

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak.

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**GUT HASTALIĞINDA KULLANILAN LESİNURAD'IN
KARDİYOTOKSİK ETKİ POTANSİYELİ VE
MEKANİZMASININ AYDINLATILMASI**

MERVE ARICI

**DANIŞMAN
PROF. DR. GÜL ÖZHAN**

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI**DOKTORA TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, DOKTORA Programında Doktora öğrencisi Merve ARICI tarafından Prof. Dr. Gül ÖZHAN'ın danışmanlığında hazırlanan "GUT HASTALIĞINDA KULLANILAN LESINURAD'IN KARDİYOTOKSİK ETKİ POTANSİYELİ VE MEKANİZMASININ AYDINLATILMASI" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 24/12/2020 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı
Prof. Dr. Sibel ÖZDEN
İstanbul Üniv. Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı



Jüri-Danışman
Prof. Dr. Gül ÖZHAN
İstanbul Üniv. Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı



Jüri
Prof. Dr. Pınar AKSOY SAĞIRLI
İstanbul Üniv. Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



Jüri
Doç. Dr. Muhammed HAMİTOĞLU
Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı



Jüri
Dr. Öğretim Üyesi Ayfer BECEREN
Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

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, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Merve Arıcı

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürecimde desteğini ve ilgisini benden esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlanma imkânı bulduğum Danışman Hocam Prof. Dr. Gül Özhan'a tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Sibel Özden başta olmak üzere; desteğini ve bilgilerini benden esirgemeyen hocalarıma ve arkadaşlarıma Tuğçe Boran, Mine Şenyıldız Çağlayan ve Fatih Mehmet Sarı'ya teşekkür ederim.

Her koşulda yanımda olan ve desteğini her zaman bana hissettiren sevgili anneme, babama ve kız kardeşim Kübra Çetin'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 33628

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	2
BEYAN.....	3
İTHAF.....	4
TEŞEKKÜR.....	5
İÇİNDEKİLER	6
TABLolar LİSTESİ.....	8
ŞEKİLLER LİSTESİ	9
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	11
ÖZET	15
ABSTRACT.....	16
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	17
2. GENEL BİLGİLER	18
2.1. Gut Hastalığı İle İlgili Bilgiler	18
2.1.1. Gut Hastalığının Klinik Özellikleri.....	20
2.1.2. Hiperürisemi ve Gut Hastalığına Sebep Olan Risk Faktörleri.....	21
2.1.3. Gut Hastalığının Tedavisi	22
2.1.3.1. Lesinurad.....	24
2.2. Ksenobiyotik Toksisitesinde Kullanılan Başlıca <i>In Vitro</i> Yöntemler.....	25
2.2.1. Sitotoksik Hasar Oluşturma Potansiyelinin Tespiti	26
2.2.2. Apoptotik ve Nekrotik Hasar Oluşturma Potansiyelinin Tespiti	28
2.2.3. Oksidatif Hasar Oluşturma Potansiyelinin Tespiti.....	29
2.2.4. Kardiyak Troponin I ve Troponin T Düzey Tespiti	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar	34
3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler	35
3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler	36
3.4. Kullanılan Yöntemler.....	38
3.4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	38
3.4.1.1. Çalışma Ortamının ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu	38
3.4.1.2. Hücre Dizisinin Temini.....	39

3.4.1.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler	39
3.4.1.4. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Alınması	39
3.4.1.5. Hücrelerin Pasajlanması.....	40
3.4.1.6. Hücrelerin Sayımı	40
3.4.1.7. Hücre Stoklanması	41
3.4.1.8. Maruziyet Ortamı	41
3.4.2. Sitotoksisite Testi.....	41
3.4.2.1. MTT Testi	41
3.4.3. Apoptoz Testi (Annexin V-FITC/PI Apoptoz Testi).....	43
3.4.4. Diklorofluorescein (DCF) Testi	47
3.4.5. Glutasyon Tayin Testi	48
3.4.6. Western Blot Yöntemi ile Protein Tayini	51
3.4.6.1. Protein İzolasyonu.....	51
3.4.6.2. Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Ölçümü	52
3.4.6.3. Western Blot Yöntemi ile Protein Tayini.....	53
3.5. Sonuçların Değerlendirilmesi	57
4. BULGULAR.....	58
5. TARTIŞMA	65
KAYNAKLAR	70
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	83
ÖZGEÇMİŞ	84

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 4-1: Lesinuradın H9c2 hücre dizisi üzerine 0,0625-0,5 M konsantrasyon aralığında Anneksin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkileri.....	59
Tablo 4-2: H9c2 hücre dizisinde 0,0625-0,5 M konsantrasyon aralığında lesinurad maruziyetinin relative Troponin I ve T düzeyleri (kontrolün %'si) üzerine etkisi.....	63



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kronik tofuslü gut (Bayraktar 2010; Khanna ve ark. 2012)	18
Şekil 2-2: Ürik asit oluşumu (Kaya 2013)	20
Şekil 2-3: Lesinuradın molekül yapısı (Livertox.nih.gov, 2019)	24
Şekil 3-1: FSC/SSC grafiğinde hücre kapılanmasının gösterimi.....	45
Şekil 3-2: Nokta alan grafiği (Gültekin ve Mutlu, 2016)	46
Şekil 3-3: Flowsitometride apoptoz tayini için elde edilen grafiğin şematik gösterimi .	47
Şekil 4-1: H9c2 hücre dizisine 0,25-4 M konsantrasyon aralığında lesinurad maruziyetinin MTT sonucu	58
Şekil 4-2: H9c2 hücre dizisine 0,0625-0,5 M konsantrasyon aralığında lesinurad maruziyetinin erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz üzerine etkisi	60
Şekil 4-3: FSC ve SSC dedektörleri yardımıyla H9c2 hücre süspansiyonundaki hücre büyüklüğü ve granülaritesinin tespiti.....	61
Şekil 4-4: Lesinuradın H9c2 hücre dizisi üzerine oksidatif hasar oluşturma potansiyelinin flowsitometrik yöntem ile değerlendirilmesi	62
Şekil 4-5: H9c2 hücre dizisine 0,0625-0,5 M konsantrasyon aralığında lesinurad maruziyetinin glutasyon miktarı üzerine etkisi	63
Şekil 4-6: Troponin I-C ve Troponin T-C düzeylerinin Western Blot tekniği ile görüntüsü	64

DENKLEMLER LİSTESİ

Denklemler 3-1: Toplam hücre sayısı/mL = (Hücre sayısı/4) × 10⁴ × Seyreltme faktörü.....43

Denklemler 3-2: % inhibisyon konsantrasyonu (IC) = 100 – (ort. OD_{madde} × 100 / ort.OD_{negatif}

kontrol).....44



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
$\cdot\text{O-O}^-$	Süperoksid radikali
ACS	Akut coroner sendromu
AMI	Akut miyokard enfarktüsü
ATCC	Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu
ATP	Adenozin trifosfat
APS	Amonyum persülfat
BMI	Vücut kilo indeksi
BSA	Bovin serum albumin
bp	Baz çifti
C_{max}	Maksimum konsantrasyon
Ca	Kalsiyum
CAT	Katalaz
cm^2	Santimetrekare
CO_2	Karbondioksit
CYP2C9	Sitokrom P450 2C9
Da	Dalton
DCF	2',7'-Dikloroflorosein
dk	Dakika
dL	Desilitre
DMEM/F12	Dulbecco'nun modifiye edilmiş besiyeri/F12

DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
ELISA	Enzim bağı immun test
FBS	Fötal sığır serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FITC	Fluoresein isotiyosiyanat
g	Gram
GGPD	Glukoz-6-fosfat-dehidogenaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSSG	Okside glutasyon
GST	Glutasyon-S-transferaz
HCl	Hidroklorür
H ₂ DCF	2',7'-Diklorodihidroflorosin
H ₂ DCF-DA	2',7'-Diklorodihidroflorosin diasetat
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H9c2	Sıçan kardiyobiyoplast hücre dizisi
HO-OH	Hidrojen peroksit
IC ₅₀	%50 maksimum inhibisyon konsantrasyonu
IC ₂₀	%20 maksimum inhibisyon konsantrasyonu
IL-1	İnterlökin 1
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
L	Litre

LDH	Laktat dehidrojenaz
lt	Litre
M	Molar
m ²	Metrekare
mA	Miliamper
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MSÜ	Monosodyum ürat
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolyum bromür
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimehoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS)
NHANES	Ulusal Beslenme ve Sağlık Araştırması
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
nm	nanometre
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NSAİİ	Non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar
OAT-1	Organik anyon taşıyıcı-1
OAT-2	Organik anyon taşıyıcı-2
OAT-4	Organik anyon taşıyıcı-4
OD	Optik dansite
OH [·]	Hidroksil radikali
PBS	Fosfat tamponu çözeltisi

PMSF	Fenilmetilsülfonil florit
PI	Propidyum iyodür
RIPA	Radyoimmünopresipitasyon
rpm	Dakikadaki devir sayısı
PVDF	Polivinilidin florür
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türevleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
sn	Saniye
SOD	Süperoksit dismutaz
TEMED	Tetrametiletildiamin
TnC	Troponin C
TnI	Troponin I
TnT	Troponin T
URAT-1	Ürik asit transporter-1
UV	Ultra viyole
V	Volt
XOI	Ksantin oksidaz inhibitörü
XTT	2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid
WST-1	4-(3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyo)-1,3-benzen disulfonat

ÖZET

Arıcı, M. (2020). Gut Hastalığında Kullanılan Lesinurad'ın Kardiyotoksik Etki Potansiyeli ve Mekanizmasının Aydınlatılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Farmasötik Toksikoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Gut, artan serum ürik asit seviyesi ve buna bağlı olarak monosodyum urat kristallerinin eklem içi ve çevre bağ dokuda birikmesiyle ortaya çıkan metabolik bir hastalıktır. Hastalığın prevalansı; komorbidite insidansının artış göstermesi, yaşam tarzı faktörleri, cinsiyet, yaş ve urat düşürücü tedavinin yetersiz kalması gibi etkenlere bağlı olarak artma eğilimindedir. Tekrarlayan akut atakların ve hiperüriseminin tedavi edilmemesi sonucunda kronik gut tablosu ortaya çıkmaktadır. Lesinurad 2015 yılında FDA tarafından kabul edilen ve kronik gut tedavisinde ksantin oksidaz inhibitörleri ile hedeflenen serum ürik asit seviyesine ulaşamadığı zaman bir ksantin oksidaz inhibitörü ile kombinasyon tedavi şeklinde uygulanan bir ürikozüriktir. FDA, lesinuradın kullanımı ile ilgili kardiyovasküler advers etkilerin gözlemlendiğini fakat bunun altında yatan sebepler hakkında nedensel bir ilişki kurulamadığını rapor etmiştir. Yapılan faz III çalışmaları kapsamında kardiyak bulguların ortaya çıktığı tespit edilmiş, ancak, lesinuradın kardiyovasküler sistem üzerine toksik etkilerin mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Literatürde lesinurad ile ilgili verilerin azlığı sebebi ile konu hakkındaki eksikliği gidermede yararlı olacağına inanılarak planlanan tez projesinde, ürikozürük ilaç grubuna ait olan lesinuradın *in vitro* koşullarda hücre kültürü ortamında kalp hücre dizisi üzerine toksik etki potansiyeli ve toksisiteye sebep olan mekanizmalar araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre, lesinuradın 0,845 M dozunda kalp hücrelerini ölüme götürdüğü, hücre ölümünde reaktif oksijen türevlerinin ve apoptozun rol oynamadığı, kardiyak protein düzeylerini etkileyecek bir mekanizmanın etkili olmadığı, glutatyon seviyelerinin doza bağlı azaldığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçların literatüre katkı sağlamasının yanında mekanik, morfolojik ve yapısal araştırmalar üzerine yapılacak kardiyotoksikite çalışmaları için bir kaynak oluşturması beklenmektedir.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 33628

Anahtar Kelimeler: Lesinurad, Gut, Kardiyotoksikite, Oksidatif hasar, Apoptotik hasar

ABSTRACT

Arici, M. (2020). Investigation of Cardiotoxic Effect Potential and Mechanism of Lesinurad used in Gout Disease. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Toxicology. Doctoral Thesis. İstanbul.

Gout is a metabolic disease that is caused by an increased serum uric acid level and accumulation of monosodium urate crystals in the intra-articular and surrounding connective tissue. The prevalence of the disease tends to increase due to rise of incidence of comorbidity, factors such as lifestyle factors, gender, age and inadequate urate-lowering therapy. Chronic gout occurs as a result of not treating recurrent acute attacks and hyperuricemia. Lesinurad is a uricosuric approved by FDA in 2015 and administered in combination therapy with a xanthine oxidase inhibitor when the targeted serum uric acid level with xanthine oxidase inhibitors cannot be reached in the treatment of chronic gout. FDA reported that cardiovascular adverse effects related to the use of lesinurad have been observed, but that a causal relationship cannot be established about the underlying causes. It determined that cardiac findings emerged within the scope of the phase III studies, however the toxic effects of lesinurad on the heart and the mechanisms of cardiovascular adverse effects have not been fully elucidated yet. Due to the inadequacy of data on lesinurad in the literature, the thesis project, which was planned to be useful in eliminating the deficiency on the subject, investigated the toxic effect potential of lesinurad, which belongs to the uricosuric drug group, on the heart cell line in *in vitro* conditions and the mechanisms that cause toxicity. According to the data obtained, it has been determined that lesinurad causes death of heart cells at a dose of 0,845 M, reactive oxygen derivatives and apoptosis do not play a role in the cell death, a mechanism that affect cardiac protein levels is not effective, glutathione levels decrease depending on the dose. It is expected that the obtained results will contribute to the literature as well as constitute a source for cardiotoxicity studies to be conducted on mechanical, morphological and structural investigations.

Key words: Lesinurad, Gout, Cardiotoxicity, Oxidative damage, Apoptotic damage

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: 33628

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gut hastalığı, hiperürisemiye ikincil olarak monosodyum urat kristallerinin eklem içinde ve çevre bağ dokuda birikmesi sonucu ortaya çıkan tekrarlayıcı akut artrit atakları ile karakterize, metabolik bir hastalıktır. Hiperürisemi ve tekrarlayan akut artrit tedavi edilmez ise urat kristallerinin birikimine bağlı olarak kronik tofuslü gut tablosu ortaya çıkmaktadır. Diyet, yaşam tarzı, tedavi hedefleri ve eş zamanlı seyreden hastalıkların yönetimi tekrarlayıcı ataklarda önerilen en temel terapötik önlemdir. Tekrarlayan gut ataklarının önlenmesi ve kronik gut hastalığının tedavisinin ilk seçeneği ksantin oksidaz inhibitörleridir. İkinci tedavi seçeneği olarak ürikozürükler tercih edilmektedir. Ürikozürükler, bir ksantin oksidaz inhibitörü ile kombinasyon tedavi şeklinde uygulanır.

Lesinurad, 2015 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration, FDA) tarafından kabul edilen kronik gut hastalarında hiperürisemi tedavisi için kullanılan bir ürikozürüktür. Ksantin oksidaz inhibitörleri ile amaçlanan serum ürik asit değerlerine ulaşamadığı zaman bir ksantin oksidaz inhibitörü ile kombinasyon tedavi şeklinde uygulanmaktadır. FDA, lesinuradın kullanımı ile ilgili majör kardiyovasküler advers etkilerin gözlemlendiği klinik verilerle belgelenmiş, fakat, altında yatan sebepler hakkında nedensel bir ilişki kurulamadığını rapor etmiştir. Literatürde verilerin yetersiz olması lesinurad ile ilgili yapılacak araştırmaların konudaki eksikliği gidermede yararlı olacağına inanılmaktadır. “Gut Hastalığında Kullanılan Lesinurad’ın Kardiyotoksik Etki Potansiyeli ve Mekanizmasının Aydınlatılması” başlıklı tez çalışmasının ürikozürük ilaç grubuna ait lesinuradın *in vitro* koşullarda kalp hücre dizisi üzerine toksik etki potansiyelini ve toksisiteye sebep olan mekanizmaları tanımlamada etkili olması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gut Hastalığı İle İlgili Bilgiler

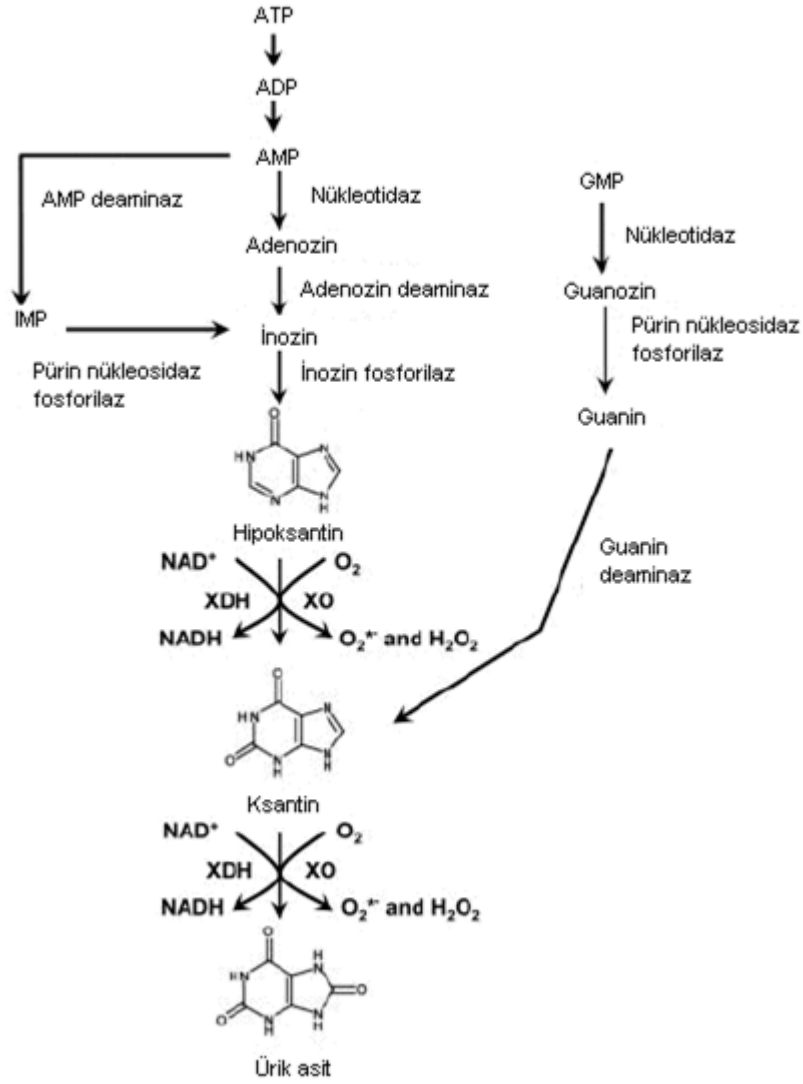
Gut hastalığının tanımlanması çok eski tarihe dayanmaktadır. İlk kez Mısırlılar tarafından M.Ö. 2640 yılında birinci metatarsofaringial eklem artritini anlamına gelen podagra olarak isimlendirilmiştir. M.Ö. 5. yüzyılda Hipokrat tarafından “yürütülemeyen hastalık” olarak tanımlanan bu durumun, alkol tüketimi ve aşırı beslenmeye bağlı olarak ortaya çıktığı kabul edilmiş ve “kral hastalığı” olarak ifade edilmiştir (Nuki ve Simkin, 2006). Gut hastalığı prevalansı kadın ve erkeklerde farklılık göstermekle beraber yaklaşık olarak 1-28/1000 oranındadır (Tetik ve ark. 2012).

Gut hastalığı, hiperürisemiye ikincil olarak monosodyum urat (MSÜ) kristallerinin eklem içinde ve çevre bağ dokuda birikmesi sonucu ortaya çıkan tekrarlayıcı akut artrit atakları ile karakterize metabolik bir hastalıktır (Richette ve Bardin, 2010). Ortaya çıkan hiperürisemi ve tekrarlayan akut artritini tedavi edilmez ise, urat kristallerinin birikimi sonucu kronik tofuslu gut tablosu ortaya çıkmaktadır (Şekil 2-1). Bu durum öncelikle birinci metatarsofaringial eklemi etkilemektedir. Ayrıca, urat kristalleri her iki dirsekte, el ve ayak bileklerinde, her iki dizde ve parmakların dorsal yüzeylerinde de birikerek tofüse sebep olabilmektedir. Eklemler zaman içerisinde geri dönüşsüz olarak hasar göyerek kronik ağrı ve engellilik düzeyinde eklem deformasyonları görülebilmektedir (Ning ve Keenan, 2010; Hainer ve ark., 2014).



Şekil 2-1: Kronik tofuslu gut (Bayraktar 2010; Khanna ve ark. 2012)

Ürik asit, 168 Da molekül kütlesi ile heterosiklik yapıda organik bir bileşiktir ve insanlarda pürin metabolizmasının son ürünüdür (Şekil 2-2). Pürin mekanizması DNA ve RNA sentezi açısından önemlidir. Ürik asitin oluşmasına kadar geçen katabolik aşamalarda, hipoksin ve ksantin oluşur. Ksantin de ksantin oksidaz enzimi aracılığı ile ürik asite dönüşür (Choi & Gout, 2008; Maiuolo ve ark. 2016). Ürik asit, vücuttan tuz formu olan ürat şeklinde atılır. Ürik asidin serum konsantrasyonu aralığı kadınlarda 1,5 – 6 mg/dL; erkeklerde ise 2,5-7,0 mg/dL'dir. Ürik asidin serum konsantrasyonu yaklaşık olarak 6,8 mg/dL'nin üzerinde olduğunda MSÜ kristalleri oluşarak hiperürisemi gelişmeye başlar (Maiuolo ve ark. 2016). Ürik asit, hücre dışı sıvının daha yüksek sodyum seviyesine sahip olmasından dolayı MSÜ kristalleri şeklinde bulunur. Bu sayede ürat iyonu normalde daha yüksek çözünürlüğe sahipken, daha az çözünürlüğe sahip bir forma dönüşmüş olur. Normal şartlarda ürik asitin vücutta yapımı ve atılımı denge halinde gerçekleşir. Böbrekler ürik asitin yaklaşık 2/3'sinin, ince bağırsak da yaklaşık 1/3'inin atılımını gerçekleştirir. Hiperürisemi tablosu da ürat üretiminin artması veya ürat atılımının azalması veya her iki mekanizma neticesinde ortaya çıkmaktadır (McLean ve Becker 2011, Kaynak: İnan 2017 p. 7; Burns ve Wortman 2014, Kaynak: İnan 2017 p. 7; Maiuolo ve ark. 2016).



Şekil 2-2: Ürik asit oluşumu (Kaya 2013)

2.1.1. Gut Hastalığının Klinik Özellikleri

Gut artriti asemptomatik hiperürisemi, akut gut artriti, interkritik gut artriti ve kronik gut artriti olarak 4 evre şeklinde seyreder. İlk evre olan asemptomatik hiperürisemi, sık karşılaşılan bir laboratuvar sonucu olmasının yanında önemli bir risk faktörüdür. Serum ürik asit konsantrasyonunun yükselişi devam ettiği sürece nefrolityazis ve akut gut artritin meydana gelme ihtimali artmaktadır (Wortman 2009; Burns ve Wortman 2014, Kaynak: İnan 2017 p. 9).

Hastalıkta en sık karşılaşılan klinik evre, akut gut artritidir. Kızarıklık, şişlik, ısı artışıyla beraber şiddetli ağrı görülmesi, akut gut artritinde tutulan eklemlerdeki belirtilerdir. İlk ataklar yaklaşık %92'sinde monoartiküler başlar ve ayakbaşı parmağı

tutulunda sonra ayak bileği, diz eklemleri, topuz ve parmakları da tutabilir. İlk gelişen atakta görülen ağrı, maksimum şiddete 12-24 saat aralığında ulaşır ve çoğunlukla 3-10 gün arasında kendiliğinden iyileşir (Choi ve ark. 2015).

İnterkritik gut evresi gut artriti atakları arasında kalan uzun bir dönemi kapsamaktadır. Bazı hastaların ikinci bir atağı geçirmediği görülse de, çoğu hastalarda 6- 48 ay arasında yeni bir atak geçirdikleri görülmektedir. Genel olarak ilk ataklar tek bir eklemden tutulum gösterse de, ikinci ve diğer tekrarlanan ataklarda birden fazla eklemden tutulum görülmektedir (Gutman 1959).

Hiperürisemi ve tekrarlayan gut artriti doğru bir şekilde tedavi edilmez ve bunların altında yatan sebeplere müdahale edilmez ise kronik tofus gelişebilir. Tofüsle seyreden gut, hiperürisemi ve kronik inflamasyon kaynaklı eklemlerde ürik asit birikimi ve çoğunlukla buralarda aşındırıcı değişimler ile karakterizedir. Kronik gut artriti görülen hastaların yaklaşık 1/3'ünün ayak başparmağında, kulak kepçeleri, dirsekler ve aşil tendonlarında, parmak eklemi ve diz çevrelerinde, pre-patellar bursalarda tofus gelişimi görülür (Gutman 1958; Schumacher & Chen 2013, Kaynak: İnan 2017 p. 11; Burns ve Wortman 2014, Kaynak: İnan 2017 p. 11).

2.1.2. Hiperürisemi ve Gut Hastalığına Sebep Olan Risk Faktörleri

Yaş ve cinsiyet: Gut hastalığı prevalansı yaşa bağlı olarak artma eğilimi göstermektedir. Ayrıca, yaşa bağlı olarak ortaya çıkan metabolik sendrom, hipertansiyon gibi hastalıklar ve bu hastalıkların tedavileri (tiazin diüretikleri vb.) prevalansı daha da artırmaktadır (Tykarski 1991; Rathmann ve ark. 1998). Hiperürisemi ve gut hastalığı prevalansı her iki cinsiyette de artmasına rağmen, 65 yaşından daha genç erkek hastalarda kadınlara kıyasla 4 kat daha yüksektir (Wallace ve ark. 2004). Bununla birlikte, menopozla beraber östrojenin ürikozürik etkisinin kaybı ile yaşlılarda gut hastalığı eşit bir cinsiyet dağılımına gelmektedir. Östrojen tedavisinin azalması ile kadın hastalarda gut hastalığı prevalansı artabilmektedir (Saag & Choi, 2006).

Diyet ve alkol tüketimi: Kırmızı et ve deniz ürünleri gibi pürin yönünden zengin yiyeceklerin ve yüksek fruktoz mısır şurubu ile tatlandırılmış içeceklerin tüketilmesi ve ayrıca yüksek yağlı diyetle beslenme gut hastalığının önemli risk faktörleri arasındadır. Pürin yönünden zengin sebzelerin tüketilmesi hiperürisemi ve gut hastalığı açısından bir risk oluşturmamaktadır (Tetik ve ark. 2012; Hainer ve ark. 2014). Özellikle bira gibi pürin yönünden zengin alkolik içeceklerin tüketilmesi hiperürisemi riskini artırmaktadır.

Yapılan bir Ulusal Beslenme ve Sağlık Araştırması (National Health and Nutrition Examination Survey, NHANES)'nda bira, likör ve viski alımı ile, bireylerin serum ürik asit seviyeleri arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, bira ve likörün serum ürik asit seviyesini yükselttiği, viskinin ise serum ürik asit seviyesine böyle bir etkisinin olmadığı bulunmuştur (Choi & Curhan, 2004).

Serum ürat: Serum ürat seviyesi gut için en önemli risk faktörüdür. Başlangıç serum ürat düzeyleri ≥ 9 mg/dL olanlarda, 6 yıllık bir süre boyunca kümülatif gut insidansı %22 olarak bulunmuştur. Serum ürat düzeyleri $\leq 7,0$ mg/dL ve 7,0-8,9 mg/dL olan hastalar arasında yıllık gut insidansı sırasıyla %0,5 ve 0,1'dir (Campion ve ark. 1987).

Obezite: Obezite önemli bir halk sağlığı problemidir. Diğer dünya ülkelerinde olduğu gibi Türkiye'de de obezite prevalansı gün geçtikçe artmaktadır. Toplumumuzda yetişkin bazında obezite yaklaşık olarak %30 oranındadır (<https://hsgm.saglik.gov.tr>, 2017). Vücut kitle indeksi (BMI), gut ile önemli ölçüde ilişkilidir. BMI oranı 23-24,9 kg/m² olanlarda yaşa göre nispi gut riski 1,40; 25-29,9 kg/m² olanlarda 2,35; 30-34,5 kg/m² olanlarda ise 3,26 şeklindedir (Choi ve ark. 2005). Ayrıca, obezite hem üratın böbreklerden atılımını azaltıp hem de ürat oluşumunu artırarak serum ürat seviyesini yükseltmektedir (Dessein ve ark. 2000).

İlaçlar: Çeşitli tedavilerde kullanılan bazı ilaçlar gut için risk oluşturmaktadır. Tiyazid diüretikler, aspirin ve organ transplantasyonunda kullanılan bazı ilaçlar hiperürisemi ve gut ile ilişkilidir. Kardiyovasküler hastalıklar için yüksek risk taşıyan bireyler çoğunlukla aspirin tüketmektedirler. Düşük doz aspirin (1-2 g/gün) ürik asit birikimine sebep olurken, yüksek doz aspirin ise (>3 g/gün) ürikozürük etki göstermektedir (Gutman 1959; Bayraktar 2010). Transplantasyon hastalarında kullanılan siklosporin, tübüler ürik asit sekresyonunu azaltarak ve glomerüler filtrasyon hızını inhibe ederek ürik asit seviyesini artırmaktadır. Ayrıca, immünsupresif bir ajan olan takrolimus da böbrekte glomerüler filtrasyon hızını etki ederek ürik asit seviyesini artırmaktadır (Hollander ve ark. 1995; Pilmore ve ark. 2001).

2.1.3. Gut Hastalığının Tedavisi

Gut hastalığı tedavisindeki temel amaç; akut gut atağının en hızlı şekilde atlatılması, atak ve ateşin tekrarlanmasının önüne geçilmesi, ağrının azaltılması, MSÜ kristallerinin eklem, böbrek, çevre ve diğer dokularda birikiminin önlenmesi, artmış

serum ürik asit seviyelerinin normal değerlere düşürülmesidir (Demir 2011). Ayrıca, pürinden zengin olmayan diyet, kilo kontrolünün sağlanması, alkol alımının ve serum urat seviyesinin artışına sebep olan bazı ilaçların kullanımının kısıtlanması gibi değiştirilebilir risk faktörlerinin ortadan kaldırılması serum ürik asit düzeyinde yaklaşık olarak 1 mg/dL düşüğe sebep olabilir (Dessein ve ark. 2000; Fam 2002).

Asemptomatik hiperürisemi saptanması durumunda hiperürisemi ile ortaya çıkan komplikasyon ve hastalığın altında yatan sebepler, varsa patolojiler, araştırılır ve genellikle serum ürik asit seviyesi kadınlar 10 mg/dL, erkeklerde 13 mg/dL'nin üzerinde olması durumunda ürik asit düşürücü tedavi önerilir (Dincer ve ark. 2002).

Akut gut ataklarının önlenmesinde sistemik ve intra-artiküler glukokortikoidler, non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ), kolşisin, İnterlökin-1 (IL-1) reseptör blokleri gibi ajanlar kullanılmaktadır (Terkeltaub 2010; Sundry 2010; Neogi 2011).

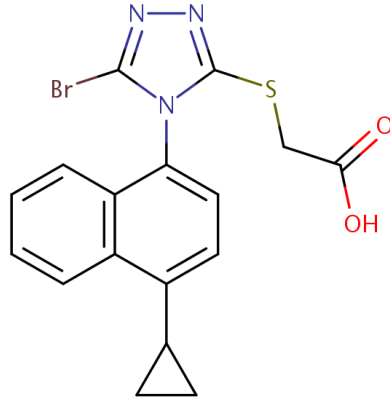
Hiperürisemi, tekrarlayıcı gut ataklarının ve kronik tofus oluşumunun önlenmesi için verilen ilaçlar mekanizmalarına göre 3 kategoriye ayrılmıştır: ürik asit yapımını azaltan ilaçlar (ksantin oksidaz inhibitörleri; XOİ), ürik asit atılımını artıran ilaçlar (ürikozürükler) ve enzimatik yolla ürik asit atılımını sağlayan ürikazlar. Terapötik etkinin görülebilmesi için bu ilaçların uzun süreli kullanılması önerilmektedir (Khanna ve ark. 2012; Becker ve Perez-Ruiz 2020).

Diyet, yaşam tarzı, tedavi hedefleri ve eş zamanlı seyreden hastalıkların yönetimi tekrarlayıcı ataklarda önerilen en temel terapötik önlemdir. Tekrarlayıcı gut atakları ve kronik tofus oluşumu tedavisinde önerilen ilk seçenek ksantin oksidaz inhibitörlerinden olan allopurinol ya da febüksostattır. Ürik asit seviyesinin düşürülmesine yönelik bu tedavi, ksantin oksidaz enzimini inhibe ettiği için ksantin ve hipoksantin konsantrasyonlarını yükseltir (Khanna ve ark. 2012; Hainer ve ark. 2014; İnan 2017). Allopurinolün başlangıç dozu 100 mg/gün'ü geçmemeli ve hatta ciddi kronik böbrek rahatsızlığı olan hastalarda daha düşük doz ile başlanması önerilmektedir. Tedaviden önce ciddi hipersensitife cilt reaksiyonlarına karşı genetik test önerilmektedir. Ayrıca, hastada ksantin oksidaz enzimi ile metabolize edilen ilaç veya ilaçların kullanımı söz konusu ise gerekli önlemler alınmalıdır (Hainer ve ark. 2014; İnan 2017). Febüksostat, allopurinole alternatif olarak 2019 yılında FDA'den onay alan ve pürin olmayan bir ksantin oksidaz inhibitörüdür. Gut alevlenmelerinin sıklığını azaltmada ve serum ürik asit seviyelerini düşürmede allopurinolün 300 mg/gün'lük

dozu kadar etkili değildir (Hair ve ark. 2008; Hainer ve ark. 2014). Probenesid, ürik asit atılımını artıran ürikozürük kategorisine ait bir ilaçtır. İlaç etkileşimlerinden dolayı tekrarlayan gut ataklarını azaltmada ikinci tedavi seçeneği olarak kullanılır. Mevcut durumda kullanılan ilaç, serum ürik asit düzeyini hedef seviyelere düşüremediğinde probenesid, allopurinol ya da febüksostat ile kombinasyon tedavi şeklinde uygulanır (Khanna ve ark. 2012). Peglotikaz ise 2010 yılında FDA tarafından onaylanan ürik asitin daha çözünür bir formu olan allantoin yapımında katalizör olarak kullanılan bir enzimdir. Tedavide kullanılan üçüncü seçenektir (Hainer ve ark. 2014).

2.1.3.1. Lesinurad

Lesinurad (Ticari ismi: Zurampic, CAS No: 878672-00-5; moleküler formülü: $C_{17}H_{14}BrN_3O_2S$), 2015 yılında FDA tarafından kabul edilen, tablet şeklinde oral yolla alınan ve günümüzde kronik gut hastalarında hiperürisemi tedavisi için kullanılan bir ürik asit transporter-1 (URAT-1) inhibitörüdür. Ksantin oksidaz inhibitörleri ile amaçlanan serum ürik asit değerlerine ulaşamadığı zaman bir ksantin oksidaz inhibitörü ile günde 2 kez 200 mg kombinasyon tedavi şeklinde uygulanır (FDA, 2016; *Livertox.nih.gov*, 2019).



Şekil 2-3: Lesinuradın molekül yapısı (*Livertox.nih.gov*, 2019)

Lesinurad, gut tedavisindeki en yeni ürikozürük ilaçtır. Fakat, 1960'larda bir ksantin oksidaz inhibitörü olan allopurinolün kullanılmasından bu yana, ürikozürük ilaçlar yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bunun nedeni, çok sayıda ilaç etkileşimi ve yan etki ile ilişkili olmasıdır (Dean 2019).

Diğer ürikozürük ilaçlar gibi, lesinurad ürik asitin böbrekte reabsorbsiyonuna aracılık eden URAT-1'i ve diüretik ilaç kullanımına bağlı hiperürisemi ile ilişkili organik anyon taşıyıcı 4'ü (OAT4) inhibe eder. Fakat probenesidin aksine, OAT1 ve OAT2'yi inhibe etmediği için lesinurad kullanımı ile daha az ilaç etkileşimi ve yan etki görülebilmektedir (Soskind ve ark. 2017).

Yüksek oranda albümine bağlanan lesinurad, %100 biyoyararlanıma sahiptir ve 1-4 saat içinde C_{max} (Maksimumum konsantrasyon) a ulaşır. Yarılanma ömrü yaklaşık olarak 5 saattir ve toplam klirens 6 L/saat'dir. İlaç ağırlıklı olarak CYP2C9 ile metabolize olmaktadır. CYP2C9 genetik polimorfizme sahip olduğundan dolayı bu enzim için yavaş metabolizör olan hastalar daha yüksek konsantrasyonda lesinurad almak zorunda kalacaklardır (Fleischman ve ark. 2014).

Lesinurad tedavisi; kreatinin seviyesinde artış, reversibl nefrolityazis (böbrek taşları), ürolityazis (üriner kanal veya mesane taşları) ve günlük dozun 400 mg'ın üzerine çıkılması durumunda böbrek yetmezliği gibi advers etkilerle ilişkilidir. Ayrıca, FDA, bu ilacın kullanımı ile ilgili olarak miyokard enfarktüsü gibi majör kardiyovasküler yan etkilerinin gözlemlendiğini fakat altında yatan sebepler hakkında nedensel bir ilişki kurulamadığını rapor etmiştir (FDA 2016; Pascart & Richette, 2017).

2.2. Ksenobiyotik Toksisitesinde Kullanılan Başlıca *In Vitro* Yöntemler

In vitro test sistemleri, toksik etki potansiyeli araştırılan kimyasal maddelerin değerlendirilmesi açısından günümüzde önemli bir yer tutmaktadır. Hüresel ve moleküler mekanizmaların aydınlatılabilmesi, hücre hasarı tespiti için imkan tanınması, tekrarlanabilirliğin yüksek olması, herhangi bir etik kurul onayı gerektirmemesi, ekonomik açıdan daha ucuz ve ulaşılabilir olması; hayvan deneylerine alternatif olarak ve gerekli hayvan deneyleri için doz ve diğer temel bilgileri belirlemek amacıyla kullanılan *in vitro* hücre kültürü çalışmalarına duyulan ilgiyi artırmaktadır (Zucco ve ark. 1998; Tokur & Aksoy, 2017).

Hücreler, dokudan uygun tekniklerle ayrıştırıldıktan sonra uygun koşullarda çoğaltılırlar ve primer kültür halini alırlar. Bu aşamadan sonra hücrelerin pasaj tekniği uygulanarak taze ve uygun bir besiyeri ile kültür kabında alt kültüre alınması gerekir (Freshney 1994). Hücre kültürleri, çoğu zaman hücreler analiz için yeterli sayıda hücre elde etmek üzere günler veya haftalar boyunca kültürde büyütülebilir. Uzun süreli

kültürde kontaminasyonu ve hücre hatlarının kaybını önlemek için hücrelerin bakımı aseptik tekniğe bağlı kalmayı gerektirmektedir (Phelan & May, 2015).

2.2.1. Sitotoksik Hasar Oluşturma Potansiyelinin Tespiti

Çeşitli methodların geliştirilmesi ve bu methodların *in vivo* toksisite ile olan korelasyonu, toksikoloji laboratuvarlarında yapılan hayvan deneylerine alternatif olarak hücre temelli deneylerin uygulanmasını artırmaktadır. Hücre canlılığını ölçmenin ya da uygulanan herhangi bir maruziyetin sonunda *in vitro* sitotoksisite potansiyelini belirlemenin çeşitli yöntemleri vardır. *In vitro* toksisite testlerinin temel amacı, ilaç ve diğer bileşiklerin öncelikle genel sitotoksisite profillerini belirlemektir (Zucco ve ark. 1998; Riss & Moravec 2004).

Hücre canlılığı belirli bir popülasyon içinde yaşayan hücrelerin miktarı olarak tanımlanır ve hücre proliferasyonunu belirlemek ilaç veya diğer ksenobiyotiklere karşı hücrenin yaşam ya da ölümünün belirlenmesinde önemli bir gösterge kabul edilir. Hücre sitotoksitesisi ve proliferasyon deneyleri, temel olarak hücrelerin ilaca ya da herhangi bir kimyasal ajana karşı tepkisini saptamak için uygulanmaktadır (Adan ve ark. 2016).

Ksenobiyotikler hücre canlılığını ve metabolizmasını etkileyebilirler. Bu ajanlar hücre membran hasarı, protein sentezi inhibisyonu, reseptörlere geri dönüşsüz olarak bağlanma, enzimatik reaksiyonlar gibi mekanizmalar aracılığıyla hücreler üzerinde toksisiteye sebep olabilir. Hücre membran geçirgenliği, boya alımı, metabolik aktiviteler, enzim salınımı, hücre adheransı, ATP ve koenzim üretimi, DNA sentezi gibi çeşitli hücre fonksiyonlarıyla ilgili olarak sitotoksiste ve proliferasyonu belirlemek için farklı metotlar uygulanmaktadır (Ishiyama ve ark. 1996; Adan ve ark. 2016; Aslantürk 2018). Sitotoksiste saptamak için kullanılan yöntemler; boya alımı, kolorimetrik, florometrik ve luminometrik testler olarak sınıflandırılır (Aslantürk 2018).

Bir hücre popülasyonundaki canlı hücre oranı bir çok yöntemle belirlenebilir. Bu yöntemlerden en kolay ve daha sık kullanılanı boya alımı testleridir (Aslantürk 2018). Boya alımı testleri, canlı hücrelerin bozulmamış membranları moleküllerin geçişinde seçici olduğundan dolayı canlı hücreler tarafından reddedilen fakat ölü hücreler tarafından içeri alınan farklı boyaların kullanılması esasına dayanır. Tripan mavisi, sadece hasarlı membranlardan ve ölü hücreler tarafından absorbe edilen ve sıklıkla kullanılan bir boyadır (Strober 1997). Belirli koşullar altında canlı hücrelerin sayısını

ve/veya hücre proliferasyon oranlarını karşılaştırmak amacıyla uygulanır. Tripan mavisi sıklıkla laboratuvarlarda mikroskop altında hücre sayımı için kullanılmaktadır. Boyanın uygulanmasından sonra ölü hücreler maviye dönerken canlı hücrelerde herhangi bir renk değişimi gözlenmez (Tennat 1964).

Kolorimetrik testler, hücrelerin metabolik aktivitesinin değerlendirmek için biyokimyasal bir göstergenin ölçülmesi esasına dayanır. Kolorimetrik testlerde kullanılan spesifik reaktifler hücrelerin canlılığına yanıt olarak renk değişimi gösterir ve spektrofotometre ile hücre canlılığının kolorimetrik ölçümüne olanak sağlar. Adherent ya da süspansiyon hücre hatları için uygun olan bu testler kolay bir şekilde uygulanabilir ve ekonomiktir (Präbst ve ark. 2017).

Belirli bir hücre popülasyonunda canlılığı saptamak amacıyla 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolyum bromür (MTT), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimesitifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS), 2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid (XTT) ve 4-(3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyo)-1,3-benzen disulfonat (WST-1) tetrazolyum bileşikleri kullanılır (Riss ve ark. 2016) Kolorimetrik testler arasında hücre canlılığı ya da sitotoksiteyi değerlendirmek için kullanılan en yaygın tetrazolyum bileşiği MTT'dir. Bu test esas olarak süksinat dehidrojenaz gibi mitokondriyal enzimlerin aktivitesini ölçerek hücrelerin mitokondriyal fonksiyonunun belirlenmesi aracılığıyla hücre canlılığını saptama esasına dayanır. Bu testte MTT, nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) aracılığı ile mor renk alarak formazana indirgenir ve spektrofotometrede 590 nm dalga boyunda ölçülür (Mosmann 1983; Stone ve ark. 2009).

MTT testi farklı durum ve konsantrasyonlar altında farklı ajanların sitotoksik etkilerini tespit amacıyla çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, MTT testiyle kullanılan kontrol grubun canlılığı ve ksenobiyotik uygulanan grup ile karşılaştırmalı olarak uygulanan ksenobiyotiklerin IC₅₀ (%50 maksimum inhibisyon konsantrasyonu) değerini hesaplamak mümkündür (Berridge ve ark. 2005).

Laktat dehidrojenaz (LDH) sitotoksite testi de kolorimetrik yöntemlerden biridir. LDH apoptotik veya nekrotik hücrelerin membran hasarlarından dolayı ekstraselüler hücre ortamına sızan ve hemen hemen her hücrede bulunan sitoplazmik bir enzimdir. LDH aktivitesi farklı ajanların ya da çevresel faktörlerin sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla ölçülebilir. LDH testi iki basamaklı bir prosedürden oluşmaktadır.

İlk basamakta, LDH, NAD⁺'ın NADH'a redüksiyonu ile laktatın pirüvata dönüşümünü katalizler. İkinci basamakta ise, oluşan NADH'ın kullanımı ile bir tetrazolyum tuzu kırmızı bir formazana ürününe dönüştürülür ve tetrazolyum tuzu spektrofotometrede 490-520 nm dalga boyunda ölçülür (Wolterbeek ve van deer Meer 2005; Sumantran 2011; Adan ve ark. 2016).

2.2.2. Apoptotik ve Nekrotik Hasar Oluşturma Potansiyelinin Tespiti

Apoptozis Yunanca'da sonbaharda yaprak dökümü anlamına gelen ve birçok genle ilişkili aktif bir sistem olup, nekrozdan farklı bir ölüm çeşidi olarak ilk kez 1972 yılında ifade edilmiştir (Kerr ve ark. 1972; Özvaran 2004). Apoptoz, organizmada işlevini yitirerek kendisi için tehlikeli olabilecek veya hasar görmüş hücrelerin programlı ölümünü tanımlayan fizyolojik bir süreçtir. Vücudumuzdaki her hücre belli bir süre yaşar, çoğalır, farklılaşır ve ölür. Organizmadaki bu süreç bir denge halindedir. Bu dengenin bozulması birçok hastalığın patofizyolojisinde önemli bir yer tutmaktadır (Akşit ve Bildik, 2008). Apoptoz genler tarafından kontrolü ve enerji kullanılmasını gerektiren, enflamasyon ile sonuçlanmayan bir süreçtir (Coşkun ve Özgür, 2011). Apoptozda temel morfolojik değişim, nukleusun yoğunlaşması ve ardından küçük parçalara ayrılmasıdır. Nukleusu parçalara ayrılan hücrede apoptotik cisimcikler oluşur, hücre organelleri kaybolur, sitoplama büzülür ve hücreler birkaç dakika (dk.) içerisinde hacimlerinin 1/3'ünü kaybeder. Oluşan apoptotik hücreler fagosite edilir (Mis ve Yeltekin, 2014).

Ekstrinsik ve intrinsik yollar apoptozun temel iki yolağıdır. Hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, büyüme ve üreme faktörlerinin eksikliği ve iskemi, ilaçlar, toksinler, UV gibi dış etkenler ekstrinsik yolak mekanizmasını oluştururken; hücre içi Ca²⁺ seviyesi artışı, endoplazmik retikulum stresi, DNA hasarı ve mitokondriyal transmembran potansiyelinin değişmesi gibi durumlar ise apoptozun intrinsik yolağını oluşturmaktadır. Ayrıca her iki yolakta da kaspazlar aktif olarak görev almaktadırlar (Coşkun ve Özgür, 2011; Mis ve Yeltekin, 2014).

Apoptoz mekanizmasının otoimmün hastalıklar, hematolojik bozukluklar, metabolik bozukluklar, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, bazı kalp hastalıkları ve kanserde önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir (Akşit ve Bildik, 2008).

Apoptozun belirlenmesinde; ışık mikroskobu, floresan mikroskobu, elektron mikroskobu ve faz-kontrast mikroskobu kullanılarak morfolojik görüntüleme

yöntemleri; annaksin V yöntemi, TUNEL yöntemi, M30 yöntemi ve Kaspaz-3 yöntemi gibi immunohistokimyasal yöntemler; agaroz jel elektroforezi, western blotting ve flowsitometri gibi biyokimyasal yöntemler; ELISA, fluorimetrik yöntem ve DNA mikroarrays gibi immünolojik ve moleküler biyoloji yöntemleri kullanılmaktadır (Galluzzi ve ark. 2009).

Nekroz, meydana gelen fizyolojik ve morfolojik değişiklikler açısından apoptozdan farklı bir ölüm şeklidir. Nekroz, genler tarafından kontrol edilmeyen, tek bir hücreyi değil bir hücre grubunu etkileyen ve enflamasyonla sonuçlanan bir süreçtir. Hipoksi, ağır metaller, insektisitler, ısı, yanma gibi fiziksel uyarılar ve toksik maddeler nekrozun sebepleri arasındadır (Coşkun ve Özgür, 2011; Golstein ve Kroemer, 2007; Nicotera ve Melino, 2004). Nekrozda, hücre bütünlüğü bozulur, organeller zarar görür ve hücre patlar. Hücre ölümünün ardından hücre içeriği interselüler boşluğa salınır ve bu durum enflamasyona neden olur. Bu durumun en belirgin özelliği nötrofil ve makrofajların nekroza uğrayan hücre ve dokuya göç ederek dokuyu fagosite etmesidir (Golstein ve Kroemer 2007).

Apotozdan farklı olarak nekrozun saptanmasında kullanılan yöntemler kısıtlıdır. Nekroz, hücre organellerinin şişerek patlaması ve hücre membranının bozulması ile karakterize bir ölüm şeklidir. Sitoplazmik bir enzim olan ve tüm hücrelerde bulunan laktat dehidrojenaz (LDH), hücrelerin zarar görmesi halinde yapısı bozulmuş hücre membranından hücreler arası boşluğa salınır. Bu esasa göre LDH aktivitesi ölçülerek nekroza bağlı hücre hasarı tespiti yapılabilir (Chan ve ark. 2013; Tokur ve Aksoy, 2017). Diğer bir yöntemde ise hücrelerin Annexin V ve geçirgen olmayan membran boyası ile boyanarak floresan mikroskobu, lazer görüntüleme sitometri veya flow sitometri ile tespit edilebilmesidir (Chan ve ark. 2011).

2.2.3. Oksidatif Hasar Oluşturma Potansiyelinin Tespiti

Oksijenin biyolojik sistemlerle etkileşimi çeşitlilik göstermektedir ve normal şartlarda bu durum kontrol altındadır (Birben ve ark. 2012). Serbest radikaller, bir orbitalinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren, bağımsız bir çoğalma kapasitesine sahip oldukça reaktif olan kimyasal türlerdir. Bu kimyasal türler herhangi bir biyokimyasal sürecin, aerobik yaşam ve metabolizmanın önemli bir parçasını oluşturmaktadır (Sharma ve ark. 2018).

Serbest radikaller vücudumuzda devamlı olarak oluşmaktadır. Ayrıca, çevresel kirlenmeler, otomobil egzoz dumanı, pestisitler, sigara dumanı, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirlenmeleri, ilaçlar (aminotriazol, doksorubisin, asetamonifen, hiperbarik oksijen, trisiklik antidepresanlar, siklosporin) ve metaller (civa, bakır, demir, kadmiyum, nikel) sebebiyle de serbest radikal oluşmaktadır (Mercan 2004; Ochieng ve ark. 2015).

Oksijenden oluşan serbest radikaller, biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller olarak kabul edilir ve reaktif oksijen türevleri (ROS) olarak isimlendirilirler (Mercan 2004; Sharma ve ark. 2018). Fizyolojik önemi en fazla olan reaktif oksijen türevleri; süperoksit ($\cdot\text{O-O}^-$), hidroksil radikali ($\text{OH}\cdot$) ve hidrojen peroksittir (HO-OH). (Birben ve ark. 2012).

Birçok hücre bileşeni serbest radikallere karşı oldukça duyarlıdır. Serbest radikaller hücre zarı lipidlerini peroksidize ederek hücre membranı bütünlüğünde ve membran proteinlerinin mikroçevresinde değişmelere sebep olurlar (Sim ve ark. 1996). Ayrıca, tek ya da çift sarmalda kırılmalar veya çapraz bağlanma gibi DNA hasarı gözlenebilir. Serbest radikaller biyolojik sistemlerin ana bileşenlerine zarar vererek onların dengesini bozar ve hücre ölümüne sebep olurlar (Yan ve ark. 2015).

Vücutta serbest radikallerin etkilerini dengelemeye çalışan savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Bu savunma mekanizmalarını antioksidanlar oluşturmaktadır (Karabulut ve Gülay 2016). Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşmasının ve zararlı etkilerinin sınırlandırılması, zararlı biyokimyasal reaksiyonların durdurulması, meydana gelen serbest radikallerin vücuttan uzaklaştırılması ve hasarlı moleküllerin ortadan kaldırılması gibi mekanizmaların üzerinde etkilidir (Konukoğlu 1997). Başlıca primer enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidazdır (GSH-Px) (Birben ve ark. 2012). Glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (GGPD) ise ikincil enzimatik antioksidanlar arasında yer alır (Sharma ve ark. 2018). Enzimatik olmayan antioksidanlar C Vitamini ve E vitamini, β - karoten, ürik asit, N-asetilsistein, albumin, glutatyon (GSH) ve bir tiol gurubu içeren sülfidridir (Konukoğlu 1997; Birben ve ark. 2012; Sharma ve ark. 2018).

GSH, tüm hücre kompartmanlarında yüksek miktarda bulunan önemli bir antioksidandır. Redükte glutatyon/Okside glutatyon (GSH/GSSG) oranı oksidatif stresin

önemli bir belirleyici faktörüdür. GSH antioksidan etkilerini bir çok yolla göstermektedir (Masella ve ark. 2005). Hidrojen peroksidi (H_2O_2) ve lipid peroksitlerin GSH-Px aracılığı ile detoksifikasyonunu sağlar. Glutasyon elektronunu H_2O_2 'e vererek onu suya ve oksijene indirger. GSSG da, elektron donörü olarak nikotinamid adenin dinükleotid fosfadi (NADPH) kullanan GSH redüktaz aracılığı ile glutatyona indirgenir. Ayrıca, GSH-Px hücre mambranını lipid peroksidasyonundan korumada önemli bir yer tutmaktadır. İndirgenmiş glutasyon membran lipidlerine proton vererek onu oksidan etkilerinden korur (Curello ve ark. 1985).

Ayrıca, glutasyon GSH-Px ve transferaz gibi detoksifikasyon enzimleri için kofaktör olarak görev almaktadır. C ve E vitaminini aktif formlarına geri döndürmede önemli bir role sahiptir. Glutasyon, proapoptotik ve antiapoptotik sinyal yollarıyla etkileşime girerek hücreleri apoptoza karşı korur (Masella ve ark. 2005).

Antioksidanların tükenmesi ya da serbest radikallerin birikmesi nedeniyle antioksidanlar ve serbest radikaller arasındaki denge bozulduğunda oksidatif stres olarak tanımlanan bir dizi biyokimyasal olay meydana gelir. Serbest radikaller son derece toksiktir ve fazla birikmeleri söz konusu olduğu zaman hücrelerin proteinler, lipidler, mitokondriyal ve nüklear DNA molekülü gibi makromoleküllerine zarar verebilirler (Birben ve ark. 2012, Jacob ve ark. 2013). Bu stres absorpsiyon, proteinlerin inhibisyonu ve sekresyonu, enzim sentezi gibi membran fonksiyon kaybı sonucunu doğurabilir ve dolaylı yoldan mutasyona ve karsinogeneze sebep olabilir (Abdel-Rahman ve ark. 2016).

Oksidatif stres; atherosikleroz, Alzheimer, karaciğer hastalıkları, romatoid artrit, diabet mellitus, miyokardial enfarktüs, iskemi- reperfüzyon hasarı, hematolojik bozukluklar, Parkinson hastalığı, pulmöner bozukluklar, radyasyon hasarı, böbrek hasarı, gastrointestinal rahatsızlıklar, hipertansiyon, beslenme yetersizlikleri, pankreatit gibi çeşitli hastalıkların nedenleri arasında gösterilmektedir (Sharma ve ark. 2018).

Son yıllarda yapılan klinik ve deneysel çalışmalar, reaktif oksijen türevlerinin aşırı üretilmesinin kalp yetmezliği ile ilişkili olduğunu ispatlamıştır. ROS'ların aşırı üretiminin yol açtığı hücresel fonksiyon bozukluğu, protein ve lipid peroksidasyonu, DNA hasarı, geri dönüşsüz hücre hasarı ve hücre ölümü kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojisinin temelini oluşturmaktadır (Tsutsui ve ark. 2011).

Serbest radikallerin belirlenmesinde kullanılan birçok *in vitro* yöntem bulunmaktadır. 2',7'-diklorodihidroflorosein diasetat (H₂DCF-DA) floresan probu hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve peroksinitrit gibi birçok ROS ile reaksiyon verebildiğinden dolayı ROS oluşumunu tespit etmek amacıyla yaygın olarak kullanılır. Hücre içine pasif difüzyon ile nüfuz eden H₂DCF-DA'nın, hücre içi esterazlar tarafından kırıldıktan sonra hücre içi seviyesi korunur. ROS ile oksidasyon sonrası floresan özellikte olmayan H₂DCF-DA, yüksek floresan özellik gösteren 2',7'-diklorofloroseine (DCF) dönüşür. Ölü ya da canlı hücreler ROS oluştururlar. Canlı hücreler içinde ROS tespiti yapmak istenirse, hücrelerin propidyum iyodür (PI) ile boyanması ve sadece PI negatif olan canlı hücreler içinde ROS oluşumunu değerlendirmek gerekmektedir. PI 488 nm'de uyarılır ve maksimum 617 nm dalga boyunda yayılır. Bir prob floresan emisyonu flowsitometri, standart bir flometre ya da floresan mikroskobu ile değerlendirilebilir (Ameziane-El-Hassani & Dupuy, 2013).

2.2.4. Kardiyak Troponin I ve Troponin T Düzey Tespiti

Troponin kompleks proteinleri düşük kütleli moleküller olup iskelet ve kalp kasında ekspresyonu olan aktin ve miyozinin kalsiyum aracılı etkileşiminin düzenlenmesinde yer alır. Kardiyak troponin kompleksi 3 tek zincirli polipeptitten oluşmaktadır (Greaser & Gergely, 1971).

Troponin C (TnC), 18 kDa molekül kütlesine sahip kalsiyum iyonlarına (Ca²⁺) bağlanan bir moleküldür (Marston & Zamora, 2020). Troponin I (TnI) kardiyak, yavaş iskelet ve hızlı iskelet kasları olarak üç farklı izoform şeklinde ekspre edilir. Embriyonik gelişim boyunca yavaş iskelet TnI kalp dokusunda ekspre edilir fakat doğumdan sonra kardiyak TnI olarak ekspre edilmeye başlar. Yetişkin TnI yaklaşık olarak 24 kDa'dur. Aktine bağlanır ve aktin filamentleri üzerinde tropomiyozin pozisyonunun kontrolü ile aktin-miyosin bağlantısını inhibe eder (Kobayashi & Solaro, 2005; Marston & Zamora, 2020).

Troponin T, üç protein arasında en büyük alt birimi oluşturur ve yapısal bir role sahiptir. Tropomiyozinin yanı sıra diğer troponin komponentlerine de bağlanır. Ayrıca, kasılmayı kolaylaştırır. Yaklaşık olarak 36 kDa molekül kütlesine sahiptir Kobayashi & Solaro, 2005; Marston & Zamora, 2020).

Kardiyak TnT (cTnT) ve kardiyak TnI (cTnI) sırasıyla *TNNI3* (19q13.4 lokasyonunda) ve *TNNT2* (1q32 lokasyonunda) olmak üzere iki spesifik gen tarafından

kodlanırken, TnC kardiyak ve iskelet kası içinde tek bir gen (*TNNC1*) tarafından kodlanmaktadır (Perry 1998).

Miyosit içinde cTnT çoğunlukla TnC ve cTnI'a bağlanır (üçlü kompleks, kardiyak TnT-I-C) ve total hücre içi havuzun sadece yaklaşık %6-8'inde serbest sitoplazmik formda bulunur. cTnI çoğunlukla TnC'ye bağlı olarak bulunur ve üçlü kompleks içinde minimal seviyededir. cTnT'nin hücre içi konsantrasyonu ve serbest sitoplazmik havuzu cTnI'dan yüksektir (Wu & Feng 1998). Akut miyokard enfarktüsü (AMI) gibi geri dönüşsüz ve ilerlemiş hasardan sonra hastaların kanında hücre içi troponinlerin farklı formlarının hepsi salınmasına ve tespit edilebilmesine rağmen, plazma membranının geçirgenliğini bozan geri dönüşlü miyokardial hasarlarda serbest sitoplazmik havuzdan salınan kardiyak troponinleri tespit edilebilir (Lippi ve ark. 2009).

cTnI ve cTnT'nin kinetik eğrileri oldukça benzerdir. Orta dereceden daha geniş AMI hastalarında kinetik eğrileri iyi bir şekilde tanımlanır. Her iki troponin de semptomların ortaya çıkışında 3-6 saat arasında kanda izlenebilir ve reperfüzyonu olmayan hastalar hariç 12-24 saatte maksimum seviyede gözlenirler. Ayrıca, her iki troponin AMI oluşumundan yaklaşık 72-96 saat kanda tespit edilebilir. Troponin değerleri yaklaşık olarak 7-14 gün boyunca yüksek seviyelerini korurlar (Falk 1985; Katus ve ark. 1991; Remppis ve ark. 1995; Mair 1997). Miyofibril havuzdan devamlı bir salınım miyokardiyal bir hasardan sonra troponinlerin uzun süreli tespitini destekler (Katus ve ark. 1991).

Troponin seviyeleri genel olarak western blot tekniği ile belirlenmektedir. Western blot tekniği, ilgili proteinlerin spesifik antikorlar tarafından işaretlenerek belirlenmesi yöntemidir (Towbin ve ark. 1979).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Araştırma ve Hücre Kültürü Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi.

3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Ayarlanabilir otomatik pipetler (0,1-2,5 µL; 0,5-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)	Eppendorf
Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik dispenser pipet (0,5-10 µL)	Eppendorf
Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik dispenser pipet (30-300 µL)	Eppendorf
Buzdolabı (+4°C)	Arçelik (2041 D)
Derin dondurucu (-20°C)	Bosch
Derin dondurucu (-80°C)	Daihan-Scientific Wisecry
Mili-Q su cihazı	Millipore Gradient
Blok ısıtıcı (5 mL tüpler için)	Stuart (SBH130D)
Blok ısıtıcı (0,5 µL mikrotüpler için)	Techne Dri-Block (DB-2D)
Blok ısıtıcı (96 kuyucuklu mikropılaka)	EuroClone Dry Bath (EMK20)
Hassas Terazı	Sartorius, Mettler (H20)
CO ₂ 'li inkübatör	Thermo-Scientific (Heracell 150i)
Laminar akımlı kabin (Biyogüvenlik Seviyesi 2)	Tezsan
Faz-kontrast invert mikroskop	Olympus (CKX4)
Digital kamera (TEM Jeol-1011 ile bağlı)	Olympus-Veleta TEM Camera
Etüv	Nüve (ES 500)
Otoklov	Hirayama (HV-50L)
Çalkalamalı blok ısıtıcı (2 mL tüp)	Biosan (TS-100C)
Çalkalamalı blok ısıtıcı (96 kuyucuklu mikropılaka)	EuroClone T-Sahker (EMS100)

Flow sitometri	Acea-Novocyte (1000)
Dikey elektroforez jel tankı	Bio-Rad Mini Protean® Tetra Cell (1658040EDU)
Elektroforez güç kaynağı	Bio-Rad PowerPac™ Basic Power Supply (1645050)
Jel görüntüleme cihazı	Vilber Louröat Fusion Fx
Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre	Biotek Epoch
Orbital çalkalayıcı	Stuart (SSMI)
Soğutmalı mikrosantrifüj	Hettich (Micro 200R)
Soğutmalı santrifüj	Hettich (Universal 32R)
Ultrasonik banyo	Elma (Transsonic T460/H)
Vorteks	Ika (NC 28405)
pH metre	Hanna (HI 1131 B)
Spin santrifüj	Labnet (C1301B)

3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Falkon tüp (15 mL)	Nest
Falkon tüp (50 mL)	Nest
Hücre kültür flaskı (25 cm ² ; 75 cm ²)	Nest
Kriyo viyal (1,8 mL)	Axygen
Mikroplaka (6 ve 96 kuyulu)	Nest
Mikrotüp (0,5 mL; 1,5 mL; 2 mL)	Eppendorf
Mikrotüplere uygun portüp	Greiner Bio-One
Falkon tüplere uygun portüp	Greiner Bio-One
Steril enjektör ucu filtre (0,22 µm)	Millex-GS
Pastör pipeti (3 mL)	Interlab
Pipet ucu	Nest

(0,5-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)

Nitril eldiven	Broche
Latex eldiven	Broche
Otoklav bandı	Sussex
Otoklavlanabilir schott şişe (250 mL; 500 mL; 1 L)	Isolab
Polivinilidin florür (PVDF) transfer membranı 0,2 µm	Bio-Rad
Kalın filtre kağıdı (110 mm)	Schleicher&Schvell
Dikey elektroforez jel kaseti, büyük	Bio-Rad Mini Protean® (1653311)
Dikey elektroforez jel kaseti, küçük	Bio-Rad Mini Protean® (1653308)

3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

β-Aktin antikor	Santa Cruz (sc-47778)
β-Merkaptoetanol	Sigma-Aldrich (60-24-2)
2',7'-Dihidro diklorofluoressein diasetat (H ₂ DCF-DA)	Thermo Scientific (D399)
3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Biomatik (A3338)
Absolu alkol	Sigma-Aldrich (32221)
Akrilamid-bis (29:1; %30)	Amresco (1610156)
Amonyum persülfat (>%98) (APS)	Sigma-Aldrich A3678
Antibiyotik çözeltisi	Multicell (450 201EL)
Anti-mouse IgG, HRP-bağlı antikor	Abcam (ab6728)
Anti-rabbit IgG, HRP-bağlı antikor	Abcam (ab6721)
Apoptoz hasar tespit kiti (Annexin V FTIC/PI)	Biolegend (640914)
Ayırma jeli (Resolving) tamponu, 1,5 M Tris HCl tamponu, pH 8,8	Bio-Rad (161-0798)

Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (A1933)
Bromfenol mavisi sodyum tuzu	Sigma-Aldrich (115-39-9)
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Biomatik (A2424)
Dulbecco'nun modifiye edilmiş besiyeri/F12 (DMEM/F12)	Multicell (319005 CL)
ELISA Kit	Elabscience E-EL-0026
Etil alkol	Merck (K38999227)
Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA)	Multicell (625 060 CG)
Fosfataz inhibitör kokteyli	Abcam (ab201113)
Fötal sığır serum (FBS) (aktive)	Capricon (FBS-12A)
Glisin	Sigma-Aldrich (56-40-6)
Hücre bağlayıcı tampon	Biologend (420201)
Laemmler Yükleme Tamponu	Sigma-Aldrich (S3401)
Lesinurad	Sigma-Aldrich (SML1607)
Metanol	Merck (106007)
Ön ayırma jeli (Stacking) tamponu, 0,5 M Tris tamponu, pH 6,8	Sigma-Aldrich (67-56-1)
Örnek indirgeyici ajan	Sigma-Aldrich(S3401-10VL)
PBS (Ca ⁺² , Mg ⁺² içermeyen, pH 7,4; 10X)	Multicell (311415CL)
Protein standardı (10-250 kDa)	Thermo Scientific™ (26619)
Penisilin (100 U) / streptomisin (100 µg/mL) çözeltisi	Wisent-Multicell (450201EL)
Proteaz inhibitör kokteyli	Abcam (ab201111)
Radyoimmünopresipitasyon (RIPA) tampon kiti	Santa Cruz Biotechnology (SC-24948)
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich (151-21-3)
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck (106469)

Sodyum klorür (NaCl)	J. T. Baker (0278)
Tetrametiletilediamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (110-18-9)
Tripan mavisi	Fluka (93595)
Tripsin (1:250)	Multicell (625-035-TG)
Tris Hidroklorür (Tris HCL) (pH: 6,8)	Bio-Rad (161-0799)
Trizma-Baze	Sigma-Aldrich (77-86-1)
Troponin I-C antikoru	ST Johns Laboratories (STJ96114-100)
Troponin T-C antikoru	ST Johns Laboratories (STJ96727-100)
Tween 20	Applichem (A49640)
Western blot jel görüntüleme çözültisi	Thermo Fisher Scientific (34075)
Yağsız süt tozu	Sigma-Aldrich (70166)

3.4. Kullanılan Yöntemler

3.4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.4.1.1. Çalışma Ortamının ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu

Cam malzemeler musluk altında 8-10 kez çeşme suyuyla doldurulup boşaltıldı ve ardından %2'lik çamaşır suyu (sodyum hipoklorit) içeren distile su dolu kovada 1 gece bekletildi. Ertesi gün tekrar musluk altında 8-10 kez çeşme suyuyla doldurup boşaltıldı ve böylece çamaşır suyu cam malzemelerden tamamen uzaklaştırıldı. Bu işlemin ardından cam malzemeler distile su içeren kova içerisinde 1 gece bekletildi. 65°C'lik etüvde kurutulduktan sonra, 165°C'de 2 saat süre ile kuru-sıcak hava sterilizasyonu gerçekleştirildi. Isıya dayanıklı pipet uçları, mikrotüpler, schott şişelerin kapakları gibi plastik malzemeler ve hazırlanan çözeltiler 121°C'de 1,5 atm basınç altında 15 dk. otoklavda steril edildi. Besiyeri ve serum gibi ısıya dayanıksız çözeltilerin sterilizasyonu ise 0,22 µm'lik steril filtrelerden geçirilerek sağlandı.

Hücre kültürü laboratuvarı çalışma alanları ve laminar kabinin içi %70'lik alkol ile düzenli olarak temizlendi. Çalışma öncesi ve sonrasında 15-20 dk ile hücre kültürü laboratuvarı ve laminar kabinin UV lambaları açılarak ortamın sterilizasyonu sağlandı.

3.4.1.2. Hücre Dizisinin Temini

Çalışmada, Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu (American Type Cell Culture, ATCC) bankasından satın alınan sıçan kardiyomyoblast hücre dizisi (H9c2) (ATCC® CRL1446™) kullanıldı. ATCC verilerine göre üretilen hücre dizileri, kriyo viyaller içerisinde -196°C’de sıvı azot tankı içerisinde saklandı.

Embriyonik sıçan kalp dokusundan elde edilen H9c2 hücreleri; morfolojik, biyokimyasal ve elektrofizyolojik özellikleri bakımından kardiyak myositlere benzer özellikler göstermesi sebebiyle *in vitro* çalışmalarda yaygın olarak kullanılan hücre hattı olduğundan dolayı tarafımızca tercih edilmiştir (Daubney ve ark. 2015).

3.4.1.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler

Fetal sığır serumu (FBS): FBS, öncelikle 30 dk. 56°C’de ve 10 dk. 37°C’de inkübe edilerek inactive hale getirildi. Belli hacimli falkonlara bölünerek -20°C’de saklandı. Kullanmadan önce 37°C’de çözündürüldü ve 0,22 µm steril filtreden geçirilerek steril edildi.

PBS çözeltisi (1X): Ana stok PBS (10X)’den 5 mL alınarak, steril su ile 50 mL’ye tamamlandı.

Antibiyotik çözeltisi [penisilin (100U) / streptomisin (100 µg/mL) %10]: 1 mL ana stok penisilin (100U) / streptomisin (100 µg/mL) çözeltisinden alınıp, PBS (1X) ile 10 mL’ye tamamlandı.

Tripsin/EDTA çözeltisi (%0,2 / %0,04): 0,04 g EDTA ve 0,2 g tripsin tartıldı ve 100 mL PBS (1X) içinde çözündü.

H9c2 hücre kültür besiyeri: 5 mL stok FBS ve 0,5 µL antibiyotik çözeltisi alınarak üzeri DMEM/F12 besiyeri ile 50 mL tamamlandı.

Hücre stok besiyeri (DMSO’lu): 2,5 mL DMSO alınarak üzerine, H9c2 hücre kültür için hazırlanmış besiyerinden 47,5 mL eklenerek 50 mL’ye tamamlandı.

3.4.1.4. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Alınması

Kriyo viyal içerisinde muhafaza edilen donmuş hücreler (yaklaşık 10⁶ hücre/mL) sıvı azot tankından çıkarılarak 37°C’lik su banyosunda 1-2 dk. bekletildi ve çözünmeleri sağlandı. Kontaminasyon oluşmaması için viyal kapağının su ile temas etmemesine dikkat edildi. Kriyo viyal %70’lik alkol ile silinerek daha önceden uygun

şartlarda sterilizasyonu sağlanan laminar kabin içerisinde alındı. Hücreler pastör pipeti yardımıyla 15 mL'lik falkona alındı ve %10 FBS içeriğine sahip besiyerinden 5 mL eklenerek pipetajlama ile süspande edildi. Hücre süspansiyonu 1200 rpm'de (dakikadaki devir sayısı) 3 dk. santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Hücre dizisi stoklarında bulunan DMSO'nun uzaklaştırılması pellet üzerine 5 mL besiyeri eklenerek bu işlem ikinci kez tekrar edildi. Elde edilen hücre pelletine 1 mL %10 FBS içeren besiyeri eklenerek yavaşça pipetajlama yapıldı ve hücre süspansiyonu 25 cm²'lik ya da 75 cm²'lik flasklarda 5-10 mL serumlu besiyeri içerisine ekilerek 37°C'de, %5 karbondioksit (CO₂) ve %95 bağıl nem içeren inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda yapışmayan hücreler süpernatantın atılması ile ortamdaki uzaklaştırıldı ve ortama yeni serumlu besiyeri ilave edildi. Faz-kontrast invert mikroskop ile hücrelerin yoğunluğu düzenli olarak kontrol edilerek hücre yoğunluğunun yaklaşık %70 konfluent (sıkışık) duruma geldiği tespit edilince hücreler pasajlandı ya da testlerde kullanıldı (ATCC® CRL-1446™, H9c2).

3.4.1.5. Hücrelerin Pasajlanması

Hücre pasajlama yani hücre kültürünün devamlılığın sağlanması işleminde; öncelikle hücre kültür flasksındaki süpernatant ortamdaki uzaklaştırıldı. Hücresel ve serum artıklarının uzaklaştırılması için hücrelerin yüzeyi 2-4 mL PBS (1X) ile yıkandı. Hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrılabilmesi için; hücreler kültür ortamına 1-3 mL tripsin-EDTA çözeltisi ilave edilerek 37°C'de, %5 CO₂'li inkübatörde 5-10 dk bekletildi. Tutundukları yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine 3-6 mL serumlu besiyeri eklendi ve hücre süspansiyonu 15 mL'lik steril falkon tüpe alınarak 1200 rpm'de 3 dk. süre ile santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pellet üzerine bir miktar daha serumlu besiyeri eklendikten sonra hücreler süspande edildi ve santrifüjleme işlemi tekrarlandı. Hücreler thoma lamı (hemositometre) ile sayılarak yaklaşık 10⁵ hücre/mL olacak şekilde yeni kültür ortamına aktarılıp serumlu besiyeri eklenerek 37°C'de, %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edildi. Hücre dizisinin devamlılığının sağlanması için pasajlama işlemi ortalama haftada 2-3 kez yapıldı.

3.4.1.6. Hücrelerin Sayımı

Hücrelerin sayımı tripan mavisi testi ile yapıldı. Test, canlı hücrelerin tripan mavisi boyasını içine almaması, ölü hücrelerin bozulmuş membranlarından boyayı hücre içine alabilmeleri esasına dayanır. Işık mikroskobu ile incelendiğinde; canlı

hücrelerin sadece membranları mavi renkli gözlenirken, ölü hücrelerin tamamıyla mavi renge boyanmış halde gözlenirler. Hücre sayımı, Thoma lamı (hemositometre) adı verilen 1 mm² alana ve 0,1 mm derinliğe sahip 4×16 küçük kareden oluşan özel sayım lamları (Thoma lamı) kullanılarak ışık mikroskobu altında gerçekleştirildi. 4×16 küçük kareye düşen tüm hücreler sayıldı. Hücre süspansiyonunun mililitresindeki toplam hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı (Denklem 3-1):

Denklem 3-1: Toplam hücre sayısı/mL = (Hücre sayısı/4) × 10⁴ × Seyreltme faktörü

3.4.1.7. Hücre Stoklanması

Hücre kültüründe ortaya çıkabilecek risk ihtimallerine karşı hücreler belli aralıklar ile dondurularak saklandı. %70 konfluent durumu tespit edilen hücreler, bölüm 3.4.1.5.'de belirtildiği gibi pasajlanma işlemine tabi tutulduktan sonra süspande halde bulunmalarından dolayı 1200 rpm'de 3 dk. santrifüjlemeye tabi tutuldular. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti üzerine 1 mL hücre stok besiyerinden eklendi ve pastör pipeti ile pipetajlama yapılarak yaklaşık 10⁶ hücre/mL olacak şekilde hazırlanan hücreler soğuğa dayanıklı kryo viyal içerisine alındı. Sırasıyla 30 dk -20°C'de, 16-24 saat -80°C'de bekletildikten sonra sıvı azot tankına kaldırılarak saklandı.

3.4.1.8. Maruziyet Ortamı

Lesinurad (C₁₇H₁₄BrN₃O₂S; Molekül ağırlığı: 404,28; CAS No: 878672-00-5) stok çözeltisi DMSO'lu ortamda 2 M konsantrasyonunda hazırlandı. Toksikite testi için maruziyet süresi 24 saat ve maruziyet konsantrasyonları 0,25-4 M olarak belirlendi. Maruziyetlerde her kuyucukta 10⁴ hücre/100 µL olacak şekilde 96 kuyulu mikropalakalar kullanıldı.

3.4.2. Sitotoksikite Testi

3.4.2.1. MTT Testi

MTT, kolorimetrik testler arasında hücre canlılığı değerlendirmek için kullanılan en yaygın tetrazolyum bileşiğidir. Bu test ile MTT, süksinat enzimin katalizörlüğünde formazana dönüşür. Mitokondriyal yapısı bozulmamış ve canlı hücreler mor renge boyanır. Ölü hücreler veya mitokondriyal fonksiyonları hasar görmüş hücrelerde ise renk değişimi gözlenmez. Hücre canlılığını belirlemek amacıyla meydana gelen rengin

şiddeti spektrofotometrede 590 nm dalga boyunda ölçülür (Mosmann 1983; Stone ve ark. 2009).

Kullanılan Çözeltiler:

MTT çözeltisi (5 mg/mL): 250 mg MTT tartılarak 50 mL PBS (1X) içerisinde çözdürüldü, çözelti +4°C’de ve karanlıkta saklandı.

Testin Yapılışı:

1. 96 Kuyulu mikropalakalara yaklaşık $10^3 - 10^4$ hücre/100 µL/kuyu olacak şekilde dağıtılan hücreler 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildi.

2. İnkübasyon sonrası ortamdaki süpernatant uzaklaştırıldı ve kuyular 100 µL PBS (1X) ile yıkandı. Taze besiyeri ilavesinden sonra 24 saatlik maruziyet için ortama lesinurad çözeltisi eklendi.

3. MTT ile sitotoksosite testinde lesinurad için 0,25-4 M maruziyet konsantrasyonları tercih edildi. 24 saatlik maruziyet sonrası her bir kuyuya 25 µL MTT çözeltisi eklendi ve 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 2 saat bekletildi.

4. 2 saatin sonunda süpernatantın uzaklaştırıldı ve her kuyuya 100 µL DMSO eklendi.

5. Mikropalakalar orbital çalkalayıcıda 150 rpm’de 5 dk süre ile çalkalandı.

6. Çözeltinin 590 nm’de absorbansı -690 nm referansa karşı- mikropalaka okuyuculu spektrofotometre yardımıyla ölçüldü.

7. Deneyle, her konsantrasyon için en az 3 tekrar ve aynı koşullarda farklı 2 günde çalışmak üzere toplam en az 6 tekrar olacak şekilde yapıldı. Negatif kontrol olarak lesinurada maruz bırakılmamış hücreler benzer şekilde analize hazırlandı.

Değerlendirme:

Negatif kontrol hücrelerindeki enzim aktivitesine bağlı olarak gözlenen absorbans değeri (optik dansite, OD) %100 canlılığa eşdeğer olarak kabul edildi. Enzim aktivitesindeki inhibisyon derecesinin tespitine bağlı olarak lesinurada maruz kalan hücrelerdeki ölüm oranı negatif kontrolün yüzdesi şeklinde aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Denklem 3-2).

Denklem 3-2: % inhibisyon konsantrasyonu (IC) = $100 - (\text{ort. OD}_{\text{madde}} \times 100 / \text{ort. OD}_{\text{negatif kontrol}})$

Çalışmada sitotoksik etki potansiyelleri %50 inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50}) üzerinden değerlendirildi. Ölüm-konsantrasyon ölçü eğrisinin elde edilmesinin ardından IC_{50} değeri eğri üzerinden hesaplandı.

3.4.3. Apoptoz Testi (Anneksin V-FITC/PI Apoptoz Testi)

Normal şartlarda negatif yüklü fosfatidilserin hücre membranının iç kısmında lokalize olmuş durumdadır. Fakat hücre apoptoza girdiğinde fosfatidilserin birimleri hücre membranının dış yüzeyine doğru yer değiştirirler (Güleş ve Eren 2008). Anneksin V, hücre membranının dış yüzeyine çıkan fosfatidilserine bağlanabilen bir proteindir ve bundan dolayı fluoresein isotiyosiyanat (FITC) gibi floresan özellikte bir madde ile işaretlendiğinde apoptotik hücre yoğunluğu flow sitometri ile ölçülebilir. Nekroza uğramış hücrelerin membranlarında da Anneksin V bağlanması meydana gelebildiği için ikinci bir boya olarak propidyum iyodür (PI) eklenir. Hücreler Anneksin V-FITC (yeşil floresans) ve non-vital bir boya olan PI (kırmızı floresans) ile eş zamanlı boyandığı zaman canlı hücre ($FITC^{-}PI^{-}$), erken apoptotik hücre ($FITC^{+}PI^{-}$), geç apoptotik hücre ($FITC^{+}PI^{+}$) ve nekrotik hücrelerin ($FITC^{-}PI^{+}$) birbirinden ayırt edilmesi mümkündür (Overbeeke ve ark. 1998; Güleş ve Eren 2008).

Kit içeriği:

Anneksin V-FITC	0,5 mL
PI	1 mL
Bağlayıcı tampon (10X)	30 mL

Testin Yapılışı:

1. Yaklaşık $2.5 \times 10^3/100$ μ L/kuyu olacak şekilde 6 kuyulu mikropalakalara dağıtılan hücreler $37^{\circ}C$ 'de %5 CO_2 'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

2. İnkübasyon sonrası ortamdaki süpernatant uzaklaştırıldı ve kuyular 1 mL PBS (1X) ile yıkandı. Her kuyuya taze besiyeri eklenerek 'Unstained', 'PI' ve 'Anneksin' boya için hazırlanmış kontrol hücre kuyuları hariç son konsantrasyonlar 0,0625, 0,125, 0,25 ve 0,5 M olacak şekilde lesinurad eklendi ve 24 saat inkübe edildi.

3. 24 saatlik maruziyetin ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve her kuyu 1 mL PBS (1X) ile 2 defa yıkandı. Bu yıkamaların ardından her kuyuya 0,5 mL %1'lik tripsin eklenerek hücreler tripsinize edildi ve 1,5 mL'lik mikrosantrifüje alındı.

4. Elde edilen hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 3 dk. süre ile santrifüj edildikten sonra hücre pelleti 1 defa 1 mL PBS (1X) ile yıkandı.

5. Elde edilen hücre pelleti 2 defa 200 µL soğuk hücre bağlayıcı tampon (Cell Staining Buffer) ile yıkanarak 1200 rpm'de 3 dk. süre ile santrifüj edildi. Her yıkamadan sonra süpernatant atıldı.

6. Yıkamaların ardından elde edilen pellet üzerine 100 µL Anneksin V Binding Buffer eklendikten sonra hücreler süspande edildi.

7. 'Unstained' kontrol hücreleri hariç her maruizyet hücrelerine 5 µL FITC Anneksin V ve 10 µL PI boya ekendi. Anneksin V boyası için hazırladığımız hücrelere sadece Anneksin V, diğerine de sadece PI boyası eklendi.

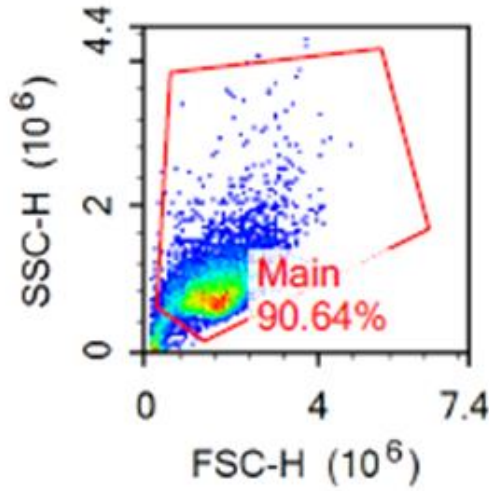
8. Boya eklenen hücreler yavaşça yaklaşık 5 sn vortekslendikten sonra 15 dk. süre ile karanlık ortam ve oda sıcaklığında bekletildi.

9. 15 dk. sonrasında her hücreye 200 µL Anneksin V Binding Buffer eklendi.

10. Hücrelerin floresans yoğunluğu flow sitometride (ACEA NovoCyte) Annexin V-FITC için Ex/Em: 494/518 nm, PI için Ex/Em: 535/617 nm dalga boyunda ölçüldü. Deneyler, her konsantrasyon için en az 3 tekrar ve aynı koşullarda farklı 2 günde çalışmak üzere toplam en az 6 tekrar olacak şekilde yapıldı.

Değerlendirme:

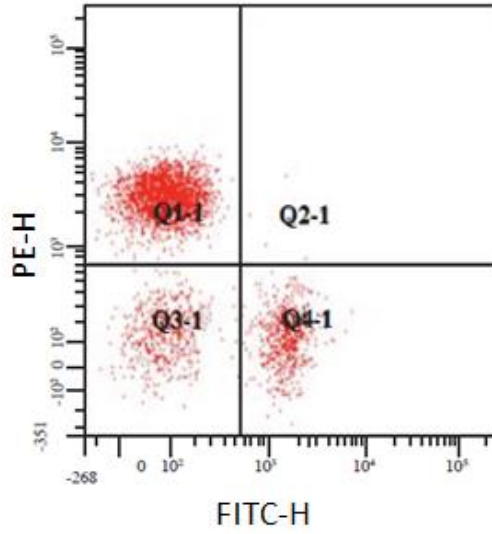
Flow sitometri, akan bir sistem içinde floresan yoğunluğuna bağlı olarak süspansiyon şeklindeki hücrelerin büyüklüğüne ve granülaritesine göre incelenmesidir (Kanev & Muranlı 2016). Bilgisayar Programı (NovoExpress Software) ile gerçekleştirilen veri analizi sonucu hücreler FSC/SSC grafiğinde belirli bir alana düşer. Bu grafik sayesinde süspansiyon halindeki hücrelerde yer alan farklı popülasyonlar ayırt edilebilir. Flow sitometride veri analizi değerlendirilirken dikkat edilmesi gereken en temel prensiplerinden biri popülasyonlar içinde yer alan ölü hücre ve debri gibi istenmeyen partikülleri elimine etmektir. Bu amaçlar doğrultusunda FSC/SSC grafiği üzerinde inceleme yapılacak hücreler bir çerçeve ile belirlenir ve bu işlem kapılama veya kapı alma (gating) olarak tanımlanır (Mutlu & Gültekin 2016). Kapılama yapılan hücre popülasyonu alanı 'Main' olarak gösterilir (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: FSC/SSC grafiğinde hücre kapılanmasının gösterimi

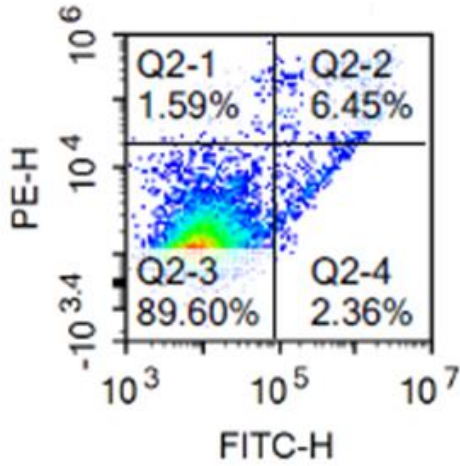
Flowsitometride veri analizine kapılanmış hücre alanı üzerinde devam edilir. Elde edilen veriler ölçülen parametrenin sayısına göre histogram, nokta alan (dot plot), yoğunluk alan, kontur alan ve 3 boyutlu izometrik grafikler olmak üzere farklı grafik çeşitleriyle gösterilebilir (Murat & Gültekin 2016). Tek bir parametreye ait hücre yoğunluğunu gösteren, en basit ve sıklıkla kullanılan veri sunum grafiği histogram (Luggi ve ark. 2010). Araştırılan parametrenin floresans yoğunluğu X eksenini ile, belli sinyal yoğunluğundaki hücre sayısı da Y eksenini gösterilir. Tek parametrelili histogram grafiklerde, elde edilen veriler bir popülasyondaki hücrelerin yüzdesini ya da ortalama floresans yoğunluğunu verir (Mutlu & Gültekin 2016). M2 kapısı, popülasyonda değerlendirilmek istenen tek bir parametrenin hücre popülasyon yüzdesini ifade eder. Örneğin, H₂DCFDA ile işaretlenmiş hücre popülasyonu araştırılırken H₂DCFDA ile işaretlenmiş hücreler M2 kapısı şeklinde gösterilir.

Aynı anda iki parametrenin görüntülenmesi istendiğinde birden fazla seçenek mevcuttur. Bu amaçla en sık kullanılan grafik nokta alan (dot plot) grafiğidir (Şekil 3-2). Nokta alan grafiğinde görüntülenen her bir nokta bir hücreyi göstermektedir. (Luggi ve ark. 2010). Nokta alan grafiğinde iki farklı floresan antikoru taşıyan hücreler de belirlenebilir. Hücreler her iki floresan antikoru taşıyorlarsa grafiğin sağ üst kadranında, tek bir floresan antikoru taşıyan hücreler grafiğin sağ alt ve sol üst kadranında, her iki floresan antikoru da taşımayan hücreler grafiğin sol alt kadranında yer alırlar (Taneli 2007).



Şekil 3-2: Nokta alan grafiği (Gültekin ve Mutlu, 2016)

Apoptoz tayininde grafiğin 4 bölgesine düşen hücrelerin her biri farklı özellikteki hücreleri gösterir (Şekil 3-3). Annexin V-FITC ve PI ile hücrelerin aynı anda boyanması ölü ve canlı hücrelerin ayırmasına imkan sağlar. Tez çalışmasında Annexin V-FITC için Ex/Em: 494/518 nm, PI için Ex/Em: 535/617 nm kullanıldı. Analiz sonucunda canlı hücreler FITC⁻PI⁻ (1.numaralı bölge), erken apoptotik hücreler FITC⁺PI⁻ (2.numaralı bölge), geç apoptotik hücreler FITC⁺PI⁺ (3.numaralı bölge), nekrotik hücreler ise FITC⁻PI⁺ (4.numaralı bölge) ekspresyonu ile tayin edildi. Her analiz ortamında (tüp) ‘Main’ kapısı (hücre analiz ortamında H9c2 hücre popülasyonunun bulunduğu kısım) 10000 hücre olacak şekilde değerlendirildi. Diğer bir ifade ile, her örnekte ‘Main’ kapısı içerisinde 10000 hücre okutuldu (Şekil 3-3).



Şekil 3-3: Flowsitometride apoptoz tayini için elde edilen grafiğin şematik gösterimi

3.4.4. Diklorofluoressein (DCF) Testi

Dihidro dikloroflorosin diasetat ($H_2DCF-DA$) hücre kültürü çalışmalarında oksidatif hasarı değerlendirmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Lipofilik ve floresans özelliği olmayan $H_2DCF-DA$, plasma membranından geçtikten sonra hücre esterazlarıyla reaksiyona girer ve hidrofilik alkol yapısında olan H_2DCF molekülünü meydana getirir. H_2DCF , reaktif oksijen türevlerinin (ROS) varlığında oksidasyon sonucu ile floresan özelliğe sahip DCF molekülüne dönüşür (Karlsson ve ark. 2010).

Kullanılan Çözeltiler:

$H_2DCF-DA$ stok çözeltisi: 20 mM olacak şekilde DMSO'da çözündürülerek hazırlandı ve $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de karanlıkta saklandı.

BSA çözeltisi (%1'lik): 30 mg BSA tartılarak 3 mL PBS (1X) içerisinde çözündürülerek hazırlandı ve çözelti $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Testin Yapılışı:

1. Yaklaşık $2.5 \times 10^3/100\text{ }\mu\text{L}$ /kuyu olacak şekilde 6 kuyulu mikropalakalara dağıtılan hücreler $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de %5 CO_2 'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

2. İnkübasyon sonrası ortamdaki süpernatant uzaklaştırıldı ve kuyular 1 mL PBS (1X) ile yıkandı. Her kuyuya taze besiyeri eklenerek 'Unstained' kontrol hücre kuyusu hariç son konsantrasyonlar 0,0625, 0,125, 0,25 ve 0,5 M olacak şekilde lesinurad eklendi ve 24 saat inkübe edildi.

3. 24 saatlik maruziyetin ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve her kuyu 1 mL PBS (1X) ile 2 defa yıkandı. Bu yıkamaların ardından her kuyuya 0,5 mL %1'lik tripsin eklenerek hücreler tripsinize edildi ve 1,5 mL'lik mikrosantrifüje alındı.

4. Elde edilen hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 3 dk. süre ile santrifüj edildikten sonra sonra hücre pelleti 3 defa 1 mL PBS (1X) ile yıkandı. Son yıkamadan sonra hücre pelleti 1 mL PBS (1X) ile süspande edildi.

5. 'Unstained' kontrol hücre süspansiyonu hariç her maruziyet hücrelerine 1 µL H₂DCF-DA (20 mM) eklenerek 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 30 dk. inkübe edildi.

6. Ardından boyanın uzaklaştırılması için hücreler 1200 rpm'de 3 dk. süre ile santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.

7. Pellet üzerine 200 µL PBS (1X) ilave edilerek hücreler süspande edildi ve 1200 rpm'de 3 dk. süre ile santrifüj edildi.

8. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra her tüpe hazırlanan %1'lik BSA çözeltisinden 150 µL eklenerek hücreler süspande edildi.

9. Floresans yoğunluğu flow sitometride (ACEA NovoCyte, FITC filtre, eksitasyon/emisyon: 485/535 nm) ölçüldü. Deneyle, her konsantrasyon için en az 3 tekrar ve aynı koşullarda farklı 2 günde çalışmak üzere toplam en az 6 tekrar olacak şekilde yapıldı.

Değerlendirme:

Bilgisayar programı (NovoExpress Software) ile FSC/SSC grafiğinde belli alanlara düşen hücrelerin yerlerini belirlemek için kapılama yapıldı. Her analiz ortamında (tüp) 10000 hücre değerlendirildi ve sonuçlar, reaktif oksijen radikallerinin varlığı, total hücre miktarının yüzdesi (%M2) olarak ifade edildi.

3.4.5. Glutasyon Tayin Testi

Redükte glutasyon (GSH) hücre içi ortamın en önemli antioksidan molekülü olup antioksidan savunma sisteminde görev almasının yanısıra birçok fizyolojik fonksiyonu da bulunmaktadır. GSH, Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzimi katalizörülüğünde reaktif oksijen türevleri ile reaksiyona girerek okside glutasyon (GSSG) formuna dönüşür. Serbest radikallerin detoksifikasyonlarının sürdürülebilmesi için NADPH varlığında GSSG'nin tekrar GSH formuna döndürülmesi gerekir (Aktaş ve

ark. 2005). Redükte glutatyonun ölçülmesi oksidatif stres ve antioksidan savunma sisteminin durumu hakkında bilgi vermesi açısından önemlidir. Tez çalışmasında GSH enzim bağı immun test (ELISA) kit ile çalışılmış olup, spektrofotometrede 450 nm’de ölçülerek değerlendirilmiştir.

Kit içeriği:

Referans Standard	2 viyal
Konsantre Biotinleşmiş Belirleme Ab (100X)	120 µL
Konsantre HRP Konjugat (100X)	120 µL
Referans Standard & Örnek Seyreltici	20 mL
Biotinleşmiş Belirleyici Ab Seyreltici	14 mL
HRP Konjugat Seyreltici	14 mL
Konsantre Yıkama Tamponu (25X)	30 mL
Substrat Reaktifi	10 mL
Durdurma Solüsyonu	10 mL
Mikro ELISA Plaka	8 x 12 şerit
Plaka kapatıcı	5 adet

Testin Yapılışı:

1. Yaklaşık 10^6 olacak şekilde 25 cm^2 'lik flaslara dağıtılan hücreler $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de %5 CO_2 'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

2. İnkübasyon sonrası ortamdaki süpernatant uzaklaştırıldı ve kuyular 2 mL PBS (1X) ile yıkandı. Her flaska taze besiyeri eklenerek son konsantrasyonlar 0,0625, 0,125, 0,25 ve 0,5 M olacak şekilde lesinurad eklendi ve 24 saat inkübe edildi.

3. 24 saatlik maruziyetin ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve her kuyu 2 mL PBS (1X) ile 1 defa yıkandı. Bu yıkamaların ardından her kuyuya 1 mL %1'lik tripsin eklenerek hücreler tripsinize edildi ve 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplere alındı.

4. Elde edilen hücre süspansiyonu $1000 \times g$ 5 dk. süre ile santrifüj edildikten sonra hücre pelleti 3 defa 200 µL soğuk PBS (1X) ile yıkandı. Son yıkamadan sonra hücre pelleti 200 µL PBS (1X) ile süspande edildi.

5. 200 µL PBS (1X) içinde toplanan hücreler 4 kez -80°C'de dondurup çözüldü.

6. Ardından tüpler 1500 x g +4°C'de 10 dk. süre ile santrifüj edildi ve süpernatant temiz mikrosantrifüj tüplerine alınarak pellet atıldı.

7. 96 kuyulu mikrolakanın ilk 2 sırasına dilüsyon esasına göre hazırlanan 50'şer µL 'Standard Çalışma Solüsyonu' ve diğer kuyulara da 50'şer µL numune eklendi.

8. Ardından çalışılan her kuyuya 50 µL 'Biyotinleşmiş Belirleyici Ab Seyreltici' ile elde edilen %1'lik 'Biyotinleşmiş Belirleme Ab Çalışma Solüsyonu' köpük oluşmamasına ve kuyuların dibine konulduğundan emin olunarak dikkatli bir şekilde eklendi ve mikrolakanın üzeri 'plaka kapatıcı' ile kaplanarak 37°C'de 45 dk. süre ile inkübe edildi.

9. 45 dk.'nın ardından her kuyudaki solüsyonlar dikkatli bir şekilde döküldü ve kuyular 1:24 oranında konsantre yıkama tamponu ve deiyonize su ile hazırlanmış yıkama tamponundan her defasında 350 µL eklenerek 3 kez yıkandı.

10. Her kuyuya 100 µL HRP Konjugat Seyreltici ile hazırlanan %1'lik HRP Konjugat Çalışma Solüsyonu eklenerek mikrolakanın üzeri plaka kapatıcı ile kaplandı ve 37°C'de 30 dk. süre ile inkübe edildi.

11. Kuyudaki solüsyonlar dikkatli bir şekilde döküldü ve kuyular 350 µL yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.

12. Her kuyuya 90 µL substrat reaktifi eklendi ve mikrolakanın üzeri yeni bir plaka kapatıcı ile kaplandı. Güneşten korumak için mikoplaka alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra 37°C'de 15 dk. süre ile inkübe edildi.

13. Ardından her kuyuya 50 µL Durdurucu Solüsyon eklendi ve mikrolaka spektrofotometride 450 nm'de ölçüldü. Deneyler, her konsantrasyon için en az 3 tekrar ve aynı koşullarda farklı 2 günde çalışmak üzere toplam en az 6 tekrar olacak şekilde yapıldı.

Değerlendirme:

Mikrolakanın spektrofotometrede 450 nm'de çift okunmasının ardından her standart ve numune için absorbans değerlerin (OD) ortalaması alınarak x ekseninde

standart konsantrasyon ve y ekseninde numunelerin OD değerleri alınarak bir eğri oluşturuldu ve miktarı $\mu\text{g}/\text{mL}$ cinsinden değerlendirdi.

3.4.6. Western Blot Yöntemi ile Protein Tayini

3.4.6.1. Protein İzolasyonu

Hücrelerin protein izolasyonu RIPA lizis tampon kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

Kit içeriği:

1X Lizis Tamponu	50 mL; pH 7,4 \pm 0,1
Fenilmetilsülfonil florit (PMSF)	500 μL ; DMSO içinde çözünmüş
Proteaz inhibitör kokteyli	500 μL ; DMSO içinde çözünmüş
Sodyum ortovanat	500 μL ; DMSO içinde çözünmüş

Testin Yapılışı:

1. Yaklaşık 1×10^6 olacak şekilde 25 cm^2 'lik flasklara dağıtılan hücreler 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

2. İnkübasyon sonrası ortamdaki süpernatant uzaklaştırıldı ve kuyular 2 mL PBS (1X) ile yıkandı. Her flaska taze besiyeri eklenerek son konsantrasyonlar 0,0625, 0,125, 0,25 ve 0,5 M olacak şekilde lesinurad eklendi ve 24 saat inkübe edildi.

3. 24 saatlik maruziyetin ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve her kuyu 2 mL PBS (1X) ile 1 defa yıkandı. Bu yıkamaların ardından her kuyuya 1 mL %1'lik tripsin eklenerek hücreler tripsinize edildi ve 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplere alındı.

4. Elde edilen hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 5 dk süre ile santrifüj edildi. Ardından 3 kez daha 200 μL soğuk PBS (1X) ile 1500 rpm'de 5 dk. süre ile santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı.

5. 10 μL PMSF, 10 μL sodyum ortovanat, 15 μL proteaz inhibitör kokteyli ve 965 μL RIPA lizis tamponu bu şekilde oranlanarak bir karışım elde edildi. Pelletler üzerine elde edilen bu karışımdan 125 μL eklenerek iyice pipetajlandı ve 15 dk. süre ile buz üzerinde bekletildi.

6. Buz üzerinde beklemiş hücreler -80°C 'de 4 kez dondurup çözüldü.

7. En son gerçekleştirilen çözülme aşamasının ardından eppendorf tüpler, içerisine buz konulmuş ultrasonik banyoda 4 kez 30 sn. süre ile berraklaşana kadar tutuldu.

8. 14000 x g'de 15 dk. süre ile santrifüjlenen hücrelerin süpernatantı temiz eppendorf tüplere alınarak -80°C'de saklandı.

3.4.6.2. Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Ölçümü

Bradford yönteminin esası Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteine bağlanması ve renk değiştirmesine dayanır. Asidik koşullarda kırmızı renkli olan Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası test edilmek istenen proteine bağlandığında mavi renge dönüşür. Meydana gelen renk 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir (Kruger 2009).

Bradford Boyası Kit İçeriği:

Protein tayini boya reaktifi konsantresi 450 mL

Sığır serum proteini (BSA, standart) çözeltisi; kit protokülü esasına göre 1,41 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde 20 mL deiyonize suda çözüldü. BSA ana stok çözeltisi -20 °C'de saklandı.

Testin Yapılışı:

Bradford yöntemi ile protein miktar ölçümü yapılırken her bir örnek 1/100 oranında sulandırılarak ölçüldü ve hesaplama yapılırken bulunan değer 100 ile çarpıldı.

1. BSA ana stok çözeltisinden konsantrasyonları 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 µg/mL olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltiler protein tayininde standart eğri çizimi için kullanıldı. Standartlar 3'er tekrarlı çalışıldı.

2. 1:4 hacim oranında konsantre boya reaktifi distile su ile seyreltildi.

3. 10'ar µL standart çözelti ve protein örneklerinden 96 kuyulu mikropalakaya uygun konfigürasyonda konuldu ve her kuyucuğa 200 µL seyreltilmiş boya reaktifi ilave edildi.

4. 5 dk.'lık inkübasyonu takiben 595 nm'de mikropalaka okuyuculu spektrofotometrede absorbans değerleri ölçüldü. Ölçülen her bir örnek için protein miktarı, hazırlanan ölçü eğrisine göre ng/ µL cinsinden hesaplandı.

3.4.6.3. Western Blot Yöntemi ile Protein Tayini

İzole edilen proteinlerde kardiyak Troponin I ve Troponin T proteinlerinin tayinleri western blot yöntemi ile gerçekleştirildi.

Western blot yöntemi; jelde ayırımı sağlanmış proteinlerin membrana emdirilerek ilgili proteinin işaretlenmiş antikor yardımıyla membran üzerine kantitatif ya da yarı kantitatif olarak belirlenmesi esasına dayanır.

Kullanılan Çözeltiler:

Yürütme Tamponu (5X): 15 g Tris (son konsantrasyon 0,025 M olacak şekilde), 72 g glisin (son konsantrasyon 0,192 M olacak şekilde) tartıldı ve 800 mL deiyonize su içerisinde çözündürüldü. Bu işlemin ardından 5 g SDS eklendi ve pH 8,3 olacak şekilde ayarlandıktan sonra hazırlanan çözeltiye son hacmi 1000 mL olacak şekilde deiyonize su eklendi.

Yürütme Tamponu (1X): Yürütme tamponu (5X)'dan 1:5 oranında deiyonize su ile seyreltilerek hazırlandı.

Transfer Tamponu (10X): 60 g tris, 144 g glisin tartıldı ve 800 mL deiyonize su içerisinde çözündürüldü. Çözündürülme işleminden ardından pH 8,3 olacak şekilde ayarlandı ve hazırlanan çözeltiye son hacmi 1000 mL olacak şekilde deiyonize su eklendi. Hazırlanan transfer tamponu (10X)'ndan 100 mL alınarak deiyonize su ile son hacmi 1000 mL'ye tamamlandı. Bu şekilde elde edilen 1X transfer tamponundan 800 mL alınarak üzerine 200 mL HPLC kalitede metanol eklenerek deney aşamasında kullanıldı.

Tris-bufferd saline (TBS) Tamponu (10X): 24 g tris baz, 88 g sodyum klorür tartıldı ve 900 mL deiyonize su içerisinde çözündürüldü. 6M HCl ile pH 7,6 olacak şekilde ayarlandı ve hazırlanan çözeltiye son hacim 1000 mL olacak şekilde deiyonoize su eklendi.

TBS (1X): TBS (10X)'den 100 mL alınarak deiyonize su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

%0,1'lik TBS-T Tamponu: TBS (10X) tamponundan 100 mL alıp 900 mL ile deiyonize su ile hazırlanan TBS (1X) tamponu içerisine 1 mL Tween-20 eklendi.

%5'lik Yağsız Süt Tozu Çözeltisi: 5 g yağsız süt tozu tartıldı ve 100 mL %0,1'lik TBS-T tamponu içerisinde çözündürüldü.

Birincil Antikor Çözeltileri: Troponin I-C birincil antikor (St John's Laboratory, STJ96727-100) 1:500 oranında %5'lik yağsız süt tozu kullanılarak hazırlanan 5 mL %0,1'lik TBS-T tamponu içerisinde seyreltilti. Troponin T-C birincil antikor da (St John's Laboratory, STJ96114-100) aynı şekilde 1:500 oranında %5'lik yağsız süt tozu kullanılarak hazırlanan 5 mL %0,1'lik TBS-T tamponu içerisinde seyreltilti.

İkincil Antikor Çözeltisi: İkincil antikor olarak kullanılan IgG anti-rabbit antikoru (Abcam, ab6721) ve IgG anti-mouse antikoru (Abcam, ab6728) 1:10000 oranında %5'lik yağsız süt tozu kullanılarak hazırlanan 5 mL %0,1'lik TBS-T tamponu içerisinde seyreltilti.

Testin Yapılışı:

1. Örneklerin Bradford yöntemi ile protein miktar tayini yapıldıktan sonra tüm örneklerin protein miktarı 40 µg olacak şekilde hesaplandı ve uygun hacimlerde alınarak PCR tüplerine aktarıldı.
2. Jele yükleme yapılanaya kadar tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.
3. PCR tüplerine alınan protein örneklerine 10 µL Laemeli tamponu (yükleme tamponu) eklendi ve tüplerdeki son hacim 20 µL olacak şekilde deiyonize su ilave edildi.
4. Protein örneklerine vorteks ve ardından spin işlemi uygulandı.
5. Örnekler blok ısıtıcıda 95°C'de 5 dk. denatüre edildikten sonra tekrardan buz üzerine alındı ve spin işlemi uygulandı.
6. Proteinlerin yürütülmesi için SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) poliakrilamid ayırma ve SDS yükleme jelleri TEMED ve APS en son eklenecek şekilde hazırlandı ve 10x10 cm'lik jel kalıplarına (Bio-Rad, Mini-PROTEAN®Tetra Cell) döküldü.
7. Jellerin hazırlanması aşamasında TEMED ve APS hariç diğer jel bileşenleri 2 tane ayrı 15 ml'lik falkon tüplere eklendi ve karışması sağlandı. TEMED ve APS akrilamid ve bis-akrilamid arasında polimerizasyonu başlattığı için ayırma jeli solüsyonu içerisine en son eklendi ve jel kalıbının ¾'lük kısmına hızlı bir şekilde pastör pipet yardımıyla döküldü. Bu işlemin ardından oluşan hava kabarcıklarının engellenmesi için bir miktar deiyonize su ilave edildi. 25 dk. jelin kuruması beklendi ve kurutma kâğıdı ile üst kısma ilave edilen su geri alındı. Daha sonra yürütme jeli de

TEMED ve APS en son eklenecek şekilde hazırlanarak jel kalıbının üst bölümünün kalan ¼'lük kısmına döküldü.

8. Yürütme jelinin dökülmesinin ardından taraklar yerleştirilerek protein içerikli karışımın ekleneceği kuyucukların oluşması sağlandı.

9. Yürütme jeli donduktan sonra taraklar dikkatli bir şekilde çıkartıldı ve soğuk 1X yürütme tamponu dikey elektroforez tankı içerisine eklendi. Proteinlerin zarar görmemesi için tankın içerisine ayrıca buz kütlesi de yerleştirildi.

10. Jelde yer alan ilk kuyucuğa 7 µL ladder (Thermo Scientific™ Pageregular Plus Prestained Protein Ladder, Katalog no: 26619) diğer kuyucuklara aynı miktarlarda protein içeriğine sahip örneklerden 20 µL karışım SDS poliakrilamid jele yüklendi.

11. Jele yüklenen protein içerikli karışımlar 300 mA sabit tutularak 30 dk. 70 V; 45 dk. 100 V; 45 dk. 125 V olacak şekilde yürütüldü.

12. Poliviniliden diflorür (PVDF) membran jelin boyutuna uygun olacak şekilde kesildi ve 10 dk. boyunca %100 metanol ile çalkalayıcıda muamele edildi.

13. Yürütmesi tamamlanan jel dikkatli bir şekilde kalıptan çıkarıldı ve membran ile 15 dk. boyunca soğuk 1X transfer tamponu ile muamele edildi.

14. Membran ve jel sandviç tekniğiyle western blot transfer aparatına yerleştirildi. Bu işlem için 2 adet sünger ve 2 adet kalın transfer kâğıdı 1X transfer tamponu ile tamamının ıslatılması sağlandı. Sırasıyla sünger altta kalacak şekilde üzerine transfer tamponu ile ıslanmış kalın transfer kâğıdı yerleştirilir. Sünger ve transfer kâğıdının üzerine jel ve jelin üzerine de 0,45 µm PVDF membran düzgün bir şekilde koyulur. Üzerinde hava kabarcığı kalmaması için silindirik bir malzeme ile üzerinden geçilir. Daha sonra sırasıyla diğer kalın transfer kâğıdı ve sünger koyulur. Bu işlemlerin ardından sıkıştırma aparatına jel tarafı siyah tarafa, membran tarafı kırmızı tarafa gelecek şekilde yerleştirilir.

15. Tankın içine 1X transfer tamponu ve buz kütlesi yerleştirilerek 70 V ve 350 mA'de 120 dk. transfer işlemi gerçekleştirildi.

16. Transfer işleminin ardından membran küçük kap içerisinde 5 ml %5'lik yağsız süt tozu çözeltisi (%0,1'lik TBST içinde) ile 1,5 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda blokladı.

17. Bloklama işleminin ardından 5 mL %5'lik yağsız süt tozu döküldü ve membran 2 kez 5'şer dk. 2 kez 10'ar dk. %0,1'lik TBST ile çalkalayıcıda yıkandı. Her yıkama sırasında bir öncesi TBST tamponu döküldü.

18. Membran, bloklama tamponu ile (TBST) ilgilenilen proteinlere özgü birincil antikor uygun oranda seyreltilerek oluşturulan 5 mL çözelti ile 12 saat +4°C’de gece boyunca çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

19. Membran, ertesi sabah 1 saat de oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Bu işlemin ardından birincil antikor çözeltisi atılmadı ve tekrar kullanım için ayrı bir 15 mL’lik falkon tüpe alınarak -20°C’de saklandı.

20. Membran art arda 2 kez 5’şer dk. 2 kez 10’ar dk. %0,1’lik TBST ile çalkalayıcıda yıkandı. Her yıkama sırasında bir öncesi TBST tamponu döküldü.

21. Membran, bloklama tamponu ile (TBST) ilgilenilen proteinlere özgü ikincil antikor uygun oranda seyreltilerek oluşturulan 5 mL çözelti ile oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

22. İnkübasyon sonrasında membran art arda 2 kez 5’şer dk. 2 kez 10’ar dk.%0,1’lik TBST ile çalkalayıcıda yıkandı. Her yıkama sırasında bir öncesi TBST tamponu döküldü.

23. Membran, görüntüleme reaktiflerinin (SuperSignal West Femto Luminol/Enhancer Solution ve SuperSignal West Femto Stable Peroxide Solution) 1:1 oranında karıştırılmasıyla elde edilen çalışma solüsyonu ile 2 dk. boyunca muamele edildi ve ardından membran iki asetat arasında konularak görüntüleme cihazında görüntülendi.

24. Deneyle, her konsantrasyon için en az 3 tekrar ve aynı koşullarda farklı 2 günde çalışmak üzere toplam en az 6 tekrar olacak şekilde yapıldı.

Değerlendirme:

Elde edilen bantlar, her bir protein için ‘stripping işlemi’ yapıldıktan sonra referans olarak kullanılan β -aktin proteinine göre kıyaslama yapılarak değerlendirildi.

Stripping İşlemi

Membranın kendisine bağlanmış olan birincil ve ikincil antikorlardan temizlenip membrana tekrardan antikor bağlanması işlemidir.

Testin Yapılışı:

1. Membran 2 kez 5’şer dk. 2 kez 10’ar dk. %0,1’lik TBST ile çalkalayıcıda yıkandı. Her yıkama sırasında bir önceki TBST tamponu döküldü.

2. Membran üzerine ticari olarak temin edilen stripping çözeltisinden (Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer) 20 mL eklenerek 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

3. İnkübasyonun ardından membran 2 kez 5'şer dk. 2 kez 10'ar dk. %0,1'lik TBST ile çalkalayıcıda yıkandı. Her yıkama sırasında bir önceki TBST tamponu döküldü.

4. Membran küçük kap içerisinde 5 mL %5'lik yağsız süt tozu çözeltisi (%0,1'lik TBST içinde) ile 1,5 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda muamele edilerek bloklama işlemi gerçekleştirildi.

5. Membran kurumaması için bir miktar TBST tampon çözeltisi içerisinde gece boyunca +4°C'de bekletildi.

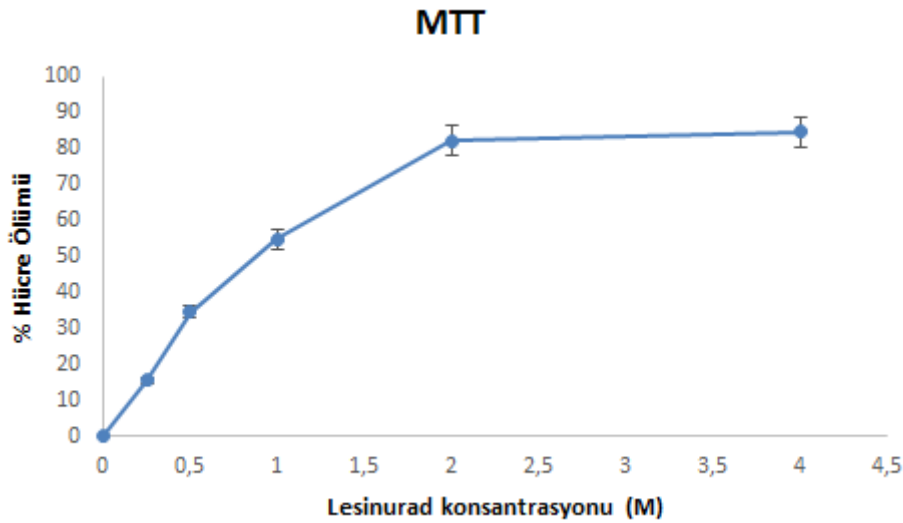
3.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

Elde edilen verileri istatistiksel yönden değerlendirmek amacıyla GraphPad Prism 6 programı ile tek yönlü varyans (ANOVA) analizi (Post Hoc-Tukey) uygulandı. $p < 0,003$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Tez çalışmasında ürikozürük ilaç grubuna ait lesinuradın sıçan kardiyomiyoplast H9c2 hücre dizisi üzerinde kardiyotoksik etki potansiyelinin değerlendirilebilmesi için sitotoksisite (MTT testi), apoptoz (Anneksin V-FITC/PI apoptoz testi ile), ROS düzeyleri (H₂DCFDA), GSH düzeyi (ELISA kit ile), kardiyak troponin I ve kardiyak troponin T düzeyini tespit testleri gerçekleştirildi.

Lesinuradın H9c2 hücre dizisi üzerine sitotoksik etki potansiyeli 0,25-4 M konsantrasyon aralığında 24 saat süreli maruziyeti takiben MTT testi ile değerlendirildi. IC₅₀ değeri 0,845 M olarak tespit edildi (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: H9c2 hücre dizisine 0,25-4 M konsantrasyon aralığında lesinurad maruziyetinin MTT sonucu

Lesinuradın H9c2 hücre dizisi üzerine IC₂₀ değeri 0,276 M olarak belirlenmiş olup apoptotik etki potansiyeli 0,0625-0,5 M konsantrasyon aralığında 24 saat süreli maruziyeti takiben Anneksin V-FITC/PI yöntemi ile değerlendirildi (Tablo 4-1; Şekil 4-2). En yüksek maruziyette gözlemlenen ölümlerde toplam hücreye oranla erken ve geç

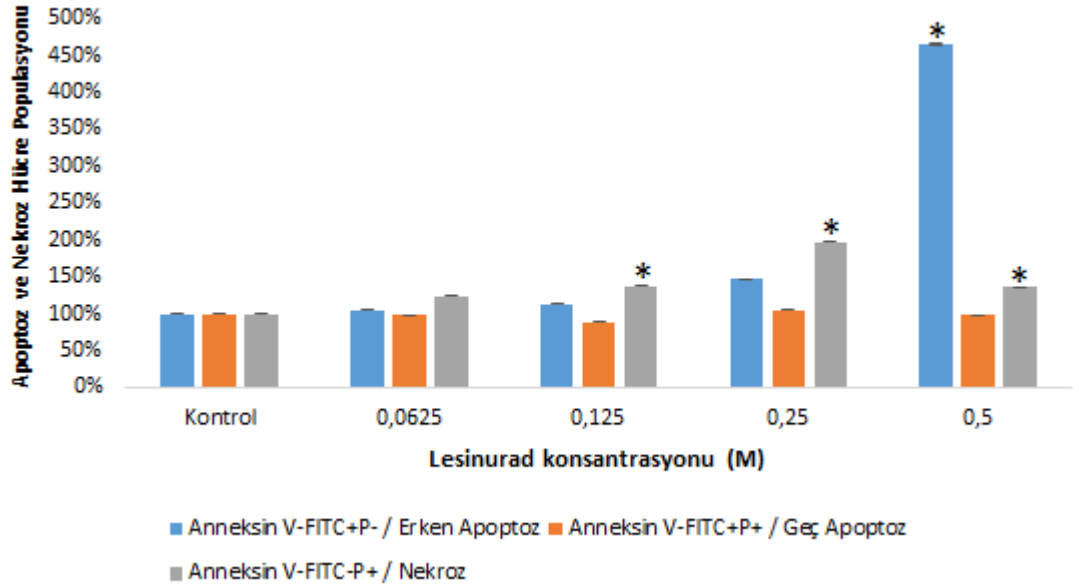
apoptoz görülme yüzdeleri sırasıyla maksimum %7,93 ve 5,79 olarak rapor edildi. Çalışılan maruziyet konsantrasyonlarında nekrozun tetiklendiği tespit edildi (Şekil 4-2).

Tablo 4-1: Lesinuradın H9c2 hücre dizisi üzerine 0,0625-0,5 M konsantrasyon aralığında Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkileri

Konsantrasyon (M)	Hücre Ölüm Oranı (%)	
	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz
Kontrol	1,71	5,88
0,0625	1,78	5,73
0,125	1,93	5,19
0,25	2,5	6,2
0,5	7,93	5,79

Lesinuradın H9c2 hücrelerine 24 saat süreli maruziyeti takiben erken apoptoz ile ilişkisinin değerlendirmesinde 0,0625-0,5 M konsantrasyon aralığında kontrole kıyasla sırasıyla 1,04; 1,13; 1,46 ve 4,65 kat artış tespit edildi. Elde edilen verilere göre lesinuradın 0,5 M konsantrasyondaki maruziyeti ile erken apoptozun indüksiyonu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulundu ($p<0,003$) (Şekil 4-2). Aynı şekilde lesinuradın H9c2 hücrelerine 24 saat süreli maruziyeti takiben geç apoptoz ile ilişkisinin değerlendirmesinde kontrole kıyasla 0,0625 ve 0,125 M konsantrasyonlarında sırasıyla 1,02 ve 1,13 kat azalma; 0,25 M konsantrasyonunda 1,05 kat artma ve 0,5 M konsantrasyonda 0,98 kat azalma tespit edildi. Elde edilen verilere göre geç apoptoz değerlendirmesinde kontrol ve maruziyet konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p<0,003$) (Şekil 4-2). Lesinuradın H9c2 hücrelerine 24 saat süreli maruziyeti takiben nekroz ile ilişkisinin değerlendirmesinde kontrole kıyasla 0,0625-0,5 M konsantrasyon aralığında sırasıyla 1,23; 1,37; 1,96 ve 1,35 kat artma tespit edildi. Elde edilen verilere göre 0,125-0,5 M konsantrasyon maruziyetinin nekroz üzerine etkisi anlamlı bulundu ($p<0,003$) (Şekil 4-2).

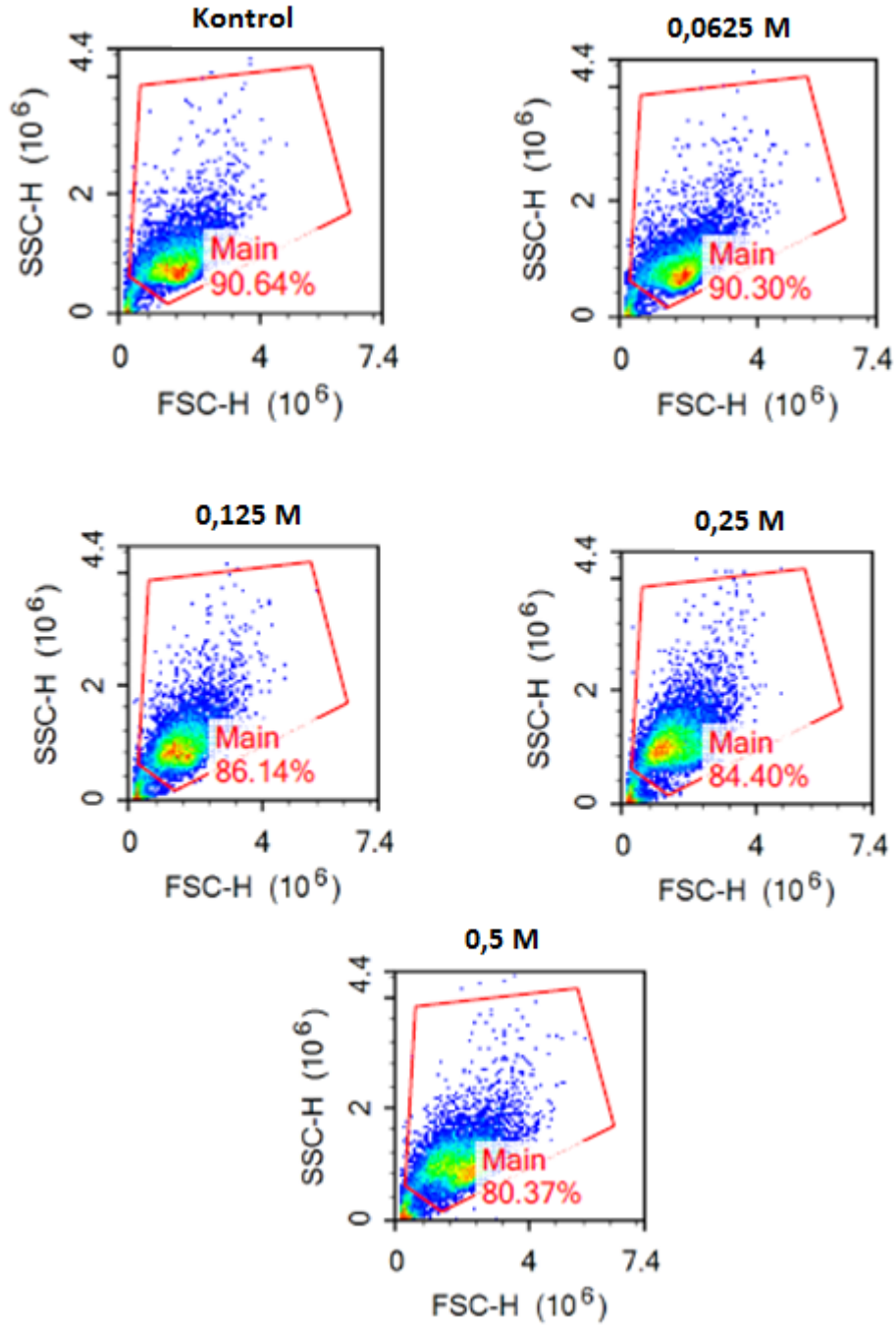
Anneksin V-FITC/PI Analizi



* $p < 0,003$ istatistiksel anlamlılık düzeyi

Şekil 4-2: H9c2 hücre dizisine 0,0625-0,5 M konsantrasyon aralığında lesinurad maruziyetinin erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz üzerine etkisi

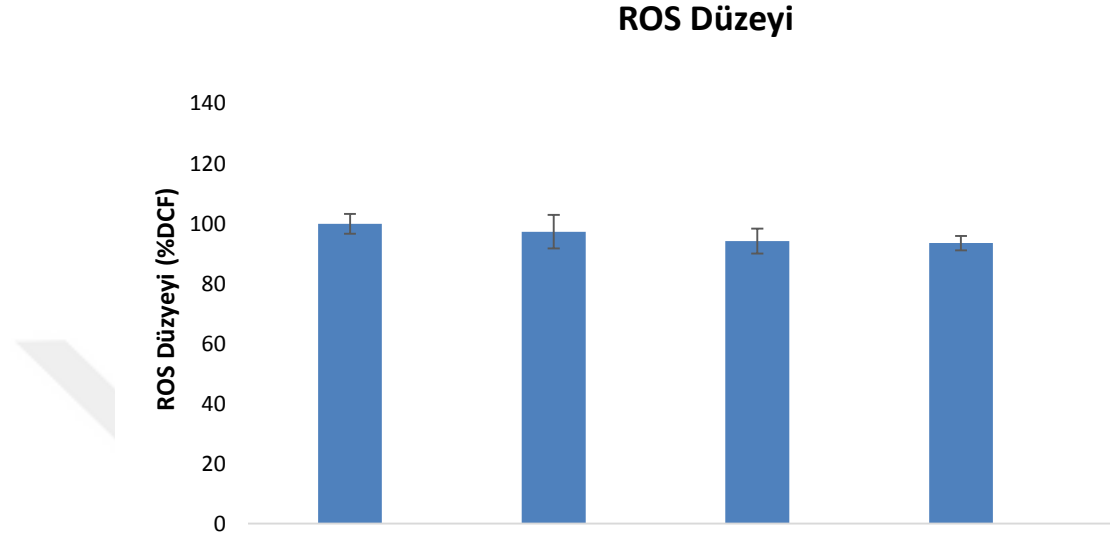
Benzer şekilde, lesinuradın H9c2 hücre dizisi üzerine 0,0625-0,5 M konsantrasyon aralığında 24 saat süreli maruziyeti takiben durumundaki FSC ve SSC dedektörleri yardımı ile hücre büyüklüğünde (FSC) 0,0625-0,25 M konsantrasyon aralığında kontrole kıyasla sırasıyla 1,04; 0,05; 1,08 kat azalma ve 0,5 M konsantrasyonda 1,21 kat artma; granülaritede (SSC) sırasıyla 1,14; 1,22; 1,38 ve 1,32 kat artma tespit edildi (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: FSC ve SSC dedektörleri yardımıyla H9c2 hücre süspansiyonundaki hücre büyüklüğü ve granülaritesinin tespiti

Lesinuradın H9c2 hücre dizisi üzerine 0,0625-0,5 M konsantrasyon aralığında 24 saat süreli maruziyeti takiben ROS oluşturma potansiyeli flowsitometrik yöntem ile değerlendirildi. ROS düzeylerinde 0,0625-0,5 M maruziyet konsantrasyonlarında kontrole kıyasla sırasıyla 1,02; 1,06; 1,07 ve 1,01 kat azalma tespit edildi. ROS

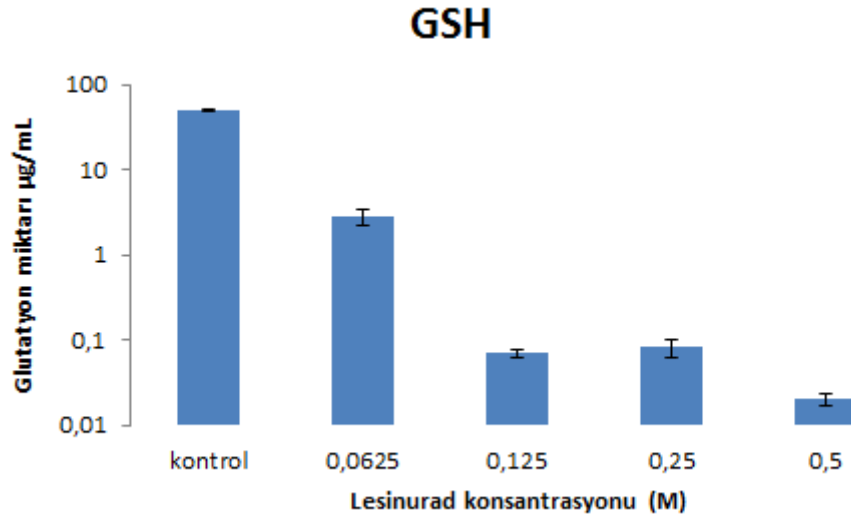
düzeylerinde saptanan azalmalar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p<0,003$) (Şekil 4-4).



* $p < 0,003$ istatistiksel anlamlılık düzeyi

Şekil 4-4: Lesinuradın H9c2 hücre dizisi üzerine oksidatif hasar oluşturma potansiyelinin flowsitometrik yöntem ile değerlendirilmesi

Lesinuradın H9c2 hücre dizisi üzerine 0,0625-0,5 M konsantrasyon aralığında 24 saat süreli maruziyeti takiben GSH miktarı ELISA yöntemi ile değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre lesinurad maruziyeti sonrasında GSH düzeylerinde doza bağlı anlamlı azalma tespit edildi (Şekil 4-7) ($p<0,003$). GSH düzeylerinin 0,0625-0,5 M konsantrasyon aralığında kontrole kıyasla sırasıyla %94,05; 99,87; 99,83 ve 99,96 azaldığı saptandı ($p<0,003$).



* $p < 0,003$ istatistiksel anlamlılık düzeyi

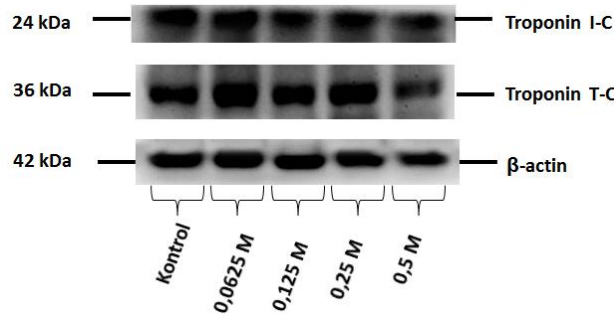
Şekil 4-5: H9c2 hücre dizisine 0,0625-0,5 M konsantrasyon aralığında lesinurad maruziyetinin glutatyon miktarı üzerine etkisi

Lesinuradın H9c2 hücre dizisi üzerine 0,0625-0,5 M konsantrasyon aralığında 24 saat süreli maruziyeti takiben kardiyak troponin I ve kardiyak troponin T düzeyleri Western Blot yöntemi ile değerlendirildi (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: H9c2 hücre dizisinde 0,0625-0,5 M konsantrasyon aralığında lesinurad maruziyetinin relative Troponin I ve T düzeyleri (kontrolün %'si) üzerine etkisi

Konsantrasyon (M)	Troponin I	Troponin T
Kontrol	1±0,22	1±0,074
0,0625	1,3±0,35	1,2±0,11
0,125	0,98±0,21	1,35±0,17
0,25	1,086±0,23	1,5±0,17
0,5	0,73±0,12	0,87±0,14

Troponin I ve troponin T düzeylerinin 0,5 M maruziyet konsantrasyonlarında kontrole kıyasla sırasıyla 1,39 kat ve 1,14 kat azaldığı tespit edildi. Troponin T düzeylerinin 0,0625-0,25 M maruziyet konsantrasyonlarında kontrole kıyasla sırasıyla 1,2; 1,3 ve 1,5 kat artma saptandı. Troponin I düzeylerinde 0,0625 M maruziyet konsantrasyonunda kontrole kıyasla 1,3 kat artma; 0,125 M konsantrasyonunda 1,02 kat azalma ve 0,25 M maruziyet konsantrasyonunda ise kontrole kıyasla 1,03 kat artma tespit edildi. Troponin I ve troponin T düzeylerinin kontrole kıyasla artması ve azalması istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p<0,003$) (Şekil 4-6) (Tablo 4-2).



* $p<0,003$ istatistiksel anlamlılık düzeyi

Şekil 4-6: Troponin I-C ve Troponin T-C düzeylerinin Western Blot tekniği ile görüntüsü

5. TARTIŞMA

Gut hastalığı, sık görülen romatizmal hastalıklardan biridir. Hastalığın prevalansı; komorbidite insidansının artması, yaşam tarzı faktörleri, yaş, cinsiyet ve ürat düşürücü tedavinin yetersiz kalması gibi etkenlere bağlı olarak artmaktadır (Claus ve Saseen, 2018). Gut hastalığı serum ürik asit seviyesinin artmasına bağlı olarak MSÜ kristallerinin eklem içinde ve çevre bağ dokuda birikmesi sonucu ortaya çıkan akut artrit atakları ile karakterizedir. Hiperürisemi ve tekrarlayan akut artrit atakları tedavi edilmediği zaman MSÜ kristallerinin birikmesine bağlı olarak kronik tofuslü gut tablosu ortaya çıkmaktadır (Ning ve Keenan, 2010; Richette ve Bardin, 2010; Hainer ve ark., 2014).

Akut gut ataklarının en hızlı şekilde ortadan kaldırılması, atak, ağrı ve ateşin tekrarlanmasının önüne geçilmesi, MSÜ kristallerinin dokularda birikiminin önlenmesi ve hiperüriseminin kontrol altına alınması hastalığın tedavisindeki temel amaçtır (Demir 2011). Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol ve febüksostat), tekrarlayan gut ataklarının önlenmesinde kullanılan ilk tedavi seçeneğidir. İkinci tedavi seçeneği olarak ürikozürikler kullanılmaktadır. Ürikozürikler, bir ksantin oksidaz inhibitörü ile kombinasyon tedavi şeklinde uygulanır (Claus ve Saseen, 2018).

Lesinurad, 2015 yılında FDA tarafından kabul edilen kronik gut hastalarında hiperürisemi tedavisi için kullanılan bir ürikozüriktir. Lesinurad ile tedavi sonrasında kardiyotoksik advers etkilerle karşılaşıldığına dair klinik çalışmalar bulunmaktadır (Bardin ve ark. 2017; Dalbeth ve ark. 2017; Saag ve ark. 2017). Fakat lesinuradın kalp üzerine olan toksik etkileri ve gözlemlenen kardiyovasküler advers etkilerin mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamıştır.

Faz III çalışması kapsamında ABD (Care in Inadequate Responders, CLEAR-1) ve Avrupa, Kuzey Amerika, Güney Afrika, Avustralya ve Yeni Zelanda (CLEAR-2) gruplarının katılımıyla lesinuradın plasebo, allopürinol ve febüksostat ile kombinasyonlarının güvenlik verileri değerlendirilmiş ve CLEAR-1 ve CLEAR-2’de sırasıyla ortalama %4,25 ve 3,45 oranında kardiyovasküler ilişkili advers etki rapor edilmiştir (Bardin ve ark. 2017; Saag ve ark. 2017). Bir diğer Faz III çalışmasında, lesinuradın febüksostat ile kombinasyonuna ait güvenlik verilerine göre, lesinuradın çalışılan farklı iki dozunda (200 mg lesinurad + febüksostat; 400 mg + febüksostat)

kardiyovasküler ilişkili advers etki görülme oranları %5,7 ve 3,7 olarak tespit edilmiştir (Dalbeth ve ark. 2017).

FDA lesinuradın kullanımı ile ilgili majör kardiyovasküler advers etkilerin gözlemlendiğini fakat altında yatan sebepler hakkında nedensel bir ilişki kurulmadığını rapor etmiştir (FDA, 2016). Yapılan literatür incelemesi sonucunda lesinurad ile ilgili verilerin azlığı sebebi ile lesinurad ile ilgili yapılacak araştırmaların konudaki eksikliği gidermede yararlı olacağına inanılmaktadır. Bu amaçla; ürikozürük ilaç grubuna ait olan lesinuradın *in vitro* koşullarda hücre kültürü ortamında kalp hücre dizisi üzerine toksik etki potansiyeli ve toksisiteye sebep olan mekanizmalar araştırılmıştır. Yapılan tez çalışmasında 24 saat süre ile lesinurada maruz bırakılan H9c2 kardiyomyoblast hücrelerinde sitotoksik etki potansiyeli olarak IC₅₀ değeri 0,845 M ve IC₂₀ değeri 0,276 M olarak tespit edildi.

Hücre ölümü, bilindiğı üzere, genel olarak biyokimyasal ve morfolojik kriterlere göre sınıflandırılır. Karışık ve farklı özelliklere rağmen hücre ölümü apoptoz, nekroz ve otofaji olmak üzere üç farklı yolak türü üzerinden tanımlanabilir (Franco ve Cidlowski, 2012). Biyolojik süreçte yer alan homeostatik bir mekanizma olan apoptoz sadece dokulardaki hücrelerin dönüşümünde değil aynı zamanda normal gelişim ve yaşlanma sırasında da kritik bir rol oynamaktadır. Apoptozun deregülasyonu ya sebep olarak ya da kanser, otoimmün ve nörodejeneratif bozukluklar gibi patolojilerin bir sonucu olarak oluşabilir (Fadeel ve Orrenius, 2005). Kardiyomyositlerde görülen apoptoz miyokardial enfarktüs, konjestif kalp yetmezliğı, transplant reddi gibi çeşitli kliniko-patolojik durumlarda oluşmaktadır (Giil ve ark. 2002; Perik ve ark. 2005). Kardiyovasküler temelli hastaneye yatışların önemli bir sebebi olan konjestif kalp yetmezliğinde, apoptoz önemli bir rol oynayabilir. Kalp yetmezliğı primer kardiyopati, miyokardial enfarktüs, hipertansiyon ve kalp kapak hastalığı gibi bozukluklar sonucunda ortaya çıkabilen heterojen bir sendromdur (Fool ve ark. 2005). Nekroz da iskemide/reperfüzyonda miyosit kaybına katkı sağlayan bir faktör olabilir (Giil ve ark. 2002). Olivetti ve ark. (1997) yaptıkları iskemik ya da idipatik kardiyopatili hastalardan eksplante edilmiş kalp araştırmasında, konjestif kalp yetmezliğine eşlik eden durumun apoptoz ve nekroz ile ilişkili olabileceğini rapor etmektedir. Mishra ve ark. (2014) *in vivo* ve H9c2 hücrelerinde *in vitro* yaptığı araştırmada tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan rosiglitazonun doza bağılı olarak apoptoz aracılığı ile kardiyotoksisiteye sebep

olduğunu, apoptozun arttığı ve erken apoptozdan nekroza doğru bir geçiş olduğunu bildirmiştir. Tez çalışmamızdan elde edilen verilere göre, lesinuradın 0,5 M konsantrasyondaki maruziyetinde kontrole kıyasla erken apoptozu 4,65 kat fazla farkla indüklediği tespit edildi. Fakat, 0,0625-0,25 M konsantrasyon aralığındaki maruziyetlerin kontrol ile kıyaslamasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p<0,003$). Ayrıca, geç apoptoz değerlendirmesinde lesinuradın 0,0625 ve 0,125 M maruziyet konsantrasyonlarında kontrole kıyasla 1,02 ve 1,13 kat azalma; 0,25 M konsantrasyonda 1,05 kat artma ve 0,5 M konsantrasyonda 0,98 kat azalma göstermesi istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p<0,003$). Lesinuradın 0,5 M konsantrasyon maruziyetinde kontrole göre erken apoptozu indüklemesine, aynı konsantrasyonda geç apoptoz açısından anlamlı fark bulunmadığından dolayı lesinuradın 0,0625-5 M konsantrasyon arasında apoptozu indüklediği sonucuna varılmıştır.

Kardiyovasküler hastalıklar ve oksidatif hasar arasındaki ilişki, çok sayıda *in vivo* ve klinik araştırmalar ile tespit edilmiştir. Oksidatif hasar miyokardial hipertropi, kontraktıl işlev bozukluğu, kardiyak fibroz gelişimi ve endotel disfonksiyonu gibi bozukluklara sebep olmaktadır (Lisciani ve ark. 1978; Dhalla ve ark. 1996; Ghyasi ve ark. 2012; Menazza ve ark. 2012). Kokain, amfetamin gibi suistimal edilen maddeler, doksorubisin ve siklofosfamid gibi ilaç kaynaklı kardiyotoksistelerde oksidatif hasar önemli rol oynar (Costa ve ark. 2013).

GSH selüler redoks potansiyelinin ve hücre ölümü yollarının aktivitesinin önemli bir göstergesidir. GSH tükenmesi genellikle reaktif oksijen ve nitrojen türevlerinin meydana getirdiği oksidatif hasarın bir belirteci olarak kabul edilir (Franco ve Cidlowski 2012). Arbo ve ark. (2014) kardiyotoksistelerde araştırmasında piperazin türevi 1-(3,4-metilendioksibenzil) piperazin GSH seviyelerinde anlamlı düzeyde azalma tespit etmiş, fakat, bu azalmada reaktif oksijen türevlerinin etken olmadığını rapor etmişlerdir. Aynı zamanda çalışmada GSH azalmasının glutatyon reduktaz (GR) enzim aktivitesi ile ilgili olduğu hipotezini kurarak ilgili enzim aktivitesini değerlendirmiş fakat anlamlı bir değişiklik gözlemlememişlerdir. Erken apoptotik ve sekonder nekroza giden hücreler hücre ölümünde anlamlı bulunmuştur.

Tez çalışmamızda, lesinuradın 0,0625-0,5 M konsantrasyon aralığında GSH seviyelerinde kontrole kıyasla doza bağlı sırasıyla %94,05; 99,87; 99,83 ve 99,96 oranında anlamlı azalma tespit edilmekle birlikte reaktif oksijen türevlerinde aynı

konsantrasyon aralığında kontrole kıyasla sırasıyla 1,02; 1,06; 1,07 ve 1,06 kat azalma anlamlı bulunmamıştır. Fakat, GSH seviyelerinin hemen hemen tamamına yakınının tükenmesi ROS'nin oluşmaması için antioksidan mekanizmanın göstergesi olabilir. Ayrıca, GSH seviyelerindeki azalmanın sebebi sitozolde meydana gelen ve β -glutamilsistein ligaz ve GSH sentaz enzimlerinin katalizlediği GSH biyosentezinin inhibisyonu olabilir (Gao ve ark. 2010; Mari ve ark. 2013). GSH tükenmesinin bir başka sebebi de; aktif tiyol gruplarının kimyasal modifikasyonuna duyarlı olduğu bilinen GR aktivitesinin değişebilir olmasıdır (Remião ve ark. 2000).

cTnT ve cTnI klinik ve pre-klinik çalışmalarda potansiyel ilaca bağlı miyokardiyal hasarı izlemek için kullanılan hassasiyeti ve özgüllüğü yüksek olan önemli belirteçlerdir. Klinik çalışmalarda cTnT ve cTnI serum konsantrasyonlarının anormal düzeyde yüksek olması ile akut mikokard enfarktüsü görülme riskinin 4-5 kat artırdığı rapor edilmiştir. Bundan dolayı kardiyak troponinlerin advers etkiler için yüksek risk altındaki hastaların sınıflandırılması ve akut koroner sendromu (ACS) hastalarının seçimi için oldukça yararlı olduğu ileri sürülmüştür (Panteghini ve ark. 1999; Adamcova ve ark. 2005). Troponinlerin biyolojik yarı ömrü nispeten kısa olmasına rağmen (cTnT: 120 dk., cTnI: 90 dk.), tanı süresi troponinlerin intraselüler bölgede bulunmaları sebebiyle birkaç saat ile 10-14 gün arasında değişebilmektedir (Adamcova ve ark. 2005). Lesinuradın 0,0625-0,5 M konsantrasyonlarına 24 saat maruz bırakılmış H9c2 hücre dizisinde troponin I ve troponin T düzeyleri Western Blot yöntemi ile değerlendirildi. Troponin I ve troponin T düzeylerinde 0,5 M maruziyet konsantrasyonun kontrole kıyasla sırasıyla 1,39 ve 1,14 kat azalma saptandı. Ayrıca, troponin T düzeylerinde 0,0625-0,25 M konsantrasyon aralığında kontrole kıyasla 1,2-1,5 kat artış tespit edildi. Troponin I düzeylerinde ise 0,0625 M ve 0,25 M konsantrasyonlarında sırasıyla 1,3 ve 1,08 kat artış gözlenirken; 0,125 M maruziyet konsantrasyonunda kontrole kıyasla 1,02 kat azalma tespit edildi. Elde edilen bu veriler değerlendirildiğinde kontrol ve maruziyet konsantrasyonları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim tespit edilmedi ($p < 0,003$). Böylece, kalp hücrelerinin ölüm sebebinin troponin I ve troponin T düzeylerini etkileyen bir mekanizma üzerinden olmadığı sonucuna varılmıştır.

Herman ve ark. (1998) doksorubisine bağlı miyokardiyal hasarı değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmada serum cTnT seviyelerinin yüksek ve immunhistokimyasal

inceleme sonucunda da miyositlerde minimal düzeyde değişiklik tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada, Sumi ve ark. (2013) H9c2 miyoblast hücre dizisi üzerinde arseniğin kardiyak farklılaşmasına etkisinin araştırılmasında cTnT protein ekspresyonunun azaldığını rapor etmişlerdir.

Kardiyovasküler yan etkiler akut ya da kronik ilaç tedavisinden sonra ortaya çıkarak miyokardın mekanik işlevini etkileyebilir. Ayrıca, morfolojik hasar ve/veya hücresel ya da kalbin doku bileşenlerinin kaybı gibi yapısal ve damar sistemi ile ilgili fonksiyon değişikliklerine sebep olabilir (Cross ve ark. 2015).

Sonuç olarak; tekrarlayan gut ataklarının önlenmesinde kullanılan lesinuradın kalp hücreleri üzerine hücre ölümünde apoptoz indüksiyonu etkili değildir. Her ne kadar ROS düzeyine etkili olsa da GSH düzeylerinde azalma oksijen radikalleri dışında serbest radikal oluşumuna sebep olabilir. Kalp kasına özgü ve sitozolik havuzda bulunan, aktin ve miyozin proteinlerinin uyarılmasını sağlayarak kalbin kasılmasını sağlayan troponin I ve T düzeylerinde değişim tespit edilmemiştir. Lesinurad ksantin oksidaz inhibitörleri (allopurinol veya febüksostat) ile kombinasyon tedavi şeklinde uygulandığı için lesinuradın kardiyotoksik etkisinde kombinasyon ilaç şeklinin ve kardiyovasküler sistemde miyokardın mekanik işlevinin etkilenmesi, morfolojik hasar ve damar sistemi ile ilgili fonksiyon değişikliği gibi sebeplerin etkili olabileceği hususunda ileri araştırmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

Abdel-Rahman, E., Mahmoud, A. M., Khalifa, A. M., & Ali, S. S. (2016). Physiological and pathophysiological reactive oxygen species as probed by EPR spectroscopy: The underutilized research window on muscle ageing. *The Journal of Physiology*, 594(16), 4591-4613.

Adamcova, M., Šterba, M., Šimuněk, T., Potacova, A., Popelova, O., Mazurova, Y., & Geršl, V. (2005). Troponin as a marker of myocardial damage in drug-induced cardiotoxicity. *Expert Opinion on Drug Safety*, 4(3), 457-472.

Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), 1213-1221.

Akşit, H., & Bildik, A. (2008). Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(1), 55-63.

Aktaş, M., Değirmenci, U., Ercan, S. K., Tamer, L., & Atik, U. (2005). Redükte glutasyon ölçümünde HPLC ve spektrofotometrik yöntemlerin karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 3(3), 95-99.

Ameziane-El-Hassani, R., & Dupuy, C. (2013). Detection of intracellular reactive oxygen species (CM-H₂DCFDA). *Bio-protocol*, 3(1), e313.

Arbo, M. D., Silva, R., Barbosa, D. J., da Silva, D. D., Rossato, L. G., de Lourdes Bastos, M., & Carmo, H. (2014). Piperazine designer drugs induce toxicity in cardiomyoblast h9c2 cells through mitochondrial impairment. *Toxicology Letters*, 229(1), 178-189.

Aslantürk, Ö. S. (2018). In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. (Vol. 2, p. 64). InTech.

Bardin, T., Keenan, R. T., Khanna, P. P., Kopicko, J., Fung, M., Bhakta, N., ... & So, A. (2017). Lesinurad in combination with allopurinol: a randomised, double-blind, placebo-controlled study in patients with gout with inadequate response to standard of care (the multinational CLEAR 2 study). *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76(5), 811-820.

Bayraktar, A. (2010, Mart-Nisan). Hiperürisemi ve gut. *Eczacılık Akademisi TEB Haberler*. Sayı 2, p. 22-25.

Becker, M.A., Perez-Ruiz, F. Pharmacologic urate-lowering therapy and treatment of tophi in patients with gout, UpToDate, Erişim Nisan 2020.

Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, 127-152.

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9-19.

Campion, E. W., Glynn, R. J., & Delabry, L. O. (1987). Asymptomatic hyperuricemia. Risks and consequences in the Normative Aging Study. *The American Journal of Medicine*, 82(3), 421-426.

Chan, F. K. M., Moriwaki, K., & De Rosa, M. J. (2013). Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. In *Immune Homeostasis* (pp. 65-70). Humana Press, Totowa, NJ.

Chan, L. L. Y., Lai, N., Wang, E., Smith, T., Yang, X., & Lin, B. (2011). A rapid detection method for apoptosis and necrosis measurement using the cellometer imaging cytometry. *Apoptosis*, 16(12), 1295.

Choi, H. K., & Curhan, G. (2004). Beer, liquor, and wine consumption and serum uric acid level: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arthritis Care & Research*, 51(6), 1023-1029.

Choi, H. K., & Gout, B. (2008). Epidemiology, pathology, and pathogenesis. *Primer on the rheumatic diseases. 13th ed. Atlanta, GA: Arthritis Foundation*, 250-256.

Choi, H. K., Atkinson, K., Karlson, E. W., & Curhan, G. (2005). Obesity, weight change, hypertension, diuretic use, and risk of gout in men: the health professionals follow-up study. *Archives of Internal Medicine*, 165(7), 742-748.

Choi, H. K., Niu, J., Neogi, T., Chen, C. A., Chaisson, C., Hunter, D., & Zhang, Y. (2015). Nocturnal risk of gout attacks. *Arthritis & Rheumatology*, 67(2), 555-562.

Claus, L. W., & Saseen, J. J. (2018). Patient considerations in the management of gout and role of combination treatment with lesinurad. *Patient Related Outcome Measures*, 9, 231.

Coşkun, G., & Özgür, H. (2011). Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3), 145-158.

Costa, V. M., Carvalho, F., Duarte, J. A., Bastos, M. D. L., & Remião, F. (2013). The heart as a target for xenobiotic toxicity: the cardiac susceptibility to oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, 26(9), 1285-1311.

Cross, M. J., Berridge, B. R., Clements, P. J. M., Cove-Smith, L., Force, T. L., Hoffmann, P., ... & Pirmohamed, M. (2015). Physiological, pharmacological and toxicological considerations of drug-induced structural cardiac injury. *British Journal of Pharmacology*, 172(4), 957-974.

Curello, S., Ceconi, C., Bigoli, C., Ferrari, R., Albertini, A., & Guarnieri, C. (1985). Changes in the cardiac glutathione status after ischemia and reperfusion. *Experientia*, 41(1), 42-43.

Dalbeth, N., Jones, G., Terkeltaub, R., Khanna, D., Kopicko, J., Bhakta, N., ... & Perez-Ruiz, F. (2017). Lesinurad, a selective uric acid reabsorption inhibitor, in combination with febuxostat in patients with tophaceous gout: findings of a phase III clinical trial. *Arthritis & Rheumatology*, 69(9), 1903-1913.

Dalton, T. P., Shertzer, H. G., & Puga, A. (1999). Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39(1), 67-101.

Daubney, J., Bonner, P. L., Hargreaves, A. J., & Dickenson, J. M. (2015). Cardioprotective and cardiotoxic effects of quercetin and two of its in vivo metabolites on differentiated H9c2 cardiomyocytes. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 116(2), 96-109.

Dean, L. Lesinurad therapy and CYP2C9 genotype. *Medical Genetics Summaries*, 237.

Demir, H. (2011). Crystal arthropaty. *Erciyes Tıp Dergisi*, 33(1):47-54

Dessein, P. H., Shipton, E. A., Stanwix, A. E., Joffe, B. I., & Ramokgadi, J. (2000). Beneficial effects of weight loss associated with moderate calorie/carbohydrate

restriction, and increased proportional intake of protein and unsaturated fat on serum urate and lipoprotein levels in gout: a pilot study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 59(7), 539-543.

Dhalla, A. K., Hill, M. F., & Singal, P. K. (1996). Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 28(2), 506-514.

Dincer, H. E., Dincer, A. P., & Levinson, D. J. (2002). Asymptomatic hyperuricemia: to treat or not to treat. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 69(8), 594-608.

Fadeel, B., & Orrenius, S. (2005). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Journal of Internal Medicine*, 258(6), 479-517.

Falk, E. R. L. I. N. G. (1985). Unstable angina with fatal outcome: dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death. Autopsy evidence of recurrent mural thrombosis with peripheral embolization culminating in total vascular occlusion. *Circulation*, 71(4), 699-708.

Fam, A. G. (2002). Gout, diet, and the insulin resistance syndrome. *The Journal of Rheumatology*, 29(7), 1350-1355.

FDA (Food and Drug Administration) ZURAMPIC® oral tablets, lesinurad oral tablets [package insert]. Wilmington, DE: AstraZeneca Pharmaceuticals LP; revised January 2016.

FDA (Food and Drug Administration) Approves Zurampic for patients with gout [Internet]. Medscape. [cited 2016 May 18]. Available from: <http://www.medscape.com/viewarticle/85637>

Fleischmann, R., Kerr, B., Yeh, L. T., Suster, M., Shen, Z., Polvent, E., ... & Baumgartner, S. (2014). Pharmacodynamic, pharmacokinetic and tolerability evaluation of concomitant administration of lesinurad and febuxostat in gout patients with hyperuricaemia. *Rheumatology*, 53(12), 2167-2174.

Foo, R.S.Y., Mani, K., & Kitsis, R. N. (2005). Death begets failure in the heart. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(3), 565-571.

Fotakis, G. & Timbrell, J.A., 2006. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), pp.171–177.

Franco, R., & Cidlowski, J. A. (2012). Glutathione efflux and cell death. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(12), 1694-1713.

Freshney, I., 1994. *Culture of animal cells, a manual of basic technique* 4th ed. Wiley-Liss, ed., Canada.

Galluzzi, L., Aaronson, S. A., Abrams, J., Alnemri, E. S., Andrews, D. W., Baehrecke, E. H., ... & Bredesen, D. E. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death & Differentiation*, 16(8), 1093-1107.

Gao, W., Mizukawa, Y., Nakatsu, N., Minowa, Y., Yamada, H., Ohno, Y., & Urushidani, T. (2010). Mechanism-based biomarker gene sets for glutathione depletion-related hepatotoxicity in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 247(3), 211-221.

Ghyasi, R., Sepehri, G., Mohammadi, M., Badalzadeh, R., & Ghyasi, A. (2012). Effect of mebudipine on oxidative stress and lipid peroxidation in myocardial ischemic-reperfusion injury in male rat. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 17(12), 1150.

Gill, C., Mestril, R., & Samali, A. (2002). Losing heart: the role of apoptosis in heart disease-A novel therapeutic target? *The FASEB Journal*, 16(2), 135-146.

Golstein, P., & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 37-43.

Greaser, M. L., & Gergely, J. (1971). Reconstitution of troponin activity from three protein components. *Journal of Biological Chemistry*, 246(13), 4226-4233.

Güleş, Ö., & Ülker, E. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2), 73-78.

Gutman, A. B. (1958). Gout and gouty arthritis. *Textbook of Medicine*. Beeson PB and McDermott W. 12th ed. W. B. Saunders, Philadelphia. sayfa. 595.

Gutman, A. B. (1959). Study of the paradoxical effects of salicylate in low, intermediate and high dosage on the renal mechanisms for excretion of urate in man. *The Journal of Clinical Investigation*, 38(8), 1298-1315.

Hainer, B. L., Matheson, E., & Wilkes, R. T. (2014). Diagnosis, treatment, and prevention of gout. *American Family Physician*, 90(12), 831-836.

Hair, P. I., McCormack, P. L., & Keating, G. M. (2008). Febuxostat. *Drugs*, 68(13), 1865-1874.

Hearse, D. J. (1977). Reperfusion of the ischemic myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 9(8), 605-616.

Herman, E. H., Lipshultz, S. E., Rifai, N., Zhang, J., Papoian, T., Yu, Z. X., ... & Ferrans, V. J. (1998). Use of cardiac troponin T levels as an indicator of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cancer Research*, 58(2), 195-197.

Hollander, A. A., van Saase, J. L., van Es, L. A., van Bockel, H. J., Kootte, A. M. M., & van Dorp, W. T. (1995). Beneficial effects of conversion from cyclosporin to azathioprine after kidney transplantation. *The Lancet*, 345(8950), 610-614.

İnan, Y.Ö. (2017). Gut hastalıklarının klinik ve laboratuvar olarak değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İstanbul Bakırköy Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı.

Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y., & Ueno, K. (1996). A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 19(11), 1518-1520.

Jacob, K. D., Hooten, N. N., Trzeciak, A. R., & Evans, M. K. (2013). Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, 134(3-4), 139-157.

Kanev, M., & Muranlı, F. G. (2016). Flow sitometri ve kullanım alanları. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(1), 33-38.

Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1), 65-76.

Karlsson, M., Kurz, T., Brunk, U. T., Nilsson, S. E., & Frennesson, C. I. (2010). What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochemical Journal*, 428(2), 183-190.

Katus, H. A., Remppis, A., Neumann, F. J., Scheffold, T., Diederich, K. W., Vinar, G., ... & Kuebler, W. (1991). Diagnostic efficiency of troponin T measurements in acute myocardial infarction. *Circulation*, 83(3), 902-912.

Kaya, Y. (2013). Ksantin oksidaz enziminin saflaştırılması ve gluteraldehit ile immobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. & Curriet, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Journal of Internal Medicine*, 258(6), pp.479–517.

Khanna, D., Fitzgerald, J. D., Khanna, P. P., Bae, S., Singh, M. K., Neogi, T., ... & Kaldas, M. (2012). 2012 American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Part 1: systematic nonpharmacologic and pharmacologic therapeutic approaches to hyperuricemia. *Arthritis Care & Research*, 64(10), 1431-1446.

Kobayashi, T., & Solaro, R. J. (2005). Calcium, thin filaments, and the integrative biology of cardiac contractility. *Annual Review of Physiology*, 67, 39-67.

Konukoğlu, D. (1997). serbest Radikaller ve Önemleri. *Türkiye Aile Hekimliği Dergisi*, 1(4), 197-200.

Kruger, N. J. (2009). The Bradford method for protein quantitation. In *The Protein Protocols Handbook* (pp. 17-24). Humana Press, Totowa, NJ.

Leyla, M. İ. S., & Yeltekin, A. Ç. (2014). Apoptosis. *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 3(1), 102-112.

Lippi, G., Targher, G., Franchini, M., & Plebani, M. (2009). Genetic and biochemical heterogeneity of cardiac troponins: clinical and laboratory implications. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 47(10), 1183-1194.

Lisciani, R., Campana, A., & Barcellona, P. S. (1978). Comparative cardiovascular toxicity of trazodone and imipramine in the rat. In *Toxicological Aspects of Food Safety* (pp. 169-172). Springer, Berlin, Heidelberg.

Lugli, E., Troiano, L., & Cossarizza, A. (2010). Investigating T cells by polychromatic flow cytometry. In *T Cell Protocols* (pp. 47-63). Humana Press.

Mair, J. (1997). Cardiac troponin I and troponin T: are enzymes still relevant as cardiac markers? *Clinica Chimica Acta*, 257(1), 99-115.

Maiuolo, J., Oppedisano, F., Gratteri, S., Muscoli, C., & Mollace, V. (2016). Regulation of uric acid metabolism and excretion. *International Journal of Cardiology*, 213, 8-14.

Marí, M., Morales, A., Colell, A., García-Ruiz, C., Kaplowitz, N., & Fernández-Checa, J. C. (2013). Mitochondrial glutathione: features, regulation and role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3317-3328.

Marston, S., & Zamora, J. E. (2020). Troponin structure and function: a view of recent progress. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 41:71-89.

Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., & Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(10), 577-586.

Menazza, S., Canton, M., Sorato, E., Boengler, K., Schulz, R., & Di Lisa, F. (2012). Old and new biomarkers of oxidative stress in heart failure. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 9(4), e189-e198.

Mercan, U. (2004). Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(1), 91-96.

Mishra, P., Singh, S. V., Verma, A. K., Srivastava, P., Sultana, S., & Rath, S. K. (2014). Rosiglitazone induces cardiotoxicity by accelerated apoptosis. *Cardiovascular Toxicology*, 14(2), 99-119.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunological Methods*, 65(1-2), pp.55-63.

Mutlu, E., & Gültekin, M. (2016). Akım sitometride veri analizi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyet Dergisi*, 45(4), 155-159.

National Institutes of Health. (2019). LiverTox: clinical and research information on drug-induced liver injury- Lesinurad. *Nih. gov* <https://livertox.nih.gov>.

Neogi, T. (2011). Gout. *New England Journal of Medicine*, 364(5), 443-452.

Nicotera, P., & Melino, G. (2004). Regulation of the apoptosis–necrosis switch. *Oncogene*, 23(16), 2757-2765.

Ning, T. C., & Keenan, R. T. (2010). Unusual clinical presentations of gout. *Current Opinion in Rheumatology*, 22(2), 181-187.

NLM Citation: LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Lesinurad. [Updated 2019 May 1]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>

Nuki, G., & Simkin, P. A. (2006). A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment. *Arthritis Research & Therapy*, 8(S1), S1.

Ochieng, J., Nangami, G. N., Ogunkua, O., Miousse, I. R., Koturbash, I., Odero-Marah, V., ... & Chen, Z. (2015). The impact of low-dose carcinogens and environmental disruptors on tissue invasion and metastasis. *Carcinogenesis*, 36(Suppl_1), S128-S159.

Olivetti, G., Abbi, R., Quaini, F., Kajstura, J., Cheng, W., Nitahara, J. A., ... & Reed, J. C. (1997). Apoptosis in the failing human heart. *New England Journal of Medicine*, 336(16), 1131-1141.

Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C., & Haanen, C. (1998). Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, 3(2), 115-121.

Özvaran, M. K. (2004). Malign mezotelyomada gen tedavisi. *Toraks Dergisi*, 5(2), 110-115.

Panteghini, M., Apple, F. S., Christenson, R. H., Dati, F., Mair, J., & Wu, A. H. (1999). Proposals from IFCC Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage (C-SMCD): recommendations on use of biochemical markers of cardiac

damage in acute coronary syndromes. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 59(sup230), 103-112.

Pascart, T., & Richette, P. (2017). Current and future therapies for gout. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18(12), 1201-1211.

Perik, P. J., de Vries, E. G., Gietema, J. A., van der Graaf, W. T., Sleijfer, D. T., Suurmeijer, A. J., & van Veldhuisen, D. J. (2005). The dilemma of the strive for apoptosis in oncology: mind the heart. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 53(2), 101-113.

Perry, S. V. (1998). Troponin T: genetics, properties and function. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 19(6), 575-602.

Phelan, K., & May, K. M. (2015). Basic techniques in mammalian cell tissue culture. *Current protocols in Toxicology*, 66(1); 1.1.1-1.1.22.

Pilmore, H. L., Faire, B., & Dittmer, I. (2001). Tacrolimus for treatment of gout in renal transplantation: two case reports and review of the literature. *Transplantation*, 72(10), 1703-1705.

Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., & Hübner, H. (2017). Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. In *Cell viability assays* (pp. 1-17). Humana Press, New York, NY.

Rathmann, W., Funkhouser, E., Dyer, A. R., & Roseman, J. M. (1998). Relations of hyperuricemia with the various components of the insulin resistance syndrome in young black and white adults: the CARDIA study. *Annals of Epidemiology*, 8(4), 250-261.

Remião, F., Carmo, H., Carvalho, F. D., & Bastos, M. L. (2000). Inhibition of glutathione reductase by isoproterenol oxidation products. *Journal of Enzyme Inhibition*, 15(1), 47-61.

Remppis, A., Scheffold, T., Greten, J., Haass, M., Greten, T., Kübler, W., & Katus, H. A. (1995). Intracellular compartmentation of troponin T: release kinetics after global ischemia and calcium paradox in the isolated perfused rat heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 27(2), 793-803.

Richette, P., and Bardin, T. (2010). Gout. *Lancet*; 375(9711):318-28

Riss, T. L., & Moravec, R. A. (2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and Drug Development Technologies*, 2(1), 51-62.

Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell viability assays. In *Assay Guidance Manual [Internet]*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

Saag, K. G., & Choi, H. (2006). Epidemiology, risk factors, and lifestyle modifications for gout. *Arthritis Research & Therapy*, 8(1), S2.

Saag, K. G., Fitz-Patrick, D., Kopicko, J., Fung, M., Bhakta, N., Adler, S., ... & Becker, M. A. (2017). Lesinurad combined with allopurinol: a randomized, double-blind, placebo-controlled study in gout patients with an inadequate response to standard-of-care allopurinol (a US-based study). *Arthritis & Rheumatology*, 69(1), 203-212.

Sharma, G. N., Gupta, G., & Sharma, P. (2018). A comprehensive review of free radicals, antioxidants, and their relationship with human ailments. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 28(2).

Siim, B. G., Van Zijl, P. L., & Brown, J. M. (1996). Tirapazamine-induced DNA damage measured using the comet assay correlates with cytotoxicity towards hypoxic tumour cells in vitro. *British Journal of Cancer*, 73(8), 952-960.

Soskind, R., Abazia, D. T., & Bridgeman, M. B. (2017). Updates on the treatment of gout, including a review of updated treatment guidelines and use of small molecule therapies for difficult-to-treat gout and gout flares. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18(11), 1115-1125.

Strober, W. (1997). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, 21(1), A-3B.

Sumantran, V. N. (2011). Cellular chemosensitivity assays: an overview. In *Cancer Cell Culture* (pp. 219-236). Humana Press.

Sumi, D., Abe, K., & Himeno, S. (2013). Arsenite retards the cardiac differentiation of rat cardiac myoblast H9c2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 436(2), 175-179.

Sundy, J. S. (2010). Progress in the pharmacotherapy of gout. *Current Opinion in Rheumatology*, 22(2), 188-193.

T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Obezite (2017). Erişim 24.03.2020, <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/obezite/turkiyede-obezitenin-gorulme-sikligi.html>

Taneli, F. (2007). Flow sitometri tekniği ve klinik laboratuvarlarda kullanımı. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 5(2), 75-82.

Tennant, J. R. (1964). Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation*, 2(6), 685-694.

Terkeltaub, R. (2010). Update on gout: new therapeutic strategies and options. *Nature Reviews Rheumatology*, 6(1), 30.

Tetik, B. K., Artantaş, A. B., İnce, B., & Üstü, Y. (2012). Üçüncü Atakta Tanı Konulan Bir Gut Vakası. *Ankara Medical Journal*, 12(2).

Tokur R, O., & Aksoy, A. (2017). In vitro sitotoksosite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112-118.

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350-4354.

Tsutsui, H., Kinugawa, S., & Matsushima, S. (2011). Oxidative stress and heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 301(6), H2181-2190.

Tykarski, A. (1991). Evaluation of renal handling of uric acid in essential hypertension: hyperuricemia related to decreased urate secretion. *Nephron*, 59(3), 364-368.

Van Meerloo, J., Kaspers, G.J. ve Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: The MTT assay. *Methods in Molecular Biology*, 731, 237-245.

Wallace, K. L., Riedel, A. A., Joseph-Ridge, N., & Wortmann, R. (2004). Increasing prevalence of gout and hyperuricemia over 10 years among older adults in a managed care population. *The Journal of Rheumatology*, 31(8), 1582-1587.

Wolterbeek, H. T., & Van der Meer, A. J. (2005). Optimization, application, and interpretation of lactate dehydrogenase measurements in microwell determination of cell number and toxicity. *Assay and Drug Development Technologies*, 3(6), 675-682.

Wortmann, R. L. (2009). Gout and Hyperuricemia. In: Firestein, G. S., Budd, R. C., Harries, E. D., McInnes, I. B., Ruddy, S., Sargent, J. S., editors. *Kelly's Textbook of Rheumatology*. Philadelphia: WB Saunder: sayfa: 1481-1506

Wu, A. H., & Feng, Y. J. (1998). Biochemical differences between cTnT and cTnI and their significance for diagnosis of acute coronary syndromes. *European Heart Journal*, 19, N25.

Yan, E. B., Frugier, T., Lim, C. K., Heng, B., Sundaram, G., Tan, M., ... & Morganti-Kossmann, M. C. (2015). Activation of the kynurenine pathway and increased production of the excitotoxin quinolinic acid following traumatic brain injury in humans. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1), 110.

Zucco, F., De Angelis, I., & Stamatii, A. (1998). Cellular models for in vitro toxicity testing. In *Animal Cell Culture Techniques* (pp. 395-422). Springer, Berlin, Heidelberg.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

GUT HASTALIĞINDA KULLANILAN LESİNURAD'IN KARDİYOTOKSİK ETKİ POTANSİYELİ VE MEKANİZMASININ AYDINLATILMASI

ORJİNALLIK RAPORU

%8	%7	%3	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	www.scribd.com İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
4	Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University Öğrenci Ödevi	<%1
5	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<%1
6	fizikoterapi.com İnternet Kaynağı	<%1
7	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Merve	Soyadı	Arıcı
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	18.06.1990
Email	mervarcc@gmail.com	Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	T.C. İstanbul Üniversitesi	2015
Lisans	T.C. Abant İzzet Baysal Üniversitesi	2013
Lise	Marmara Lisesi	2007

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Öğretim Görevlisi	İstinye Üniversitesi	2017-Devam

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	İyi		83,75

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

- Arıcı M, Abudayyak M, Boran T, Ozhan G. Does pendimethalin develop in pancreatic cancer induced inflammation? *Chemosphere*, 2020, 252:126644.
- Arıcı M, Oztas E, Yanar F, Aksakal N, Ozcinar Beyza, Ozhan G. Association between genetic polymorphism and Levothyroxine bioavailability in hypothyroid patients. *Endocrine Journal*, 2018, 28;65(3):317-323
- Arıcı M, Ozhan G. The Genetic profiles of CYP1A1, -A2 and -2E1 enzymes as susceptibility factor in xenobiotic toxicity in Turkish Population. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2017, 25(2):294-297.
- Arıcı M, Ozhan G. CYP2C9, -C19 and -2D6 gene profiles and gene susceptibility to drug response and toxicity in turkish population. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2017, 25(3):376-380.
- Abudayyak M, Öztaş E, Arıcı M, Özhan G. Investigation on the toxicity of bismuth oxide nanoparticles in different cell lines. *Chemosphere*, 2017, 169:117-123.
- Abudayyak M, Öztaş E, Arıcı M, Özhan G. In vitro toxicological assessment of magnesium oxide nanoparticle exposure in several mammalian cell types. *International J Toxicology*, 2016, 35(4):429-37.

- Oztas E, Arici M, Yanar TH, Özhan G. Genetic variations in Phospholipase C-epsilon 1 (PLCE1) and susceptibility to colorectal cancer risk: a case-control study in Turkish population. *Biochemical Genetics*, 2016, 54(6):826-829.
- Öztaş E, Abudayyak M, Arıcı M, Özhan G. Investigation on the toxicity of bismuth oxide nanoparticles in HepG2 cell line. 55th Annual Meeting of Society of Toxicology, 13-17 Mart 2016, New Orleans-USA, The Toxicologist, Supplement to Toxicological Sciences, Vol:150, Issue 1
- Hun B, Arici M. Drug-induced liver injury (DILI) and genetic susceptibility. 9th Congress of Toxicology of Turkheltox, 21-24 Ekim 2015, Izmir, Türkiye.
- Arici M. Genotyping and haplotyping analysis of drug-metabolizing enzymes CYP1A1, -1A2, -2D6, -2C9, -2C19, -2E1, -3A4 and -3A5 in Turkish population. 9th Congress of Toxicology of Turkheltox, 21-24 Ekim 2015, Izmir (Sözlü bildiri).
- Oztas E., Arici M., Yanar T.H., Ozhan G. Genetic variations in phospholipase C-Epsilon 1 (PLCE1) and susceptibility to colorectal cancer risk: A case-control study in turkish population. 13th European ISSX Meeting, Glasgow, Scotland, 22-25 Haziran 2015.
- Arici M. Genomic-based biomarkers of drug-induced nephrotoxicity. International Symposium on Advances In Predictive and Personalized Medicine 2-3 Nisan 2015, İstanbul, Türkiye.
- Arici M, Ozhan G. Interaction between the male infertility and the genetic susceptibility to endocrine disruptors. 4. Uluslararası Eczacılık Bilimleri Kongresi (IMPPS-4), 18-21 Ekim 2014, İstanbul, Türkiye.
- Arici M, Ozhan G. Individual variability in coumarin-induced toxicity. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi, 28-30 Kasım 2014, İstanbul.
- Akman S, Arıcı M, Bayındır N, Cansız D, Dalagan V, İnci G, Yıldız M, İkinci N. Traditional folk medicine in Balı village Kırıcık/Bolu (Turkey). 11. Uluslararası Etnobotani Sempozyumu, Ekim 2-5, 2013, Antalya. Emirates Journal of Food and Agriculture Suppl. Issue: 25: 141 (2013).
- Arici M, Ozhan G. The evaluation of CYP3A4 and CYP3A5 Genetic Profiles in Turkish Population. *Journal of Faculty Pharmacy of Istanbul University*, 46(1):15-22 (2016).
- Merve A, Özhan G. The effects of endocrine disrupting chemicals and genetic susceptibility on male infertility. *Journal of Faculty Pharmacy of Istanbul University*, 45(1):39-60 (2015).
- Merve A, Özhan G. Suların dezenfeksiyonunda oluşan yan ürünlerin riskleri. Toksikoloji Bülteni, (41):9-10 (2015).

Diğer Faaliyetler

- Principles of Toxicology Kursu, 4-8 Nisan 2016 Zagreb, Hırvatistan
- Drug Induced Liver Injury: Genomic Approaches and Risk Assessment. Mini-Sempozyum. 25.11.2015, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
- Abcam seminer. Introduction and optimization of CHIP, Optimization of ELİSA. 14.05.2015, İstanbul Bilim Üniversitesi.
- Deneysel Tasarım ve Ön Biyoistatistik Sempozyumu. 29.09.2014-30.09.2014, İstanbul Üniversitesi.
- Karaköy Otofaji Sempozyumu. 22.10.2014. İstanbul
- ISO/IEC 17025 : 2005 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği, TSC Yönetim Sistemleri Akademisi, Mart 2013, Ankara, Türkiye.
- GMP- İyi Üretim Uygulamaları, TSC Yönetim Sistemleri Akademisi, Mart 2013, Ankara, Türkiye.
- GLP- İyi Laboratuvar Uygulamaları, TSC Yönetim Sistemleri Akademisi, Mart 2013, Ankara, Türkiye.

Projeler

- Pendimetalin'in in vitro şartlarda AR42J pankreas hücreleri üzerinde inflamatuvar etki potansiyelinin araştırılması, İstanbul Üniversitesi BAP Projesi (22596), Araştırmacı, 2016-2017
- Levotiroksin tedavisi gören hipotiroidi hastalarında genetik farklılığın levotiroksin etkinliği ve toksisitesi üzerine etkisinin araştırılması. Araştırmacı, İstanbul Üniversitesi BAP Projesi (53871), 2015-2016.
- İlaç Yanıtında Önemli Rol Oynayan Sitokrom P450 Enzim Polimorfizminin Türk Popülasyonundaki Sıklığı. Yürütücü, Yüksek Lisans Tez Projesi. İstanbul Üniversitesi BAP Projesi (49558), 2015-2016.
- HER2 amplifikasyonu göstermeyen metastatik gastrik/gastroözefageal bileşke adenokanserli hastalarda verilen 1. Seri sisplatin ve 5-fluorourasil'in etkinliği ve toksisitesi üzerine genetik polimorfizmin Etkisi. 2013-2016. Tübitak (112S543).

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Sulu boya, seyahat etmek, fotoğraf çekmek, yemek yapmak, dikiş dikmek, çiçek/bitki bakımı.

