasiklin *Streptomyces peucetius* bakterisinden türetilen daunorubisindir. Daha sonra daunorubisinden daha etkili olan DOX üretilmiştir. Antrasiklinler genel olarak DNA baz çiftleri arasına girerek, serbest oksijen radikallerini arttırarak ve topoizomerez IIβ'yı (TopIIβ) inhibe ederek kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemektedirler. DOX, birçok farklı tümör tipine karşı geniş spektrum aktivitesi sergiler ve bu nedenle onkolojik tedavinin ana dayanaklarından biri olmaya devam eder

Antrasiklinlerin sıklıkla kullanılan dört çeşidi bulunmaktadır. Bunlar DOX, daunorubisin, epirubisin ve idarubisindir. Şekil 2.2'de görüldüğü gibi hepsinin yapıları birbirine benzese de kullanıldığı yerler ve etkileri arasında farklılıklar bulunmaktadır (McGowan ve ark., 2017). Antrasiklinler, bir şeker grubuna bağlı tetrasiklik bir halka yapısından oluşmaktadırlar. DOX ile daunorubisin arasındaki tek fark, DOX'un yan zincirinin alkol ile biterken, daunorubisin yan zincirinde bir metil grubu ile sonlanmaktadır. Bu farklılık, iki antrasiklinin aktivitesinde önemli sonuçlar ortaya çıkarmaktadır.



Şekil 2.2: Doksorubisin, daunorubisin, epirubisin ve idarubisinin kimyasal yapısı. Şekil (McGowan ve ark., 2017) kaynaktan modifiye edilmiştir.

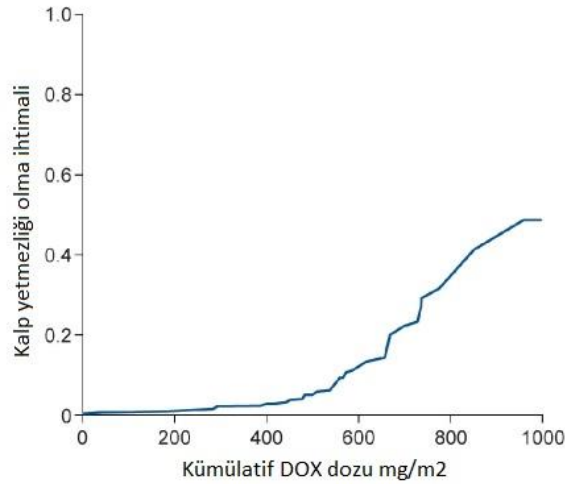
DOX kanser tedavisinde çok başarılı olmasına rağmen, yanında getirdiği birçok zararlı yan etkileri de bulunmaktadır. Bunlardan en önemlileri tümör hücrelerinde direnç gelişimi, sağlıklı dokularda toksisite ve en önemlisi kronik kardiyomiyopati ve konjestif kalp yetmezliğidir. Bu yüzden DOX kullanımı kümülatif olarak 600 mg/m^2 geçmeyecek şekilde sınırlandırılmıştır (Minotti ve ark., 2004).

2.2.1. Doksorubisin

Antrasiklin türevlerinden biri olan DOX, kanser tedavilerinde kullanılan önemli bir kemoterapötik ilaçtır. Doğal bileşiği olan daunorubisinin ölümcül kardiyotoksisite oluşturması sonucu (Tan ve ark., 1967) daha az zararlı bileşik bulma çabasına girilmiş ve *Streptomyces* bakterisi mutasyona uğratarak farklı bir antibiyotik üretilmiştir. Bu yeni bileşiğin kardiyotoksisitesi aynı kalmasına rağmen daha yüksek terapötik indeks göstermiştir (Di Marco ve ark., 1969). Bu bileşik hematolojik kanserler, yumuşak doku sarkomaları ve çeşitli karsinoma tipleri gibi kanser çeşitlerinde etkili olarak kullanılmaktadır ve ticari adı Adriyamisin olarak da bilinmektedir.

2.2.2. Dokсорubisin Toksisitesi

DOX, birçok farklı kanser tedavisinde kullanılmasına rağmen, kullanımının oluşturduğu toksisiteden dolayı doz miktarı sınırlandırılmıştır. İyi bilinen yan etkileri genellikle bulantı, kusma ve saç dökülmesidir (Carvalho ve ark., 2009). Görülen bu etkiler doz miktarına bağlı olarak değişmekte ve doz miktarı arttıkça görülen etkiler de daha ölümcül olarak ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.3). Eğer alınan doz miktarı 550 mg/m^2 'nin üzerine çıkarsa, kanser tedavisinde başarılı olunsa bile %50 ölüm oranı ile kardiyomiyopati gelişmesi muhtemeldir (von Hoff ve ark., 1979). Bunun gibi etkiler hastaya kanserin kendisinden daha büyük bir tehdit oluşturmaktadır.



Şekil 2.3: Kümülatif dokсорubisin dozuna bağlı olarak kalp yetmezliği gelişme riski. Şekil (Amadori, 2011) kaynaktan modifiye edilmiştir.

Şu anda, DOX'un kardiyotoksisite mekanizması tam olarak çözülememiştir, ancak son çalışmalar ciddi toksisite oluşumunu potansiyel olarak artırabilecek yaş, yaşam tarzı seçimleri, kardiyotoksik anti-tümör ilaçları ile kombinasyonu ve önceki radyasyon tedavisi gibi risk faktörleri olduğu gösterilmiştir (Chatterjee ve ark., 2010). DOX'a bağlı kardiyotoksisite 3 kategoriye ayrılmaktadır. Bunlar akut, erken ve geç başlangıçlı kronik kardiyotoksisitedir (Yeh ve Bickford, 2009).

Akut Kardiyotoksisite

Akut kardiyotoksisite hastaların %1'den azında görülmektedir. Etkisi uygulamanın hemen ardından veya tedaviyi takip eden iki hafta içinde görülür ve genel olarak etkileri geçicidir

(Wouters ve ark., 2005). Ritim bozuklukları, miyokard kontraktilitesinde geçici azalmalar ve/veya hipotansiyon perikardit, geçici aritmiler veya sol ventrikül bozukluğu olarak ortaya çıkan etkileri görülebilmektedir (Billingham ve ark., 1978; Steinberg ve ark., 1987). Sol ventrikül fonksiyonundaki görülen bozulma kardiyak fonksiyonda gösterilen iyileşmeler ile belgelendiği için kalıcı olmamaktadır (Billingham ve ark., 1978).

Erken başlangıçlı Kronik Kardiyotoksisite

Antrasiklin indüklü kardiyotoksisitenin (AİK) en yaygın belirtisi akut kardiyak toksisitedir. Bir antrasiklin uygulamasından sonra veya sırasında hastalar, akut hipotansiyon veya geçici ritim bozuklukları olarak ortaya çıkan akut kardiyak toksisite yaşayabilir. Bu genellikle geçicidir ve müdahale olmaksızın düzelir (Kremer ve ark., 2002). Semptomlar genel olarak ilaç tedavisinin başlangıcını takip eden bir yıl içinde kalp yetmezliğine yol açabilen dilate kardiyomiyopati şeklinde ortaya çıkar. Erken başlangıçlı kronik AİK'in insidansını ve klinik özelliklerini aydınlatmak için yapılan bir çalışmada, hastaların %9'unda AİK gelişmiş ve bu hastaların da %98'i bu etkileri tedaviden sonraki bir yıl içerisinde göstermiştir (Cardinale ve ark., 2015). AİK'nin önemli bir göstergesi olan sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunda bir azalmanın olması üzerine, DOX uygulanan hastalara kalp yetmezliği tedavisi için enalapril kullanılmış ve hastaların %71'i ancak kısmi bir iyileşme gösterirken, %11'i tam iyileşme göstermiştir (Cardinale ve ark., 2015).

Geç Başlangıçlı Kronik Kardiyotoksisite

Geç başlangıçlı kronik kardiyotoksisite çoğunlukla çocukluk çağında kanser tedavisi gören kişilerde görülür. Tedavinin tamamlanmasından en az 1 yıl sonra ortaya çıkar. DOX'a maruz kalındıktan uzun bir süre herhangi bir belirti göstermeden on yıllar sonra da ortaya çıkabilmektedir (Lipshultz ve ark., 2013). Antrasiklin tedavisinden sonra kanseri yenen çocuklarda, tedavinin bitiminden 30 yıl sonra yaklaşık yüzde 75'inde kalp yapısı ve işlevinde anormalliklere rastlanmıştır (Lipshultz ve ark., 1991; Lipshultz ve ark., 1995) ve bu anormallikler çoğu hastada ileri seviyede görülmüştür. Çocuklarda yapılan çalışmalarda geç başlangıçlı kronik kardiyotoksisitenin ortalama 6 yıl sonra görülme sıklığı %1,6 ile %2,8 şeklinde bulunmuştur (von Hoff ve ark., 1979; Kremer ve ark., 2001). Tedavinin başlamasından 15-20 yıl sonra antrasiklinin neden olduğu klinik kalp

yetmezliği riskinin %4-5 olduğu tahmin edilmiştir (Green ve ark., 2001; Kremer ve ark., 2001).

Geç başlangıçlı kronik kardiyotoksisite için yüksek kümülatif doz, yaş ve antrasiklinlere daha önceden maruz kalma gibi risk faktörleri de bulunmaktadır (Wouters ve ark., 2005). Yüksek kümülatif antrasiklin dozu, geç kardiyotoksisite için iyi bilinen bir risk faktörüdür. Yapılan çalışmalarda yaklaşık 250-300 mg/m²'den fazla antrasiklin alan hastalarda kardiyak performansın kötüleştiği görülmüştür (Nysom ve ark., 1998; Sorensen ve ark., 2003). Kümülatif doz, hem art-yükü hem de kasılmayı etkilemektedir (Lipshultz ve ark., 1991).

2.2.3. Kalp Yetmezliği

İnsan vücudunda bulunan metabolik olarak en aktif organ olan kalbin kanser tedavisinde kullanılan ilaçların hücresel döngüyü ve kontrolsüz olarak metabolizmayı bozmaya yönelik etkilerinden dolayı bu bireylerde kalp yetmezliği görülmesi muhtemeldir. Kullanılan doz, kullanım sıklığı ve başka ilaçlarla beraber kullanımı kardiyomiyopati oluşma olasılığını etkilemektedir (Yeh ve Bickford, 2009).

Antrasiklinlerin kalpte oluşturduğu olumsuz etkilerin önlenmesi için birçok çalışma yapılmıştır. Fakat yapılan çalışmalarda tam anlamıyla bir sonuç çıkmadığı için, antrasikline maruz kalma sonucu bireylerde kalp yetmezliği görülmesi devam etmektedir. Antrasikline bağlı kalp yetmezliği genel olarak tedaviden on yıllar sonra ortaya çıktığı için önleyici stratejiler geliştirmek zorlaşmaktadır (Sawyer, 2013). Bu nedenle antrasiklinlerin kardiyomiyositlerde meydana getirdiği hasarın spesifik mekanizması belirsizliğini korumaktadır. Serbest radikal oluşturan hem enzimatik hem de mitokondriyal solunum zinciri ve enzimatik olmayan demir (Fe⁺²)-antrasiklin kompleksinin olası mekanizmalar olabileceği ileri sürülmüştür. Bu mekanizmaların hepsi ROS retmektedir (Olson ve Mushlin, 1990).

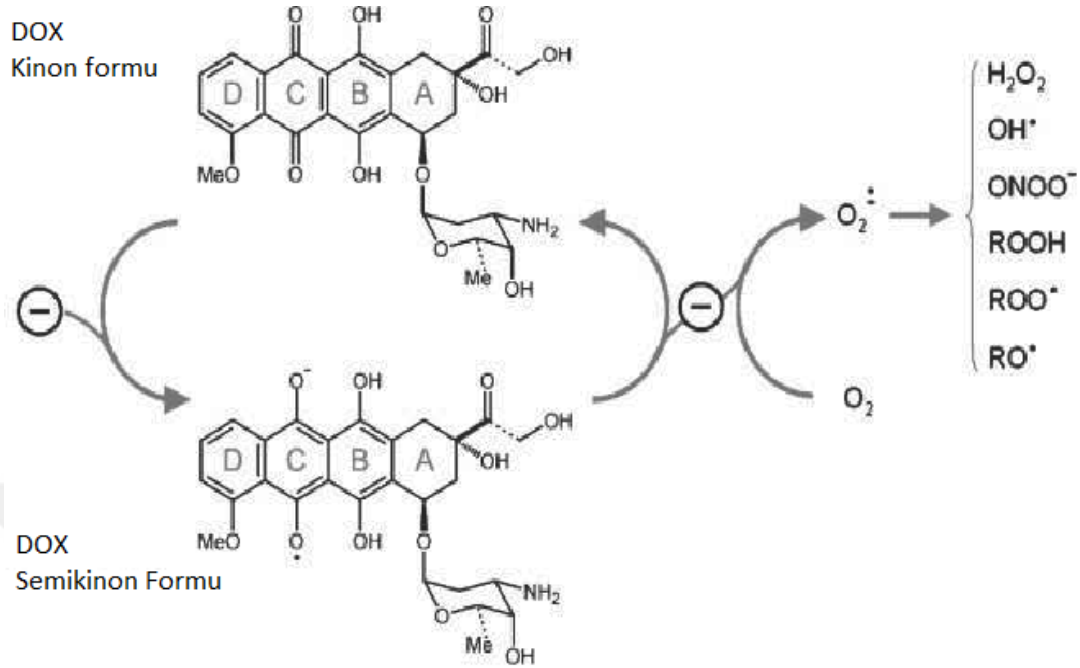
2.2.4. Kardiyotoksisite Mekanizmaları

Kemoterapiye bağlı kardiyotoksik etkisinin yüksek olduğu bilinmesine rağmen (Groarke ve Nohria, 2015), antrasiklinlerin kardiyomiyositlere vermiş olduğu geri dönüşümsüz hasarın mekanizması tam olarak bilinmemektedir (şterba ve ark., 2011). alışmalar

DOX'un oluşturduğu olumsuz kardiyak etkilerin ilerleyici ve çok faktörlü olduğunu göstermektedir. Bu etkileri, doku ve hücrenel seviye ve hücre altı seviye olmak üzere iki kısım şeklinde incelenmektedir. Doku ve hücrenel seviyede DOX, mitoz sonrası farklılaşmış kardiyomiyositlerin sitotoksitesine sebep olmaktadır ve buna bağlı olarak hücrenel boyutta ktle kaybına neden olmaktadır (Billingham ve ark., 1978). Hücre altı düzeyde bakıldığında, DOX mitokondriyal membranın ve miyofibril düzenlemesinin bozulmasına neden olmaktadır (Rahman ve ark., 1982). DOX'a bağlı kardiyomiyopatinin olası mekanizmaları arasında bozulmuş Ca^{+2} dengesi, değişmiş gen ve protein ekspresyonu, TopII β 'nın inhibisyonu yoluyla DNA kırılması ve hücrelerin mitokondrisine zarar veren oksijen radikallerin oluşumu yer alır (Rahman ve ark., 1982; Gewirtz, 1999; Lipshultz ve ark., 2014).

Oksidatif Stres

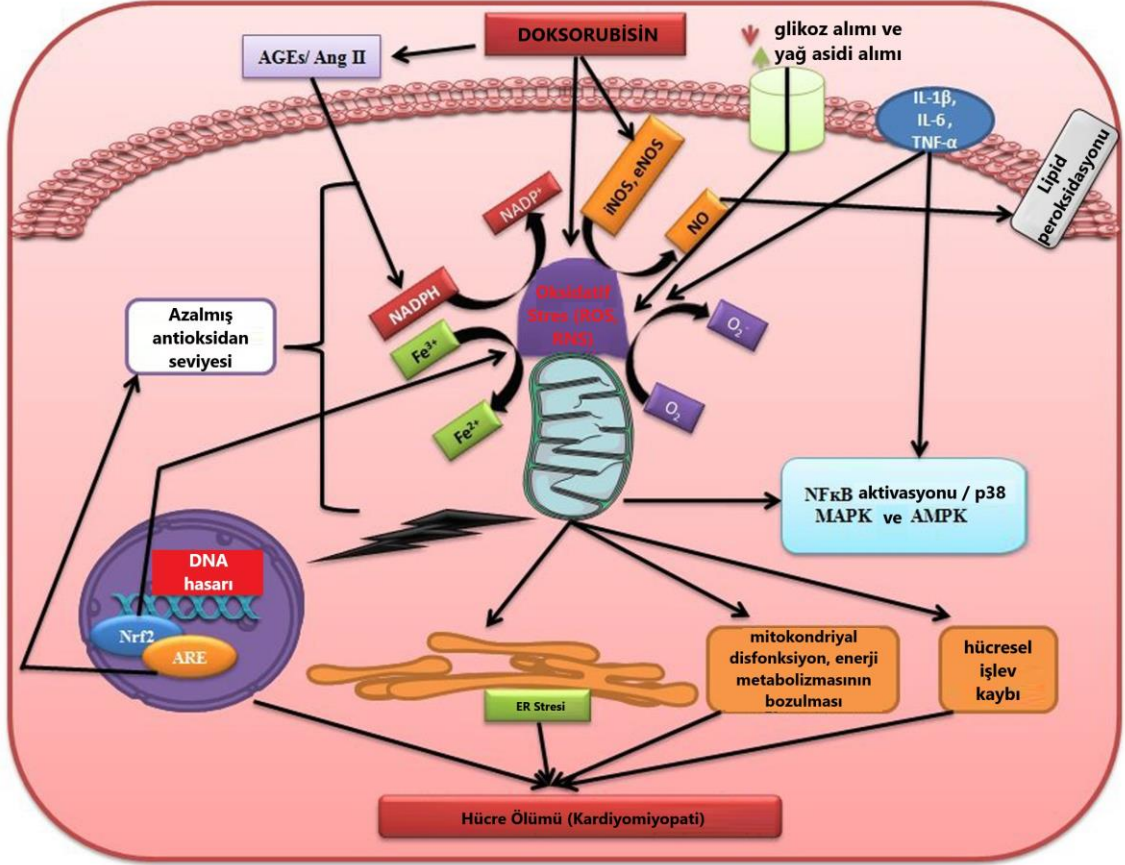
DOX'un keşfinden bu yana, oksidatif stres DOX indüklü kardiyotoksisitenin (DİK) karmaşık patofizyolojisini açıklamak için en sık önerilen mekanizmadır (Takemura ve Fujiwara, 2007; şimnek ve ark., 2009; Salazar-Mendiguchía ve ark., 2014). Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş tek elektronun bulunduğu atom ve molekül olarak tanımlanır. Bu nedenle elektronları eşleştirilmiş aynı atom ve moleküllere kıyasla son derece reaktiflerdir. Birden fazla radikal cinsi olmasına rağmen, oksijenden türetilen radikaller, biyolojik sistemler için en önemli olanıdır ve genellikle ROS olarak bilinirler. ROS birçok hücrede normal fizyolojik yanıt olarak üretilmekte ve düşük yoğunlukta bulunduğu takdirde yararları olduğu bilinmektedir (Valko ve ark., 2007). Fizyolojik koşullar altında biyokimyasal antioksidan sistemler tarafından ROS seviyesi düşük ve dengede tutulmaktadır. Bu denge eğer ROS seviyesindeki artış yönünde bozulursa, artan ROS'a bağlı oksidatif stres oluşur. Kalp hücrelerinde peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzimlerin diğer hücrelere göre daha düşük seviyelerde olması nedeniyle oksidatif hasara son derece eğilimlidirler. Ek olarak, DOX'un kimyasal yapısı, moleküler oksijenle (bir elektron alıcısı) reaksiyona girebilen ve hızla ana bileşiğe geri dönebilen kararsız bir metabolit olan bir semikinona indirgenebilen kinon grupları içerir (şekil 2.4). Bu döngü mitokondri içerisinde süperoksit anyon radikallerinin oluşumuna neden olarak kardiyotoksisiteye sebep olur (Ichikawa ve ark., 2014; Raj ve ark., 2014; Salazar-Mendiguchía ve ark., 2014; Varricchi ve ark., 2018).



Şekil 2.4: DOX molekülünde süperoksit radikallerinin oluşumu. Dokсорubisin, C-B halkalarında bitişik kinon-hidrokinon grupları içeren ve A halkasına glikozidik bir bağlantı ile bağlanan şeker daunosamin ile birleştirilmiş bir tetrasiklik halkadan oluşur. Hüresel oksidoredüktazların aracılık ettiği kinon kısmının bir elektron indirgemesi, oksijen molekülünü (O_2) süperoksit radikaline ($O_2^{\bullet -}$) indirgeyerek ana kinonu yeniden üreten bir semiketon radikalının oluşmasıyla sonuçlanır. Bu, diğer ROS ve RNS oluşumuna yol açan bir reaksiyon kaskadını başlatır. Süperoksit dismutazlar $O_2^{\bullet -}$ 'yi H_2O_2 'ye dönüştürebilir. $O_2^{\bullet -}$ ve H_2O_2 , hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) oluşturmak için Fe^{+2} veya diğer geçiş metali iyonları ile etkileşime girebilir. $O_2^{\bullet -}$ ayrıca lipid peroksitler ve türetilmiş alkoksil ve peroksil radikalleri ($ROOH$, RO , ROO) oluşturan lipid peroksidasyonunu başlatabilir veya peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşturmak için nitrik oksit (NO) ile reaksiyona girebilir.

Kalp diğer birçok organa göre çok fazla çalışmaktadır. Günde ortalama bir yetişkin bireyde 100.000 atım yaparak 10 ton civarında kanı vücuda pompalamaktadır. Kalpte bu işlemlerin gerçekleşmesi için muazzam miktarda enerji gerekmektedir. Bu yüzden diğer birçok hücreye oranla kalp hücrelerinde mitokondri sayısı fazladır. Buna bağlı olarak da mitokondride gözlemlenecek herhangi bir aksaklık kalbi daha fazla etkileyecektir (Goffart ve ark., 2004). Mitokondri kalpte DİK'ten en fazla etkilenen organdır. Bunun en büyük sebebi katyonik bir ilaç olan DOX'un kardiyolipine yüksek olan affinitesidir. Bunun sonucunda mitokondrinin iç membranında geri dönüşsüz bir kompleks oluşmaktadır (Goormaghtigh ve ark., 1990; Ghigo ve ark., 2016). Mitokondri içinde bulunan elektron taşıma zincirinde bulunan proteinlerin düzgün çalışabilmesi için kardiyolipin gereklidir. DOX ile kompleks oluşturan kardiyolipin elektron taşıma zinciri sonucunda normalden daha fazla süperoksit anyon radikali oluşumuna neden olmaktadır (Singal ve ark., 1997).

Böylelikle ROS farklı şekillerde kardiyomiyosit ölümüne sebep olmaktadır. Ayrıca, kasılma için gerekli ATP'yi sağlamakta olan mitokondride oluşacak fizyolojik aksaklık, hücrenin kasılma ve gevşemesinde anormalliklerin oluşmasına sebep olur (Lipshultz ve ark., 1991; Ventura-Clapier ve ark., 2004). Miyokardial mitokondri, Ca^{+2} dengesinde de rol aldığı için mitokondride oluşacak fizyolojik hasarlar hücre içi Ca^{+2} dengesini de etkilemektedir (Crompton ve Costi, 1988).



Şekil 2.5: Doksorubisinin oksidatif strese katılımı ve moleküler sonuçları. Şekil (Renu ve ark., 2018) kaynaktan modifiye edilmiştir. AGEs, ileri glikasyon son ürünleri; Ang II, anjiyotensin II; Nrf2, Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2; ER, endoplazmik retikulum; NfκB, nükleer faktör-kappa B; MAPK, mitojenle etkinleşen protein kinaz; AMPK, AMP ile aktive olan protein kinaz.

DOX indüklü ROS'un oluşumunda mitokondriden farklı olarak nitrik oksit (NO) sentaz (NOS) ve NOX yolları da bulunmaktadır. Bu enzimler DOX ile etkileşime girerek oksidatif stresi arttırmaktadır (Salazar-Mendiguchía ve ark., 2014; Ghigo ve ark., 2016). NOS, L-arginin ve oksijenden NO üretilmesinden sorumlu bir enzimdir (Kalivendi ve ark., 2001; Förstermann ve Sessa, 2012). DOX, endotelial NOS (eNOS)'un redüktaz

alanına doğrudan bağlanarak süperoksit oluşumuna neden olmaktadır (Vásquez-Vivar ve ark., 1997). Daha önceki bir çalışmada, NOS aracılığı ile üretilen süperoksitin kardiyomiyositlere verdiği zararlar gösterilmiştir (Garner ve ark., 1999).

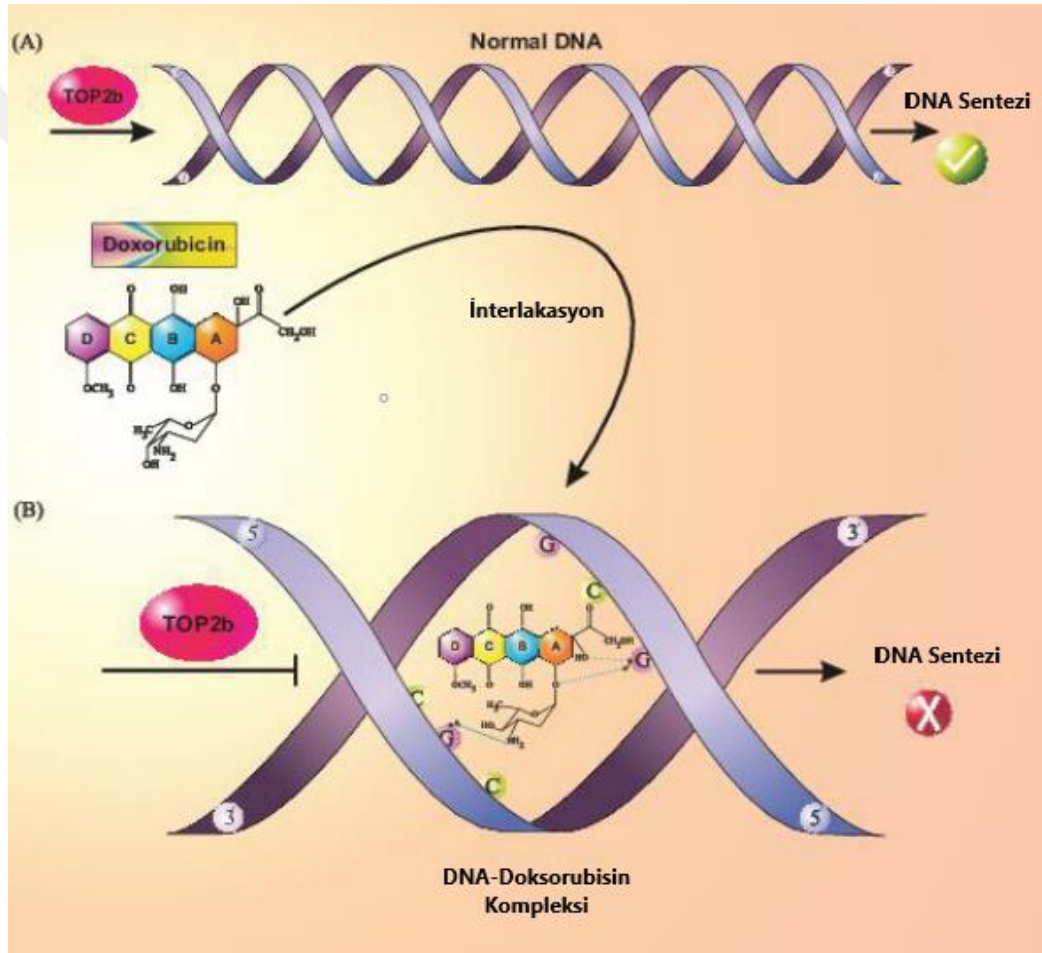
NOX ile ilgili yapılan çalışmalarda, bu enzim miyokardiyal ROS'un önemli bir kaynağı olarak tanımlanmaktadır (Byrne ve ark., 2003; Grieve ve ark., 2006; Looi ve ark., 2008). Prototipik NOX, aktivasyonla ilişkili birkaç sitozolik alt birimle (p47phox, p67phox, p40phox ve Rac) birlikte bir katalitik çekirdek (NOX2/p22phox) içeren çok bileşenli kompleks bir yapıdır (Cave ve ark., 2006). NOX1-5 arasında farklı NOX izoformları tanımlanmıştır. Kardiyomiyositler, fibroblastlar ve endotel hücrelerinde eksprese edilen NOX2 ve NOX4 başlıca kardiyak izoformlarıdır (Byrne ve ark., 2003; Cave ve ark., 2006). Bu enzimler, bir elektronun NADPH'den kinon DOX'a transferine aracılık ederek DOX semikinin radikalini oluşmasına sebep olur. Sonuç olarak, NOS'lara benzer şekilde süperoksit üretebilirler. Semikinin radikali ayrıca hidrojen peroksit (H_2O_2) ile reaksiyona girerek hidroksil radikalleri oluşturur (Octavia ve ark., 2012a). Ayrıca, NOX'a bağımlı ROS üretimi, miyosit hipertrofisi, kontraktıl disfonksiyon, apoptoz ve fibroz gibi kardiyak yeniden şekillenmenin birkaç temel bileşenini düzenler (Şekil 2.5) (Bendall ve ark., 2002; Qin ve ark., 2006).

DNA Hasarı

DOX'un kansere karşı oluşturduğu etkinin en büyük kısmı tümör hücre DNA'sına yaptığı geri dönüşü olmayan hasar olabilir. Sıçan modelinde DİK indikatörü olarak TopII β tanımlanmıştır (Cirillo ve ark., 2000). TopII β tüm hücrelerde bulunur ve replikasyon, transkripsiyon veya rekombinasyon sırasında DNA ipliklerini çözer. DOX, DNA zincirlerine interkalasyon (DNA molekülünde çeşitli ligandların birleşmesini) yoluyla DNA sentezini önleyen bir TopII β zehiri olarak bilinir. TopII β , DNA topolojisini değiştirerek kardiyomiyositin ölümüne sebep olabilecek çift sarmallı DNA'nın geçici kırılmasına ve DNA süpersarım düzensizliğine yol açmaktadır (Şekil 2.6) (Lipshultz ve ark., 1997).

DİK'de p53 ve apoptotik yolların anormal düzeyde aktivasyonu gösterilmiştir (Nousiainen ve ark., 1999). DOX bağımlı ROS miktarının artmasının sebebinin, TopII β bağımlı olarak antioksidan enzimlerinin genlerindeki ekspresyonun azalmasından

kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Minotti ve ark., 1996). Normal koşullarda hücrede DNA hasarı görüldüğünde, DNA onarım yolları aktive olmaktadır. Bu yolaktaki enzimlerin bazıları DNA kopyalanmadan önce veya replikasyondan sonra DNA'dan oksitlenmiş bazları ayırırken, bazıları da nükleotidik havuzdan oksitlenmiş bazları çıkarır (Takao ve ark., 1999). Bu oksitlenmiş bazların, DNA replikasyonunun önlenmesine ve DNA polimeraz düzeltme hatalarının artmasına yol açan mutajenik bileşikler olduğu gösterilmiştir (Parker ve ark., 2001).



Şekil 2.6: DOX, DNA'ya enterlakasyonu. A) TopIIβ DNA sentezini kolaylaştırmak için DNA süpersarımını gevşetir. B) DOX, DNA ile her iki DNA zincirinde G bazları aracılığıyla bir kompleks oluşturur ve TopIIβ aktivitesini ve DNA sentezini önler. Şekil (Mobaraki ve ark., 2017) kaynaktan modifiye edilmiştir.

Demir Metabolizması

Kabul edilen bir diğer önemli mekanizma ise Fe^{+2} ile DOX'un oluşturduğu kompleksin mitokondrinin iç zarında serbest radikal oluşmasına neden olmasıdır. Mitokondrinin

kardiyomiyositlerin yaklaşık olarak %40'ını kapladığı düşünülürse, bu organel ROS üretimi için önemli bir yer tutmaktadır (Goffart ve ark., 2004).

DOX'un mitokondrinde bulunan kardiyolipine bağlanması ile mitokondride DOX birikimine neden olur. ATP üretimi sırasında mitokondride redoks döngüleri sırasında önemli miktarda H_2O_2 üretilmektedir. Fe^{+2} 'nin varlığında fenton reaksiyonu sonucunda H_2O_2 yüksek derecede reaktif olan hidroksil radikali ($OH^\cdot$) dönüşmektedir (Gutteridge, 1989; Minotti ve ark., 2004).

DOX, hücre içindeki Fe^{+2} 'i taşıyan veya bağlayan proteinlerin aktivitesine müdahale ederek Fe^{+2} metabolizması üzerinde etki göstermektedir. Sonuç olarak DOX hücre içindeki serbest Fe^{+2} 'de bir artışa neden olur ve bu artış sonucu hücre içi serbest radikal üretimine yol açabilir (Minotti ve ark., 2001). Ayrıca DOX, hücre içindeki serbest Fe^{+2} 'i azaltan ve Fe^{+2} taşıyıcı gibi çalışan ferritinin ağır ve hafif zincirlerinin Fe^{+2} 'e duyarlı elamanları ile de etkileşime girebilmektedir. Buna bağlı olarak bu proteinlerde oluşacak hasar hücre içi serbest Fe^{+2} miktarında artışa neden olacaktır ve bu artış nedeni ile yine serbest radikal üretiminde artış görülebilmektedir (Canzoneri ve Oyeler, 2008).

Hücre İçi Ca^{+2} Düzensizliği

Ca^{+2} , hücrenin kasılma sırasında görev alan kilit bir iyondur. Hücrenin, kasılma-gevşeme sırasında Ca^{+2} seviyesini çok iyi bir şekilde kontrol etmesi gerekmektedir. Kasılma aktivitesi sırasında Ca^{+2} seviyesinde oluşabilecek herhangi bir bozulma kardiyak hipertrofi ve kalp yetmezliğinde olduğu gibi kontraktıl disfonksiyona sebep olabilmektedir (MacLennan ve Chen, 2009; Lee ve ark., 2012). Birçok çalışmada DİK'in en büyük patogenezinin hücre içi Ca^{+2} dengesinde oluşan bozulmalar olduğu gösterilmiştir (Ondrias ve ark., 1990; Olson ve ark., 2005; Kim ve ark., 2006). DOX'a bağlı olarak hücre içi Ca^{+2} seviyesinin artmasına neden olan birçok mekanizma önerilmiştir (Octavia ve ark., 2012b). Bunlardan ilki, hücre zarı üzerinde bulunan Ca^{+2} iyonunu hücre içine ve/veya hücre dışına taşıyan pompalar üzerine etkisidir. Na^+/Ca^{+2} değiş-tokuşçusunu inhibe ederek, hücre içinde alınan Ca^{+2} iyonlarının dışarı çıkmasını engellemektedir (Caroni ve ark., 1981). Aynı zamanda, L-tipi Ca^{+2} kanallarının aktivasyonunu arttırarak bu kanallardan hücre içine giren Ca^{+2} miktarını da arttırmaktadır (Keung ve ark., 1991). DOX'un aktif bir metaboliti olan doxorubisinol,

kardiyomiyositlerde birikerek SR üzerinde bulunan SERCA'nın çalışmasını inhibe ederek SR içerisine Ca^{+2} iyonlarının alımını azaltmaktadır (Hanna ve ark., 2014). Etkili bir kasılma-gevşeme döngüsü için Ca^{+2} iyonlarının hücre içinden SR içerisine alınması ve daha sonra ihtiyaç halinde SR içerisinden RyR2 kanalları yoluyla hücre içine boşaltılması gerekmektedir. Bu döngü etkili bir şekilde gerçekleşmediği takdirde kardiyomiyositlerde kasılma-gevşeme süreçlerinde önemli bir aksamaya neden olur. Bir başka mekanizmada ise DOX direk olarak RyR2'ye bağlanarak açılma olasılığını arttırmaktadır (Saeki ve ark., 2002). Bu bağlanma sonucunda SR içerisindeki Ca^{+2} konsantrasyonunda azalma gözlemlenirken, sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunun arttığı görülmüştür (Feng ve ark., 1999; Gambliel ve ark., 2002). Son olarak SR içerisinde Ca^{+2} tamponu olarak çalışan kalsequestrin proteinine bağlanarak kalsequestrinin Ca^{+2} 'a bağlanmasını engellemektedir (Charlier ve ark., 2005; Park ve ark., 2005). Böylelikle Ca^{+2} bağlanma kapasitesini düşürerek SR içerisindeki Ca^{+2} konsantrasyonunda düşüşe sebep olmaktadır. Sonuç olarak, uzun süre ilaç kullanımına bağlı olarak kalsequestrinin Ca^{+2} bağlama kapasitesinin azalması katekolaminerjik polimorfik ventrikül taşikardi oluşmasına sebep olmaktadır (Terentyev ve ark., 2003).

Sarkomer Yapı Değişiklikleri

DİK oluşması ile beraber sarkomerde bulunan miyofilamentlerde bozulma veya kayıplar görülür. Kardiyak sarkomerde önemli ve büyük bir protein olan titinin hem yapısal hem de kasılmayı düzenleyici birçok işlevi vardır (Gautel, 2011). Bu proteinin yapısında oluşacak fonksiyon bozukluğunun dilate kardiyomiyopati gelişmesi ile alakalı olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (McNally, 2012; Chan ve ark., 2020). DOX uygulamasının kalpain bağımlı titin proteolizini uyardığını gösteren veriler bulunmaktadır (Nakagawa ve ark., 2000).

Apoptoz

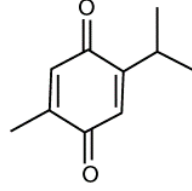
Apoptoz, dokulardaki hücre popülasyonunu korumak için homeostatik bir mekanizma olarak gelişim ve yaşlanma sırasında ortaya çıkar. Apoptoz ayrıca bağışıklık reaksiyonlarında veya hücreler, hastalık veya zararlı maddeler tarafından hasar gördüğünde ortaya çıkan bir savunma mekanizmasıdır (Jackson ve Bartek, 2009). Apoptozu tetikleyebilecek hem fizyolojik hem de patolojik çok çeşitli uyaran ve koşullar

bulunmaktadır. Apoptoz, BAD ve Bcl-21 dahil olmak üzere Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin etkileşimi ile başlamaktadır. Proteolitik enzimler ailesinden olan kaspaz proteinlerinin aktivasyonu ile hücre iskeletini, organelleri parçalayan ve DNA'yı bozan diğer proteinler aktive olur (Cavalcante ve ark., 2019). Bu kontrollü süreç ile yapısı bozulan hücrenin komşu hücrelere zarar vermeden ölümü gerçekleştirilmiş olur.

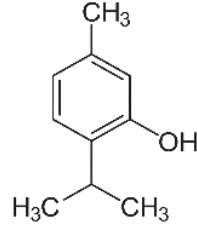
Yapılan hem kronik hem de akut çalışmalarda, DOX'un farklı mekanizmalar ile apoptotik yolları etkilediği bilinmektedir. Süperoksit ve H₂O₂ ile aktive olan p53 Bax genlerini aktive ederek hücrenin apoptoza gitmesine neden olur (Kotamraju ve ark., 2000). Ayrıca DOX, kaspaz aktivitesini de etkilemektedir. DOX'un hem sıçan kalplerinde hem de sıçan kardiyomiyosit kültürlerinde yapılan çalışmalarda kaspaz-3 aktivitesini artırarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Ueno ve ark., 2006). DOX ile indüklenen Ser/Thr PP1 fosfatazın yukarı regülasyonunu ile Akt ve BAD'ın fosforile olmasından sonra kaspaz-3'ün aktive olduğu gösterilmiştir (Fan ve ark., 2008).

2.3. Timokinon

Nigella sativa (NS) tohumu (çörek otu olarak da adlandırılır) düğün çiçeğigiller ailesinin bir üyesidir (Şekil 2.7). Genellikle Doğu Akdeniz, Kuzey Afrika, Pakistan ve Hindistan bölgesine özgü olan bir bitki çeşididir. NS'nin, Mısır Hanedanlığı dönemine kadar uzanan ilginç bir kültürel tarihi bulunmakta ve tohumları ekmek, kek ve yemeklerde tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Botnick ve ark., 2012).



Timokinon (2-izopropil-5-metilbenzo-1, 4-kuinon)



5-Metil-2- (propan-2-il) fenol

Şekil 2.7: Çörek otunda bulunan uçucu olmayan yağındaki aktif ana maddeler. Şekil (Ramadan, 2007) kaynaktan modifiye edilmiştir.

NS'nin kimyasal bileşenleri birçok çalışma yapılarak ortaya koyulmuştur. Başlıca, %24,76 – %40,35 arasında uçucu olmayan yağlar (p-simen, karvakrol, timo-hidrokinon, ditmokinon (nigellon), timol, nigelisin, nigellidin, α -hedrin ve TQ), %0,5 - %1,6 arasında uçucu yağlar ve eser miktarda alkaloidler, saponinler, proteinler, vitaminler ve minerallerden oluşmaktadır (Liu ve ark., 2011; Botnick ve ark., 2012). Bulunan değerlerin birbirinden farklılık göstermesi çörek otunun farklı bölgelerde farklı içeriğinin olması ve farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılmasından kaynaklanmaktadır. TQ, çörek otunun içinde bulunan en aktif bileşendir. Çörek otu ile yapılan çalışmalarda görülen etkilerin birçoğu TQ'ya atfedilmektedir (Darakhshan ve ark., 2015).

2.3.1. Timokinonun Kimyasal Özellikleri

TQ, NS bitkisinin siyah tohumlarının yağından elde edilen, koyu sarı renkli kristale sahip, toksik olmayan, büyük bir biyoaktif bileşiktir. TQ, kimyasal adı 2-izopropil-5 metil-1,4-benzokinon olan 10 karbonlu bir bileşiktir. TQ'nun çözünürlüğü sulu solüsyonlarda 549-669 mg/mL aralığında değişir (Ahmad ve ark., 2018). Şekil 2.7'de kimyasal formülü görülmektedir. Kimyasal formülü $C_{10}H_{12}O_2$ ve moleküler ağırlığı 164,204 g/mol'dür. Termogravimetrik analizinde TQ'nun termal ayrışması 65 °C'de başlayıp, 213 °C'de bitmektedir. TQ, çoğunlukla bu bileşiğin farmakolojik özelliklerinden sorumlu olan keto formu (~% 90) olarak totomerik formlarda bulunur. Spesifik olarak, TQ, keto formunun

farmakolojik eylemler sergileyen ana konfigürasyon olduğu bir totomerik bileşiktir. TQ, hidrofobik bir moleküldür ve çözünürlüğü zamana bağlıdır. TQ, ışığa duyarlıdır ve sulu çözeltileri özellikle alkalın pH'larda kararsızlık göstermektedir (Salmani ve ark., 2014).

2.3.2. TQ'nun Toksisitesi

TQ toksisitesinin *in vitro* ve *in vivo* ölçümlemlerini araştıran çok sayıda rapor bulunmaktadır. Hayvan modelleri, hayvan tipine ve uygulama şekline bağlı olarak toksisite modellerinde farklılık göstermektedir. Hayvanlarda yapılan *in vitro* çalışmalarındaki maksimum tolere edilebilecek doz ile ilgili bilgiler Tablo 2.1'de verilmiştir.

Farelerde yapılan TQ çalışmalarında intraperitoneal enjeksiyon için öldürücü dozun (LD₅₀) 104,7 mg/kg ve oral alımlar için ise 870,9 mg/kg olarak belirlenmiştir. Sıçanlarda ise bu oranların farelere göre çok yüksek olduğu görülmüştür. Başka bir çalışmada ise farelere TQ krem olarak uygulanmış ve %10'luk konsantrasyonlarda vajinal kandidiyaz için güvenli olduğu bulunmuştur (Azeiz ve ark., 2013).

Tablo 2.1: İn vitro çalışmalarda TQ'nun toksik doz değerleri. Tablo (Almshawit, 2015) kaynaktan modifiye edilmiştir.

	Uygulama Yöntemi	Toksik Doz
Fare	İntraperitoneal enjeksiyon	104,7 mg/kg (LD ₅₀)
Fare	İntraperitoneal enjeksiyon	5 mg/kg güvenli doz
Fare	Oral alım	870,9 mg/kg (LD ₅₀)
Fare	Oral alım	2,4 g/kg (LD ₅₀)
Fare	Krem	> 10%
Sıçan	İntraperitoneal enjeksiyon	57,5 mg/kg (LD ₅₀)
Sıçan	İntraperitoneal enjeksiyon	22,5 mg/kg (erkek) 15 mg/kg (dişi)
	Oral alım	250 mg/kg (erkek & dişi)
Sıçan	Oral alım	10 mg/kg/gün güvenli doz

2.3.3. TQ'nun Tıbbi Özellikleri

TQ, antioksidan (Badary ve ark., 2003), antiinflamatuvar (Shoker ve ark., 2011), antibakteriyel (Zaoui ve ark., 2000), antikanser, hipotansif (Türkdoğan ve ark., 2001),

antidiyabetik (Houghton ve ark., 1995), antihistaminik, nöromodölatör gibi etkiler göstermektedir (Glamočlija ve ark., 2018).

Anti Diyabetik Etkisi

Tip 2 diabetes mellitus hastalarına 2 g/gün dozunda verilen NS'nin, açlık ve tokluk kan şekeri parametrelerini önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir (Bamosa ve ark., 2010). Bir başka çalışmada, NS yağının obez diyabetik insanlarda açlık kan şekeri, toplam kolesterol ve LDL kolesterolü üzerinde olumlu bir etkisi olduğu gösterilmiştir (Najmi ve ark., 2008). Kronik bir çalışmada diyabet hastalarına 12 hafta boyunca TQ verildikten sonra vücut kilo indeksi ve kilolarında düşüş gösterilmiştir. Plasebo grubu ile TQ verilen grup karşılaştırıldığında açlık kan şekeri, HbA1c, trigliserit ve LDL değerlerinde düşme görülürken; toplam kolesterol, HDL ve insülin salgılanmasında bir değişikliğe rastlanmamıştır (Heshmati ve ark., 2015). Diğer yandan ileri glikasyon son ürünlerinin dokularda ve serumda birikmesi, diyabete bağlı komplikasyonlarda önemli rol oynamaktadır. Yapılan bir çalışmada, TQ'nun, anti-glikasyon etkisine sahip olduğu ve protein glikasyonuna bağlı diyabetik sorunları azalttığı gösterilmiştir (Anwar ve ark., 2014).

Çoğu hücrede ana antioksidan enzimlerinden olan GSH, SOD, glutatyon s-transferaz (GST) ve GSH-Px serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif hasarı etkisizleştirmektedir. TQ bu enzimlerin aktivitesini veya ekspresyonunu arttırmaktadır (Badary ve ark., 2003; Kanter ve ark., 2005; Elbarbry ve ark., 2012). Ayrıca TQ'nun, diyabetik sıçanlarda antioksidan seviyelerini normal seviyelere çektiği gösterilmiştir (Liu ve ark., 2016).

Anti Kanser Etkisi

Günümüzde biyoaktif doğal ürünler araştırılan anti-neoplastik ilaçlar arasında büyük bir ilgi görmektedir. Doğal bileşikler ve fitokimyasallar, kanser için önleyici birer ajan olabilecekleri gibi, kanser tedavisinde kullanılan sentetik ilaçların yan etkilerini ve kullanılan dozu azaltırken; sentetik ilacın etkilerini arttırabilecek önemli birer kaynak olabilme potansiyelleri olduğu tahmin edilmektedir. Kansere karşı ideal bir terapötik ajanın, normal dokulara karşı toksik etkisinin minimum düzeyde olması beklenir. Literatürdeki bilgilere göre TQ'nun en büyük avantajlarından biri, kansere karşı olan etkisinin normal hücrelere oranla kanser hücrelerine karşı daha spesifik olmasıdır (Shoieb

ve ark., 2003). Kanser oluşumunda, hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve çoğalması önemli bir özelliktir ve böylelikle tümörün boyutunun artmasına ve tedavisinin zorlaşmasına neden olur. Çalışmalar, TQ'nun kanser hücrelerini hücre döngüsünün farklı aşamalarında etkilediğini göstermiştir (Gali-Muhtasib ve ark., 2004; Kaseb ve ark., 2007).

Tümörün büyümesi ile daha çok besin ve oksijen ihtiyacı duyan tümör hücreleri yeni damarlanmalar yapmaktadır. TQ'nun önemli bir bulgusu, güçlü anti-anjiyojenik etkiye sahip olmasıdır. TQ, bir anahtar pro-anjiyojenik molekül olan vasküler endotelial büyüme faktörünün seçici bir blokörüdür ve endotelial koloni oluşturan hücrelerin proliferasyonunu ortadan kaldırmıştır (Dragoni ve ark., 2011). *In vivo* ve *in vitro* yapılan deneylerde anjiyogenezi bloke ettiği ve böylelikle tümör büyümesinin önüne geçtiği gösterilmiştir (Peng ve ark., 2013).

TQ, güçlü bir anti-proliferatif aktivite göstererek meme kanseri hücre hatlarının büyümesini inhibe etmiştir. TQ, DOX ve 5-florourasil ile beraber kullanıldığında, sitotoksik etki göstermiştir. Yapılan bir çalışmada, TQ'nun anti-kanser etkilerinin Bcl-2, Bcl-xL ve survivin gibi pro-apoptotik genleri aşağı regüle etme kabiliyetinden kaynaklandığı gösterilmiştir (Woo ve ark., 2011). Bunun yanında DOX'a dirençli MCF-7 hücrelerinin çoğalmasını da inhibe etmiştir. TQ'nun, MCF-7 hücrelerini G2/M fazında durdurduğu ve p53 ve p21 proteinlerinin hücrese seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (Arafa ve ark., 2011). Bu çalışmada TQ ile indüklenen apoptoz, MCF-7 hücrelerindeki mitokondrial membran potansiyelindeki değişiklikler, kaspazların aktivasyonu ve PARP bölünmesi ile ilişkilendirilmiş TQ kullanımının Bax/Bcl-2 oranını da arttırdığı gösterilmiştir.

Kanser tedavisi için geliştirilen birçok sitotoksik ilaç türü olmasına rağmen, bu ilaçların yan etkileri bazı durumlarda çok ciddi bir hal almaktadır. Bununla birlikte kemoterapinin iyileşme oranı, hastanın o ilaca direnç geliştirmesi ile sınırlı kalmaktadır. Bu yüzden, günümüzde kullanılan birçok ilacın yanında doğal ürünlere olan ilgi de giderek artmaktadır. TQ'nun, tümör hücrelerini engellemekteki potansiyeli ve kemoterapinin olası yan etkilerini ve toksisitesini azaltmak amacı ile kullanılabilecek en umut verici ilaçlardan biri olduğu öne sürülmüştür (Woo ve ark., 2012).

Kardiyovasküler Hastalıklara Etkisi

Dünya çapında başlıca ölüm nedenlerinden birisi kardiyovasküler hastalıklarıdır. Birçok çalışma TQ'nun, kardiyovasküler komplikasyonlarda da terapötik bir seçenek olabileceğini göstermektedir. Kemoterapiden önce TQ ile tedavi edilen hastalarda, DOX'un anti tümör aktivitesini etkilemeden kardiyotoksisiteye karşı koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir (Nagi ve Mansour, 2000). Al-Shabanah ve ark. (1988) yaptıkları bir çalışmada DOX uygulaması öncesi verilen TQ'nun, farelerde DOX ile indüklenen kalp yetmezliğini önlediğini, LDH ve yüksek kreatin kinaz seviyelerinin düşmesiyle ve kalp dokusunun histopatolojik gelişimi ile desteklemişlerdir (Al-Shabanah ve ark., 1998). Başka bir çalışmada; sıçanlarda DOX ile indüklenen kardiyotoksisitede TQ'nun lipid peroksidasyon inhibitörü ve süperoksit radikal temizleyicisi olduğu gösterilmiştir (Nagi ve Mansour, 2000). Başka bir kemoterapötik ilaç olan siklofosamid, serum kreatin kinaz, kreatinin, üre, LDH, kolesterol, trigliseridler ve TNF'yi yükseltmekte, kalp dokusunda ise TBARS ve toplam nitrat/nitriti arttırırken, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), CAT ve ATP seviyelerini düşürmektedir. Nagi ve ark. (2011) yaptığı bir çalışmada, TQ'nun bu etkileri tam tersine döndürdüğünü ve neredeyse kontrol seviyesine çektiğini göstermişlerdir (Nagi ve ark., 2011).

İntravenöz olarak verilen TQ'nun doza bağımlı olarak arteriyel kan basıncını ve kalp hızını düşürdüğü gösterilmiştir (El Gazzar ve ark., 2006). TQ'nun, sıçanlarda L-NAME ile indüklenen hipertansiyona karşı süperoksit radikallerinin üretimini inhibe ettiği ve kreatin seviyesini düşürürken glutatyon (GSH) seviyesini de yükselttiği gösterilmiştir (Khattab ve Nagi, 2007). Fareler üzerinde yapılan hiperkolesterolemi modelinde, TQ'nun lipid birikimi, proinflamatuvar sitokin ve makrofaj birikimi sekresyonunun ilerlemesini, durdurduğunu ve bu şekilde kardiyak hasar üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (Xu ve ark., 2018).

TQ'nun, DOX ile tedavi edilen sıçanlarda CPK ve LDH seviyelerinde azalma gösterirken oksidatif stresi de azalttığı gösterilmiştir (Nagi ve Mansour, 2000). Süperoksit radikallerini üreten ROS'u azaltarak kalp yetmezliğini önlediği ileri sürülmüştür. Kemoterapötik bir ajan olan siklofosamid ile yapılan bir sıçan çalışmasında, kardiyotoksisite indeksi olan LDH ve CK-MB seviyesini arttırdığı gösterilmiştir.

Siklofosfamid lipid peroksidasyon göstergesi olan TBARS'ı arttırırken, antioksidan savunma mekanizması olan SOD, GSHPx ve CAT seviyelerinin azalmasına neden olmaktadır. Sonuçta TQ uygulamasının bu etkilerin tümünü bertaraf ederek, siklofosfamid'in neden olduğu kardiyak hasara karşı potansiyel koruyucu etkiye sahip olduğunu öne sürülmüştür (Nagi ve ark., 2011). Yapılan başka bir çalışmada, kardiyotoksisitenin tanısal belirteçleri olan AST, ALT, CK-MB, ve LDH seviyelerinde DOX uygulaması ile artış olduğu görülmüş ve TQ uygulaması ile antioksidan seviyesinin arttığı ve oksidatif stres ile aktivitesi artan enflamatuar yolağının onarıldığını gösterilmiştir (Alam ve ark., 2018).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Moleküler Biyofizik Laboratuvarında gerçekleştirilen bu çalışmada üç aylık Wistar türü erkek sıçanlar kullanıldı. Tüm deney prosedürleri Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun onayı ve gözetimi altında yürütülmüştür. Sıçanlar Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden sağlandı ve post-operatif bakımı deney hayvanları ünitesinin kontrollü ortamı içerisinde 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüde, yem ve su kısıtlaması olmaksızın yapıldı.

Sıçanlar dört gruba rastgele ayrılmıştır. Tüm sıçanlara gavaj ve enjeksiyon uygulaması aynı gün başlatıldı. TQ önce Dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözünüp sonra salin ile karıştırıldı. Çözücü solüsyon %25 DMSO ve %75 salinden oluşmaktadır.

1. Grup I'de yer alan sıçanlara iki günde bir olacak şekilde 5 kez salin intraperitoneal olarak enjekte edildi ve 4 hafta boyunca 24 saat aralıklarla gavaj yoluyla taşıyıcı çözelti ağırlığına göre verildi (Kontrol, N=24).
2. Grup II'de yer alan sıçanlara iki günde bir olacak şekilde 5 kez her seferinde 3 mg/kg DOX (toplamda 15 mg/kg olacak şekilde) intraperitoneal olarak enjekte edildi. Ayrıca, 4 hafta boyunca 24 saat aralıklarla gavaj yoluyla taşıyıcı çözelti verildi (DOX, N=35).
3. Grup III'de yer alan sıçanlara iki günde bir olacak şekilde 5 kez her seferinde 3 mg/kg DOX (toplamda 15 mg/kg olacak şekilde) intraperitoneal olarak enjekte edildi. 4 hafta boyunca 24 saat aralıklarla gavaj yoluyla TQ (10 mg/kg) verildi (DOX+TQ, N=42).
4. Grup IV'de yer alan sıçanlara iki günde bir olacak şekilde 5 kez salin intraperitoneal olarak enjekte edildi. 4 hafta boyunca 24 saat aralıklarla gavaj yoluyla TQ (10 mg/kg) verildi (KON+TQ, N=18).

3.2. Kardiyak Miyositlerin İzolasyonu

Kardiyak miyositlerin izolasyonu için deney hayvanları anestezi altındayken (50 mg/kg sodyum pento barbital verilerek) kalpleri hızlıca çıkartılıp Langendorff sistemine bağlandı. Enzimatik hücre ayrıştırma yöntemi kullanılarak Langendorff sistemine asılı

olan sıçan kalbi önce içeriği (mM): 137 NaCl; 5,4 KCl; 1,2 MgSO₄; 1,2 KH₂PO₄; 5,8 HEPES; 20 glikoz olan Ca⁺² içermeyen perfüzyon solüsyonu ile 5 dakika boyunca yıkandı. Solüsyonun pH 7,2 dengesinin sağlanması için %5 CO₂ - %95 O₂ içeren gaz karışımı ile sürekli gazlandı. Daha sonra aynı solüsyon ile hazırlanmış enzim karışımı (Worthington, Collagenase, Type 2) (0,7 mg/ml) ve proteaz (0,06 mg/ml) 20-25 dk boyunca kalpten geçirilip, kalbin uygun kıvama ulaşması beklendi. Kalp uygun kıvama ulaştıktan sonra sol ventrikül ayrıştırılarak makas ile küçük parçalara dilimlendi. Daha sonra ince bir filtreden geçirilen doğranmış kalp dokusuna birkaç yıkama işlemi yapıldı. Son olarak hücrelere kademeli şekilde Ca⁺² eklenerek fizyolojik Ca⁺² seviyelerine adaptasyonu sağlandı. Tüm deneylerde sol ventrikül miyositleri kullanıldı ve kayıtlar sıcaklığı 36±1 °C olan hücre banyosunda alındı.

3.3. Elektrofizyolojik Kayıtlar

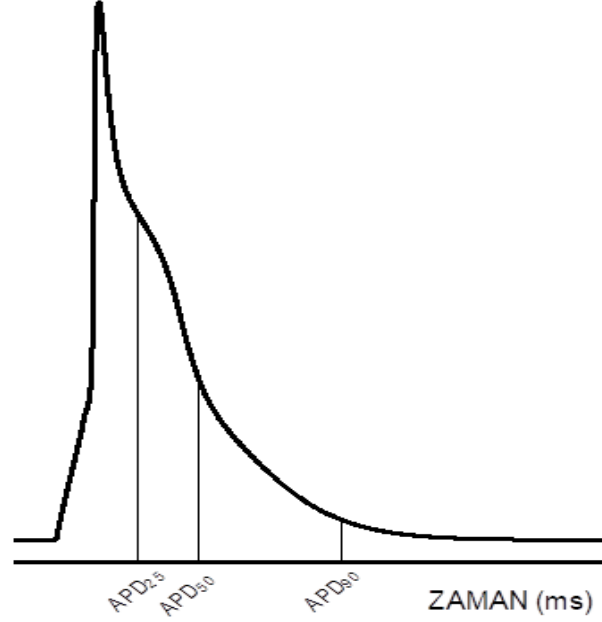
3.3.1. Kasılma Parametrelerinin Ölçülmesi

Kasılma yanıtları alabilmek için öncelikle Tyrode solüsyonu dolu olan havuza elektriksel alan uyarısı için iki uçlu elektrot yerleştirildi. Daha sonra izole edilen ventrikül miyositleri bu havuza eklendi. Banyo içerisindeki bu hücrelere 1 Hz frekansında 5-8 V genliğine sahip uyarılar verilerek, sarkomer boyutlarındaki değişimler kararlı bir yanıt oluşana kadar en az 200 s süreyle kaydedildi (IonOptix LLC, Milton USA). Hücrelerde alınan kasılma parametreleri daha sonra Ionwizard (IonOptix, USA) programı ile analiz edildi. Analiz sonunda gruplar arasındaki bazal (diastolik) sarkomer boyu, yüzde fraksiyonel kısalma (%L/L₀), kısalmanın maksimuma ulaşması için geçen süre (TP) ve gevşemenin %50'sine (RT₅₀) iniş süresi incelendi.

3.3.2. Aksiyon Potansiyelinin Ölçülmesi

Kasılma parametrelerinden sonra izole edilen hücrelerden AP kayıtları alındı. Tüm kayıtlarda pipet dirençleri 2-2,5 MΩ olacak şekilde hazırlandı. Pipet içi solüsyonu (mM): 125 K-aspartat; 20 KCl; 5 MgATP; 10 NaCl; 5; 10 HEPES (pH=7,2 olacak şekilde KOH ile ayarlandı). AP kayıtları almak için akım kenetleme tekniği ile hücre içine depolarize edici pulslar gönderilerek hücrenin uyarılması sağlandı ve potansiyelin zamana bağlı değişimi kaydedildi. Elde edilen AP kayıtlarının repolarizasyon fazlarının %25, 50, 90

(APD₂₅, 50, 90) süreleri (Şekil 3.1), dinlenme membran potansiyeli ve AP'nin tepe değeri değerlendirildi.



Şekil 3.1: Sol ventrükül hücrelerinden kaydedilen aksiyon potansiyeli eğrisi üzerinden ölçülen parametreler. APD₂₅, APD₅₀ ve APD₉₀ aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazının sırasıyla %25, %50 ve %90'ına düşmesi için gereken süreleri göstermektedir.

3.3.3. L-tipi Ca⁺² Akımlarının Ölçülmesi

L-tipi Ca⁺² akımı 2-2,5 MΩ'luk elektrotlar ile voltaj kenetleme tekniğinin tüm hücre konfigürasyonu kullanılarak kaydedildi. Ölçümler için pipet solüsyonu (mM): 120 L-aspartate, 20 CsCl, 10 NaCl, 5 MgATP, 10 HEPES ve 10 EGTA (pH = 7,2 seviyesi CsOH ile ayarlandı) olacak şekilde hazırlandı. Banyo solüsyonu ise (mM): 137 NaCl; 5,4 KCl; 1,5 CaCl₂; 0,5 MgCl₂; 10 Glukoz; 11,8 HEPES (pH=7,35) olacak şekilde hazırlandı. Ayrıca K⁺ akımlarını bloke etmek için kapiller borular aracılığıyla hücre üzerine içeriği (mM): 137 NaCl; 5,4 CsCl; 0,5 MgCl₂; 1,8 CaCl₂; 11,8 HEPES; 10 Glikoz ve pH 7,40 olan dış solüsyon uygulandı.

Hücreler -70 mV düzeyinde tutulurken Na⁺ akımlarını bloke etmek için -45 mV'luk bir ön-puls uygulanırdıktan sonra, L-tipi Ca⁺² akımlarını almak için -50 mV'den +60 mV'ye kadar 300 ms'lik depolarize edici pulslar 10 mV'luk basamaklar şeklinde top uygulandı. Patch-clamp amplifikatörünün (Axon 200B, Molecular Devices, USA) 3 kHz'lik

filtresinden geçirilen Ca^{+2} akımları, Digidata 1200'ün 5 kHz'lik örnekleme hızında pClamp 10 yazılımı (Axon Instrument, Foster City CA, USA) ile kaydedildi ve Clampfit 11.0.3 yazılımı ile analiz edildi. Akımın genliği, 300 ms'lik pulsun son kısımları tepe değerinden çıkartılarak hesaplandı. Son olarak hücre büyüklüğünün akımlara etkisini bertaraf etmek için her akım değerini o hücrenin sığasına bölerek akım yoğunluğu (pA/pF) cinsinden değerlendirildi.

3.3.4. Potasyum Akımlarının Ölçülmesi

Akım kayıtları voltaj kenetleme yönteminin tüm-hücre konfigürasyonunda alındı ve kayıt için elektrot olarak direnci 1,5 – 2,5 M Ω olan cam pipetler kullanıldı. Bunun için öncelikle elektrot ucunun hücreye yapışması arkasından G Ω düzeyinde bir direnç oluşması sağlandıktan sonra elektrik pulsu uygulanarak hücre membranı kırıldı. Kenetlenme sonrası -70 mV düzeyinde tutulan zar potansiyeline Na^+ akımlarını bloke etmek için -45 mV'luk bir ön-puls uygulanmaktadır. Daha sonra 4 s'lik aralıklarla 3 s'lik pulslar verilmiştir. Verilen 3 s'lik pulslar ile I_{to} ve I_{ss} almak için -50 mV'den +70 mV'ye kadar 10 mV'luk adımlar şeklinde toplam 13 basamak uygulanmıştır. Patch-clamp amplifikatörünün (Axon 200B, Molecular Devices, USA) voltaj kenetleme modunda 3 kHz'lik filtreden geçirilen akımlar, Digidata 1200'ün 5 kHz'lik örnekleme hızında pClamp 10 yazılımı (Axon Instrument, Foster City CA, USA) ile kaydedilmiştir.

Genel olarak kayıt sırasında giriş direncinin 4 M Ω geçmemesine ve kararlı durumda olmasına özen gösterildi. Akım kayıtları alırken hücre dışı solüsyonu (mM): 137 NaCl; 5,4 KCl; 1,5 CaCl_2 ; 0,5 MgCl_2 ; 10 Glukoz; 11,8 HEPES (pH=7,35) içerirken, pipet için ise (mM): 125 K-aspartat; 20 KCl; 5 MgATP; 10 NaCl; 5; 10 HEPES ve 10 EGTA (pH=7,2) olacak şekilde hazırlandı. L-tipi Ca^{+2} akımlarını bloke etmek için dış solüsyona 250 μM CdCl_2 eklendi. I_{to} elde etmek için verilen 3 s'lik pulsun son kısımdaki akım değerleri (I_{ss}) tepe değerinden çıkartılarak hesaplandı.

I_{K1} ölçümleri için, I_{to} kayıtlarında olduğu gibi elektrod hücreye kenetlendikten sonra, -120 mV'den +10 mV'ye kadar 10 mV'luk basamaklar şeklide toplam 14 defa adım pulsları uygulandı. Verilen 3 s'lik pulsun son kısmındaki akım değerleri alınarak I_{K1} hesaplandı. Hücre büyüklüğünün akımlara etkisini bertaraf etmek için her akım kaydını o hücrenin sığasına bölerek akım yoğunluğu cinsinden değerlendirildi.

3.3.5. Protein Ekspresyonlarının Analizi

Her gruptan 10 adet hayvanın kalbi Western blot ve kit uygulamaları için ayrıldı. Hızlıca çıkarıldıktan sonra kanı temizlemek için perfüze edilen kalpler sıvı nitrojen yardımı ile ezilerek doku homojenatları hazırlandı. Ezilen kalp dokuları içeriği ((mM): 20 Tris HCl; 150 NaCl; 2 KCl; 2 EDTA; 0,5 DDT; 1 Sodyum Orthovande; 20 NaF; 1 EGTA; 100 Proteaz inhibitörü; 0,4 PMSF) olan homojenizasyon tamponuna konuldu ve ince bıçaklı bir homojenizatör ile iyice parçalandı. Daha sonra elde edilen homojenatlar 10 dk boyunca 10000xg'de santrifüj edildi ve üst tarafta oluşan süpernatantlar toplandı. Son olarak Bradford yöntemi kullanılarak her grubun protein miktarları ölçüldü.

Her grubun protein miktarı belirlendikten sonra grupların SERCA, fosfolamban (PLB), fosforile fosfolamban (p-PLB), CaMKII, fosforile CaMKII (p-CaMKII), NOX2, prokaspaz-3 protein ekspresyonları Western blot yöntemiyle belirlendi. Proteinlerin ağırlıklarına bağlı olarak %8 ile %15 konsantrasyon aralığına sahip jeller hazırlanarak kuyucuklara eşit miktarda protein (ilgili proteinin yoğunluğuna bağlı olarak 30-50 µg/ml arasında) yüklendi. Kuyucuklara yüklenen proteinlerle birlikte kaset elektroforez havuzuna koyularak havuzun içeriği 28,83 gr glycine, 6,06 gr Tris, 2 gr SDS olan solüsyon ile dolduruldu. Daha sonra güç kaynağı (Hoefer, USA) ile sabit voltaj değeriyle (üst jel için 82 V, alt jel için 100 V) elektrik alan oluşturularak kuyucuklara yüklenen proteinlerin ağırlıklarına göre ayrılması sağlandı. İstenilen bölgenin ayrışmasından sonra jeldeki proteinler hızlı transfer sistemi (Trans-Blot Turbo BioRad) ile polivinil diflorür (PVDF) membrana transfer edildi (25 V; 1,3 mA; 15-25 dakika). Transfer sonrası gürültüyü azaltmak için membrana %3 oranında hazırlanan süt tozu solüsyon eklendi ve 1 saat bu solüsyon ile bloklama işlemi yapıldı. Daha sonra membrana %3 bovine albümin serum (BSA) solüsyonu içerisinde SERCA 1:3000 (SantaCruz, sc-73022), PLB 1:1000 (SantaCruz, sc393990), p-PLB 1:1000 (cell signaling 8496), CaMKII 1:1000 (Abcam, ab22609), p-CaMKII 1:1000 (Abcam, ab32678), NOX2 1:1000 (Abcam, ab129068), prokaspaz-3 1:1000 (SantaCruz, sc-271028), ve GAPDH 1:10000 (Thermo Fisher Scientific, GA1R) primer antikor hazırlanıp bir gece boyunca +4 °C'de inkübe edildi. Ertesi gün, üzerindeki fazla primerleri uzaklaştırmak için membran 20 dk boyunca tampon solüsyonu ile yıkandı. Ardından membranlar %3'lük BSA solüsyonu içerisine primer antikorlara uygun olarak (goat anti-mouse IgG (SantaCruz, sc2031) ya da goat anti-rabbit

IgG (SantaCruz, sc2004)) Horseradish peroksidaz sekonder antikor kullanıldı. Membranlar, bir saat boyunca sekonder antikor ile inkübe edildikten sonra 20 dk boyunca tampon solüsyonuyla yıkandı. Daha sonra membranların üstüne karanlık bir odada kemilüminesans uygulanarak oluşturulan ışıma filme aktarıldı. Sonuçlar Image J yazılımı kullanılarak analiz edildi. Grupların protein ekspresyon miktarları hedef proteinin eşleşen GAPDH'ine oranlanmasıyla ya da fosforile proteine oranlanmasıyla belirlendi.

3.3.6. Protein Karbonil Analizi

Deney gruplarının protein karbonil ölçümü ticari kit (Cat. #10005020. Cayman Chemical Ann Arbor, MI USA) kullanılarak yapıldı. Protein karboniller ile 2,4-dinitrophenylhydrazin (DNPH)'in bir araya gelerek reaksiyon oluşturması sonucu protein hidrazon bileşikleri oluşmaktadır. Oluşan bu bileşiğin miktarı bir spektrofotometre yardımıyla absorbansı ölçülerek tayin edilmektedir. Protein hidrazon bileşiği 360-385 nm dalga boyu arasında ışık yaymaktadır. Ölçümü yapılan karbonil içeriği protein konsantrasyonu ile standardize edilmiştir. Reaktif olarak DNPH, hidroklorik asit (HCl), guanidin hidroklorür, etanol, TCA solüsyonu ve etil asetat kullanıldı. Donuk halde bulunan dokular bir homogenizatör yardımı ile 1 mM EDTA bulunan 50 mM K₂HPO₄ (pH=6,7) soğuk solüsyonunda parçalandı. Parçalanmış dokular 4 °C'de 10.000×g'de 15 dk boyunca santrifüj edildi ve santrifüj sonrasında süpernatantlar ortamdan uzaklaştırıldı. Toplanan örneklerin her birinden 200 µl olacak şekilde ikiye bölünerek biri örnek diğeri ise kontrol olarak değerlendirildi. Kontrol tüpüne 800 µl 2,5 M HCl ve örnek tüpüne 800 µl DNPH, ilave edilerek 1 saat boyunca oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edildi. Sonrasında tüm tüplere 1 ml %20 TCA ilave edildi ve vortex yapıldı. Tüplere %20 TCA eklenerek buz üzerine yerleştirildi ve 5 dk boyunca inkübe edildi. Daha sonra 4 °C'de 10.000×g'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatantlar ortamdan uzaklaştırıldı. Tüm tüplere 1 ml %10 TCA ilave edildi ve buz üzerine alınarak 5 dk boyunca inkübe edildi. Daha sonra 4 °C'de 10.000×g'de 10 dk santrifüj edildi. Ortamdan süpernatantlar atılarak tüplere 1 ml etanol/etil asetat karışımı eklendi. Son olarak tekrar 4 °C'de 10.000×g'de 10 dk santrifüj edildi. Bu işlem birkaç kez daha tekrarlandıktan sonra proteion pelletlerine 500 µl guanidin hidroklorür eklenerek tüpler vorteks edildi ardından 4 °C'de 10.000×g'de 10 dk santrifüj edildi. Bu işlemlerin sonunda örnek tüplerinden ve

kontrol tüplerinden ikişer adet olmak üzere platin kuyucuklara yüklendi. 360-385 nm dalga boyundaki absorbansları ölçmek için plate okuyucu kullanıldı.

3.3.7. Total Antioksidan Kapasitesi Analizi

Total Antioksidan Kapasite (TAK) testi (Cat. #STA-360. Cell Biolabs Inc, CA USA) 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit; ABTS) radikalinin indirgenmesinin ölçümlerine dayanmaktadır. Reaktifler, hidrofilik veya lipofilik numuneler için hazırlanmaktadır. Birçok lipofilik numune 1 x PBS ile seyreltikten sonra çözünür olmasına rağmen, kit reaktiflerinin tam çözünebilirliğini sağlamak için metanol içinde hazırlanmaktadır.

Reaksiyon tamponu 1:100 oranında 1 x PBS ile seyretildi. Daha sonra 1 x copper ion reagent hazırlamak için 1:100 oranında deiyonize su veya metanol ile seyretildi. 1 x stop solüsyonu için 1:10 oranında deiyonize su veya metanol ile seyreltilti.

Numuneler çalışmaya başlanılmadan önce -80 °C'de saklandı. Dokular saklanmadan önce EDTA ile muamele edilmemelidir çünkü TAK testine etki edebilmektedir. Soğuk PBS solüsyonunda 5 mL'de 1 gr olacak şekilde doku örnekleri homojenize edildi. Daha sonra homojenize edilen solüsyon 4 °C'de 10000 g'de 10 dk boyunca santrijüf yapıldı. Son olarak süpernutantları alikvatlanıp -80 °C'de saklandı.

1N NaOH içinde 10 mg/mL çözelti için ürik asit tozunu tartarak taze ürik asit standartları hazırlandı. 2 mM ürik asit solüsyonu hazırlamak için 60 mM ürik asit solüsyonunu kullanıldı. Tablo 3.1'de gösterildiği gibi ürik asit standartları hazırlandı.

Tablo 3.1: Ürik Asit Standartlarının Hazırlanması

Tüpler	2 mM Ürik Asit Antioksidan Standardı (µL)	Deiyonize Su (µL)	Ortaya Çıkan Ürik Asit Konsantrasyonu (mM)
1	500	500	1
2	Tüp #1'den 500	500	0,5
3	Tüp #2'den 500	500	0,25
4	Tüp #3'den 500	500	0,125
5	Tüp #4'ten 500	500	0,0625
6	Tüp #5'ten 500	500	0,03125
7	Tüp #6'dan 500	500	0,0156
8	Tüp #7'den 500	500	0,0078
9	Tüp #8'den 500	500	0,0039
10	0	500	0,0

Her bir ürik asit standardı ve kullandığımız örnekler ikiyeşerli halde test edildi. Kuyucuklara 20 µL seyreltilmiş ürik asit standardı ve örnekler eklendi. Her kuyuya 180 µL 1 x Reaction Buffer eklenerek 200 µL'ye tamamlandı. Kuyucuklardaki solüsyonlar iyice karıştırıldı. Spektrofotometre kullanılarak 490 nm'de okuma yapılarak başlangıç absorbansları elde edildi. Reaksiyonu başlatmak için, her kuyuya 50 µL 1 x copper ion reagent eklendi ve 5 dk boyunca karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Daha sonra reaksiyonu durdurmak için her kuyuya 50 µL 1 x stop solüsyonu eklendi. Son olarak spektrofotometre kullanılarak 490 nm'de tekrar okuma yapıldı.

Sonuçlar hesaplanırken hem örneklerden hem standartlar için son okunan absorbans değerinden ilk okunan absorbans değeri çıkartıldı. Böylece net absorbans değeri hesaplanmış oldu. Ürik asit standart eğrisi için ürik asit konsantrasyonuna karşı net absorbansı çizildi. Numunelerin net OD 490 nm değerlerini ürik asit standart eğrisi ile karşılaştırarak bilinmeyen numunelerin antioksidan kapasitesini hesaplandı.

Örnekler için “µM Bakır İndirgeme Eşdeğerlerini” (CRE) belirlemek için ürik asit eşdeğerliği (UAE) konsantrasyonunu 2189 µM Cu⁺²/mM ürik asit ile çarpıldı. 1 mM ürik asit = 2189 µM Bakır İndirgeme Eşdeğeri şeklinde hesaplandı. CRE örnek değerleri, örneğin Toplam Antioksidan Kapasitesi veya Toplam Antioksidan Gücü ile orantılıdır.

3.4. İstatiksel Analizler

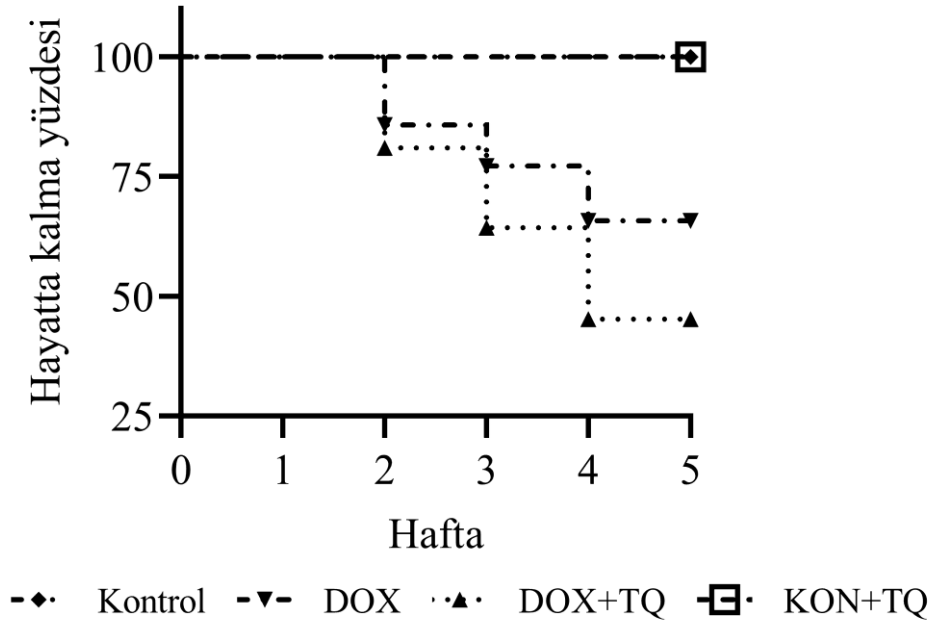
İstatistiksel değerlendirme SPSS paket programı kullanılarak yapıldı ve sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. Her değişken için normallik testi uygulanmıştır. Normal dağılıma uyan veriler için parametrik olan Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve onu takiben Tukey testi, uymayanlarda ise nonparametrik olan Kruskal Wallis Varyans Analizi ve onu takiben Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır. $P<0,05$ 'i sağlayan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Deney Hayvanlarının Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri

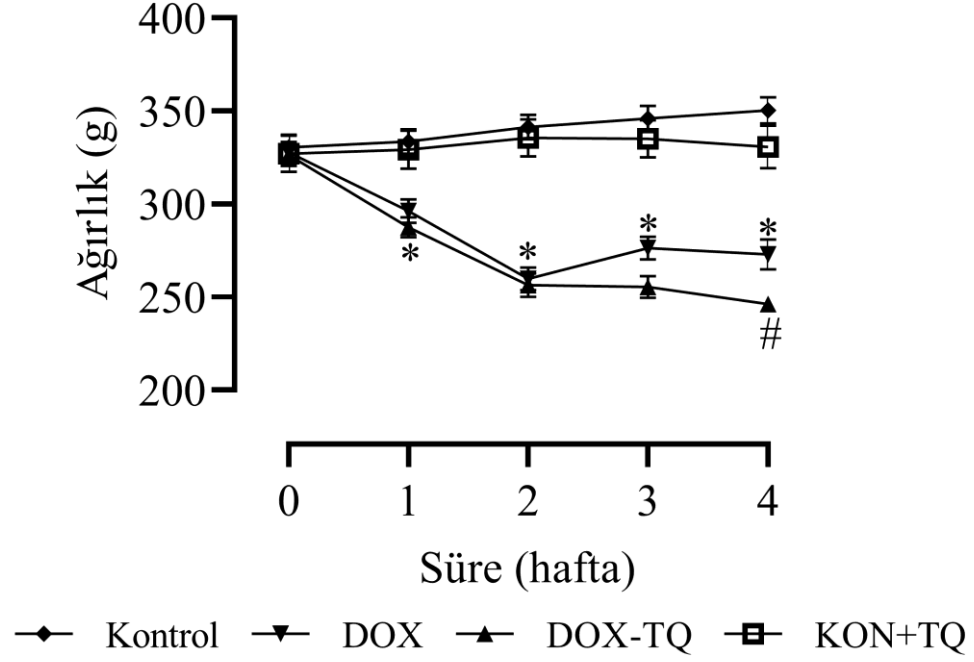
Kontrol ve KON+TQ grubunda 4 haftalık uygulama sonunda deneye alınan sıçanlarda herhangi bir ölüm olmazken, DOX ve DOX+TQ grubunda ikinci haftadan itibaren ölümler görülmeye başlandı. DOX+TQ grubunda DOX grubuna göre ölüm oranının haftalar geçtikçe daha fazla olduğu görüldü. DOX grubunda sağ kalım %65,71 iken DOX+TQ grubundaki sağ kalım %45,24 olarak gerçekleşti. Yaptığımız çalışmada DOX üzerine TQ uygulanan grupta (DOX+TQ) anlamlı olarak sağ kalım oranının düştüğü görülmüştür (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: 4 haftalık deney süresi sonunda gruplarda gözlemlenen sağ kalım yüzdesinin değişimi

Tüm grupların 4 hafta boyunca, her haftanın ilk günü olmak üzere kilo takibi yapıldı. Şekil 4.2’de ve Tablo 4.1’de görüldüğü gibi başlangıçta grupların ortalama kiloları arasında fark yokken DOX verilen gruplarda kontrole göre anlamlı düzeyde kilo kaybı görüldü. 4. haftanın sonunda yapılan kilo ölçümlerinde DOX+TQ grubunda DOX grubuna göre kilo

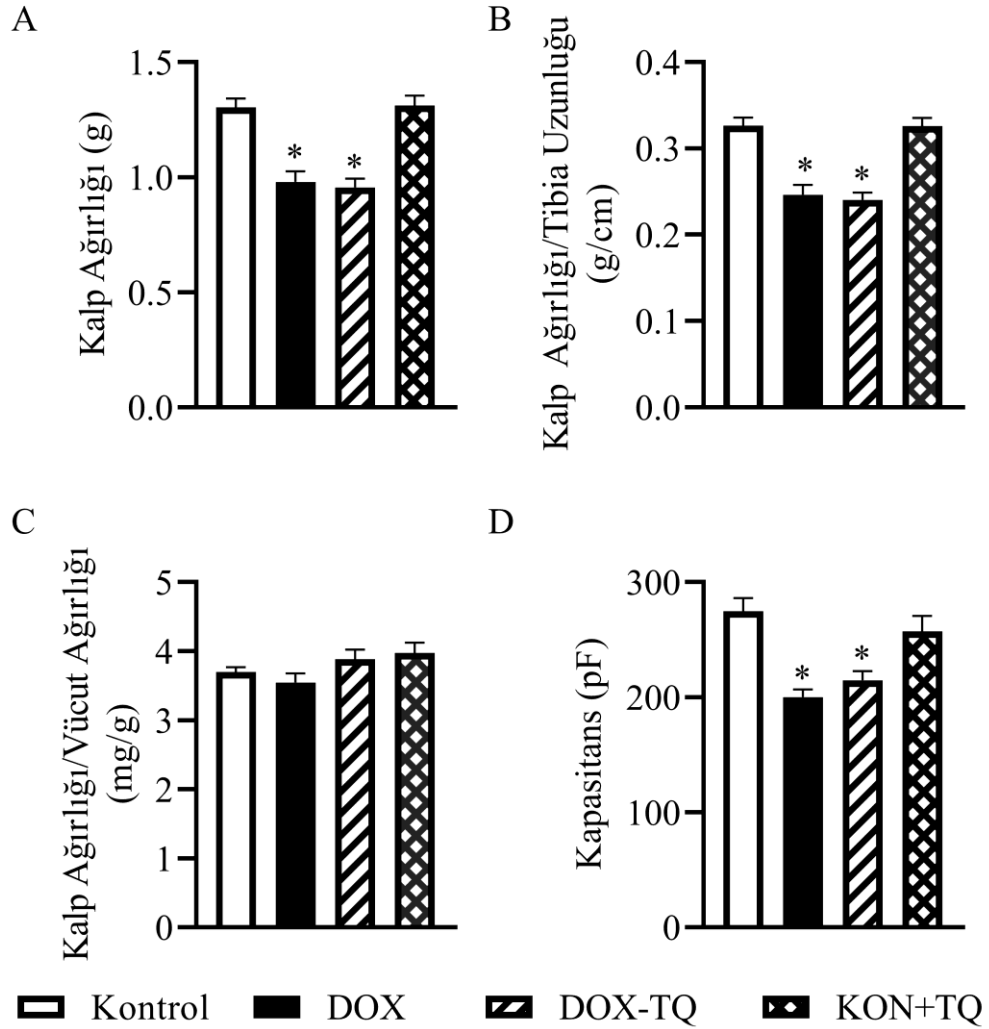
kaybının anlamlı şekilde arttığı görüldü. Buna karşılık Kontrol grubu sıçanlarında deney süreci sonunda kilo artışı olduğu görüldü.



Şekil 4.2: Deney gruplarının haftalık ortalama kilo değerleri. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. Sırasıyla Kontrol, DOX, DOX+TQ, KON+TQ grupları için n=24, 23, 19, 18 hayvan. *p<0,05, Kontrol grubuna göre ve #p<0,05, DOX grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir.

Tablo 4.1: Deney gruplarından ölçülen vücut ağırlıklarının ilk ve son değerleri ve yüzdelik değişimi. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi.

Grup	İlk Kilo	Son Kilo	Yüzde Değişim
Kontrol	330,46±6,84	350,29±7,20	6,08
DOX	327,83±5,71	273,04±8,07	-16,99
DOX+TQ	326,32±5,79	246,16±3,77	-24.29
KON+TQ	327,00±9,68	330,72±11,49	0,95



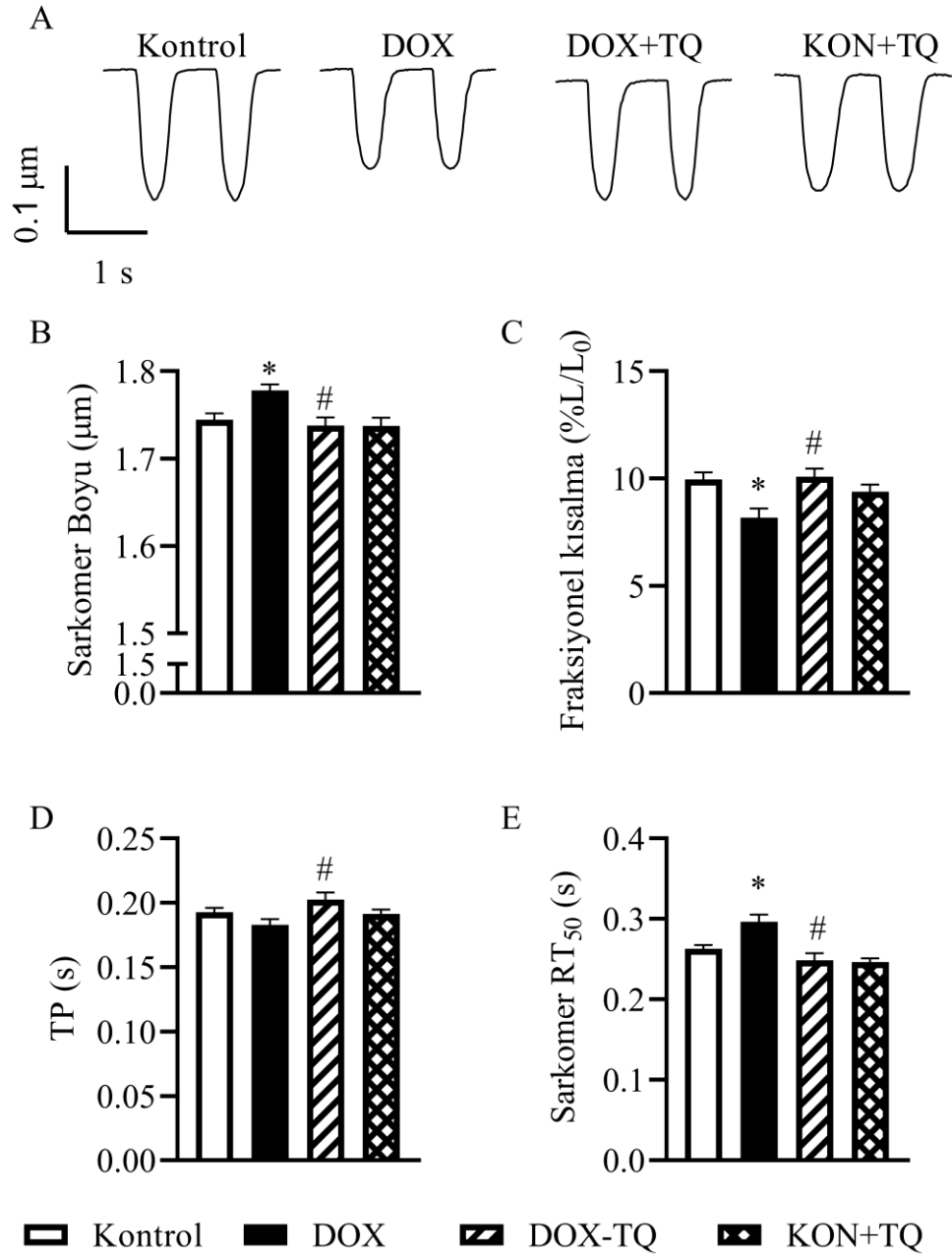
Şekil 4.3: TQ uygulamasının kalp ağırlığına etkisi. A) Kalp ağırlığı, B) Kalp ağırlığının tibia uzunluğuna oranı, C) Kalp ağırlığının vücut ağırlığına oranı D) Ortalama kapasitans değerleri. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. Sırasıyla Kontrol, DOX, DOX+TQ, KON+TQ grupları için n=24, 23, 19, 18 hayvan, *p<0,05, Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir.

Şekil 4.3A’da görüldüğü gibi kalp ağırlıklarının DOX verilen gruplarda anlamlı olarak azaldığı görüldü (Kontrol: $1,30 \pm 0,04$ g; DOX: $0,98 \pm 0,05$ g, $p < 0,05$). DOX+TQ grubundaki hayvanların kalp ağırlıklarında DOX grubuna göre anlamlı bir farka rastlanmadı (DOX: $0,98 \pm 0,05$ g; DOX+TQ: $0,96 \pm 0,04$ g, $p = 0,71$). Buna karşılık Kontrol ile KON+TQ arasında anlamlı bir fark görülmedi (Kontrol: $1,30 \pm 0,04$ g; KON+TQ: $1,31 \pm 0,04$ g, $p = 0,90$). Şekil 4.3B’de kalp ağırlıklarının tibia uzunluğuna oranı gösterildi. Şekilde de görüldüğü gibi kalp ağırlığının tibia uzunluğuna oranının DOX uygulanan gruplarda kontrole göre anlamlı derece azaldığı gözlemlendi (Kontrol: $0,33 \pm 0,01$ g/cm;

DOX: $0,25 \pm 0,01$ g/cm, $p < 0,05$). Şekil 4.3C’de görüldüğü gibi vücut ağırlığı ile orantılı şekilde kalp ağırlığının da azalmasından dolayı kalp ağırlığının vücut ağırlığına oranında gruplar arasında anlamlı fark görülmedi. Kalp kütlesi azalırken kardiyomiyosit hücrelerinin büyüklükleri kapasitans değerlerine bakılarak incelendiğinde DOX uygulaması alan hayvanların kardiyomiyositlerinde kontrole göre anlamlı fark olduğu gözlemlendi (Kontrol: $274,70 \pm 11,54$ pF; DOX: $200,20 \pm 6,59$ pF, $p < 0,05$) (Şekil 4.3D). DOX+TQ grubunda DOX grubuna göre anlamlı bir değişiklik görülmedi (DOX: $200,20 \pm 6,59$ pF; DOX+TQ: $214,80 \pm 7,98$ g, $p = 0,07$).

4.2. Kasılma Parametreleri

DOX kullanımı sonrası kalpte oluşabilecek fonksiyonel bozukluklara TQ’nun etkisini belirlemek için kardiyomiyositlerde kasılma parametreleri incelendi. Kardiyomiyositlerin fraksiyonel kısalmaları 5-8 V genliğinde ve 1 Hz frekansa sahip elektriksel alan uyarısı altında kaydedildi. Şekil 4.4A’da her bir grup için örnek kasılma yanıtları bulunmaktadır. Dinlenim durumundaki sarkomer boyu ölçüldüğünde DOX grubunda kontrole göre anlamlı bir artışın olduğu görüldü (Kontrol: $1,75 \pm 0,01$ μ m; DOX: $1,78 \pm 0,01$ μ m, $p < 0,05$). Fakat DOX uygulaması üzerine TQ verilen hayvanlarda bu değişikliğin düzeldiği (DOX: $1,78 \pm 0,01$ μ m; DOX+TQ: $1,74 \pm 0,01$ μ m $p < 0,05$) gözlemlendi (Şekil 4.4B). Kontrol ile KON+TQ grupları arasında ise anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Kontrol: $1,75 \pm 0,05$ μ m; KON+TQ: $1,74 \pm 0,01$ μ m, $p = 0,55$). Daha sonra gruplar arasındaki fraksiyonel kısalma miktarı incelendi (Şekil 4.4C). Fraksiyonel kasılma parametreleri açısından kontrol grubu ile DOX grubu arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edildi (Kontrol: $9,96 \pm 0,33$; DOX: $8,17 \pm 0,44$, $p < 0,05$). DOX grubu miyositlerinde kontrol grubu miyositlerine göre fraksiyonel kısalma miktarında azalma görülürken, DOX+TQ grubunda bu değişikliğin anlamlı olarak düzeldiği ve kontrol seviyesine yaklaştığı gözlemlendi (DOX: $8,17 \pm 0,44$; DOX+TQ: $10,09 \pm 0,38$, $p < 0,05$). KON+TQ grubuna bakıldığında ise kontrole göre anlamlı bir fark gözlemlenmedi (Kontrol: $9,96 \pm 0,33$; KON+TQ: $9,38 \pm 0,34$, $p = 0,55$).



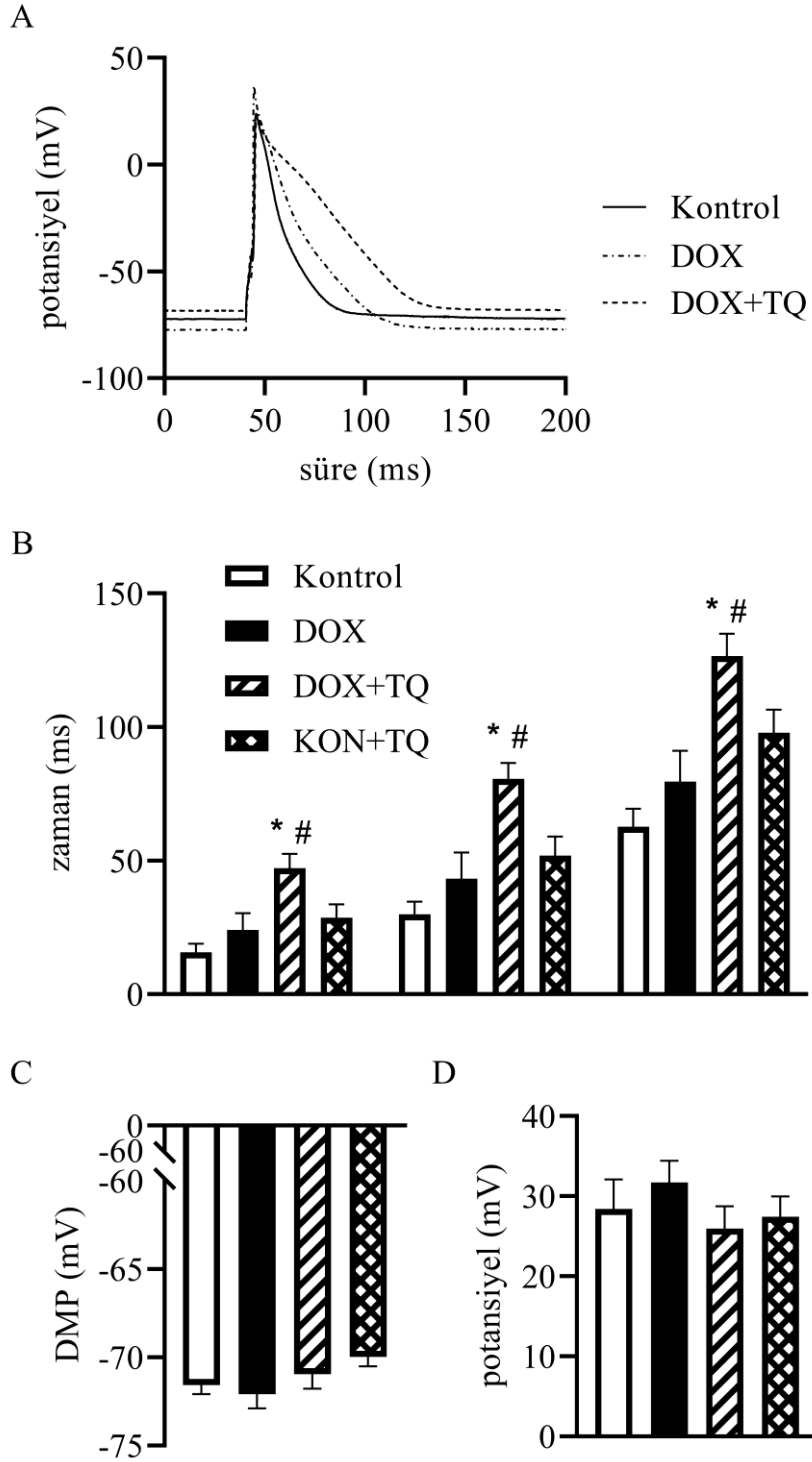
Şekil 4.4: Frekansı 1 Hz olan elektriksel alan uyarısı verilen kardiyomiyositlerden kaydedilen kısalma parametreleri. A) Her bir gruba ait kısalma traseleri. B) Dinlenme durumunda ölçülen sarkomer boyları. C) Fraksiyonel kısalma oranı. D) Kısalmanın maksimuma ulaşması için gereken süre (TP). E) Relaksasyonun %50'sine ulaşması için gereken süre. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. Sırasıyla Kontrol, DOX, DOX+TQ, KON+TQ grupları için n=51, 50, 47, 52 kardiyomiyosit, *p<0,05, Kontrol grubuna göre ve #p<0,05, DOX grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir.

Son olarak gruplar arasındaki kasılma ve gevşeme sürelerindeki değişimleri incelemek için TP ve RT₅₀ parametreleri incelendi. Şekil 4.4D'de görüldüğü gibi TP parametresi incelendiğinde kontrole göre DOX grubunda anlamlı bir fark görülmedi (Kontrol:

0,19±0,00 s; DOX: 0,18±0,01 s, p=0,09). DOX+TQ grubunda DOX grubuna göre kısılmanın maksimuma ulaşması için gereken süre anlamlı şekilde arttığı görüldü (DOX: 0,18±0,01; DOX+TQ: 0,20±0,01 s, p<0,05). Kısılma sürelerinden sonra gruplar arasındaki gevşeme süreleri karşılaştırıldı (Şekil 4.4E). Kontrol grubuna göre DOX grubunda RT₅₀ ulaşma süresinin anlamlı şekilde arttığı görüldü (Kontrol: 0,26±0,00 s; DOX: 0,30±0,01 s, p<0,05). DOX+TQ grubunda ise bu uzamanın düzeldiği ve DOX grubu ile aralarında anlamlı bir fark olduğu görüldü (DOX: 0,30±0,01 s; DOX+TQ: 0,24±0,01 s, p<0,05). Bu sonuçlar, kalpte oluşan DOX indüklü kardiyotoksisitenin neden olduğu kasılma bozukluğunun TQ ile engellenebileceğini göstermektedir.

4.3. Aksiyon Potansiyeli

DOX uygulaması sonucunda sıçan sol ventrikül miyositlerinin elektriksel aktivitesinde oluşan hasarı ve TQ'nun bu hasarı engelleyip engellemediğini görmek için AP kayıtları alındı. Gruplar için örnek AP kayıtları Şekil 4.5A'da verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi hem DOX grubunda hem de DOX+TQ grubunda repolarizasyon sürelerinde kontrol grubu miyositlerine göre uzama görülmektedir. Şekil 4.5B'de AP'nin repolarizasyon fazının %25, %50 ve %90'ına düşene kadar geçen sürenin hesaplanan değerleri görülmektedir ve seçilen bu süreler sırasıyla APD₂₅, APD₅₀ ve APD₉₀ olarak adlandırıldı. Kontrol grubuna göre DOX grubu incelendiğinde bütün repolarizasyon sürelerinde uzama eğilimi olduğu ancak bu uzamanın istatistiksel olarak anlamlı bir seviyeye ulaşamadığı gözlenmiştir. DOX+TQ grubu miyositlerinde ise hem kontrol hem de DOX grubu miyositlerine göre repolarizasyon sürelerinde anlamlı bir uzama görüldü. Burada görüldüğü gibi DOX+TQ grubunda, 4 haftalık TQ tedavisi AP repolarizasyon sürelerini anlamlı olarak düzeltmedi. Daha sonra ventrikül miyositlerinin dinlenim membran potansiyelleri ve AP genlikleri incelendiğinde, gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.5D).

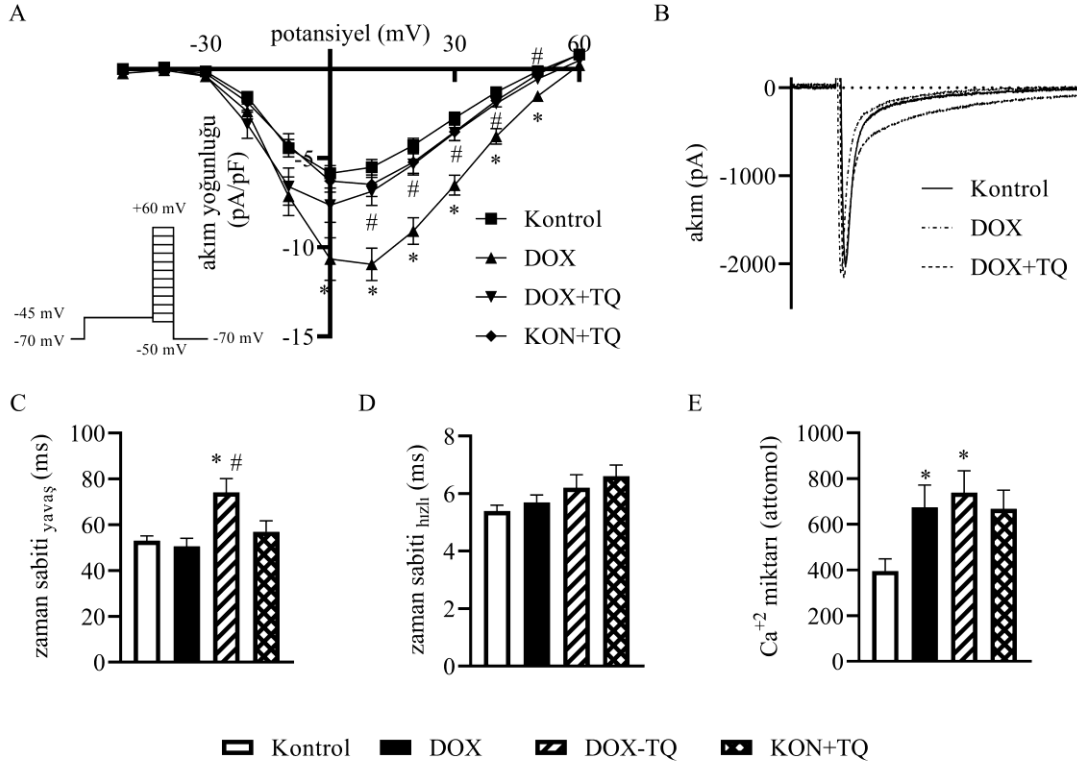


Şekil 4.5: 1 Hz frekansında uyarılan hücrelerde ölçülen aksiyon potansiyeli parametreleri. A) Gruplar için örnek aksiyon potansiyeli kayıtları. B) Aksiyon potansiyeli genliğinin %25, %50 ve %90'ına düşene kadar geçen süre. C) Dinlenme membran potansiyeli. D) Aksiyon potansiyelinin tepe noktası. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. Sırasıyla Kontrol, DOX, DOX+TQ, KON+TQ grupları için $n=18, 14, 15, 19$ miyosit hücresi, * $p<0,05$, Kontrol grubuna göre ve # $p<0,05$, DOX grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir.

4.4. L-tipi Ca^{+2} Akımları

İlk önce potansiyele bağılı olarak akım yoğunluğu kayıtları alındı (Şekil 4.6A). 0 mV'dan sonra Kontrol grubu miyositlerinin akım yoğunluğunda DOX grubuna göre anlamlı bir artış görüldü. TQ tedavisinin ise bu etkiyi anlamlı şekilde düzelttiği gözlemlendi. Şekil 4.6B'de grupların 0 mV değerinde gözlenen örnek akım traseleri gösterilmiştir. Şekil 4.6B'de görülen akım traseleri için zaman sabitlerine bakıldığında yavaş zaman sabitinde Kontrol grubuna göre DOX grubu miyositlerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı (Kontrol: $53,06 \pm 2,11$ ms; DOX: $50,59 \pm 3,45$ ms, $p=0,14$) (Şekil 4.6C), fakat DOX+TQ grubunda akımın yavaş zaman sabitinde DOX grubu miyositlerine göre anlamlı bir uzamanın olduğu görülmüştür (DOX: $50,59 \pm 3,45$ ms; DOX+TQ: $74,08 \pm 6,08$ ms, $p<0,05$). Hızlı zaman sabitlerinde ise gruplar arasında herhangi bir fark görülmemiştir (Kontrol: $5,39 \pm 0,21$ ms; DOX: $5,70 \pm 0,26$ ms, $p=0,42$) (Şekil 4.6D).

RyR2'nin aktivasyonu için L-tipi Ca^{+2} kanallarından giren Ca^{+2} önemli bir yer tutmaktadır. L-tipi Ca^{+2} kanallarının tepe noktasındaki değişimin yanında bu kanallardan zamanla giren Ca^{+2} miktarı da önemli bir parametredir. Bundan dolayı, son olarak L-tipi Ca^{+2} kanallarından giren Ca^{+2} iyonlarının miktarı hesaplandı (Şekil 4.6E). Bunun için L-tipi Ca^{+2} kanallarından ölçülen traselerin altında kalan alan hesaplanarak hücre içine giren toplam yük hesaplandı. Kontrol grubuna göre DOX grubunda hücre içine giren Ca^{+2} iyon miktarı anlamlı şekilde artmaktadır (Kontrol: $392,20 \pm 53,49$ attomol; DOX: $674,00 \pm 97,47$ attomol, $p<0,05$). DOX+TQ grubu miyositlerinde ise DOX grubuna göre anlamlı şekilde artmamış olsa dahi hücre içine giren Ca^{+2} iyon miktarının DOX grubuna göre arttığı gösterilmiştir (DOX: $674,00 \pm 97,47$ attomol; DOX+TQ: $739,40 \pm 94,71$ attomol, $p=0,49$).

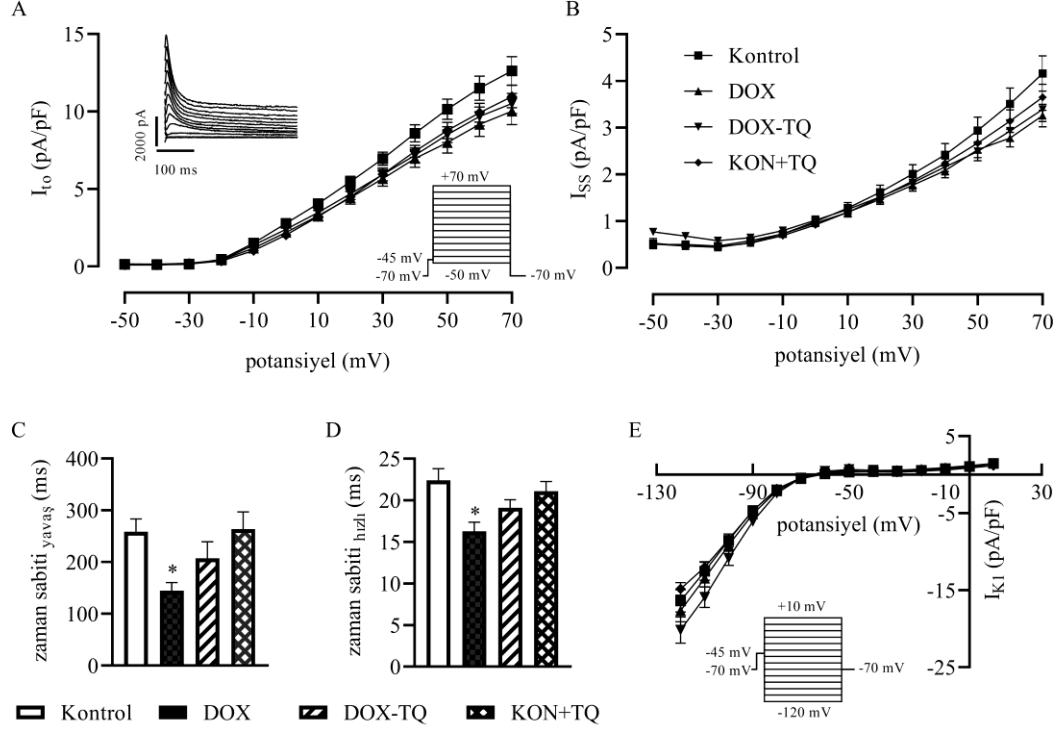


Şekil 4.6: Deney grupları için elde edilen L-tipi Ca^{2+} akımları. A) Her bir gruptan alınan ortalama akım değerlerinin potansiyele göre grafiği. B) Örnek L-tipi Ca^{2+} akım traseleri. C ve D) L-tipi Ca^{2+} kanallarının kapanma kinetiklerinin sırasıyla yavaş ve hızlı zaman sabitleri. E) L-tipi Ca^{2+} kanallarından hücre içine giren Ca^{2+} miktarı. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. Sırasıyla Kontrol, DOX, DOX+TQ, KON+TQ grupları için $n=14, 16, 14, 14$ miyosit hücresi, * $p<0,05$, Kontrol grubuna göre ve # $p<0,05$, DOX grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir.

4.5. Potasyum Akımları

AP'nin repolarizasyonunda önemli bir role sahip olan K^{+} kanalları incelendi. Bu çalışmada I_{to} , I_{ss} ve I_{K1} kayıtları gruplar arasında karşılaştırıldı. İlk önce farklı potansiyel değerlerine göre ölçülen ortalama I_{to} yoğunluğu grafiği verildi (Şekil 4.7A). Grupların I_{to} yoğunlukları arasında herhangi bir fark görülmedi. Aynı şekilde I_{ss} olarak değerlendirilen kuyruk akımlarının da potansiyele bağlı değişimleri incelendi (Şekil 4.7B). I_{to} 'da olduğu gibi, gruplar arasında herhangi bir fark bulunamadı. Daha sonra I_{to} yoğunluğunun yavaş ve hızlı zaman sabitleri hesaplandı (sırasıyla Şekil 4.7C ve Şekil 4.7D). Kontrol grubuna göre DOX grubu miyositlerinin yavaş zaman sabitinde anlamlı bir azalma görüldü (Kontrol: $258,70 \pm 24,41$ ms; DOX: $144,70 \pm 15,85$ ms, $p<0,05$). DOX+TQ grubunda DOX grubuna göre yavaş zaman sabitinde artma olsa da bu artış anlamlı bulunmadı (DOX: $144,70 \pm 15,85$ ms; DOX+TQ: $207,40 \pm 31,82$ ms, $p=0,22$). Aynı şekilde hızlı zaman

sabitinde de kontrole göre DOX grubunda anlamlı bir azalma görüldü (Kontrol: $22,39 \pm 1,40$ ms; DOX: $16,27 \pm 1,10$ ms, $p < 0,05$). Yavaş zaman sabitinde de DOX grubuna göre DOX+TQ grubunda anlamlı bir fark görülmedi (DOX: $16,27 \pm 1,10$ ms; DOX+TQ: $19,10 \pm 0,96$ ms, $p = 0,09$).

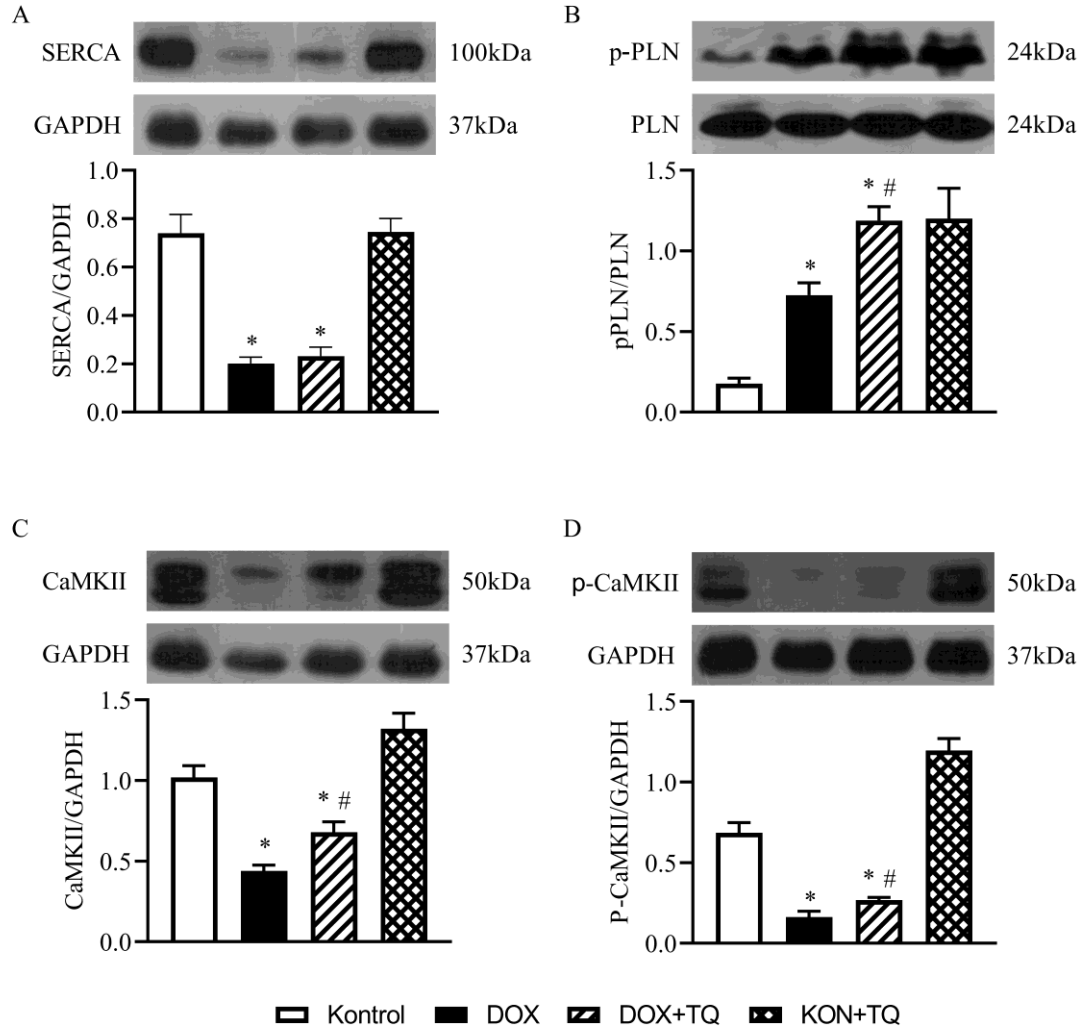


Şekil 4.7: Gruplara ait potasyum akım yoğunluğu I-V grafikleri ve zaman sabitleri. A) Tüm gruplar için I_{to} yoğunluğu ortalama traseleri. B) Her bir grup için I_{ss} yoğunluğu ortalama traseleri. C ve D) +70 mV'daki I_{to} 'lara ait sırasıyla yavaş ve hızlı zaman sabitleri. E) Her bir grup için I_{K1} yoğunluğu ortalama traseleri. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. Sırasıyla Kontrol, DOX, DOX+TQ, KON+TQ grupları için $n=14, 17, 14, 13$ miyosit, * $p < 0,05$, Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir.

Son olarak dinlenim membran potansiyelinden, stabil olmasından ve AP'nin repolarizasyon fazının son kısmından sorumlu olan I_{K1} akım kayıtları alındı ve I-V değişim eğrisi çizildi (Şekil 4.7E). Kontrol grubuna göre DOX grubunda anlamlı bir fark görülmedi. Aynı şekilde DOX grubuna göre DOX+TQ grubunda da anlamlı bir fark bulunamadı. Bu sonuçlarda dinlenim membran potansiyeli bulguları ile örtüşmektedir.

4.6. Protein Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

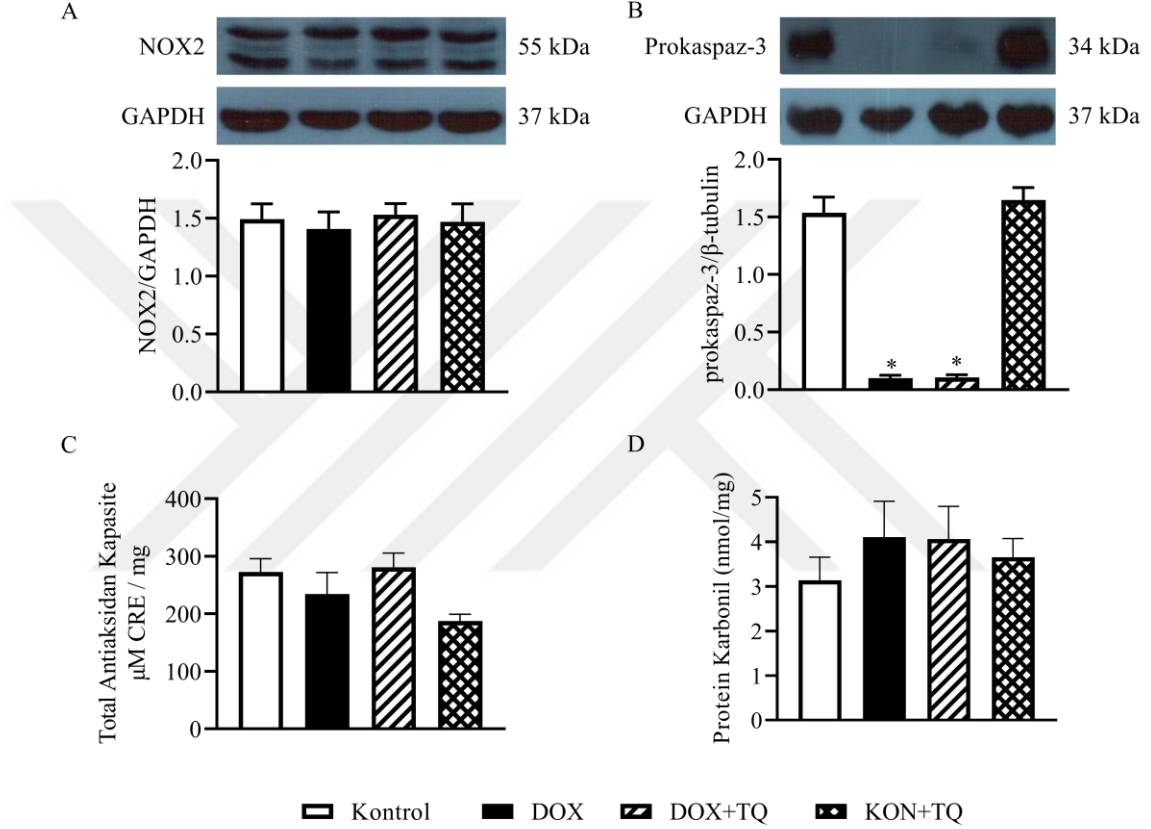
Normal şartlar altında hücre içindeki Ca^{+2} konsantrasyonunu düzenleyen birçok protein bulunmaktadır. DOX uygulamasının hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu etkilediği bilindiği için hücre içi Ca^{+2} regülasyonunda etkili olan proteinlerin ekspresyonları da değerlendirildi ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.8’de gösterildi. SERCA ekspresyonu analiz edildiğinde (Şekil 4.8A) Kontrol grubuna göre DOX grubu kalplerine anlamlı şekilde azaldığı görüldü (Kontrol: $0,74 \pm 0,08$; DOX: $0,20 \pm 0,03$, $p < 0,05$). DOX+TQ grubunda ise SERCA ekspresyonu DOX grubuna göre artmış olsa da anlamlı bir fark görülmedi (DOX: $0,20 \pm 0,03$; DOX+TQ: $0,23 \pm 0,04$, $p = 0,52$). SERCA aktivitesini düzenleyen önemli bir protein olan PLB ve p-PLB ekspresyonları da ölçüldü (Şekil 4.8B). Kontrol grubuna göre DOX grubundaki p-PLB/PLB oranının anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir (Kontrol: $0,18 \pm 0,03$; DOX: $0,73 \pm 0,08$, $p < 0,05$). DOX+TQ grubunda hem Kontrol hem de DOX grubuna göre anlamlı düzeyde fark gösterdi (DOX: $0,73 \pm 0,08$; DOX+TQ: $1,19 \pm 0,08$, $p < 0,05$). Hücre içi Ca^{+2} regülasyonunda önemli diğer bir protein olan CaMKII’nin total ve fosforillenmiş formunun (p-CaMKII) ekspresyonlarının DOX uygulaması ile nasıl değiştiği ve TQ uygulamasının buna etkisi de araştırıldı (sırasıyla Şekil 4.8C ve Şekil 4.8D). Kontrole göre DOX grubunda CaMKII protein miktarının anlamlı seviyede azaldığı görüldü (Kontrol: $1,02 \pm 0,07$; DOX: $0,44 \pm 0,04$, $p < 0,05$). DOX+TQ grubunda DOX grubuna göre anlamlı bir artış olsa da Kontrol grubu seviyesine getiremedi (DOX: $0,44 \pm 0,04$; DOX+TQ: $0,68 \pm 0,06$, $p < 0,05$). Benzer şekilde, p-CaMKII protein ekspresyonu incelendiğinde, Kontrol grubuna göre DOX grubunda ekspresyonun anlamlı düzeyde azaldığı görülmektedir (Kontrol: $0,69 \pm 0,06$; DOX: $0,16 \pm 0,04$, $p < 0,05$). DOX grubuna göre DOX+TQ grubunda p-CaMKII ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış ve düzelme gözlemlendi (DOX: $0,16 \pm 0,04$; DOX+TQ: $0,27 \pm 0,02$, $p < 0,05$).



Şekil 4.8: Hücre içi Ca^{+2} düzenleyici proteinlerin western blot görüntüleri ve grafikleri. A) SERCA (110 kDa), B) p-PLB/PLB (24 kDa), C) CaMKII (50 kDa) ve D) p-CaMKII (50 kDa) protein ekspresyon miktarları. SERCA, CaMKII ve p-CaMKII GAPDH ile normalize edildi. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. Sırasıyla SERCA, p-PLN/PLN, CaMKII, p-CaMKII ölçümleri için $n=8$, 8 , 15 , 11 , $*p<0,05$, Kontrol grubuna göre ve $\#p<0,05$, DOX grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir.

DOX'un en önemli etki mekanizmasının artan ROS miktarı ile oluşan hücre hasarı olduğu iddia edilmektedir. O yüzden ilk önce önemli bir ROS kaynağı olan NOX2 enziminin protein ekspresyonu değerlendirildi (Şekil 4.9A). Şekilde de görüldüğü gibi gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı (Kontrol: $1,49 \pm 0,13$; DOX: $1,41 \pm 0,15$, $p=0,67$ ve DOX: $1,41 \pm 0,15$; DOX+TQ: $1,53 \pm 0,10$, $p=0,50$). Daha sonra hücrelerin apoptotik yolağın önemli belirteçlerinden biri olan kaspaz aktivitesinin değişimi hakkında bilgi elde etmek için prokaspaz-3 protein ekspresyonu ölçüldü (Şekil 4.9B). Normal şartlarda inaktif bulunan bu protein apoptoz sinyali aldıktan sonra aktif hale geçerek (kaspaza dönüşür)

hücresinin ölümünü gerçekleştirmektedir. Kontrol grubuna göre DOX grubunda prokaspaz-3 protein ekspresyonunun anlamlı derecede düştüğü görüldü (Kontrol: $1,54 \pm 0,14$; DOX: $0,10 \pm 0,03$, $p < 0,05$). DOX grubu ile DOX+TQ grubu arasında ise anlamlı herhangi bir fark bulunmadı (DOX: $0,10 \pm 0,03$; DOX+TQ: $0,11 \pm 0,02$, $p = 0,90$).



Şekil 4.9: Deney gruplarının oksidatif stres, antioksidan ve apoptoz parametreleri. A) NOX2 (55 kDa), B) Prokaspaz-3 (34 kDa) protein ekspresyon miktarları ve western blot görüntüleri. C) Tüm grupların ortalama antioksidan kapasitesi. D) Protein karbonil seviyeleri. Her bir protein ekspresyonu kendi GAPDH ekspresyonuna bölünerek normalize edildi. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. Sırasıyla NOX2, prokaspaz-3, TAK ve protein karbonil ölçümleri için $n = 6, 8, 10, 6$, * $p < 0,05$, Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir.

TQ'nun iyi bir antioksidan olduğu iddia edildiği için gruplar arasındaki antioksidan miktarı değişimini gösteren TAK miktarı ölçüldü (Şekil 4.9C). Kontrole göre DOX grubunda anlamlı bir fark görülmedi (Kontrol: $272,90 \pm 23,30$ μ M CRE/mg; DOX: $234,60 \pm 37,28$ μ M CRE/mg, $p = 0,39$). Aynı şekilde DOX grubu ile DOX+TQ grubu arasında da anlamlı bir fark bulunmadı (DOX: $234,60 \pm 37,28$ μ M CRE/mg; DOX+TQ: $281,10 \pm 24,59$ μ M CRE/mg, $p = 0,30$). İlginç bir şekilde antioksidan miktarının Kontrol

grubuna göre KON+TQ grubunda anlamlı şekilde düştüğü görüldü (Kontrol: $272,90 \pm 23,30$ μ M CRE/mg; KON+TQ: $187,50 \pm 11,95$ μ M CRE/mg, $p < 0,05$). Son olarak protein oksidasyonunun seviyesini ölçmek için protein karbonil seviyesi ölçüldü (Şekil 4.9D). Gruplar arasında herhangi bir fark görölmedi (Kontrol: $3,14 \pm 0,52$ nmol/mg; DOX: $4,11 \pm 0,80$ nmol/mg, $p = 0,32$ ve DOX: $4,11 \pm 0,80$ nmol/mg; DOX+TQ: $4,07 \pm 0,73$ nmol/mg, $p = 0,97$).



5. TARTIŞMA

DOX, kanser tedavisinde kullanılan çok etkili ve geniş spektrumlu antrasiklin türevi bir antibiyotiktir. Genellikle lösemi ve lenfoma gibi hematolojik kanser türlerinde, meme kanserinde ve yumuşak doku kanserlerinin tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Tümörlere karşı çok etkili olması ve birçok farklı kanser türünde kullanılmasına rağmen oldukça toksik bir maddedir. Birçok yan etkisinin olmasına rağmen DİK bunların en önemlilerindendir. Oluşturduğu kardiyotoksisitenin birçok farklı mekanizma tarafından gerçekleştiği öne sürülmektedir. Bunlardan en yaygın kabul edilen mekanizma olarak hücre içi ROS seviyesinin artışı ve antioksidan seviyesindeki düşüştür (Ferreira ve ark., 2007).

Çalışmamızda, DİK oluşturabilmek için deney gruplarına bir gün arayla toplamda beş gün olacak şekilde DOX verildi. Hayvanlara verilen toplam doz 15 mg/kg olarak seçildi ve bu doz ile deney hayvanlarında kronik kardiyotoksisite oluşturuldu (Meeran ve ark., 2019). Dört haftanın sonunda kardiyomiyositlerde meydana gelen elektrofizyolojik değişiklikler ve kasılmada oluşan değişiklikler belirlendi. Daha sonra antioksidan özelliği gösterdiği öne sürülen TQ'nun kardiyomiyositlerde oluşan değişikliklere etkisi incelendi. Sonuç olarak da TQ'nun DİK'e olumlu etkilerinin olup olmadığı araştırıldı.

İlk bulgumuz olan sağ kalım yüzdesinde gruplar arasında anlamlı farklılıklar görüldü. Çalışmamızda DOX grubunda sağ kalım oranının %65,71'lere düştüğü görüldü. Bu sonuç literatürde de bulunan sonuçlar ile örtüşmektedir. Cappetta ve ark. (2017) ile Sugiyama ve ark. (2016)'nın çalışmalarında akut ve kronik DOX uygulamasındaki sağ kalım oranlarının %75 civarlarında olduğu belirtilmiştir (Sugiyama ve ark., 2016; Cappetta ve ark., 2017). Hatta daha uzun süreli çalışmalarda sağ kalım oranının çok fazla düştüğü de gösterilmiştir (Vasić ve ark., 2019). Literatürde günde 10 mg/kg verilen KON+TQ gruplarında herhangi bir ölüm gözükmezken Atta ve ark. (2017) yaptığı kronik çalışmadan günlük 50 mg/kg alan sıçanlarda sağ kalım oranının %86,67 olduğu gösterilmiştir (Atta ve ark., 2017). Bizim çalışmamızda ise DOX+TQ grubunun sağ kalım yüzdesinin DOX grubuna göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Sağ kalım oranlarının DOX+TQ grubunda DOX grubuna göre %31,14 azaldığı belirlenmiştir. Bu nedenle, çalışmamız

DOX üzerine TQ tedavisi verilen hayvanlarda kalp yetmezliğinden dolayı oluşan ölüm oranlarında iyileşme yerine daha da kötüleşen bir durum olduğunu göstermektedir. Ölüm oranları ile paralel olarak 4 hafta sonundaki kilo değişimlerini karşılaştırdığımızda DOX+TQ grubunun başlangıç kilo değerine göre %24,29 oranında kilo kaybettiği görülmüştür. Bu oran DOX grubunda ise %16,99 olarak belirlenmiştir. Genelde DOX tedavisi sırasında kilo kaybının görülmesi gıda isteksizliğinden dolayı normal olarak karşılanmaktadır (McLean ve ark., 2019).

Çalışmadaki tüm hayvanların kalpleri tartıldı ve DOX ve DOX+TQ gruplarında kontrole göre anlamlı bir azalma görüldü. DOX uygulaması alan hayvanlarda oluşan yemek yeme isteğinin azalmasının nedeni olarak *anorexia nervosa* gösterilebilir (Ofiaz ve ark., 2013). Bu şekilde hem kilo kayıpları hem de kalpteki ağırlık kaybı açıklanabilmektedir. Tibia uzunluğunda gruplar arasında anlamlı bir fark yokken kalp ağırlığı/tibia uzunluğu oranında Kontrol grubuna göre DOX ve DOX+TQ grubunda görülen anlamlı azalma, kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranında görülmemektedir. Bu sonuçlar da gösteriyor ki, kalp ağırlığındaki azalma vücut ağırlığındaki azalma ile orantılıdır. DOX'un kardiyotoksik özelliği daha önceki çalışmalarda da gösterildiği gibi kalp ağırlığında ve kalp ağırlığı/tibia uzunlu oranında azalma göstermektedir (Kizaki ve ark., 2004). Hücre boyutundaki değişime bakıldığında DOX uygulanan hücrelerde Kontrol grubuna göre azalma görülmektedir. Keung ve ark. (1991) yaptıkları çalışmada hücre boyutundaki değişimin büyük bir ihtimalle T-tübüler sistemdeki kısmi kayıplardan olacağını bulmuşlardır (Keung ve ark., 1991). İskelet kasında yapılan çalışmalarda T-tübüler sistemdeki kaybın en önemli sonucu elektriksel aktivite için içe doğru iletim yolunun kesintiye uğraması ve kasılma kaybıyla sonuçlanmasıdır (Howell, 1969).

Çalışmamızda öncelikle kronik DOX uygulamasının kardiyak hücrelerinde oluşturabileceği fonksiyonel değişiklikleri ve bu değişiklikler üzerine TQ'nun etkisini araştırabilmek için kasılma parametreleri incelendi. DOX grubunda sarkomer boyunda uzama ve fraksiyonel kısalma miktarında da azalma olduğu gözlenmiştir. Kasılmanın kinetikleri incelendiğinde de yavaşladığı görülmektedir. Bu sonuçlar DOX uygulamasının sol ventrikül fonksiyonlarında önemli derecede bozulmaya sebep olduğunu göstermektedir. Bunun üzerine DOX+TQ grubunda bu etkilerin düzeldiği ve Kontrol

grubu seviyesine yaklaştığı gösterildi. Mitry ve Edwards (2016) tarafından yapılan bir çalışmada DOX alan kişilerde hem fraksiyonel kasılmada hem de ejeksiyon fraksiyonunda azalma olduğu tespit edilmiştir (Mitry ve Edwards, 2016). Çocukluk kanserini atlatan bireylerde yapılan bir başka çalışmada ileriki yaşlarda sol ventrikül fonksiyonlarında belirgin bir azalma görülmüştür (Armstrong ve ark., 2012). Monti ve ark. (1986) sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada tek doz DOX uygulamasının bile kasılma kuvvetini önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir (Monti ve ark., 1986). Bu çalışmalar ile elde edilen sonuçların çalışma bulgularımız ile uyumlu olduğu görülmektedir. Literatürde kasılma ile ilgili çalışmalarda DOX'un ROS miktarını artırıp lipid peroksidasyonuna neden olabileceği ve bunun da Ca^{+2} homeostazında rol oynayan yapılar tarafından Ca^{+2} taşınmasının bozulmasına yol açabileceği iddia edilmektedir. Ayrıca DOX ile tedavi edilen sıçanların miyokardiyumunda miyofibrillerin kaybının yanında tübüllerde ve SR'da oluşan hasarların da uyarılma-kasılma çiftlenimi üzerine etkisinin olduğu söylenmektedir. Caroni ve ark. (1981) köpek kalbinde yaptıkları bir çalışmada, DOX'un Na^{+} - Ca^{+2} değiş tokuşcusunu baskıladığını göstermişlerdir. Böyle bir durumda SR Ca^{+2} içeriğinin daha fazla olması beklenirken tam tersine SR içeriğinin azaldığı ve buna bağlı olarak kasılmanın da azaldığı gözlemlenmiştir (Caroni ve ark., 1981; Wang ve Korth, 1995).

DOX uygulamasının kalpte birçok iyon kanalını etkilediği bilinmektedir (Fernandez-Chas ve ark., 2018). Kanallarda oluşacak herhangi bir değişiklik AP morfolojisini de etkileyecektir. Çalışmamızda DOX uygulanan grubun miyosit AP süresinde uzama görülürken sadece DOX+TQ grubundaki uzamanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir. Bu uzamanın akut çalışmalarda DOX'un pozitif inotropik etkisinden olabileceği söylenmiştir (Wang ve Korth, 1995; Wang ve ark., 2001). Yine aynı çalışmalarda bu etkinin zamanla azaldığı da gösterilmiştir. Çalışmamız kronik bir çalışma olduğundan inotropik etkisinden çok, DOX'un kanallara olan etkisinden kaynaklanan bir uzama olduğu tahmin edilmektedir. DOX'un kronik uygulaması sonrası APD'de uzamanın görülmesi literatürde de gösterildiği gibi muhtemelen I_{CaL} ve I_{Kr} akımları ile alakalıdır (Fernandez-Chas ve ark., 2018). Çalışmamızda gördüğümüz bir diğer önemli sonuç ise DOX+TQ grubunun APD'sindeki uzamanın DOX grubundan daha fazla olmasıdır. Bu sonuç beklenen bir şey değildi, çünkü APD'si hali hazırda uzamış olan

diyabet gibi hastalıklara literatürde TQ'nun iyi geldiği bildirilmiştir (Sangi ve ark., 2015; Farkhondeh ve ark., 2017). Buna rağmen, hem DOX+TQ grubunda hem de KON+TQ grubunda APD'de uzama görüldü. Genelde, TQ'nun kardiyoprotektif etkisinden bahsedilirken daha önceki çalışmalarda kan serum içeriği ya da enzim aktivitelerine bakılmaktadır (Al-Shabanah ve ark., 1998; Nagi ve ark., 2011; Randhawa ve ark., 2013). Bu değerlerde iyileşme gösterilse bile bu verilerin organ fonksiyonu hakkında bir kanaate varmak için yeterli olmadığı ve kronik hastalık modelinde TQ'nun elektrofizyolojik etkilerine de bakılıp kalpteki elektriksel aktivitenin nasıl değiştiğinin gösterilmesiyle daha doğru bir değerlendirme yapılabileceği söylenebilir.

AP'nin diğer bir parametresi olan dinlenim membran potansiyelinde gruplar arasında herhangi bir fark bulunamadı. Bu sonuç burada etkili olan K^+ kanalının akımında (I_{K1}) gruplar arasında bir fark bulunamamasıyla uyumluluk göstermektedir. Son olarak AP'nin genlik değerleri karşılaştırıldığında burada da anlamlı farklar görülmedi. Kronik olarak hem DOX hem de TQ uygulaması sodyum kanallarına etki etmediği düşünülmektedir.

Ventrikül miyositlerinin kasılması hücre içindeki Ca^{+2} konsantrasyonundaki ani ve geçici değişimle mümkün olmaktadır. Kasılma, AP'nin başlamasından sonra açılan L-tipi Ca^{+2} kanallarından giren Ca^{+2} iyonları ile başlamaktadır. Bu yüzden L-tipi Ca^{+2} kanallarından giren Ca^{+2} iyonlarının ölçülmesi önemlidir. APD'ye de etkisi olan akımlardan biri olan I_{CaL} 'deki değişimler incelendiğinde DOX grubunda önemli bir artış olduğu görülmektedir. Keung ve ark. (1991) yaptığı çalışmada kontrole göre DOX grubunda hem I_{CaL} akımlarında artış hem de hızlı inaktivasyon zaman sabitinde uzama olduğunu rapor ederken, yavaş zaman sabitinde herhangi bir fark olmadığını göstermişlerdir. (Keung ve ark., 1991). Başka bir çalışmada DOX uygulamasının L-tipi Ca^{+2} kanalının protein seviyesini etkilemeden fosforilasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Ikeda ve ark., 2019). Bu bulgular bizim çalışmamızın sonuçlarıyla uyumludur ve DOX grubundaki akım yoğunluğunun anlamlı şekilde artmasının sebebini açıklamaktadır. DOX+TQ grubunda ise I_{CaL} , Kontrol grubu seviyesine gelirken, TQ kanalın kinetiğini değiştirmektedir. Kanal kinetiğinin değişmesi ile beraber kanalın açık kalma süresi değişecektir. DOX+TQ grubunda kanalın inaktivasyon süresinin uzaması ile beraber hücre içine zamanla girecek Ca^{+2} miktarı da artacaktır. Her ne kadar akım yoğunluğu DOX+TQ grubunda Kontrol

grubu seviyesine gelse de kanal kinetiğindeki bu değışim hücre içine giren Ca^{+2} miktarını arttıracak, böylelikle APD uzaması görülecektir.

APD'ye etki edebilecek bir başka akım ise K^{+} kanal akımlarıdır. Çalışmamızda voltaja bağımlı olarak I_{to} kayıtları alındı. Ne I_{to} 'da ne de I_{ss} 'de gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi. Buradan DOX'un kanalın geçirgenliğine etkisinin olmadığını görmekteyiz. Aynı şekilde TQ uygulamasının da I_{to} 'nun genliğine bir etkisinin olmadığını görmekteyiz. Genliğinin yanında DOX'un I_{to} kanal kinetiklerine etkisi incelendiğinde hem yavaş hem de hızlı kanal kinetiklerinde anlamlı bir hızlanma görülmektedir. Böylelikle bu kanalların DOX uygulaması ile daha hızlı bir şekilde kapanacağını ve buna bağılı olarak hücre dışına çıkacak K^{+} iyonlarında azalma olacağını göstermektedir. Bu sonuç tek başına incelendiğinde APD'lerin uzaması gerektiğini göstermektedir fakat APD'ye etkili tek kanal I_{to} olmadığı için bu kanallardaki farklar direk olarak APD'ye etki etmeyebilir. DOX+TQ grubunda ise kinetikler yavaşlasa da, ne Kontrol grubuna göre ne de DOX grubuna göre anlamlı bir fark saptanmadı.

Sonuç olarak AP'deki uzamaya etkili olabilecek K^{+} ve Ca^{+2} kanalları beraber düşünöldüğünde, her ne kadar L-tipi Ca^{+2} kanallarındaki akım yoğunluğu DOX grubunda fazla olmuş olsa da bu kanallardan giren Ca^{+2} miktarının DOX+TQ grubunda daha fazla olduğı göröldü. Potasyum kanallarında da gruplar arasında anlamlı bir fark olmaması nedeniyle APD'nin DOX+TQ grubunda uzun olmasının sebebi muhtemelen içeri giren Ca^{+2} miktarının diğere gruplara göre fazla olmasıdır.

L-tipi Ca^{+2} kanallarından giren Ca^{+2} iyonları hücrenin kasılması için tek başına yeterli olmamaktadır. Bundan dolayı L-tipi Ca^{+2} kanallarından giren Ca^{+2} iyonları SR üzerinde bulunan RyR2 aracılığı ile SR içerisindeki Ca^{+2} iyonlarını hücre içine salınımını tetikler. Böyle bir amplifikasyon mekanizmasına Ca^{+2} indöklü Ca^{+2} salınımı denmektedir. SR içerisinde hücre içine salınan Ca^{+2} iyonları hücredeki kasılmayı başlatmış olur. SERCA, SR üzerinde olan ve hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu düzenlenmesinde önemli rolü bulunan bir proteindir. Çalışmamızda bu proteinin, DOX grubunda ekspresyonunun azaldığını gösterdik. Bu azalma ile paralel olarak mRNA düzeyinde azalma olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Arai ve ark., 2000). SERCA'nın protein ekspresyon seviyesinin bu denli azalması SR içerisindeki Ca^{+2} konsantrasyonunun

azalmasına neden olabilmektedir. SERCA miktarındaki azalma SR içerisinde kasılma sırasında hücre içine dökülecek Ca^{+2} miktarını azaltacağından fraksiyonel kısalmada azalmalar görülecektir. DOX grubunda fraksiyonel kısalmadaki düşüşe paralel olarak SERCA'daki protein ekspresyonunun azalması bu durumu açıklamaktadır.

SERCA'nın aktivasyonunda etkili bir protein olan PLB'nin aktivasyonunun Kontrol grubuna göre diğer gruplarda arttığı gösterildi. PLB normal şartlar altında inaktif durumdayken, cAMP bağımlı protein kinaz A (PKA)'nın PLB'yi fosforile etmesiyle SERCA'nın Ca^{+2} a olan afinitesini arttırarak SR içi Ca^{+2} konsantrasyonunu arttırmaktadır. Kasılma parametrelerinde görülen fraksiyonel kısalmanın TQ uygulamasıyla Kontrol düzeyine gelmesinin sebebi artmış olan p-PLB/PLB oranı olabilir. cAMP ve PKA'nın protein ekspresyon seviyesi incelenerek, yolağın p-PLB/PLB oranına etkisi kesin olarak bulunabilir. Sadece SR üzerindeki proteinlerin ekspresyon seviyelerine bakmak kasılma parametrelerindeki iyileşmenin nedenlerini kesin olarak söylemek için yeterli değildir. O yüzden, SR içerisinde bulunan Ca^{+2} konsantrasyonunun belirlenmesi, diyastol sürecinde oluşan Ca^{+2} sızıntıların saptanması ve hücre içindeki bazal Ca^{+2} konsantrasyonunu belirlenmesi fraksiyonel kısalmaya TQ'nun nerede etkili olduğunu tam olarak gösterebilir.

Çalışmalarda DOX uygulamasına bağlı olarak L -tipi Ca^{+2} kanallarından giren Ca^{+2} 'nin CaMKII'yi arttırdığı ve bununla nükleer faktör kapp B aracılığıyla apoptotik yolağı etkilediği gösterilmiştir (Ikeda ve ark., 2019). Başka bir çalışmada ise CaMKII ile artan kalsinörin NFAT yolağı ile hücreyi hipertrofiye götürdüğü gösterilmiştir (MacDonnell ve ark., 2009). SERCA'nın aktivasyonunda da etkili bir protein olan CaMKII'nin ekspresyon seviyesi incelendiğinde Kontrol grubuna göre DOX grubunda anlamlı bir azalma olduğu görüldü. Çalışmamızda kalp ağırlıklarındaki düşüş ve kalp ağırlığı/tibia uzunluğunda azalış ile kalplerin hipertrofiye gitmediği görülmektedir. Bundan dolayı CaMKII indüklü kalsinörin yolağının aktif olmadığı görülmektedir. Çalışmamızda CaMKII ve p-CaMKII protein ekspresyonlarındaki azalma ile hücrenin hipertrofiye gitmemesi paralellik göstermektedir.

DOX'un en büyük etki mekanizması olarak artan ROS miktarı olarak gösterilse de antioksidanların DOX'un toksik etkilerini bertaraf etmede işe yaramadığı gösterilmiştir

(Hanna ve ark., 2014). Yapılan çalışmalarda DOX'un apoptozu sadece ROS üretimi ve oksidatif stresi içermeyen mekanizmalar ile indükleyebildiği gösterilmiştir (Octavia ve ark., 2012b). DOX tarafından indüklenen miyokardiyal fonksiyon bozukluğunun ilerlemesinde apoptozun da büyük bir önemi olduğu gösterilmiştir (Ueno ve ark., 2006). Çalışmamızda apoptozun bir göstergesi olan prokaspaz-3'ün DOX alan gruplarda çok düştüğü gösterildi. Prokaspaz-3'teki bu azalma kaspaz-3'ün aktive olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada ROS'un önemli bir kaynağı olan NOX2'nin protein ekspresyonunda herhangi bir artış görülmemesi, DOX indüklü apoptozun ROS üzerinden olmadığını göstermektedir. DOX mitokondri içine girerek bir diğer apoptotik yolak olan sitokrom C oksidaz salınımına da neden olur. Sitokrom C daha sonra kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozu tetiklemiş olabilir. Akt fosforilasyonu ile ana anti-apoptotik yolda bulunan BAD aktivasyonunu engelleyerek apoptotik süreci artırır. Bu yolların daha detaylı incelenmesiyle, DOX indüklü apoptozun mekanizması daha net bir şekilde açıklanabilir.

Proteinler hücrelerdeki çoğu fonksiyonel süreçten birincil olarak sorumlu oldukları için ROS için ana hedeflerdir. Proteinler birden fazla şekilde oksidatif modifikasyona uğrayabilirler. Bunlardan en yaygını karbonilasyondur ve bu genel protein oksidasyonu türüdür (Madian ve Regnier, 2010). Oksidatif stres ile indüklenen karbonilasyon, genellikle proteinlerin fonksiyonunun kaybına ve biyolojik aktivitesinin değişmesine yol açan geri dönüşümsüz bir post-translasyonel modifikasyondur (Dennis ve ark., 2013). Çalışmamızda ROS seviyesinin artmadığını NOX2 proteinin ekspresyonuna bakarak söyleyebiliriz. Buna paralel olarak protein karbonil kiti ile yaptığımız ölçümlerde protein oksidasyonunun gruplar arasında anlamlı bir şekilde değişmediği de gözlemlendi. Literatürde yapılan çalışmalarda kalp yetmezliği oluşturulan hayvanlarda protein oksidasyonunun arttığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmalarda NOX2 protein ekspresyonunun da arttığı gösterilmiştir (Bowen ve ark., 2015). Bu sonuçlar ışığında çalışmamızda protein oksidasyonunu artmamasının NOX protein ekspresyonunun gruplar arasında değişmemesi ile uyumlu olduğu görülmektedir. Bunlara ek olarak grupların doku antioksidan kapasiteleri arasında da anlamlı bir fark olmaması bu durumu teyid etmekte

ve DOX veya TQ tedavisine bağlı olarak gözlenen kardiyak etkilerin oksidatif stres ile ilişkisi olmadığını düşündürmektedir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ajan olan DOX'un uygulanması sonucunda oluşan kalp yetmezliğinin, kardiyomiyositlerde oluşturacağı kasılma, AP ve iyon kanallarındaki değişiklikler ve bu oluşan değişikliklere 4 hafta boyunca TQ tedavisinin etkisi incelendi.

Sıçanlara toplamda 15 mg/kg olacak şekilde 5 doz uygulanan DOX'un sağ kalım oranını düşürdüğü gösterildi. Buna karşın DOX uygulanan sıçanlara 4 hafta boyunca verilen TQ'nun (10 mg/kg/gün) sağ kalım oranında ciddi bir azalmaya yol açtığı görüldü. Bu şekilde TQ'nun ölüm oranını iyileştirmediği, hatta beraber kullanımında ölüm oranının daha da arttığı gösterildi.

Her ne kadar ölüm oranını arttırsa da 4 hafta sonunda DOX uygulamasına bağlı olarak sarkomer boyundaki ve relaksasyon süresindeki uzamanın ve fraksiyonel kısalmadaki azalmanın TQ uygulaması ile düzeldiği bulundu.

DOX ile uzayan APD'nin TQ varlığında daha da uzadığı gösterilmiştir. Genel olarak K^+ akımlarının genliklerinde fark görülmezken I_{to} kinetiklerinde değişim olduğu görüldü. I_{CaL} 'da DOX etkisi TQ ile Kontrol grubu seviyesine çekilirken, kanal kinetiğinde anlamlı bir fark olduğu görüldü.

Son olarak DOX'un apoptotik süreçleri etkilediğini ve bunun ROS indüklü olmadığını gösterdik. DOX grubunun antioksidan seviyesinin düşmemesi de apoptotik yolların ROS indüklü olmadığını desteklemektedir.

Özetle elde ettiğimiz bulguların ışığında TQ'nun DOX ile beraber kullanılması için dozu, uygulama zamanı ve uygulama süresine ilişkin daha detaylı çalışmalar yaparak etki mekanizmalarının ortaya çıkarılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abramson, J. J., Buck, E., Salama, G., Casida, J. E., & Pessah, I. N. Mechanism of anthraquinone-induced calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*. 1988; 263 (35): 18750-18758.
- Ahmad, A., Raish, M., Alkharfy, K. M., Alsarra, I. A., Khan, A., Ahad, A., . . . Shakeel, F. Solubility, solubility parameters and solution thermodynamics of thymoquinone in different mono solvents. *Journal of Molecular Liquids*. 2018; 272: 912-918.
- Al-Shabanah, O. A., Badary, O. A., Nagi, M. N., Al-Gharably, N. M., Al-Rikabi, A. C., & Al-Bekairi, A. M. Thymoquinone protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity without compromising its antitumor activity. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 1998; 17 (2): 193-198.
- Alam, M. F., Khan, G., Safhi, M. M., Alshahrani, S., Siddiqui, R., Sivagurunathan Moni, S., & Anwer, T. Thymoquinone ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity in swiss albino mice by modulating oxidative damage and cellular inflammation. *Cardiol Res Pract*. 2018; 2018: 1483041.
- Alenzi, F. Q., El-Bolkiny Yel, S., & Salem, M. L. Protective effects of nigella sativa oil and thymoquinone against toxicity induced by the anticancer drug cyclophosphamide. *Br J Biomed Sci*. 2010; 67 (1): 20-28.
- Almshawit, H. S. Studies on the effect of thymoquinone on oxidative stress and cell wall integrity of candida glabrata. RMIT University, 2015,
- Amadori, D. Moving forward with new data and approaches: A fresh look at anthracyclines in non-hodgkin's lymphoma. *Hematology Reports*. 2011; 3 (3 SUPPL.): 1-3.
- Anwar, S., Khan, M. A., Sadaf, A., & Younus, H. A structural study on the protection of glycation of superoxide dismutase by thymoquinone. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014; 69: 476-481.
- Arafa, E. S. A., Zhu, Q., Shah, Z. I., Wani, G., Barakat, B. M., Racoma, I., . . . Wani, A. A. Thymoquinone up-regulates pten expression and induces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2011; 706 (1-2): 28-35.
- Arai, M., Yoguchi, A., Takizawa, T., Yokoyama, T., Kanda, T., Kurabayashi, M., & Nagai, R. Mechanism of doxorubicin-induced inhibition of sarcoplasmic reticulum ca^{2+} -atpase gene transcription. *Circulation Research*. 2000; 86 (1): 8-14.
- Armstrong, G. T., Plana, J. C., Zhang, N., Srivastava, D., Green, D. M., Ness, K. K., . . . Flamm, S. D. Screening adult survivors of childhood cancer for cardiomyopathy: Comparison of echocardiography and cardiac magnetic resonance imaging. *Journal of Clinical Oncology*. 2012; 30 (23): 2876-2884.
- Atta, M. S., Almadaly, E. A., El-Far, A. H., Saleh, R. M., Assar, D. H., Al Jaouni, S. K., & Mousa, S. A. Thymoquinone defeats diabetes-induced testicular damage in rats targeting antioxidant, inflammatory and aromatase expression. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18 (5).

- Azeiz, A. Z. A., Saad, A. H., & Darweesh, M. F. Efficacy of thymoquinone against vaginal candidiasis in prednisolone-induced immunosuppressed mice. *The Journal of American Science*. 2013; 9 (4): 155-159.
- Badary, O. A., Taha, R. A., Gamal El-Din, A. M., & Abdel-Wahab, M. H. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug and Chemical Toxicology*. 2003; 26 (2): 87-98.
- Bamosa, A. O., Kaatabi, H., Lebda, F. M., Al Elq, A. M., & Al-Sultan, A. Effect of nigella sativa seeds on the glycemic control of patients with type 2 diabetes mellitus. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2010; 54 (4): 344-354.
- Bendall, J. K., Cave, A. C., Heymes, C., Gall, N., & Shah, A. M. Pivotal role of a gp91phox-containing nadph oxidase in angiotensin ii-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation*. 2002; 105 (3): 293-296.
- Bers, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002; 415 (6868): 198-205.
- Billingham, M. E., Mason, J. W., Bristow, M. R., & Daniels, J. R. Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treatment Reports*. 1978; 62 (6): 865-872.
- Botnick, I., Xue, W., Bar, E., Ibdah, M., Schwartz, A., Joel, D. M., . . . Lewinsohn, E. Distribution of primary and specialized metabolites in nigella sativa seeds, a spice with vast traditional and historical uses. *Molecules*. 2012; 17 (9): 10159-10177.
- Bowen, T. S., Mangner, N., Werner, S., Glaser, S., Kullnick, Y., Schrepper, A., . . . Adams, V. Diaphragm muscle weakness in mice is early-onset post-myocardial infarction and associated with elevated protein oxidation. *Journal of Applied Physiology*. 2015; 118 (1): 11-19.
- Byrne, J. A., Grieve, D. J., Bendall, J. K., Li, J. M., Gove, C., Lambeth, J. D., . . . Shah, A. M. Contrasting roles of nadph oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin ii-induced cardiac hypertrophy. *Circulation Research*. 2003; 93 (9): 802-804.
- Canzoneri, J. C., & Oyelere, A. K. Interaction of anthracyclines with iron responsive element mrnas. *Nucleic Acids Research*. 2008; 36 (21): 6825-6834.
- Cappetta, D., Esposito, G., Coppini, R., Piegari, E., Russo, R., Ciuffreda, L. P., . . . De Angelis, A. Effects of ranolazine in a model of doxorubicin-induced left ventricle diastolic dysfunction. *British Journal of Pharmacology*. 2017; 174 (21): 3696-3712.
- Cardinale, D., Colombo, A., Bacchiani, G., Tedeschi, I., Meroni, C. A., Veglia, F., . . . Cipolla, C. M. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. *Circulation*. 2015; 131 (22): 1981-1988.
- Caroni, P., Villani, F., & Carafoli, E. The cardiotoxic antibiotic doxorubicin inhibits the na⁺/ca²⁺ exchange of dog heart sarcolemmal vesicles. *FEBS Letters*. 1981; 130 (2): 184-186.
- Carvalho, C., Santos, R., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P., Santos, M., & Moreira, P. Doxorubicin: The good, the bad and the ugly effect. *Current Medicinal Chemistry*. 2009; 16 (25): 3267-3285.
- Cavalcante, G. C., Schaan, A. P., Cabral, G. F., Santana-da-Silva, M. N., Pinto, P., Vidal, A. F., & Ribeiro-Dos-Santos, A. A cell's fate: An overview of the molecular biology and genetics of apoptosis. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (17).

- Cave, A. C., Brewer, A. C., Narayanapanicker, A., Ray, R., Grieve, D. J., Walker, S., & Shah, A. M. Nadph oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2006; 8 (5-6): 691-728.
- Chan, B. Y. H., Roczkowsky, A., Cho, W. J., Poirier, M., Sergi, C., Keschrumrus, V., . . . Schulz, R. Mmp inhibitors attenuate doxorubicin cardiotoxicity by preventing intracellular and extracellular matrix remodelling. *Cardiovascular Research*. 2020; 117 (1): 188-200.
- Charlier, H. A., Olson, R. D., Thornock, C. M., Mercer, W. K., Olson, D. R., Broyles, T. S., . . . Shadle, S. E. Investigations of calsequestrin as a target for anthracyclines: Comparison of functional effects of daunorubicin, daunorubicinol, and trifluoperazine. *Molecular Pharmacology*. 2005; 67 (5): 1505-1512.
- Chatterjee, K., Zhang, J., Honbo, N., & Karliner, J. S. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*. 2010; 155 (2): 155-162.
- Cirillo, R., Sacco, G., Venturella, S., Brightwell, J., Giachetti, A., & Manzini, S. Comparison of doxorubicin- and men 10755-induced long-term progressive cardiotoxicity in the rat. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2000; 35 (1): 100-108.
- Crompton, M., & Costi, A. Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by ca^{2+} , inorganic phosphate and oxidative stress: A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular ca^{2+} overload. *European Journal of Biochemistry*. 1988; 178 (2): 489-501.
- Darakhshan, S., Bidmeshki Pour, A., Hosseinzadeh Colagar, A., & Sisakhtnezhad, S. Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacol Res*. 2015; 95-96: 138-158.
- Dennis, K. E., Hill, S., Rose, K. L., Sampson, U. K. A., & Hill, M. F. Augmented cardiac formation of oxidatively-induced carbonylated proteins accompanies the increased functional severity of post-myocardial infarction heart failure in the setting of type 1 diabetes mellitus. *Cardiovascular Pathology*. 2013; 22 (6): 473-480.
- Di Marco, A., Gaetani, M., & Scarpinato, B. Adriamycin (nsc-123,127): A new antibiotic with antitumor activity. *Cancer chemotherapy reports. Part 1*. 1969; 53 (1): 33-37.
- Dragoni, S., Laforenza, U., Bonetti, E., Lodola, F., Bottino, C., Berra-Romani, R., . . . Moccia, F. Vascular endothelial growth factor stimulates endothelial colony forming cells proliferation and tubulogenesis by inducing oscillations in intracellular ca^{2+} concentration. *Stem Cells*. 2011; 29 (11): 1898-1907.
- El Gazzar, M., El Mezayen, R., Marecki, J. C., Nicolls, M. R., Canastar, A., & Dreskin, S. C. Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *International Immunopharmacology*. 2006; 6 (7): 1135-1142.
- Elbarbry, F., Ragheb, A., Marfleet, T., & Shoker, A. Modulation of hepatic drug metabolizing enzymes by dietary doses of thymoquinone in female new zealand white rabbits. *Phytotherapy Research*. 2012; 26 (11): 1726-1730.
- Ewer, M. S., & Ewer, S. M. Cardiotoxicity of anticancer treatments. *Nat Rev Cardiol*. 2015; 12 (9): 547-558.
- Fan, G. C., Zhou, X., Wang, X., Song, G., Qian, J., Nicolaou, P., . . . Kranias, E. G. Heat shock protein 20 interacting with phosphorylated akt reduces doxorubicin-triggered oxidative stress and cardiotoxicity. *Circulation Research*. 2008; 103 (11): 1270-1279.

- Farkhondeh, T., Samarghandian, S., & Borji, A. An overview on cardioprotective and anti-diabetic effects of thymoquinone. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2017; 10 (9): 849-854.
- Feng, W., Liu, G., Xia, R., Abramson, J. J., & Pessah, I. N. Site-selective modification of hyperreactive cysteines of ryanodine receptor complex by quinones. *Molecular Pharmacology*. 1999; 55 (5): 821-831.
- Fernandez-Chas, M., Curtis, M. J., & Niederer, S. A. Mechanism of doxorubicin cardiotoxicity evaluated by integrating multiple molecular effects into a biophysical model. *British Journal of Pharmacology*. 2018; 175 (5): 763-781.
- Ferreira, A. L. A., Yeum, K. J., Matsubara, L. S., Matsubara, B. B., Correa, C. R., Pereira, E. J., . . . Tang, G. Doxorubicin as an antioxidant: Maintenance of myocardial levels of lycopene under doxorubicin treatment. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007; 43 (5): 740-751.
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur Heart J*. 2012; 33 (7): 829-837, 837a-837d.
- Gali-Muhtasib, H. U., Abou Kheir, W. G., Kheir, L. A., Darwiche, N., & Crooks, P. A. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anti-Cancer Drugs*. 2004; 15 (4): 389-399.
- Gambliel, H. A., Burke, B. E., Cusack, B. J., Zhang, Y. L., Olson, R. D., Gambliel, H. A., . . . Mushlin, P. S. Doxorubicin and c-13 deoxydoxorubicin effects on ryanodine receptor gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002; 291 (3): 433-438.
- Garner, A. P., Paine, M. J. I., Rodriguez-Crespo, I., Chinje, E. C., De Montellano, P. O., Stratford, I. J., . . . Wolf, C. R. Nitric oxide synthases catalyze the activation of redox cycling and bioreductive anticancer agents. *Cancer Research*. 1999; 59 (8): 1929-1934.
- Gautel, M. The sarcomeric cytoskeleton: Who picks up the strain? *Curr Opin Cell Biol*. 2011; 23 (1): 39-46.
- Gewirtz, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*. 1999; 57 (7): 727-741.
- Ghigo, A., Li, M., & Hirsch, E. New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1863 (7 Pt B): 1916-1925.
- Gholamnezhad, Z., Havakhah, S., & Boskabady, M. H. Preclinical and clinical effects of nigella sativa and its constituent, thymoquinone: A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016; 190: 372-386.
- Glamočlija, U., Padhye, S., Špirtović-Halilović, S., Osmanović, A., Veljović, E., Roca, S., . . . Završnik, D. Synthesis, biological evaluation and docking studies of benzoxazoles derived from thymoquinone. *Molecules*. 2018; 23 (12).
- Goffart, S., Von Kleist-Retzow, J. C., & Wiesner, R. J. Regulation of mitochondrial proliferation in the heart: Power-plant failure contributes to cardiac failure in hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2004; 64 (2): 198-207.
- Goormaghtigh, E., Huart, P., Praet, M., Brasseur, R., & Ruyschaert, J. M. Structure of the adriamycin-cardiolipin complex. Role in mitochondrial toxicity. *Biophysical Chemistry*. 1990; 35 (2-3): 247-257.
- Green, D. M., Grigoriev, Y. A., Nan, B., Takashima, J. R., Norkool, P. A., D'Angio, G. J., & Breslow, N. E. Congestive heart failure after treatment for wilms' tumor: A

- report from the national wilms' tumor study group. *Journal of Clinical Oncology*. 2001; 19 (7): 1926-1934.
- Grieve, D. J., Byrne, J. A., Siva, A., Layland, J., Johar, S., Cave, A. C., & Shah, A. M. Involvement of the nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate oxidase isoform nox2 in cardiac contractile dysfunction occurring in response to pressure overload. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006; 47 (4): 817-826.
- Groarke, J. D., & Nohria, A. Editorial: Anthracycline cardiotoxicity a new paradigm for an old classic. *Circulation*. 2015; 131 (22): 1946-1949.
- Grunnet, M. Repolarization of the cardiac action potential. Does an increase in repolarization capacity constitute a new anti-arrhythmic principle? *Acta Physiologica*. 2010; 198 (SUPPL. 676): 1-48.
- Gutteridge, J. M. C. Iron and oxygen: A biologically damaging mixture. *Acta Paediatrica Scandinavica, Supplement*. 1989; 78 (361): 78-85.
- Hahn, V. S., Lenihan, D. J., & Ky, B. Cancer therapy-induced cardiotoxicity: Basic mechanisms and potential cardioprotective therapies. *J Am Heart Assoc*. 2014; 3 (2): e000665.
- Hanna, A. D., Lam, A., Tham, S., Dulhunty, A. F., & Beard, N. A. Adverse effects of doxorubicin and its metabolic product on cardiac ryr2 and serca2a. *Molecular Pharmacology*. 2014; 86 (4): 438-449.
- Heshmati, J., Namazi, N., Memarzadeh, M. R., Taghizadeh, M., & Kolahdooz, F. Nigella sativa oil affects glucose metabolism and lipid concentrations in patients with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Food Research International*. 2015; 70: 87-93.
- Houghton, P. J., Zarka, R., De Las Heras, B., & Hoult, J. R. S. Fixed oil of nigella sativa and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Medica*. 1995; 61 (1): 33-36.
- Howell, J. N. A lesion of the transverse tubules of skeletal muscle. *The Journal of Physiology*. 1969; 201 (3): 515-533.
- Ichikawa, Y., Ghaneifar, M., Bayeva, M., Wu, R., Khechaduri, A., Naga Prasad, S. V., . . . Ardehali, H. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *Journal of Clinical Investigation*. 2014; 124 (2): 617-630.
- Ikeda, S., Matsushima, S., Okabe, K., Ikeda, M., Ishikita, A., Tadokoro, T., . . . Tsutsui, H. Blockade of l-type ca^{2+} channel attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy via suppression of camkii-nf- κ b pathway. *Scientific Reports*. 2019; 9 (1): 9850.
- Jackson, S. P., & Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009; 461 (7267): 1071-1078.
- Kalivendi, S. V., Kotamraju, S., Zhao, H., Joseph, J., & Kalyanaraman, B. Doxorubicin-induced apoptosis is associated with increased transcription of endothelial nitric-oxide synthase: Effect of antiapoptotic antioxidants and calcium. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276 (50): 47266-47276.
- Kanter, M., Demir, H., Karakaya, C., & Ozbek, H. Gastroprotective activity of nigella sativa l oil and its constituent, thymoquinone against acute alcohol-induced gastric mucosal injury in rats. *World Journal of Gastroenterology*. 2005; 11 (42): 6662-6666.

- Karabulut, D., Ozturk, E., Kaymak, E., Akin, A. T., & Yakan, B. Thymoquinone attenuates doxorubicin-cardiotoxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2021; 35 (1): e22618.
- Kaseb, A. O., Chinnakannu, K., Chen, D., Sivanandam, A., Tejawani, S., Menon, M., . . . Reddy, G. P. V. Androgen receptor- and e2f-1-targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Research*. 2007; 67 (16): 7782-7788.
- Keung, E. C., Toll, L., Ellis, M., & Jensen, R. A. L-type cardiac calcium channels in doxorubicin cardiomyopathy in rats morphological, biochemical, and functional correlations. *Journal of Clinical Investigation*. 1991; 87 (6): 2108-2113.
- Khattab, M. M., & Nagi, M. N. Thymoquinone supplementation attenuates hypertension and renal damage in nitric oxide deficient hypertensive rats. *Phytotherapy Research*. 2007; 21 (5): 410-414.
- Kim, S. Y., Kim, S. J., Kim, B. J., Rah, S. Y., Sung, M. C., Im, M. J., & Kim, U. H. Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular ca^{2+} increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes. *Experimental and Molecular Medicine*. 2006; 38 (5): 535-545.
- Kizaki, K., Akatsuka, K., Momozaki, M., Fujimori, Y., Uchide, T., Temma, K., & Hara, Y. Changes in myocardial β 1-adrenergic receptor and stimulatory g-protein gene expression after chronic treatment with doxorubicin in rat. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2004; 66 (8): 989-992.
- Kotamraju, S., Konorev, E. A., Joseph, J., & Kalyanaraman, B. Doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and cardiomyocytes is ameliorated by nitron spin traps and ebselen. Role of reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275 (43): 33585-33592.
- Köhler, A. C., Sag, C. M., & Maier, L. S. Reactive oxygen species and excitation–contraction coupling in the context of cardiac pathology. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2014; 73: 92-102.
- Kremer, L. C. M., Van Dalen, E. C., Offringa, M., Ottenkamp, J., & Voûte, P. A. Anthracycline-induced clinical heart failure in a cohort of 607 children: Long-term follow-up study. *Journal of Clinical Oncology*. 2001; 19 (1): 191-196.
- Kremer, L. C. M., van der Pal, H. J. H., Offringa, M., van Dalen, E. C., & Voute, P. A. Frequency and risk factors of subclinical cardiotoxicity after anthracycline therapy in children: A systematic review. *Ann Oncol*. 2002; 13 (6): 819-829.
- Lee, K. W., Maeng, J. S., Choi, J. Y., Lee, Y. R., Hwang, C. Y., Park, S. S., . . . Kwon, K. S. Role of junctin protein interactions in cellular dynamics of calsequestrin polymer upon calcium perturbation. *Journal of Biological Chemistry*. 2012; 287 (3): 1679-1687.
- Lipshultz, S. E., Cochran, T. R., Franco, V. I., & Miller, T. L. Treatment-related cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013; 10 (12): 697-710.
- Lipshultz, S. E., Colan, S. D., Gelber, R. D., Perez-Atayde, A. R., Sallan, S. E., & Sanders, S. P. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *New England Journal of Medicine*. 1991; 324 (12): 808-815.
- Lipshultz, S. E., Karnik, R., Sambatakis, P., Franco, V. I., Ross, S. W., & Miller, T. L. Anthracycline-related cardiotoxicity in childhood cancer survivors. *Curr Opin Cardiol*. 2014; 29 (1): 103-112.

- Lipshultz, S. E., Lipsitz, S. R., Mone, S. M., Goorin, A. M., Sallan, S. E., Sanders, S. P., . . . Colan, S. D. Female sex and higher drug dose as risk factors for late cardiotoxic effects of doxorubicin therapy for childhood cancer. *New England Journal of Medicine*. 1995; 332 (26): 1738-1744.
- Lipshultz, S. E., Rifai, N., Sallan, S. E., Lipsitz, S. R., Dalton, V., Sacks, D. B., & Ottlinger, M. E. Predictive value of cardiac troponin t in pediatric patients at risk for myocardial injury. *Circulation*. 1997; 96 (8): 2641-2648.
- Liu, H., Liu, H. Y., Jiang, Y. N., & Li, N. Protective effect of thymoquinone improves cardiovascular function, and attenuates oxidative stress, inflammation and apoptosis by mediating the pi3k/akt pathway in diabetic rats. *Molecular Medicine Reports*. 2016; 13 (3): 2836-2842.
- Liu, X., M. Abd El-Aty, A., & Shim, J. H. Various extraction and analytical techniques for isolation and identification of secondary metabolites from nigella sativa seeds. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2011; 11 (11): 947-955.
- Looi, Y. H., Grieve, D. J., Siva, A., Walker, S. J., Anilkumar, N., Cave, A. C., . . . Shah, A. M. Involvement of nox2 nadph oxidase in adverse cardiac remodeling after myocardial infarction. *Hypertension*. 2008; 51 (2): 319-325.
- MacDonnell, S. M., Weisser-Thomas, J., Kubo, H., Hanscome, M., Liu, Q., Jaleel, N., . . . Houser, S. R. Camkii negatively regulates calcineurin-nfat signaling in cardiac myocytes. *Circulation Research*. 2009; 105 (4): 316-325.
- MacLennan, D. H., & Chen, S. R. W. Store overload-induced ca²⁺ release as a triggering mechanism for cpvt and mh episodes caused by mutations in ryr and casq genes. *J Physiol*. 2009; 587 (Pt 13): 3113-3115.
- Madian, A. G., & Regnier, F. E. Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites. *Journal of Proteome Research*. 2010; 9 (8): 3766-3780.
- McGowan, J. V., Chung, R., Maulik, A., Piotrowska, I., Walker, J. M., & Yellon, D. M. Anthracycline chemotherapy and cardiotoxicity. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2017; 31 (1): 63-75.
- McLean, B. A., Patel, V. B., Zhabyeyev, P., Chen, X., Basu, R., Wang, F., . . . Oudit, G. Y. Pi3kα pathway inhibition with doxorubicin treatment results in distinct biventricular atrophy and remodeling with right ventricular dysfunction. *Journal of the American Heart Association*. 2019; 8 (9): e010961.
- McNally, E. M. Genetics: Broken giant linked to heart failure. *Nature*. 2012; 483 (7389): 281-282.
- Meeran, M. F. N., Al Taei, H., Azimullah, S., Tariq, S., Adeghate, E., & Ojha, S. B-caryophyllene, a natural bicyclic sesquiterpene attenuates doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity via activation of myocardial cannabinoid type-2 (cb2) receptors in rats. *Chemico-Biological Interactions*. 2019; 304: 158-167.
- Minotti, G., Mancuso, C., Frustaci, A., Mordente, A., Santini, S. A., Calafiore, A. M., . . . Gentilini, N. Paradoxical inhibition of cardiac lipid peroxidation in cancer patients treated with doxorubicin: Pharmacologic and molecular reappraisal of anthracycline cardiotoxicity. *Journal of Clinical Investigation*. 1996; 98 (3): 650-661.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004; 56 (2): 185-229.

- Minotti, G., Salvatorelli, E., Menna, P., Ronchi, R., & Cairo, G. Doxorubicin irreversibly inactivates iron regulatory proteins 1 and 2 in cardiomyocytes: Evidence for distinct metabolic pathways and implications for iron-mediated cardiotoxicity of antitumor therapy. *Cancer Research*. 2001; 61 (23): 8422-8428.
- Mitry, M. A., & Edwards, J. G. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *Int J Cardiol Heart Vasc*. 2016; 10: 17-24.
- Mobaraki, M., Faraji, A., Zare, M., Dolati, P., Ataei, M., & Dehghan Manshadi, H. R. Molecular mechanisms of cardiotoxicity: A review on the major side-effects of doxorubicin. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017; 79 (3): 335-344.
- Monti, E., Piccinini, F., Villani, F., & Favalli, L. Myocardial contractility and heart pharmacokinetics of adriamycin following a single administration in rat. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1986; 18 (3): 289-291.
- Nagi, M. N., Al-Shabanah, O. A., Hafez, M. M., & Sayed-Ahmed, M. M. Thymoquinone supplementation attenuates cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2011; 25 (3): 135-142.
- Nagi, M. N., & Mansour, M. A. Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: A possible mechanism of protection. *Pharmacological Research*. 2000; 41 (3): 283-289.
- Najmi, A., Nasiruddin, M., Khan, R., & Haque, S. Effect of nigella sativa oil on various clinical and biochemical parameters of insulin resistance syndrome. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*. 2008; 28 (1): 11-14.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., & Yuan, J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature*. 2000; 403 (6765): 98-103.
- Nerbonne, J. M., & Kass, R. S. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev*. 2005; 85 (4): 1205-1253.
- Nousiainen, T., Jantunen, E., Vanninen, E., Remes, J., Vuolteenaho, O., & Hartikainen, J. Natriuretic peptides as markers of cardiotoxicity during doxorubicin treatment for non-hodgkin's lymphoma. *European Journal of Haematology*. 1999; 62 (2): 135-141.
- Nysom, K., Holm, K., Lipsitz, S. R., Mone, S. M., Colan, S. D., Orav, E. J., . . . Lipshultz, S. E. Relationship between cumulative anthracycline dose and late cardiotoxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 1998; 16 (2): 545-550.
- Octavia, Y., Brunner-La Rocca, H. P., & Moens, A. L. NADPH oxidase-dependent oxidative stress in the failing heart: From pathogenic roles to therapeutic approach. *Free Radic Biol Med*. 2012a; 52 (2): 291-297.
- Octavia, Y., Tocchetti, C. G., Gabrielson, K. L., Janssens, S., Crijns, H. J., & Moens, A. L. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol*. 2012b; 52 (6): 1213-1225.
- Oflaz, S., Yucel, B., Oz, F., Sahin, D., Ozturk, N., Yaci, O., . . . Oflaz, H. Assessment of myocardial damage by cardiac MRI in patients with anorexia nervosa. *International Journal of Eating Disorders*. 2013; 46 (8): 862-866.
- Olson, R. D., Gambliel, H. A., Vestal, R. E., Shadle, S. E., Charlier, H. A., & Cusack, B. J. Doxorubicin cardiac dysfunction: Effects on calcium regulatory proteins, sarcoplasmic reticulum, and triiodothyronine. *Cardiovascular Toxicology*. 2005; 5 (3): 269-283.

- Olson, R. D., & Mushlin, P. S. Doxorubicin cardiotoxicity: Analysis of prevailing hypotheses. *The FASEB Journal*. 1990; 4 (13): 3076-3086.
- Ondrias, K., Borgatta, L., Kim, D. H., & Ehrlich, B. E. Biphasic effects of doxorubicin on the calcium release channel from sarcoplasmic reticulum of cardiac muscle. *Circulation Research*. 1990; 67 (5): 1167-1174.
- Park, I. Y., Kim, E. J., Park, H. J., Fields, K., Dunker, A. K., & Kang, C. H. Interaction between cardiac calsequestrin and drugs with known cardiotoxicity. *Molecular Pharmacology*. 2005; 67 (1): 97-104.
- Parker, M. A., King, V., & Howard, K. P. Nuclear magnetic resonance study of doxorubicin binding to cardiolipin containing magnetically oriented phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2001; 1514 (2): 206-216.
- Pei, Z., Hu, J., Bai, Q., Liu, B., Cheng, D., Liu, H., . . . Yu, Q. Thymoquinone protects against cardiac damage from doxorubicin-induced heart failure in sprague-dawley rats. *RSC advances*. 2018; 8 (26): 14633-14639.
- Peng, L., Liu, A., Shen, Y., Xu, H. Z., Yang, S. Z., Ying, X. Z., . . . Shen, W. D. Antitumor and anti-angiogenesis effects of thymoquinone on osteosarcoma through the nf-kb pathway. *Oncology Reports*. 2013; 29 (2): 571-578.
- Periasamy, V. S., Athinarayanan, J., & Alshatwi, A. A. Anticancer activity of an ultrasonic nanoemulsion formulation of nigella sativa l. Essential oil on human breast cancer cells. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2016; 31: 449-455.
- Prosser, B. L., Ward, C. W., & Lederer, W. J. X-ros signaling: Rapid mechano-chemo transduction in heart. *Science*. 2011; 333 (6048): 1440-1445.
- Qin, F., Patel, R., Yan, C., & Liu, W. NADPH oxidase is involved in angiotensin II-induced apoptosis in h9c2 cardiac muscle cells: Effects of apocynin. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006; 40 (2): 236-246.
- Rahman, A., Schein, P. S., & More, N. Doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity and its protection by liposomal administration. *Cancer Research*. 1982; 42 (5): 1817-1825.
- Rahman, A. M., Yusuf, S. W., & Ewer, M. S. Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *Int J Nanomedicine*. 2007; 2 (4): 567-583.
- Raj, S., Franco, V. I., & Lipshultz, S. E. Anthracycline-induced cardiotoxicity: A review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2014; 16 (6): 315.
- Ramadan, M. F. Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*nigella sativa* L.): An overview. *International Journal of Food Science and Technology*. 2007; 42 (10): 1208-1218.
- Randhawa, M. A., Alghamdi, M. S., & Maulik, S. K. The effect of thymoquinone, an active component of *nigella sativa*, on isoproterenol induced myocardial injury. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013; 26 (6): 1215-1219.
- Renu, K., V.G. A., Tirupathi, T. P., & Arunachalam, S. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy – an update. *Eur J Pharmacol*. 2018; 818: 241-253.
- Roden, D. M. Taking the "idio" out of "idiosyncratic": Predicting torsades de pointes. *Pacing Clin Electrophysiol*. 1998; 21 (5): 1029-1034.

- Rossant, J., & Howard, L. Signaling pathways in vascular development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2002; 18: 541-573.
- Saeki, K., Obi, I., Ogiku, N., Shigekawa, M., Imagawa, T., & Matsumoto, T. Doxorubicin directly binds to the cardiac-type ryanodine receptor. *Life Sciences*. 2002; 70 (20): 2377-2389.
- Sag, C. M., Köhler, A. C., Anderson, M. E., Backs, J., & Maier, L. S. Camkii-dependent sr ca leak contributes to doxorubicin-induced impaired ca handling in isolated cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2011; 51 (5): 749-759.
- Salazar-Mendiguchía, J., González-Costello, J., Roca, J., Ariza-Solé, A., Manito, N., & Cequier, Á. Anthracycline-mediated cardiomyopathy: Basic molecular knowledge for the cardiologist. *Arch Cardiol Mex*. 2014; 84 (3): 218-223.
- Salmani, J. M. M., Asghar, S., Lv, H., & Zhou, J. Aqueous solubility and degradation kinetics of the phytochemical anticancer thymoquinone; probing the effects of solvents, ph and light. *Molecules*. 2014; 19 (5): 5925-5939.
- Sangi, S. A., Sulaiman, M., El-wahab, M. A., Ahmedani, E., & Ali, S. Antihyperglycemic effect of thymoquinone and oleuropein, on streptozotocin-induced diabetes mellitus in experimental animals. *Pharmacognosy Magazine*. 2015; 11 (44): 251-251.
- Sawyer, D. B. Anthracyclines and heart failure. *New England Journal of Medicine*. 2013; 368 (12): 1154-1156.
- Shabana, A., El-Menyar, A., Asim, M., Al-Azzeh, H., & Al Thani, H. Cardiovascular benefits of black cumin (*nigella sativa*). *Cardiovasc Toxicol*. 2013; 13 (1): 9-21.
- Shoieb, A. M., Elgayyar, M., Dudrick, P. S., Bell, J. L., & Tithof, P. K. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *International journal of oncology*. 2003; 22 (1): 107-113.
- Shoker, A., Ragheb, A., Attia, A., Elbarbry, F., & Prasad, K. Attenuated combined action of cyclosporine a and hyperlipidemia on atherogenesis in rabbits by thymoquinone. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2011; 2011: 620319.
- Šimůnek, T., Štěřba, M., Popelová, O., Adamcová, M., Hrdina, R., & Geršl, V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological reports*. 2009; 61 (1): 154-171.
- Singal, P. K., Iliskovic, N., Li, T., & Kumar, D. Adriamycin cardiomyopathy: Pathophysiology and prevention. *The FASEB Journal*. 1997; 11 (12): 931-936.
- Sorensen, K., Levitt, G. A., Bull, C., Dorup, I., & Sullivan, I. D. Late anthracycline cardiotoxicity after childhood cancer: A prospective longitudinal study. *Cancer*. 2003; 97 (8): 1991-1998.
- Steinberg, J. S., Cohen, A. J., Wasserman, A. G., Cohen, P., & Ross, A. M. Acute arrhythmogenicity of doxorubicin administration. *Cancer*. 1987; 60 (6): 1213-1218.
- Štěřba, M., Popelová, O., Lenčo, J., Fučíková, A., Brčáková, E., Mazurová, Y., . . . Geršl, V. Proteomic insights into chronic anthracycline cardiotoxicity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2011; 50 (5): 849-862.
- Sugiyama, K., Sasano, T., Kurokawa, J., Takahashi, K., Okamura, T., Kato, N., . . . Furukawa, T. Oxidative stress induced ventricular arrhythmia and impairment of

- cardiac function in *nos1ap* deleted mice. *International Heart Journal*. 2016; 57 (3): 341-349.
- Takao, M., Zhang, Q. M., Yonei, S., & Yasui, A. Differential subcellular localization of human muty homolog (*hmyh*) and the functional activity of adenine:8-oxoguanine DNA glycosylase. *Nucleic Acids Research*. 1999; 27 (18): 3638-3644.
- Takemura, G., & Fujiwara, H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. From the cardiotoxic mechanisms to management. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2007; 49 (5): 330-352.
- Tan, C., Tasaka, H., Yu, K. P. P., Murphy, M. L., & Karnofsky, D. A. Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer*. 1967; 20 (3): 333-353.
- Terentyev, D., Viatchenko-Karpinski, S., Györke, I., Volpe, P., Williams, S. C., & Györke, S. Calsequestrin determines the functional size and stability of cardiac intracellular calcium stores: Mechanism for hereditary arrhythmia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; 100 (20): 11759-11764.
- Timolati, F., Ott, D., Pentassuglia, L., Giraud, M. N., Perriard, J. C., Suter, T. M., & Zuppinger, C. Neuregulin-1 beta attenuates doxorubicin-induced alterations of excitation-contraction coupling and reduces oxidative stress in adult rat cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2006; 41 (5): 845-854.
- Türkdoğan, M. K., Ağaoğlu, Z., Yener, Z., Şekeroğlu, R., Akkan, H. A., & Avci, M. E. The role of antioxidant vitamins (c and e), selenium and *nigella sativa* in the prevention of liver fibrosis and cirrhosis in rabbits: New hopes. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. 2001; 108 (2): 71-73.
- Ueno, M., Kakinuma, Y., Yuhki, K. I., Murakoshi, N., Iemitsu, M., Miyauchi, T., & Yamaguchi, I. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2006; 101 (2): 151-158.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39 (1): 44-84.
- Varricchi, G., Ameri, P., Cadeddu, C., Ghigo, A., Madonna, R., Marone, G., . . . Tocchetti, C. G. Antineoplastic drug-induced cardiotoxicity: A redox perspective. *Front Physiol*. 2018; 9: 167.
- Vasić, M., Lončar-Turukalo, T., Tasić, T., Matić, M., Glumac, S., Bajić, D., . . . Japundžić-Žigon, N. Cardiovascular variability and β -ars gene expression at two stages of doxorubicin – induced cardiomyopathy. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2019; 362: 43-51.
- Vásquez-Vivar, J., Martasek, P., Hogg, N., Masters, B. S. S., Pritchard, K. A., & Kalyanaraman, B. Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin. *Biochemistry*. 1997; 36 (38): 11293-11297.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., & Veksler, V. Energy metabolism in heart failure. *J Physiol*. 2004; 555 (Pt 1): 1-13.
- von Hoff, D. D., Layard, M. W., Basa, P., Davis, H. L., Von Hoff, A. L., Rozenzweig, M., & Muggia, F. M. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Annals of Internal Medicine*. 1979; 91 (5): 710-717.

- Wang, G. X., Wang, Y. X., Zhou, X. B., & Korth, M. Effects of doxorubicinol on excitation-contraction coupling in guinea pig ventricular myocytes. *European Journal of Pharmacology*. 2001; 423 (2-3): 99-107.
- Wang, Y. X., & Korth, M. Effects of doxorubicin on excitation-contraction coupling in guinea pig ventricular myocardium. *Circulation Research*. 1995; 76 (4): 645-653.
- Whalley, D. W., Wendt, D. J., & Grant, A. O. Basic concepts in cellular cardiac electrophysiology: Part i: Ion channels, membrane currents, and the action potential. *Pacing and Clinical Electrophysiology*. 1995; 18 (8): 1556-1574.
- Woo, C. C., Kumar, A. P., Sethi, G., & Tan, K. H. B. Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochem Pharmacol*. 2012; 83 (4): 443-451.
- Woo, C. C., Loo, S. Y., Gee, V., Yap, C. W., Sethi, G., Kumar, A. P., & Benny Tan, K. H. Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: Possible involvement of ppar- γ pathway. *Biochemical Pharmacology*. 2011; 82 (5): 464-475.
- Wouters, K. A., Kremer, L. C. M., Miller, T. L., Herman, E. H., & Lipshultz, S. E. Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: A review of the most promising strategies. *Br J Haematol*. 2005; 131 (5): 561-578.
- Xu, H., Guo, W., & Nerbonne, J. M. Four kinetically distinct depolarization-activated K^+ currents in adult mouse ventricular myocytes. *Journal of General Physiology*. 1999; 113 (5): 661-677.
- Xu, J., Zhu, L., Liu, H., Li, M., Liu, Y., Yang, F., & Pei, Z. Thymoquinone reduces cardiac damage caused by hypercholesterolemia in apolipoprotein e-deficient mice. *Lipids Health Dis*. 2018; 17 (1): 173.
- Yeh, E. T. H., & Bickford, C. L. Cardiovascular complications of cancer therapy: Incidence, pathogenesis, diagnosis, and management. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009; 53 (24): 2231-2247.
- Zaoui, A., Cherrah, Y., Lacaille-Dubois, M. A., Settaf, A., Amarouch, H., & Hassar, M. Diuretic and hypotensive effects of nigella sativa on the spontaneously hypertensive rat. *Therapie*. 2000; 55 (3): 379-382.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Tanju	Uyruğu	
Soyadı	Mercan	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Gebze Anadolu Lisesi	2006
Lisans	Orta Doğu Teknik Üniversitesi	2012
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2015
Doktora	Akdeniz Üniversitesi	2021

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi	2014-2021

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	IELTS	6
İngilizce	YÖK-DİL (Sağlık Bilimleri)	81.25

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Kardiyak Miyositlerde Kasılma Fonksiyon Bozukluklarında Sitozolik Serbest Magnezyum Konsantrasyon Değişimlerinin Rolü	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2017-2020
Ellagik asidin kardiyak hipertofi üzerindeki etkisinin elektrofizyolojik olarak incelenmesi	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2017-2020
Rosuvastatinin sol ventrikül miyosit iyon kanalları üzerine akut etkisi	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2018-2018

Burslar-Ödüller:

Yayınlar:

- Kucukseymen, S., Cekin, A. H., Bayar, N., Arslan, S., Uygur Kucukseymen, E., Mercan, T., & Ozdemir, S. A novel biomarker for prediction of atrial fibrillation susceptibility in patients with celiac disease. PLoS One. 2018; 13 (1): e0190382.
- Yurtseven, H., & Mercan, T. Dielectric properties of hdbambc close to the smectic a–chiral smectic c (ac*) transition. Ferroelectrics. 2015; 481 (1): 10-20.
- Kazancı, H. Ö., Mercan, T., & Canpolat, M. Design and evaluation of a reflectance diffuse optical tomography system. Optical and Quantum Electronics. 2014; 47 (2): 257-265.
- Erkan, O., Yamasan, B. E., T., M., & S., Ö. Rosuvastatinin sol ventrikül miyosit kalsiyum ve potasyum İyon kanalları üzerine akut etkisi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi. 2020; 34: 161-166.
- Mercan, T., Sevim, G., Üncü, Y. A., Serkan, U., Kazancı, H. Ö., & Canpolat, M. The comparison of reconstruction algorithms for diffuse optical tomography. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi. 2019; 14 (2): 285-295.
- Canpolat, M., Kazancı, H. Ö., Mercan, T., & Alimoğlu, E. Meme lazer tomografi sisteminin tasarımı ve pilot klinik çalışma sonuçları. Akdeniz Tıp Dergisi. 2015; 1: 58-63.

Bildiriler:

- Erkan, O., Yamasan, B., Mercan, T., Erboğa, N., & Ozdemir, S. (2018). The role of protein kinase a on magnesium related changes in contractile function of rat cardiac myocytes. Paper presented at the Journal of Molecular and Cellular Cardiology.
- Mercan, T., Yamasan, B., Erkan, O., & Özdemir, S. (2018). Thymoquinone alters ionic currents and decreases β adrenergic response in rat ventricle myocytes. Paper presented at the Journal of Molecular and Cellular Cardiology.
- Ozdemir, S., Yamasan, B., Mercan, T., & Erkan, O. (2018). Rosuvastatin modulates ionic currents and prolongs action potential duration in rat ventricular myocyte. Paper presented at the Journal of Molecular and Cellular Cardiology.
- Yamasan, B., Mercan, T., Erkan, O., & Ozdemir, S. (2018). The effect of ellagic acid on isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. Paper presented at the Journal of Molecular and Cellular Cardiology.
- Sevim, G., Mercan, T., Uncu, Y. A., & Canpolat, M. (2017). A new reconstruction technique used in diffuse optical tomography system. Paper presented at the 2017 21st National Biomedical Engineering Meeting (BIYOMUT).

- Üncü, Y. A., Mercan, T., Canpolat, M., & Sevim, G. (2017). A new approach to image processing in diffuse optical tomography and 3-d image. Paper presented at the 2017 25th Signal Processing and Communications Applications Conference (SIU).
- Üncü, Y. A., Mercan, T., Sevim, G., & Canpolat, M. (2017). Interpolation applications in diffuse optical tomography system. Paper presented at the 2017 21st National Biomedical Engineering Meeting (BIYOMUT).
- Mercan, T., Sevim, G., Kazancı, H. Ö., Üncü, Y. A., & Canpolat, M. (2017). Comparison of images produced by diffuse optical tomography with two different backscatter techniques. Paper presented at the 2017 21st National Biomedical Engineering Meeting (BIYOMUT).
- Mercan, T., Yamasan, B., Erkan, O., & Ozdemir, S. (2017). Acute effects of thymoquinone on electrophysiological parameters of rat ventricular myocytes. Paper presented at the Journal of Molecular and Cellular CardiologyCanpolat, M., Mercan, T., Sevim, G., Alimoğlu, E., & Kazancı, H. Ö. (2015, 29 Eylül - 3 Ekim). Meme lazer diffüz optik tomografi sisteminin geliştirilmesi ve pilot klinik deney sonuçları. Paper presented at the 27. Ulusal Biyofizik Kongresi, Malatya, Türkiye.
- Canpolat, M., Kazancı, H., & Mercan, T. (2014). Developing and testing a multi source and detector reflectance diffuse optical tomography system. Paper presented at the SPIE Photonics West.
- Mercan, T., Kazancı, H., & Canpolat, M. (2013, 24 Eylül - 27 Eylül). Diffüz optik tomografi sistemi ile ışığın doku benzeri yapı içerisinde aldığı derinliğin belirlenmesi. Paper presented at the 25. Ulusal Biyofizik Kongresi, Trabzon, Türkiye.