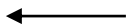


Adınızı soyadınızı giriniz

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)

**ANTİNEOPLASTİK İLAÇ LENVATİNİB KAYNAKLI
KARDİYOTOKSİSİTENİN MOLEKÜLER ETKİ MEKANİZMALARI
AÇISINDAN İN VİTRO İNCELENMESİ**

AYŞENUR GÜNAYDIN AKYILDIZ

**DANIŞMAN
PROF. DR. BÜKET ALPERTUNGA**

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

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.

Ayşenur GÜNAYDIN AKYILDIZ

(İmza)



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamamasında beni destekleyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Buket Alpertunga'ya,

Desteklerini esirgemeyen İ.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı değerli hocalarım Prof. Dr. Gül Özhan, Doç. Dr. Eren Özçağlı ve Doç. Dr. Sibel Özden'e, tez çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen değerli Arş. Gör. Dr. Ayşe Tarbın Jannuzzi ve Arş. Gör. Tuğçe Boran'a,

Akım sitometrisi ile mitokondriyal membran potansiyeli çalışmaları için Marmara Üniversitesi Genetik ve Metabolik Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'na ve tez çalışmalarına değerli katkıları için değerli hocam Doç. Dr. Betül Karademir Yılmaz'a,

TEM görüntüleme için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne

Deneylerim süresince her türlü desteği sağlayan Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Gülaçtı Topçu'ya ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ndeki tüm hocalarım ve arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca destekleri ve sonsuz sevgileri ile her zaman yanımda olan canım annem ve babam Elif-Muhammet Günaydın'a, canım kardeşlerim Ahmet Arif ve Mehmet Akif'e, canım yol arkadaşım Ömer Akyıldız'a,

Değerli dostlarım Rabia Sare Yanıkoğlu, Gülbahar Özge Alim Toraman, Sezen Atasoy, Gizem Tırıs, Dr. Demet Dinçel, Dr. Burcu Bütün, Dr. Dilek Öztürk, Dr. Eray Metin Güler, Muhammet Yunus Bektay, Dr. Mehtap Kara, Dr. Ezgi Öztaş, Bengül Çalık, Bahar Karaca, Ecem Karaman, Mine Çağlayan, Merve Arıcı ve Fatih Sarı'ya

Çok Teşekkür Ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-26002

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN.....	İV
İTHAF.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER	VII
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	XI
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XIII
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVI
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Protein Kinaz İnhibitörleri	3
2.2. Tirozin Kinaz İnhibitörleri (TKİ).....	5
2.2.1. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Advers Etkileri	10
2.2.2. Tirozin Kinaz İnhibitörleri Kaynaklı Kardiyotoksisite	11
2.3. Lenvatinib	14
2.4. Mitokondri	16
2.4.1. Mitokondrinin Yapısı ve İşlevleri	16
2.4.2. Mitokondriyal Dinamikler	19
2.4.3. Mitokondriyal Hasar ve Kardiyotoksisite	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1. Gereç	30
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	30
3.1.2. Kitler	32
3.1.3. Cihazlar	33
3.2. Yöntem.....	34
3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	35
3.2.1.1. Hücre Dizisinin Kültür Edilmesi.....	35
3.2.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler	35

3.2.1.3. Hücrelerin Sayımı	36
3.2.2. Lenvatinib Çözeltilerinin Hazırlanması	37
3.2.3. Hücrelere Lenvatinib Maruziyet Uygulaması	37
3.2.4. MTT Sitotoksosite Testi	37
3.2.5. ATP Miktar Tayini	38
3.2.6. Mitokondri Membran Potansiyeli (MMP) Tayini	40
3.2.7. Mitokondriyal Kütle Tayini	42
3.2.8. Protein Ekspresyon Analizi	42
3.2.8.1. Protein izolasyonu	42
3.2.8.2. İzole Edilen Proteinlerin Miktarlarının Ölçülmesi	43
3.2.8.3. SDS-PAGE	44
3.2.8.4. Western Blot	45
3.2.9. RNA Düzeyinde Gen İfadesi Analizi	47
3.2.9.1. Total RNA İzolasyonu	47
3.2.9.2. RNA'nın Saflık ve Miktar Tayini	48
3.2.9.3. cDNA Sentezi	48
3.2.9.4. Gen Ekspresyonunun Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR ile Belirlenmesi	49
3.3. Mitokondriyal DNA İçeriğinin Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR ile Belirlenmesi	51
3.3.1.1. DNA İzolasyonu	51
3.3.1.2. DNA'nın Saflık ve Miktar Tayini	52
3.3.1.3. Mitokondriyal DNA İçeriğinin Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR ile Belirlenmesi	52
3.3.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM)	53
3.3.3. İstatistiksel Analizler	54
3.3.4. Şekiller ve Grafikler	54
4. BULGULAR	55
4.1. MTT Sitotoksosite Testi Sonuçları	55
4.2. ATP Miktarı	55
4.3. Mitokondriyal Membran Potansiyeli	57
4.4. Mitokondriyal Kütle Tayini	57
4.5. Protein Ekspresyon Sonuçları	58
4.6. RNA Düzeyinde Gen İfadesi Analizi Sonuçları	63
4.7. Mitokondriyal DNA İçeriği	68

4.8. Transmisyon Elektron Mikroskopisi (TEM) Görüntüleri.....	69
4.9. Tüm Bulguların Tablosu	70
5. TARTIŞMA	72
KAYNAKLAR	87
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	107
ÖZGEÇMİŞ	108



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Protein Kinazlar	5
Tablo 2-2: Reseptör Tirozin Kinazlar (Alexander ve ark., 2019).....	6
Tablo 2-3: Lenvatinib'in tedavi sonlandırmaya veya doz azaltılmasına sebep olan advers etkileri (U.S. FDA ve CDER, 2015)	15
Tablo 2-4: Füzyon ve Fisyonun Önemli İşlevleri (Meyer ve ark., 2017)	21
Tablo 2-5: Seçili Tirozin Kinaz İnhibitörü İlaçların Mitokondriyal Hasarlarına Dair Yapılmış Çalışmalar	24
Tablo 3-1: Gen Ekspresyonu analizinde kullanılan primer çiftleri.....	50
Tablo 3-2: Gerçek Zamanlı PZR Protokolü (60 °C)	50
Tablo 3-3: Gerçek Zamanlı PZR Protokolü (63 °C)	51
Tablo 3-4: Mitokondriyal DNA içeriği analizi için kullanılan primer dizileri	53
Tablo 4-1: 48 ve 72 saat 1,25 µM, 5 µM ve 10 µM Lenvatinib Maruziyeti Sonucunda Elde Edilen Bulguların Özeti	71

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Protein fosforilasyonunun şematik gösterimi.....	5
Şekil 2-2: RTK aktivasyonu ile başlayan aşağı akış sinyalizasyon yolları.....	10
Şekil 2-3: TKİ indüklü kardiyotoksisiteye sebep olan mekanizmaların şematik gösterimi. Sağ tarafta mitokondri ile ilgili işlevlere odaklanılmıştır.	12
Şekil 2-4: VEGFR inhibisyonu kaynaklı hipertansiyon oluşumu (Ancker ve ark., 2017)	13
Şekil 2-5: Elektron Transport Zinciri (ETZ). Kırmızı ok ile gösterilen elektronların izlediği yoldur. I: Kompleks I, II: Kompleks II, III: Kompleks III, IV: Kompleks IV, V: Kompleks V, Q: KoenzimQ10, c: Sitokrom c, TCA: Trikarboksilik asit	17
Şekil 2-6: Mitokondriyal Fisyon ve Füzyon (Westermann, 2010)	20
Şekil 2-7: Mitokondriyal hasar mekanizmaları	25
Şekil 2-8: Saptanan mitokondriyal değişikliklerin şematik gösterimi.....	29
Şekil 3-1: Çalışmanın özet deneysel şeması	35
Şekil 3-2: ATP miktar tayininin esası.....	39
Şekil 3-3: JC-1 katyonik boyasının mitokondriyal membran potansiyeli tayinindeki çalışma prensibi	41
Şekil 4-1: 48 ve 72 saat Lenvatinib maruziyeti sonrası hücre canlılığında meydana gelen değişiklikler	55
Şekil 4-2: ATP standart ölçü eğrisi.....	56
Şekil 4-3: 48 ve 72 saat Lenvatinib maruziyeti sonrası hücre içi ATP miktarında meydana gelen değişiklikler	56
Şekil 4-4: Lenvatinib maruziyet sonrası mitokondriyal membran potansiyeli sonuçları a) 48 saat b) 72 saat.....	57
Şekil 4-5: 48 saat Lenvatinib maruziyeti sonrası ölçülen mitokondriyal kütle tayini sonuçları.....	58
Şekil 4-6: Protein standart ölçü eğrisi.....	59
Şekil 4-7: Lenvatinib maruziyeti yapılan hücrelerde mitokondriyal komplekslerin ekspresyonlarında meydana gelen değişiklikler	61
Şekil 4-8: Lenvatinib maruziyeti yapılan hücrelerde Sit c ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler.....	61

Şekil 4-9: Lenvatinib maruziyeti yapılan hücrelerde LONP1 ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler.....	62
Şekil 4-10: Lenvatinib maruziyeti yapılan hücrelerde P21 ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler.....	63
Şekil 4-11: Lenvatinib maruziyeti yapılan hücrelerde füzyon genleri ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler	64
Şekil 4-12: Lenvatinib maruziyeti yapılan hücrelerde fisyon genleri ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler	65
Şekil 4-13: 48 ve 72 saatlik 1,25 μ M, 5 μ M ve 10 μ M Lenvatinib konsantrasyonlarına maruziyet sonrası ölçülen ASK1 gen ekspresyonunda görülen değişikliklerin grafiği..	66
Şekil 4-14: 48 ve 72 saatlik 1,25 μ M, 5 μ M ve 10 μ M Lenvatinib konsantrasyonlarına maruziyet sonrası ölçülen SOD2 gen ekspresyonunda görülen değişikliklerin grafiği..	67
Şekil 4-15: 48 ve 72 saatlik 1,25 μ M, 5 μ M ve 10 μ M Lenvatinib konsantrasyonlarına maruziyet sonrası ölçülen JNK gen ekspresyonunda görülen değişikliklerin grafiği. ...	68
Şekil 4-16: 48 ve 72 saat 1,25 μ M, 5 μ M ve 10 μ M Lenvatinib maruziyeti sonucunda ölçülen mtDNA içeriği.....	69
Şekil 4-17: 48 ve 72 saat Lenvatinib maruziyeti yapılan hücrelerin TEM görüntüleri ..	70

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ADP:	Adenin difosfat
AKT:	Protein kinaz B (PKB olarak da bilinir)
ASK1:	Apoptoz signaling kinaz 1
ATP:	Adenin trifosfat
BCA:	Bikinkoninik asit
Ca ²⁺ :	Kalsiyum iyonu
CDK:	Siklin bağımlı kinaz
Da:	Dalton
ddH ₂ O:	Didistile su, ultrasaf steril su
DNA:	Deoksiribo nükleik asit
DRP1:	Dinamin ilişkili protein 1
EGFR:	Endotelyal büyüme faktörü reseptörü
ER:	Endoplazmik retikulum
ERK:	Ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz
ETZ:	Elektron transport zinciri
FADH ₂ :	Flavin adenin dinükleotit
FDA:	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration)
FGFR:	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü
FIS1:	Fisyon protein 1
GDNF:	Glial hücre-derive nörotrofik faktör
GTPaz:	Guanozin-5'-trifosfataz
JNK:	C-Jun N-terminal kinaz
KIT:	Kök hücre büyüme faktörü reseptörü
LONP1:	Lon proteaz 1
MAPK:	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MFN1:	Mitofüsin 1
MFN2:	Mitofüsin 2
MMP:	Mitokondriyal membran potansiyeli

mPTP: Mitokondriyal geçirgenlik gözeneđi (mitochondrial permeability transition pore)

mtDNA: Mitokondriyal DNA

MTT: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotit

NF-κB: Nükleer faktör kappa B (NFKB)

NRTK: Non-reseptör tirozin kinaz

OECD: Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (Organisation for Economic Co-operation and Development)

OPA1: Optik atrofi 1

OXPHOS: Oksidatif fosforilasyon

P21: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü (CDKN1A)

PDGFR: Trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü

PDH: Piruvat dehidrojenaz

PDK: Fosfoinositid bağımlı protein kinaz

PZR: Polimer zincir reaksiyon

RET: Transfeksiyon sırasında yeniden düzenlenmiş kinaz

ROS: Reaktif oksijen türleri

RTK: Reseptör tirozin kinaz

Sit c: Sitokrom c

SOD2: Süperoksit dismutaz 2 (mitokondriyal süperoksid dismutaz)

SR: Sarkoplazmik retikulum

TCA: Trikarboksilik asit döngüsü

TEM: Transmisyon elektron mikroskop

TKİ: Tirozin kinaz inhibitörü

VEGFR: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü

ÖZET

Günaydın Akyıldız, A. (2020). Antineoplastik İlaç Lenvatinib Kaynaklı Kardiyotoksisitenin Moleküler Etki Mekanizmaları Açısından İn Vitro İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Lenvatinib, dirençli diferansiye tiroid kanseri, ilerlemiş renal hücreli karsinoma, anrezektabl hepatoselüler karsinoma ve endometriyal karsinoma tedavileri için onay almış bir çoklu kinaz inhibitörüdür. Kanser tedavisinde başarıyla kullanılmakla beraber, kardiyotoksisite gibi hayatı tehdit edebilecek düzeyde yan etkilere yol açabilmektedir. Lenvatinib'in neden olduğu kardiyotoksisitenin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

Bu çalışmada, Lenvatinib'in neden olduğu kardiyotoksisitenin moleküler mekanizması H9c2 kardiyomiyosit hücresinde mitokondriyal toksisiteye odaklanılarak incelenmiştir. Lenvatinib'in seçilen üç konsantrasyonda (1,25 μ M, 5 μ M ve 10 μ M) 48 ve 72 saat maruziyette hücre canlılığını; 72 saatte ise hücre içi ATP oranını anlamlı ölçüde inhibe ettiği belirlenmiştir. Akım sitometrisi yöntemiyle bakılan total mitokondri kütlesinde 48 saatte 10 μ M konsantrasyonda artış görülmüştür. Mitokondriyal membran potansiyelinde 48 saatte azalma, 72 saatte düzelme görülmüştür. Western blot yöntemiyle mitokondriyal elektron transport zinciri proteinleri (Kompleks I-V), Sitokrom c, LONP1 ve P21 protein seviyelerinde anlamlı değişim gözlenmiştir. Gerçek zamanlı PZR ile bakılan mitokondriyal dinamikler ("MFN1, MFN2, OPA1, DRP1, FIS1") gen ekspresyon seviyeleri anlamlı olarak değişmiştir. Lenvatinib 48 saatte mitokondrilerde füzyondan fisyona geçişi tetiklemiş, 72 saatte ise hem füzyon hem fisyonu artırmıştır. Apoptoz (ASK1 ve JNK) ve antioksidan enzim SOD2 genlerinde 48 saat 5 μ M ve 72 saat 10 μ M gruplarında artış bulunmuştur. MtDNA oranında 48 saatte artış, 72 saatte ise inhibisyon görülmüştür. Mitokondrilerin TEM görüntülemesiyle histolojik değerlendirilmesinde mitokondriyal şekil değişiklikleri saptanmıştır.

Lenvatinib'in konsantrasyona ve maruziyet süresine bağlı olarak hücresel strese yol açtığı ve bunun sonucunda mitokondriyal membran potansiyelini, mitokondriyal proteinleri ve ATP sentezini etkilediği, ROS üretimini artırdığı, mitokondriyal dinamikleri de bozmak suretiyle mitokondriyal hasarı indüklediği düşünülebilir. Bulgularımızın Lenvatinib ve diğer TKİ ilaçlarla tedavi sırasında sıklıkla karşılaşılan ve önemli bir yan etki olan kardiyotoksisitenin moleküler mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Tirozin kinaz inhibitörleri, Lenvatinib, kardiyotoksisite, in vitro, H9c2, Mitokondriyal hasar

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-26002

ABSTRACT

Gunaydin Akyildiz, A. (2006). In Vitro Investigation of the Antineoplastic Drug Lenvatinib-Induced Cardiotoxicity in Terms of Molecular Mechanisms. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Toxicology. Doctoral Thesis. İstanbul.

Lenvatinib is a multi-tyrosine kinase inhibitor (TKI) approved for the treatment of resistant differentiated thyroid cancer, advanced renal cell carcinoma, unresectable hepatocellular carcinoma, and endometrial carcinoma. Although it is successful in cancer treatment, it can cause life-threatening side effects such as cardiotoxicity. The molecular mechanism of cardiotoxicity caused by Lenvatinib is not fully known.

In this study, the molecular mechanism of Lenvatinib's cardiotoxicity was investigated focusing on mitochondrial toxicity in H9c2 cardiomyocyte cell line. Lenvatinib significantly inhibited cell viability at 48 and 72 hours exposure with three selected concentrations (1.25 μ M, 5 μ M and 10 μ M); and significantly inhibited intracellular ATP at 72 hours. Examined by the flow cytometry method, an increase in the total mass of mitochondria was observed in the 48 hour 10 μ M concentration group. Mitochondrial membrane potential was decreased after 48 hours and was recovered after 72 hours treatment. Evaluated with real-time PCR, mitochondrial dynamics (MFN1, MFN2, OPA1, DRP1, FIS1) gene expression levels significantly changed. Lenvatinib triggered the tendency from fusion to fission in mitochondria after 48 hours, and increased both fusion and fission after 72 hours. Apoptosis (ASK1 and JNK) and antioxidant enzyme SOD2 genes increased in the 48 hours 5 μ M and 72 hours 10 μ M treatment groups. The mtDNA ratio increased after 48 hours and decreased after 72 hours. Mitochondrial changes were detected in the histological evaluation of mitochondria by TEM imaging.

Lenvatinib causes cellular stress depending on the concentration and exposure time and affects mitochondrial membrane potential, mitochondrial proteins and ATP synthesis; increases ROS production, and induces mitochondrial damage by disrupting mitochondrial dynamics. The outcome of our study is expected to be a contribution to the understanding of the molecular mechanism of TKI-induced cardiotoxicity, an important side effect frequently encountered during treatment with Lenvatinib and other TKI medications.

Key Words: Tyrosine kinase inhibitors, Lenvatinib, Cardiotoxicity, in vitro, H9c2, Mitochondrial damage

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: TDK-2017-26002.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yirmi yılda yapılan çalışmalardan elde edilen kanıtlar, kanser oluşumu ile tümör hücrelerin sinyal yollarında bulunan moleküler değişikliklerin birbiriyle ilişkili olduğunu açığa çıkarmıştır. Erken teşhis stratejileri, modern cerrahi teknikler ve kanser terapötiklerine yönelik yeni yaklaşımlar sayesinde kanserden ölüm oranlarının 1990-2015 arasında %18 oranında düştüğü raporlanmıştır ancak hayatta kalma oranlarındaki bu olumlu gelişmeler, diğer taraftan da hedef dışı organ toksisite ile ilişkilendirilmektedir. Bu ciddi yan etkiler hastaların hayatlarını tehdit edebileceği için doz azalmasına ve/veya tedavinin kesilmesine neden olabilmektedir (Curigliano ve ark., 2016; Burstein ve ark., 2017; OECD, 2017).

Tirozin kinazlar, hücre biyolojisinin regülasyonunda reversibl fosforilasyon yoluyla metabolizmayı, hücre siklusunu, hücre proliferasyonunu, hücre ölümünü, farklılaşma ve onarım gibi pek çok yaşamsal faaliyeti kontrol eden sinyal yollarına etki eden enzimlerdir. Ayrıca patojenik anjiyogenez, lenf anjiyogenez, tümör gelişimi ve kanser ilerlemesinde de görev alırlar. Hücre büyümesinde ve anjiyogenezde fizyolojik olarak yer alan çeşitli tirozin kinazların ve reseptörlerinin mutasyon geçirdiği veya tümör hücrelerinde aşırı eksprese edildiği keşfedilmiştir. Bundan hareketle geliştirilen Tirozin Kinaz İnhibitörü (TKİ) ilaçlar, kanser hastaları için yaşam beklentilerini büyük oranda arttırmıştır. TKİ ilaçlar, kanser hücrelerinde artmış fosforilasyon aktivitesini inhibe ederek hücre sağ kalımını, proliferasyonu ve kanser gelişimiyle ilişkili migrasyonu engellemektedirler (Force ve Kolaja, 2011; Roskoski, 2015).

TKİ ilaçların, genellikle güvenli ve etkin olarak kabul edilmelerine ve kanser tedavisinde onkolojik başarıyı arttırmalarına karşın, başta kardiyotoksikite olmak üzere ciddi istenmeyen etkilere de yol açtığı bildirilmektedir. Bu yan etkiler bazen hekim ve hastayı doz azaltmaya, tedaviyi sonlandırmaya ve alternatif tedavi seçimine zorlayabilmektedir (Chen ve ark., 2008; Narayan ve Ky, 2018).

TKİ ilaçların istenmeyen etkileri hedefe yönelik (on-target) ve hedef dışı (off-target) olarak sınıflandırılmaktadır. Tümör hücrelerinin proliferasyonunu kontrol eden tirozin kinaz sinyal yolağının inhibe olmasından dolayı ortaya çıkan etkiler hedefe yönelik etkilere aittir. Bu yollar diğer doku ve organlarda da önemli fonksiyonlara sahiptir. Hedef dışı etkiler ise TKİ ilaçların hedeflenmeyen tirozin kinazları inhibe

etmesiyle ortaya çıkar. Hedef dışı etkilerin sebebi ilacın seçiciliğinin iyi olmaması veya ilacın daha etkili olması için özellikle “multikinaz” olarak tasarlanmış olmalarıdır. Yeni nesil TKİ ilaçların çoğu çeşitli kanser tiplerinin tedavisinde kullanılmak amacıyla non-selektif multikinaz olarak tasarlanmışlardır. Ancak bu özellik hem hedefe yönelik hem de hedef dışı kardiyotoksisite riskini de beraberinde getirmektedir. Bu etkiler; hipertansiyon, pulmoner hipertansiyon, kanama, venöz trombozis, pulmoner emboli, arteriyal tromboz, QT intervalinde değişiklikler ve sol ventrikül disfonksiyonu şeklinde görülmektedir (Orphanos ve ark., 2009; Shah ve Morganroth, 2015; Yang ve Papoian, 2018).

Lenvatinib, 2015 yılında radyoaktif iyot tedavisine dirençli diferansiye tiroid kanseri tedavisi için onay almış olan, oral yolla alınan bir tirozin multikinaz inhibitörüdür. Hedeflediği tirozin kinazlar ile anjiyojenez işlemlerine müdahale eder. Ayrıca Lenvatinib, RET ve c-KIT onkogenlerini de inhibe ederek tümör hücre proliferasyonunu kontrol edebilmektedir (Bruheim ve ark., 2011; Krajewska ve ark., 2015; Schlumberger ve ark., 2016; Hussein ve ark., 2017). Lenvatinib’in FDA tarafından onaylanmış diğer endikasyonları 2016 yılında ilerlemiş renal hücreli karsinoma; 2018 yılında anrezektabl hepatoselüler karsinoma ve 2019 yılında endometriyal karsinomadır (U.S. FDA, 2019). Lenvatinib’in, ayrıca melanoma, küçük moleküllü olmayan akciğer karsinoması, glioblastoma multiforme, yumurtalık ve endometriyal karsinomada solid tümörlere karşı monoterapi veya kombinasyon tedavisi şeklinde kullanımı üzerine araştırmalar sürmektedir (National Institutes of Health, 2019).

Lenvatinib’e ait yan etkilerden en sık karşılaşılanları hipertansiyon, kardiyak disfonksiyon, arteriyal tromboembolik olaylar, hepatotoksisite, renal yetmezlik, gastrointestinal perforasyon ve fistül oluşumu, QT interval uzaması, hipokalsemi, reversibl posterior lökoensefalopati sendromu ve hemorajik olaylardır. Ayrıca, Faz 3 çalışmalarında hipertansif kriz ve kardiyak disfonksiyon bildirilmiştir (Schlumberger ve ark., 2015; Scott, 2015). Lenvatinib’in kardiyotoksisitesinin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

Bu çalışmada Lenvatinib’in indüklediği kardiyotoksisitenin nedenleri H9c2 kardiyomiyosit hücresinde mitokondriyal toksisiteye odaklanılarak moleküler düzeyde incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Protein Kinaz İnhibitörleri

Hedefe yönelik tedaviler, kanserin büyümesinde, ilerlemesinde ve yayılmasında rol oynayan belirli moleküllere ("moleküler hedefler") müdahale ederek kanserin büyümesini ve yayılmasını engelleyen ilaç veya diğer maddelerin kullanıldığı tedavi yöntemleridir. Kanserın spesifik genlerini, proteinlerini veya kanser hücrelerinin büyümesine katkı sağlayan mikro çevresini hedefleyerek çalışmaktadır. Hedeflenen bu genler ve proteinler kanser hücrelerinde veya kan damarı hücreleri gibi kanser hücrelerinin çoğalmasına ve büyümesine katkı sağlayan hücrelerde bulunabilmektedir (Sawyers, 2004; National Institutes of Health, 2020).

Hanahan ve Weinberg'in yayınlamış olduğu hemen hemen tüm insan tümör tipleri tarafından ortak olarak paylaşılan "*Hallmarks of Cancer*" doğrultusunda, hedefe yönelik tedavilerin kullanımı üzerine klinik ve preklinik çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir.

Kanserin sahip olduğu özellikler (Hanahan ve Weinberg, 2000):

- Büyüme sinyallerinde kendi kendine yetebilirlik
- Anti-büyüme sinyallerine duyarsızlık
- Apoptoz'dan sıyrılma/kaçma
- Sınırsız çoğalma potansiyeli
- Sürekli anjiyogenez
- Doku invazyonu ve metastaz

Bu altı özelliğe ilaveten 2011 yılında; "Tümör tetikleyici inflamasyon, genom instabilitesi ve mutasyon, enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve immün tahribatından kaçma" eklenerek güncelleme yapılmıştır. Günümüzde hedeflendirilmiş terapi yöntemleri bu özellikler doğrultusunda kanserin spesifik karakteristiğine göre çeşitli hedeflere etki etmek üzere tasarlanmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Kanser tedavisinde kullanım için birçok farklı hedefe yönelik tedavi Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (U.S. Food and Drug Administration; FDA) tarafından

onaylanmıştır. Bu tedaviler arasında hormon terapileri, sinyal iletimi inhibitörleri, gen ekspresyon modulatorleri, apoptoz indükleyicileri, anjiyogenez inhibitörleri, immünoterapiler ve toksik moleküller sağlayan antikörler bulunmaktadır. Ayrıca en çok hedeflenen terapilerden olan küçük moleküllü inhibitörler günümüz kanser ilaçlarının arasında ön plandadır.

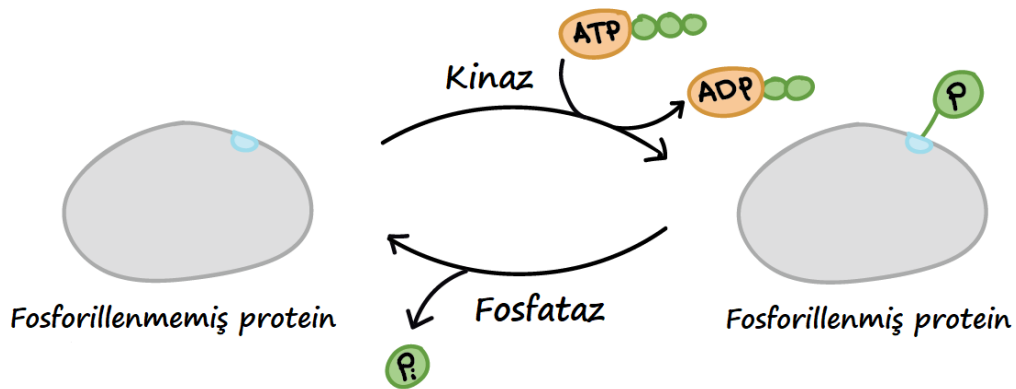
Küçük moleküllü inhibitörler nispeten hücrelere kolayca girebildiği için hücrenin içerisinde yer alan hedeflere yönelik geliştirilmiştir. Bu bileşikler genellikle ≤ 500 Da boyutundadır ve oral yoldan verilir. Küçük boyutları ayrıca plazma zarı boyunca yer değiştirmelerine ve hücre yüzeyi reseptörlerinin ve hücre içi sinyal moleküllerinin sitoplazmik alanı ile etkileşime girmelerine izin verir. Bu ilaçlar, çeşitli hücre içi ve hücre dışı sinyal yollarının aşırı aktivasyonuna dayanan kanserin çoğalmasını ve yayılmasını engeller. Küçük moleküllü kanser ilaçları, küçük boyutlarından ötürü, hücre dışı, hücre yüzeyi ligand bağlayıcı reseptörlerini hedef alabildiği gibi hücre büyümesi ve metastaz teşviki için akış aşağı (transduction/transdüksiyon) sinyalin aktarılmasında anahtar rol oynayan hücre içi proteinleri hedef almada başarıyla kullanılmaktadır. Bu ilaçların çoğu, serin / treonin kinazlar ve tirozin kinazlar, matriks metalloproteinazlar, ısı şok proteinleri, proteozom ve sinyal iletim yollarında rol oynayan diğer proteinler gibi kritik kanser hedeflerini inhibe edebilmektedir (Lavanya ve ark., 2014).

Protein kinazlarda oluşan düzensizlikler ve genetik değişiklikler; otoimmün, kardiyovasküler, enflamatuvar ve sinir hastalıkları ve kanser de dahil olmak üzere birçok hastalığın patogenezinde yer aldığından, bu enzim grubu son 20 yılda en önemli farmasötik hedeflerden biri haline gelmiştir (Cohen, 2002; Roskoski, 2015; Sharma ve ark., 2017). Protein kinazlar, ökaryotlarda en büyük gen ailelerinden birisidir. İnsan genomu bir fosfat grubunu ATP'den serin, treonin veya tirozin protein kalıntılarına aktaran 518 adet protein kinazı kodlar. FDA onaylı ilaçlar protein kinaz süper ailesi “kinom” içerisinde 20 farklı protein kinazı hedefleyerek etki göstermektedirler (Manning ve ark., 2002; Bhullar ve ark., 2018). Kinazlar fosforillenen OH gruplarının bağlı olduğu proteinin çeşidine göre sınıflandırılmaktadır (Tablo 2-1). Bu kinazların çoğunun, kanserinin başlaması ve ilerlemesi ile ilişkili olduğu belirtilmektedir.

Tablo 2-1: Protein Kinazlar

- **Tirozin kinazlar** (90 adet): Reseptör tirozin kinazlar (58 adet) ve non-reseptör tirozin kinazlar (32 adet)
- Tirozin kinaz-benzeri enzimler (43 adet)
- Serin/treonin kinazlar (385 adet)

Bu enzimler reversibl fosforilasyon reaksiyonunu katalizleyerek işlem görmektedirler. ATP'nin terminal fosfatının protein substratlarına transferini katalizlerler (Şekil 2-1). Substratlar genellikle serin/treonin veya tirozin kalıntıları olan protein substratlarıdır. Bir proteinin bazı bölgelerindeki fosforilasyon stimülatör etki gösterirken bazıları inhibitör etkili olabilmektedir.

**Şekil 2-1: Protein fosforilasyonunun şematik gösterimi**

2.2. Tirozin Kinaz İnhibitörleri (TKİ)

Hücre büyümesinde ve anjiyogenezde fizyolojik olarak yer alan çeşitli tirozin kinazların ve reseptörlerinin mutasyon geçirdiği veya tümör hücrelerinde aşırı eksprese edildiği keşfedilmiştir. Bundan hareketle geliştirilen TKİ ilaçlar kanser hastaları için yaşam beklentisini büyük oranda arttırmıştır. TKİ ilaçlar, kanser hücrelerinde artmış fosforilasyon aktivitesini inhibe ederek hücre sağ kalımını, proliferasyonu, ve kanser gelişimiyle ilişkili migrasyonu engellemektedir (Roskoski, 2015; Jiao ve ark., 2018).

FDA tarafından onaylanan ilk TKİ ilaç 2001 yılında kronik myeloid lösemi için geliştirilen Imatinib'tir. 2001'den günümüze 52 adet küçük moleküllü kinaz inhibitörü vardır. Bunlardan 28 tanesi reseptör tirozin kinaz inhibitörüdür, 11 tanesi non-reseptör

tirozin kinaz inhibitörüdür. 13 tanesi ise serin/treonin protein kinazları hedeflemektedir. Onaylanan ilaçların en az 21 tanesi çoklu kinaz inhibitörüdür. Çoklu kinaz inhibitörlerin potansiyel avantajları ve dezavantajları vardır. Bu tür ilaçların terapötik etkinliğinin, birden fazla enzimin inhibisyonu ile ilişkili olması mümkündür. Bununla birlikte, hedef dışı enzimlerin inhibisyonu olumsuz yan etkilere yol açmaktadır (Roskoski, 2019a, 2019b).

Tirozin kinazlar, transmembran reseptör tirozin kinazlar (RTK) ve sitoplazmik non-reseptör tirozin kinazlar (NRTK) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. RTK'ler, hücre dışı sinyalleri sitoplazmaya ve daha sonra bir dizi sinyal yolu aktivasyonuna yol açarak çekirdeğe iletirken, sitozol ve çekirdekte reseptör olmayan tirozin kinazlar hücre içi sinyaller tarafından aktive edilir. RTK'ler, spesifik ligandlarının bağlanması ve akabinde oligomerizasyon ile aktive edilen transmembran glikoproteinlerdir; bunlar daha sonra bu dış sinyali, otofosforilasyon ile tirozin kalıntıları ve aşağı akış proteinler yoluyla sitoplazmaya iletirler. Hücre membranında bulunan RTK'ler sinyal iletimi yollarının aktive olmasında merkezi bir role sahiptir. Bu yollar hücre proliferasyonu, migrasyonu, apoptoz ve diferansiyasyon gibi hücresel işlemlerin kontrolüyle ilgilidirler. Ayrıca patojenik anjiyogenez, lenf anjiyogenez, tümör gelişimi ve kanser ilerlemesinde de görev alırlar (Schlessinger ve Ullrich, 1992; Zhang ve ark., 2009). RTK'ler 20 alt aileye (tip) mensup toplamda 58 üyeden oluşur (Tablo 2-2) ve aralarında epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR'ler), fibroblast büyüme faktörü reseptörleri (FGFR'ler), Fms benzeri tirozin kinaz 3 (FLT3), trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) ve kök hücre büyüme faktörü reseptörü (proto-onkogen c-KIT) gibi oldukça önemli kinazlar bulunmaktadır.

Tablo 2-2: Reseptör Tirozin Kinazlar (Alexander ve ark., 2019)

Tip I RTK: ErbB (epidermal büyüme faktörü) reseptör ailesi
Tip II RTK: Insulin reseptör ailesi
Tip III RTK: PDGFR , CSFR, Kit , FLT3 reseptör ailesi
Tip IV RTK: VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) reseptör ailesi
Tip V RTK: FGF (fibroblast büyüme faktörü) reseptör ailesi
Tip VI RTK: PTK7/CCK4
Tip VII RTK: Neurotrofin reseptör/Trk ailesi
Tip VIII RTK: ROR ailesi

-
- Tip IX RTK: MuSK
 - Tip X RTK: HGF (hepatosit büyüme faktörü) reseptör ailesi
 - Tip XI RTK: TAM (TYRO3-, AXL- and MER-TK) reseptör ailesi
 - Tip XII RTK: TIE ailesi anjiyopoietin reseptörleri
 - Tip XIII RTK: Ephrin reseptör ailesi
 - Tip XIV RTK: **RET**
 - Tip XV RTK: RYK
 - Tip XVI RTK: DDR (collagen reseptör) ailesi
 - Tip XVII RTK: ROS reseptörleri
 - Tip XVIII RTK: LMR ailesi
 - Tip XIX RTK: Lökosit tirozin kinaz (LTK) reseptör ailesi
 - Tip XX RTK: STYK1
-

Hücre dışı bir yapısı olmayan NRTK'ler ise RTK'ler ve G-proteini ile bağlanmış reseptörler gibi diğer hücre yüzeyi reseptörleri tarafından tetiklenen sinyalleme kaskadının ayrılmaz bir parçasını oluştururlar. NRTK'ler, alan yapısındaki benzerliklerine dayanarak on ana alt aileye bölünmüş 32 üyeden oluşur. Bunların arasında c-SRC, FYN, JAK1, JAK2 ve BTK gibi önemli kinazlar bulunmaktadır. NRTK'lerin aktivasyonu aşağı akış yolağındaki moleküllere transfosforilasyon sinyal iletimini sağlayan protein-protein etkileşimlerini içeren bir mekanizmadır (Marcinkowska ve Gocek, 2016). Hücre içi sinyal yollarına sonraki bölümlerde daha ayrıntılı değinilecektir.

Tez çalışmasının konusu olan Lenvatinib'in hedefi VEGFR, FGFR, PDGFR, c-KIT ve RET reseptör tirozin kinazlardır.

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörleri (VEGFR)

VEGFR1, VEGFR2 ve VEGFR3'ten oluşmaktadırlar. Solid tümörlerin malign büyümesi ve metastazında önemli işlevi olan neovaskülarizasyonda rol oynamaktadırlar. "Anjiyogenez" de denilen bu oluşum, tümör büyümesi için gerekli olan besin ve oksijenin iletilmesini sağlayan yeni damarların oluşumunu sağlar. VEGFR ekspresyon seviyesi ile vaskülarizasyon derecesi ve tümör dokusunun malignitesi arasında anlamlı pozitif korelasyon olduğu bulunmuştur. VEGFR ailesi anjiyogenez ve lenfanjiyogenezin kilit düzenleyicileridir; bu nedenle, metastatik kanser gibi durumlar için ilaç keşfinin odağı olmaktadır (Jiao ve ark., 2018). Bununla beraber sağlıklı hücrelerin de VEGFR inhibitörlerinden etkilenmesi bu ilaç grubunun genel bir advers

etkisi olan hipertansiyon şeklinde kendini göstermektedir. TKİ ilaçların kardiyotoksitesinin altında yatan mekanizmalardan birinin VEGFR inhibisyonu kaynaklı olabileceği belirtilmektedir (Jensen ve ark., 2017; Touyz ve Herrmann, 2018).

Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörleri (FGFR)

FGF'ler gelişim süreçlerinin kilit düzenleyicileridir. Özellikle akciğerlerin, uzuvların, dolaşım ve merkezi sinir sisteminin, orta beynin ve iç kulağın oluşumu sırasında FGF'lerin önemli rolleri bulunmuştur. Yetişkin organizmalarda, yara iyileşmesi doku onarımı, anjiyogenez, pro-apoptotik sinyallere direnç, aynı zamanda gelişimsel süreçlerin bir kalıntısı olarak kanserlerde epitelyalden mezenkimal geçişte görev alırlar. FGF'lerin mitojenik, pro-anjiyojenik ve epitelyal mezenkimal dönüşüm indükleyici aktiviteleri, kanserlerin gelişmesinde ve yayılmasında önemli rol oynar. FGFR'ler hiperaktifleştiği durumlarda kanser oluşumu gözlenmekte olduğu için anti-kanser tedavisi olarak bu reseptörleri hedefleyerek inhibe etmek üzerine çok sayıda küçük molekülü TKİ ilaç geliştirilmiştir (Lee ve Secord, 2014; Marcinkowska ve Gocsek, 2016).

Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörleri (PDGFR)

PDGF, iki hücre yüzeyi tirozin kinaz reseptörü, PDGFR α ve PDGFR β aracılığıyla sinyal verir. PDGFR esas olarak fibroblastlarda, düz kas hücrelerinde, böbrekte, testiste ve beyinde eksprese edilmektedirler. Özellikle bağ doku ve gelişmekte olan sinir sistemi gibi hücrelerde PDGF'nin mitojenik özelliği ön plandadır. PDGF kemo-çekici özelliklere sahiptir ve kemik oluşumu, eritropoez, yara iyileşmesi; böbrek, beyin, kardiyovasküler ve solunum sistemlerinin normal gelişiminde rol oynadığı saptanmıştır. PDGFR, kardiyovasküler gelişimde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca anjiyogenezde VEGFR ve FGFR ile birlikte görev almaktadır (Raica ve Cimpean, 2010). Son 10 yılda PDGF/PDGFR ekseninin hem normal hem de tümör koşullarında anjiyogenez geliştirilmesine katkısını destekleyen çok sayıda kanıt toplanmıştır (Jechlinger ve ark., 2006; Jiao ve ark., 2018).

c-KIT (KIT Proto-onkogen, CD117, Mast/Kök Hücre Büyüme Faktörü Reseptörü)

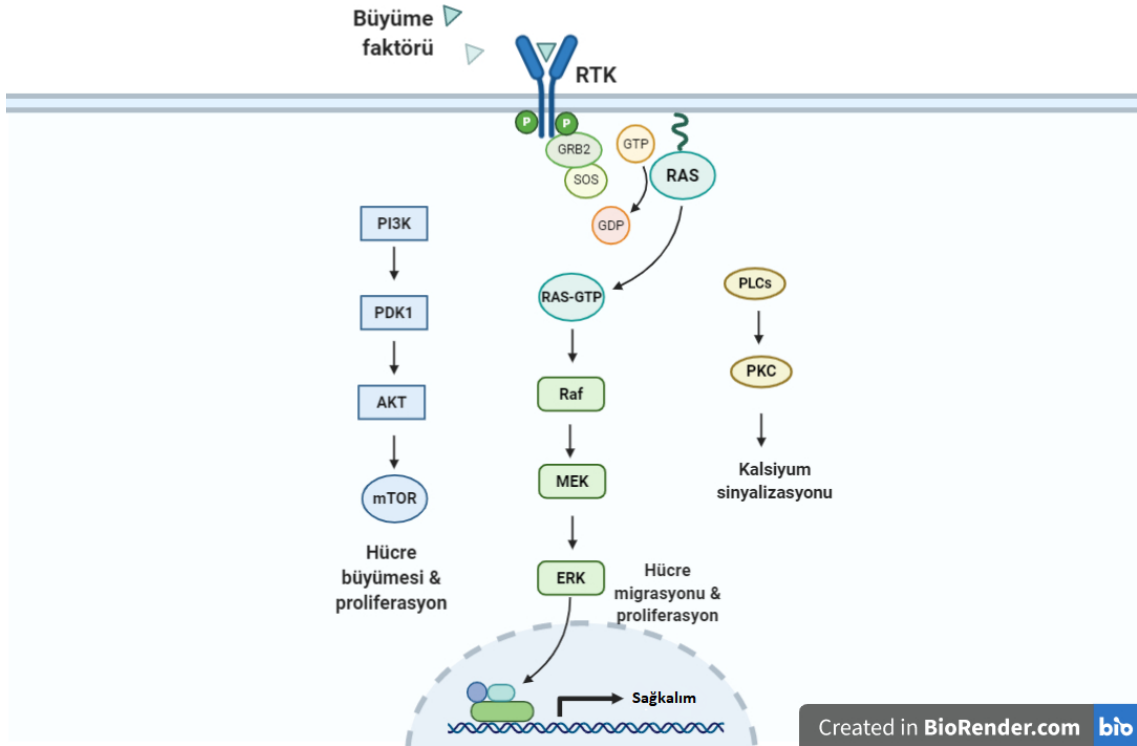
Bu reseptörler kök hücre faktörü (stem cell factor; SCF) veya mast hücre büyüme faktörü olarak bilinen KIT ligand tarafından aktive olmaktadır. Son zamanlarda, c-KIT'in çoklu insan neoplastik hastalıklarının patogenezinde rol oynadığı

bulunmuştur ve ligand yokluğunda yapısal olarak aktif bir KIT ürününe yol açan c-KIT mutasyonları saptanmıştır. Anormal KIT ekspresyonu, küçük hücreli akciğer kanseri, prostat kanseri ve akut miyeloblastik lösemi dahil olmak üzere çoklu neoplazmlarda giderek daha fazla tanımlanmaktadır (Abrams ve ark., 2003; Webster ve ark., 2006).

RET Proto-onkogeni

RET proto-onkogen (transfeksiyon sırasında yeniden düzenlenmiş; Rearranged during transfection; RET), GDNF ailesi reseptörü ailesi için sinyalleşmeyi sağlayan bir transmembran tirozin kinaz enzimidir. GDNF ailesi, glial hücre hattı türevi olan nörotrofik faktör olarak tanımlanan ekstrasik bir tirozin kinaz reseptörü ailesidir (Alexander ve ark., 2019). RET; hücre yaşamını, farklılaşmasını, çoğalmasını, göçünü, kemotaksisini, dallanma morfogenezini, nörit büyümesini ve sinaptik plastisiteyi düzenleyen birden fazla hücre içi sinyalleşme kaskadını aktive eder. RET reseptör tirozin kinazındaki mutasyonların neden olduğu çeşitli hastalıklar vardır. Örneğin, tiroid karsinomu ve Hirschsprung hastalığında RET'in farklı mekanizmalarla mutasyon geçirdiği gösterilmiştir (Arighi ve ark., 2005). Moleküler hedeflerinden birisi RET olan Lenvatinib'in ilk onay alan endikasyonu tiroid kanserinin bir çeşidi olan radyoaktif iyot tedavisine dirençli diferansiye tiroid kanseridir (Scott, 2015).

Temelde aynı şekilde çalışan farklı hücre içi sinyal yolları bulunmaktadır. Bunlardan PI3K-AKT-mTOR yolağı, RAS-Raf-MEK-ERK yolağı ve PLC- γ -CaMK yolağı RTK aktivasyonu ile başlayan aşağı akış sinyal yollarından en önemlileridir (Şekil 2-2). Bu yolların herhangi bir aşamasındaki bozukluk veya aşırı aktivasyon tümör jenezise yol açabilmektedir. TKİ ilaçların çalışma prensibi burada yatmaktadır: Tümör hücrelerinde sağlıklı hücrelere göre anormal çalışan bu yolları inhibe ederek tümör hücrelerinin çoğalmasını engellemek.



Şekil 2-2: RTK aktivasyonu ile başlayan aşağı akış sinyalizasyon yolları

Normal (sağlıklı) hücrelerde, tirozin kinazların seviyesi ve ikincil hedef aktivasyonu, büyüme faktörleri/sitokinlerin mevcudiyeti veya kinazların ve fosfatazların zıt etkileri dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Tirozin kinazların dengesiz bir şekilde aktive olması onkojenizasyonu başlatabilmektedir (Marcinkowska ve Gocek, 2016).

2.2.1. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Advers Etkileri

TKİ'lerin genellikle güvenli ve etkin olarak kabul edilmelerine ve kanser tedavisinde onkolojik başarıyı arttırmalarına karşın ve özellikle sistemik sitotoksik kemoterapiye kıyasla nispeten iyi tolere edildiği düşünülse de, bu ilaçların kullanımını sınırlayan birçok istenmeyen etki görülmektedir. İlaçtan ilaca değişiklik göstermekle beraber en sık görülen etkiler; kardiyotoksikite, hematolojik yan etkiler (anemi, trombositopeni, nötropeni), deri toksisitesi, gastrointestinal yan etkiler ve hipotiroidizmdir (Chen ve ark., 2008; Hartmann ve ark., 2009; Narayan ve Ky, 2018). TKİ kullanan diferansiye tiroid kanseri hastalarının % 40'ında özellikle hipertansiyon, ishal, asteni veya yorgunluk, mide bulantısı, kilo kaybı ve iştahsızlık gibi olumsuz

etkiler meydana gelmiştir (Krajewska ve ark., 2017; Kudo ve ark., 2018). Bu yan etkiler, iyi tümör cevabı alınmasına rağmen dozun azaltılmasına neden olmuştur. TKİ tedavisi geçiren hastaların yaklaşık % 14'ü istenmeyen etkiler nedeniyle tedaviyi bırakmak zorunda kalmıştır (Hor Yue Tan, 2019).

TKİ ilaçların istenmeyen etkileri hedefe yönelik (on-target) ve hedef dışı (off-target) olarak sınıflandırılmaktadır. Tümör hücrelerinin proliferasyonunu kontrol eden tirozin kinaz sinyal yolağının inhibe olmasından dolayı ortaya çıkan etkiler hedefe yönelik etkilerdir. Bu yollar diğer doku ve organlarda da önemli fonksiyonlara sahiptir. Hedef dışı etkiler ise TKİ ilaçların hedeflenmeyen tirozin kinazları inhibe etmesiyle ortaya çıkar. Hedef dışı etkilerin sebebi ilacın seçiciliğinin iyi olmaması veya ilacın daha etkili olması için özellikle “multikinaz” olarak tasarlanmış olması olabilmektedir. Yeni nesil TKİ ilaçların çoğu, çeşitli kanser tiplerinin tedavisinde kullanılmak amacıyla non-selektif multikinaz olarak tasarlanmışlardır. Ancak bu özellik hem hedefe yönelik hem de hedef dışı kardiyotoksisite riskini de beraberinde getirmektedir (Orphanos ve ark., 2009; Shah ve Morganroth, 2015; Yang ve Papoian, 2017).

2.2.2. Tirozin Kinaz İnhibitörleri Kaynaklı Kardiyotoksisite

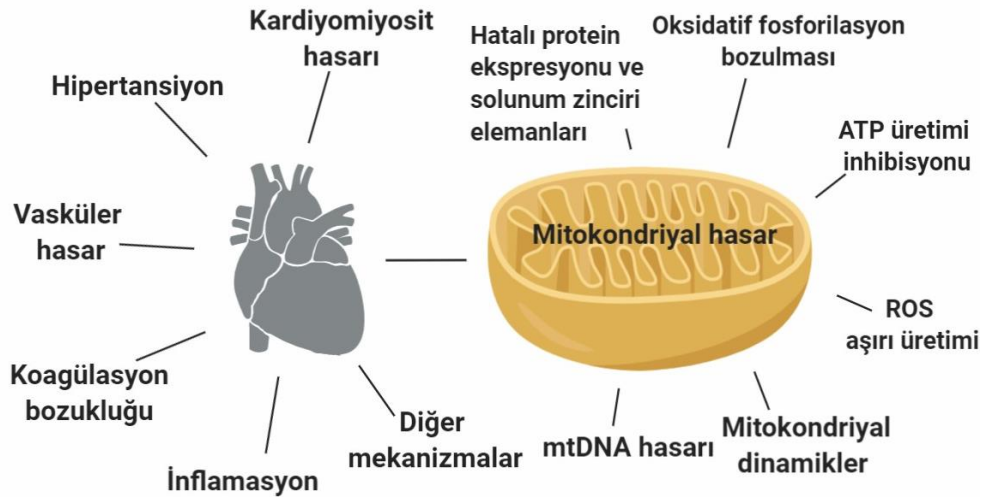
TKİ ilaçların hedeflediği kanser hücrelerinin hayatta kalma yolları aynı zamanda kardiyomiyositlerin önemli yaşamsal faaliyetlerinin düzenlenmesinde görevli olduğu için kardiyotoksisite ortaya çıkabilmektedir. Öte yandan TKİ ilaçlar ATP bağlanma ceplerini hedeflediği ve multi-kinaz inhibitörü olarak tasarlandıkları için hedef-dışı kinazları da inhibe edebilmekte veya non-kinaz proteinleri hedefleyebilmektedir. Bu durumlarda hedef dışı kardiyotoksisite görülebilmektedir (Montaigne ve ark., 2012).

2001 yılında tirozin kinaz inhibisyonu için geliştirilen ilk ilaçlardan olan Imatinib'in kardiyotoksisite ile ilgili ilk raporları FDA onayından 5 yıl sonra yayınlanmıştır (Kerkelä ve ark., 2006). TKİ kaynaklı kardiyotoksisitenin araştırılmaya başlanmasıyla tirozin kinazların kalp hücrelerindeki önemli işlevleri açığa çıkmıştır. Bu önemli işlevlerinden dolayı kalpte bulunan tirozin kinazların inhibe olmasıyla kardiyotoksisite ortaya çıkabilmektedir. Bu işlevler başlıca şöyle sıralanabilir; hayatta kalma sinyalinin oluşumu, mitokondriyal ve sarkoplazmik retikulum homeostazının

sağlanması, kalbin elektriksel ve kasılma fonksiyonunun sağlanması (Shim ve ark., 2017).

TKİ kaynaklı kardiyotoksisite subakut, akut veya kronik bir şekilde gelişebilmektedir. Akut veya subakut kardiyotoksisite, tedavinin başlamasıyla birlikte herhangi bir zamanda gözlemlenebilmekte ve tedavinin sonlanmasından 2 hafta sonraya kadar devam etmektedir. Ventriküler repolarizasyonda ve elektrokardiyografik QT-aralık değişikliklerinde anormalliklerin ortaya çıkması; supraventriküler ve ventriküler aritmiler veya akut kronik sendromlar ve perikardit ve/veya miyokardit benzeri sendromlar ile karakterize edilmektedir. Kronik kardiyotoksisite ise kemoterapinin sonlanmasından sonraki bir yıl içerisinde veya bir yıldan fazla bir sürede kendini gösterebilmektedir. En tipik özelliği, asemptomatik sistolik ve/veya diastolik sol ventrikül fonksiyon bozukluğudur ki bu bozukluk şiddetli konjestif kardiyomiyopati ve sonuçta ölüme sebebiyet verebilmektedir (Albini ve ark., 2010). Bir çalışmada TKİ tedavisi (VEGF-TKİ tedavisi) alan böbrek hücreli karsinom hastalarının % 73'ünde kardiyotoksisite geliştiği belirtilmiştir (Mellor ve ark., 2011; Hall ve ark., 2013; Shah ve Morganroth, 2015; Jensen ve ark., 2017).

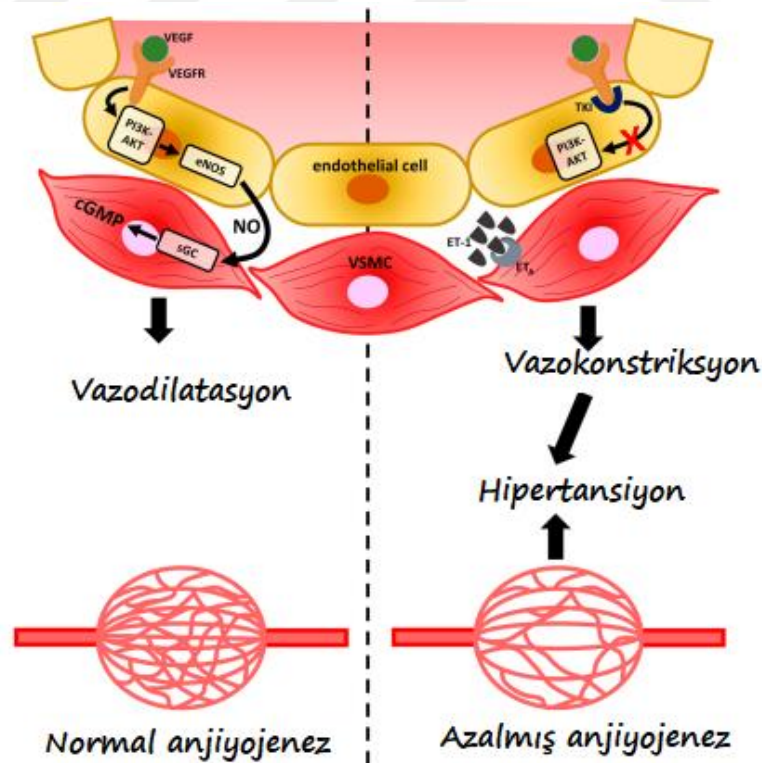
TKİ indüklü kardiyotoksisiteye sebep olduğu söylenen mekanizmalar Şekil 2-3'te şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2-3: TKİ indüklü kardiyotoksisiteye sebep olan mekanizmaların şematik gösterimi. Sağ tarafta mitokondri ile ilgili işlevlere odaklanılmıştır.

Mitokondriyal homeostazın bozulmasının ciddi kardiyovasküler sorunlara yol açabileceğine dair çalışmalar vardır (Wu ve ark., 2019). Örneğin, multikinaz inhibitörü Imatinib ve Sunitinib ile yapılan *in vitro* çalışmalarda mitokondriyal toksisitenin kardiyotoksositeye yol açabileceği gösterilmiştir (Kerkelä ve ark., 2006; Force ve ark., 2007). Çalışmanın ileriki bölümlerinde kardiyotoksositeye sebep olabilen mitokondriyal toksisite üzerinde daha ayrıntılı durulacaktır.

Hipertansiyon, TKİ ilaçların sınıf etkisi olarak kabul edilirken temel olarak anti-anjiyojenik ilaçlardan kaynaklanır ve kalp risk faktörlerinin artmasına katkıda bulunabilmektedir. Hipertansiyon mekanizması VEGF reseptörüne TKİ bağlanmasıyla PI3K-AKT sinyalizasyon yolunun inhibe olmasına dayandırılmaktadır (Şekil 2-4). Hipertansiyon, ateroskleroz için tek ve en önemli risk faktörü olmasının yanı sıra kalp yetmezliği, koroner arter hastalığı, felç, böbrek hastalığı ve periferik arter hastalığı için bağımsız bir predispozan faktördür. Ayrıca; intraserebral kanama, subaraknoid kanama, stabil angina pectoris, miyokard enfarktüsü, aort anevrizması ve kalp yetmezliği gibi pek çok yüksek mortalite oranına sahip kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olabilmektedir (Rapsomaniki ve ark., 2014; Ancker ve ark., 2017).



Şekil 2-4: VEGFR inhibisyonu kaynaklı hipertansiyon oluşumu (Ancker ve ark., 2017)

Kardiyotoksisiteye sebep olabilen mekanizmalardan bir diğeri de inflamasyondur. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve pro-enflamatuar sitokinler miyokard enflamasyonunda rol oynar. Kardiyovasküler patolojilerin ilerlemesinde, nükleer faktör kappa-B (NF-κB) sinyalleme sinin indüklenmesi ve aktivasyonu gibi enflamatuar yollar bulunmaktadır. Kalbin strese dayanma kabiliyeti, HER ligandları tarafından aktive edilen ve aktivatör protein-1 ve NF-κB'yi içeren hücrenin hayatta kalmasına yol açan bir protein ağına bağlıdır. Aktivatör protein-1 ve NF-κB, stres ve iltihaplanmalara hücre sel cevapta rol oynayan genleri düzenler. Proinflamatuar sinyalin TKİ tedavisinden sonra kardiyotoksisite ile ilişkili olup olmadığı kesin olmamakla birlikte bununla ilgili çalışmalar sürmektedir (Albini ve ark., 2010; Ahn ve Kim, 2012).

Bunların dışında advers kardiyak olaylarla ilişkili başka mekanizmalar üzerine de çalışılmaktadır. Kalp hücrelerine zarar veren otofaji, TKİ kaynaklı hücre sel toksitenin başka bir mekanizması olabilir. Sorafenib, Dasatinib ve Regorafenib bu sınıfın ilaçlarıdır (Weng ve ark., 2015; Vaidya ve ark., 2018). Ayrıca, TKİ ilaçların neden olduğu hipotiroidizmin bozulmuş endotel fonksiyonuna dönüşebileceğine ve kardiyak debiyi azaltarak kardiyotoksisite gelişme potansiyeline katkıda bulunabileceğine dair çalışma mevcuttur (Ripoli ve ark., 2005).

Bunların yanısıra, ilerlemiş yaş ve önceden geçirilmiş miyokard infarktüsü, koroner arter hastalığı öyküsü olan veya diyabet gibi kronik hastalığı olan hastalarda TKİ tedavisi ile kalp yetmezliği ve kardiyomiyopati gelişmesi daha olasıdır (Chu ve ark., 2007; Billemont ve ark., 2008; Sudasena ve ark., 2012).

2.3. Lenvatinib

Lenvatinib (E7080; 4-[3-chloro-4-(N'-cyclopropylureido) phenoxy] 7-methoxyquinoline-6-carboxamide mesylate) oral yolla alınan ve VEGFR, FGFR, PDGFR-alfa reseptörlerini inhibe eden bir tirozin multikinaz inhibitörüdür. 2015 yılında radyoaktif iyot tedavisine dirençli diferansiye tiroid kanseri tedavisi için onay almış olan Lenvatinib, hedeflediği tirozin kinazlar ile anjiyogenez işlemlerine müdahale eder. Ayrıca Lenvatinib, RET ve c-KIT onkogenlerini de inhibe ederek tümör hücre proliferasyonunu kontrol edebilmektedir (Bruheim ve ark., 2011; Krajewska ve ark., 2015; Schlumberger ve ark., 2016; Hussein ve ark., 2017). Lenvatinib'in FDA tarafından onaylanmış diğ er endikasyonları 2016 yılında ilerlemiş renal hücreli

karsinoma; 2018 yılında anrezektabl hepatoselüler karsinoma ve 2019 yılında endometriyal karsinomadır (U.S. FDA, 2019). Ayrıca; melanoma, küçük molekülü olmayan akciğer karsinoması, glioblastoma multiforme, yumurtalık ve endometriyal karsinomada solid tümörlere karşı monoterapi veya kombinasyon tedavisi şeklinde kullanımı üzerine araştırmalar sürmektedir (National Institutes of Health, 2019).

Lenvatinib'in diğer TKİ ilaçlardan ayrılan en önemli özelliği FGFR1'i de inhibe etmesidir. Böylelikle VEGF/VEGFR inhibitörlerine dirençli vakalarda etkili bir ilaç olmaktadır. X-ray kristallografi ve kinetik etkileşim çalışmalarına dayanarak Lenvatinib'in VEGFR2'nin ATP bağlayıcı bölgesine bağlandığı ve bununla birlikte komşu bölgesine siklopropan halkasıyla bağlanarak tirozin kinaz aktivitesini ve ilişkili yolları inhibe ettiği belirtilmektedir. Bu bağlanma şekli diğer VEGFR2 kinaz inhibitörlerinden farklıdır (Scott, 2015; Lorusso ve ark., 2016).

Lenvatinib için bildirilen yan etkilerden en sık karşılaşılanları; hipertansiyon, kardiyak disfonksiyon, arteriyal tromboembolik olaylar, hepatotoksisite, renal yetmezlik, gastrointestinal perforasyon ve fistül oluşumu, QT interval uzaması, hipokalsemi ve hemorajik olaylardır. Ayrıca, Faz 3 çalışmalarında hipertansif kriz ve kardiyak disfonksiyon bildirilmiştir (Schlumberger ve ark., 2015; Scott, 2015). Tablo 2-3'te Lenvatinib'in diferansiye tiroid kanseri ve renal hücreli karsinoma tedavisinde tedavi sonlandırmaya veya doz azaltmaya sebep olan advers etkilerinin listesi verilmiştir. Özellikle diyabetes mellitus, kardiyovasküler hastalık sahibi olanlar ve kronik böbrek hastaları TKİ kaynaklı istenmeyen etkilerden daha fazla etkilenmektedirler. Lenvatinib'in kardiyotoksisitesinin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir, eldeki veriler klinikte ilacın kullanılmasına bağlı oluşan advers etkilerden elde edilen bilgilerle sınırlıdır.

Tablo 2-3: Lenvatinib'in tedavi sonlandırmaya veya doz azaltılmasına sebep olan advers etkileri (U.S. FDA ve CDER, 2015)

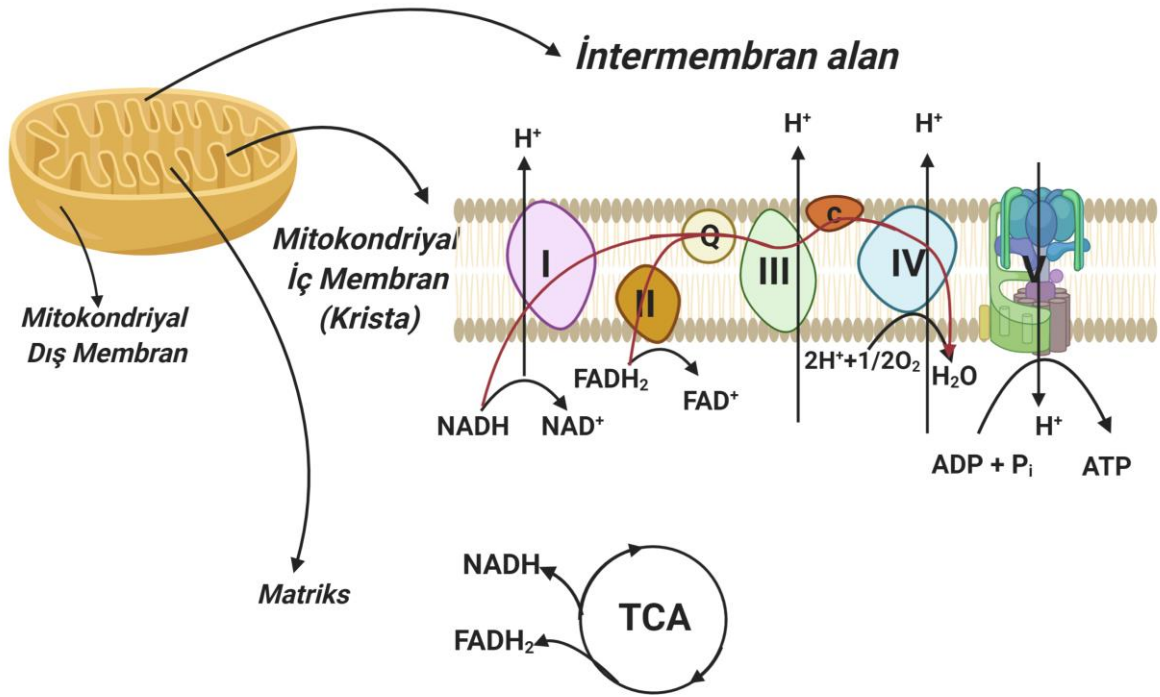
Hipertansiyon
Kardiyak disfonksiyon
Arteriyal Tromboembolik olaylar
QTc Uzaması

Hepatotoksisite
Hepatik Yetmezlik
Proteinüri
Nefrotik Sendrom
Mide bulantısı, baş dönmesi ve diyare
Kusma ve diyare
Renal yetmezlik
GI perforasyon
Fistül
Hemoraji

2.4. Mitokondri

2.4.1. Mitokondrinin Yapısı ve İşlevleri

Mitokondriler, *matriksi* çevreleyen iki membranlı, kendi DNA'sı olan, hücrel biyolojik süreçlerin çoğunda önemli rol oynayan hücre içi organellerdir. *Matriks*, trikarboksilik asit (TCA) döngüsü yoluyla mitokondriyal yağ asidi oksidasyonu ve piruvat oksidasyonu gibi farklı anahtar oksidatif yollarda yer alan çok sayıda enzim içerir. Matriks ayrıca; replikasyonu, transkripsiyonu, translasyonu ve onarım için zorunlu olan tüm bileşenler (örn. enzimler ve transkripsiyon faktörleri) dahil olmak üzere mitokondriyal genomu içermektedir. Mitokondriyal DNA (mtDNA), her bir mitokondri içinde çeşitli kopyalarda bulunan ve mitokondriyal solunum zincirinin (elektron transport zinciri, ETZ) 13 polipeptidini kodlayan 16,6 kb'lık dairesel bir genomdur. Bu polipeptitler daha sonra düzinelerce nükleer DNA kodlu proteinle birlikte ETZ Kompleksleri üretimiyle iç membrana dahil olur (Chinnery ve Hudson, 2013). Oksidatif enerji üretiminin gerçekleşmekte olduğu mitokondriyal iç membrana *krista* denir ve yüzey alanının genişlemesini sağlayan kıvrımlara sahiptir (Şekil 2-5).



Şekil 2-5: Elektron Transport Zinciri (ETZ). Kırmızı ok ile gösterilen elektronların izlediği yoldur. I: Kompleks I, II: Kompleks II, III: Kompleks III, IV: Kompleks IV, V: Kompleks V, Q: KoenzimQ10, c: Sitokrom c, TCA: Trikarboksilik asit

Krista boyunca gerçekleşen mitokondriyal oksidatif fosforilasyon, yağ asidi β -oksidasyonu sırasında ve TCA döngüsü ile üretilen redükte haldeki nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) ve flavin adenin dinükleotit (FADH) formlarının oksidasyonu ile birlikte oksijenin varlığında ATP üretimine yönelik bir işlemdir (Tzagoloff, 2012).

Mitokondriler, amino asitleri, piruvat ve yağ asitleri dahil olmak üzere birçok substratı oksitleyebilmektedir. Glikoliz (mitokondrinin dışında sitoplazmada gerçekleşir) ile sağlanan piruvat, mitokondriyal enzim *piruvat dehidrojenaz* tarafından Asetil-CoA'ya dönüştükten sonra TCA döngüsü tarafından oksitlenir. TCA döngüsünün FAD'a bağımlı bir enzimi olan *süksinat dehidrojenaz*, ETZ'nin beş Kompleksinden biridir ve Kompleks II olarak adlandırılır. TCA döngüsü ayrıca üç farklı NAD^+ bağımlı dehidrojenaz içerir. Yağ asitleri ise β -oksidasyon işlemi ile oksitlenir. Piruvat ve yağ asitleri gibi substratların mitokondriyal oksidasyonu sürekli olarak NADH ve FADH_2 üretir. Bu indirgenmiş kofaktörler daha sonra elektronlarını ETZ'ye aktarır (Wallace ve ark., 2010). Oksidatif süreç ETZ Kompleksleri; Kompleks I (NADH übikinon dehidrojenaz), Kompleks II (Süksinat dehidrojenaz), Kompleks III (Übikinol sitokrom c

redüktaz), Kompleks IV (sitokrom c oksidaz) ve Kompleks V (ATP sentaz) tarafından katalizlenir. Son elektron alıcısı olarak oksijen Kompleks IV'tedir (Şekil 2-5).

Ardışık oksido-redüksiyon reaksiyonları ile birlikte, NADH ve FADH₂'den elektronların yüksek redoks enerjisinin bir kısmı, mitokondriyal iç zar boyunca protonların elektrokimyasal bir gradyanına dönüştürülür. Protonlar matriksten intermembran boşluğa Kompleksler tarafından pompalanır. ETZ Kompleksleri I, III ve IV boyunca elektron transferi, mitokondriyal matriksten mitokondriyal zarlar arası boşluğuna protonların dışarıya atılması ile birleştirilir, böylece iç zar boyunca büyük bir elektrokimyasal gradient (mitokondriyal membran potansiyeli; $\Delta\psi$; MMP) oluşturulur. Bu proton gradienti, ATP sentazın, fosforilasyon adı verilen bir süreç olan ADP'den enerji açısından zenginleştirilmiş ATP'yi sentezlemesine izin verir. ADP yüksek olduğunda, protonlar matrikse ATP sentaz enziminin F₀ kısmı boyunca yeniden girerek ADP'nin ATP'ye bu enzimin F₁ kısmı tarafından dönüştürülmesine yol açar. Vücutta ATP biriktirilemez, dolayısıyla ADP → ATP dönüşümü sürekli gerçekleşen bir reaksiyondur. Özetle, substrat oksidasyonunu ATP oluşumuna bağlayan bu biyokimyasal işleme *oksidatif fosforilasyon* adı verilmektedir (Scheffler, 2011).

Hücresinin enerji kaynağı olarak görülen mitokondrinin esas görevinin oksidatif fosforilasyon yoluyla hücre metabolizması için gerekli olan enerjiyi üretmek olduğu çok uzun süredir bilinmektedir. Günümüzde ise mitokondrinin bu görevinin yanısıra; hücre ölümü, bağışıklık, otofaji, redoks sinyalleşmesi, kalsiyum homeostazı ve kök hücre reprogramlaması gibi pek çok önemli fizyolojik işlemde gerekli olduğu anlaşılmıştır (Montaigne ve ark., 2015; Meyer ve Chan, 2017; Tilokani ve ark., 2018).

Diğer yandan, oksidatif fosforilasyon sırasında ETZ Kompleksleri I ve III'ten geçen küçük bir elektron fraksiyonu bu komplekslerden sızar ve süperoksit anyon radikalini (O₂⁻) oluşturmak üzere oksijen ile reaksiyona girer. Bununla birlikte, bu radikal çoğunlukla manganez süperoksit dismutaz (SOD2 olarak da adlandırılan MnSOD) tarafından süperoksit anyon radikaline kıyasla daha kararlı olan hidrojen peroksit (H₂O₂) radikaline dönüştürülerek detoksifiye edilmeye çalışılır. β -oksidasyon yolunun bazı enzimleri de mitokondri içerisinde önemli miktarda H₂O₂ üretebilmektedir (Wallace ve ark., 2010; Massart ve ark., 2018). Normal mitokondriyal fizyolojide, oksidasyon ve fosforilasyon işlemleri birbirine eş zamanlı olarak yürümektedir. Reaktif

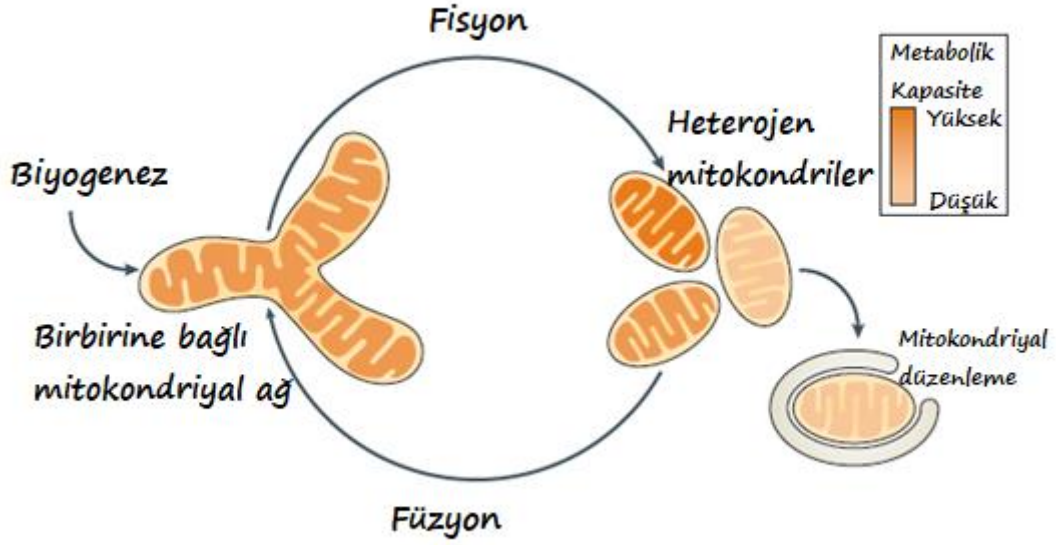
oksijen türleri (ROS), büyük miktarlarda üretildiğinde zararlı hale gelen oldukça reaktif bileşiklerdir.

2.4.2. Mitokondriyal Dinamikler

Mitokondriler, şekillerini, dağılımlarını ve boyutlarını korumak için 'mitokondriyal dinamikler' olarak adlandırılan koordineli fisyon ve füzyon döngülerinden geçen oldukça dinamik organellerdir. Mitokondrilerin geçici ve hızlı morfolojik adaptasyonları, hücre döngüsü, bağışıklık, apoptoz ve mitokondriyal kalite kontrolü gibi birçok hücresel süreç için mitokondriyal dinamikler çok önemlidir. Bunun yanı sıra, mitokondriyal dinamiklerde görülen bozukluklar pek çok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Tilokani ve ark., 2018).

Mitokondriyal dinamikler, mitokondriyal homeostazın sağlanmasında görevli olan füzyon/fisyon ve biyogenez/degradasyon olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir. Mitokondriyal yaşam döngüsü önceden var olan organellerin büyümesi ve bölünmesi (biyogenez) ile başlarken hasarlı organellerin mitofaji ile atılmasıyla sona erer. Mitofaji, organel yıkımıyla sonuçlanan lizozomlarla kaynaşan otofagosomlar tarafından yutulan işlevsiz mitokondrilerin spesifik olarak ortadan kaldırılmasıdır. Ayrıca mitokondriyal metabolizmayı ve enerjiyi yeniden programladığı gösterilmiştir (Meyer ve ark., 2017; Wu ve ark., 2019a; Venkatesh ve Suzuki, 2020).

Mitokondri, fizyolojik koşullara bağlı olarak hücrenin birden fazla heterojen mitokondri oluşturmaya veya birbirine bağlı mitokondriyal bir ağ üretmesine izin veren fisyon ve füzyon döngülerine maruz kalır (Şekil 2-6). Bu işlemler mitokondrinin şekli, hacmi ve fonksiyonun regülasyonunda görevli olması dolayısıyla strese karşı verilen hücresel cevaplarda incelenmesi gereken kritik bir hücresel bileşendir (Westermann, 2010; Meyer ve ark., 2017).



Şekil 2-6: Mitokondriyal Fisyon ve Füzyon (Westermann, 2010)

Mitokondriyal füzyon iki mitokondrinin birleşerek tek bir mitokondri oluşturmasıdır. Fisyon ise bir mitokondrinin iki evlat mitokondriye bölünmesiyle karakterizedir. Bu iki zıt proses arasındaki denge hücrede mitokondrinin sayısını, büyüklüğünü ve sitoplazmadaki yerini kontrol eder. Bu olaylar arasındaki dengenin bozulması sonucu ya çok sayıda küçük yuvarlak şekilli mitokondri ile karakterize edilmiş parçalanmış bir ağ ya da uzun ve yüksek derecede bağlı mitokondrileri olan hiperfüzyonlu bir mitokondriyal ağ oluşur. Bu dengeli dinamik geçişler sadece mitokondriyal fonksiyonu sağlamak için değil, aynı zamanda mitokondriyal ağı hücredeki besin mevcudiyetine ve hücrenin metabolik durumuna uyarlayarak hücresel ihtiyaçlara cevap vermek için gereklidir. Ayrıca, farklı morfolojik durumlar çoklu fizyolojik ve patofizyolojik durumlarla ilişkilidir. Genel olarak füzyon ve fisyonun önemli işlevleri Tablo 2-4'te özetlenmiştir. Füzyon ve fisyon işlemleri aynı zamanda mitokondrilerin subselüler özelleşmesine olanak vermektedir. Örneğin sınır hücrelerinde perinükleer mitokondri aksonal mitokondriye göre daha farklı fonksiyon göstermektedir (Liesa ve ark., 2009; Nunnari ve Suomalainen, 2012; Wai ve Langer, 2016; Meyer ve ark., 2017).

Tablo 2-4: Füzyon ve Fisyonun Önemli İşlevleri (Meyer ve ark., 2017)

-mtDNA kopya sayısını korumak
-Hasarlı ve mutasyonlu mtDNA'nın uzaklaştırılması (mitofaji)
-Hücre içi mitokondriyal dağılımın düzenlenmesi
-mtDNA mutasyonuna karşı tolerans geliştirmek

Füzyon

Bu dinamik geçişler genel olarak Dinamin ailesine ait büyük Guanozin-5'-trifosfatazlar (GTPazlar) tarafından yürütülmektedir. Mitokondri organeli iç ve dış membran GTPaz proteinleri sayesinde füzyona uğramaktadır. İnsanlarda bu proteinler mitokondriyal dış membran proteinleri (mitofüsinler; MFN1 ve MFN2) ve iç membran proteini olan optik atrofi 1 (optic atrophy 1; OPA1) olarak isimlendirilmektedir. Mitokondriyal füzyon, MFN1 ve MFN2'nin aracılık ettiği dış mitokondriyal membran füzyonu ve ardından OPA1'in aracılık ettiği iç membran füzyonu ile yürüyen iki aşamalı bir işlemdir. Her iki mitofüsinlerin aşırı ekspresyonu, çekirdek çevresinde mitokondriyal birikmeye yol açar. Eğer bir mitokondrinin birden çok bileşeni hasarlıysa veya mitokondriyal DNA'da mutasyon varsa bu yıkıcı hasarların kompanse edilebilmesi sağlıklı bir mitokondri ile füzyonun gerçekleştirilmesi yoluyla sağlanabilmektedir (Eura ve ark., 2003; Schrepfer ve Scorrano, 2016).

Hala tartışma konusu olsa da, kaynaşmış bir mitokondriyal ağ matriks bileşen dağılımına ve oksidatif fosforilasyon aktivitesinin uyarılmasına izin verir. Mitokondriyal uzamayı sağlayan füzyon ayrıca besin açlığı ile tetiklenen otofaji sırasında fagofor yutulmasına karşı koruma sağlar ve esas olarak hücre sağkalım mekanizmalarıyla ilişkilidir (Rambold ve ark., 2011; Prashant ve Chan, 2016).

Fisyon

Mitokondriyal fisyon ise bir diğer GTPaz olan dinamin ilişkili protein 1 (Dynamine related protein 1; DRP1) proteininin aracılık ettiği bir işlemdir. Mitokondriyal dış zarda bulunan fisyon proteini 1 (FIS1) yardımıyla DRP1 dış zara toplanır ve etki gösterir. DRP1 oligomerizasyonu ve ardından mitokondriyal daralma,

membran kesilmesini sonlandırmak için Dynamin 2'nin devreye girmesine yol açar (Tilokani ve ark., 2018). FIS1 proteini mitofüsinlere ve OPA1'e bağlanarak bu GTPazların aktivitelerini inhibe ettiğini, böylece füzyon mekanizmasını bloke ettiği görülmüştür (Yu ve ark., 2019).

Mitokondriyal parçalanma/fragmentasyon genellikle mitokondriyal disfonksiyon ile bağlantılıdır, çünkü bu morfolojik durum yüksek stres seviyeleri ve hücre ölümü sırasında kendini gösterir. Apoptozun düzenlenmesinde mitokondriyal fisyon önemlidir zira apoptoz yolağının erken safhalarında (kaspaz aktivasyonundan önce) DRP1'e bağlı mitokondriyal fragmentasyon gerçekleşmektedir. Bununla birlikte, hücre döngüsünün G2 / M fazında da fisyon gözlenir ve mitokondriyal motilite, kalite kontrol ve mtDNA kalıtımı için gereklidir (Westermann, 2010; Tilokani ve ark., 2018; Zemirli ve ark., 2018). Fisyon, mitokondrilerin hücre içinde hareket etmesine izin verir. Fisyon, disfonksiyonel yavru mitokondrilerin saptanmasına olanak verir ve (füzyon işleminin inhibe olmasıyla eş zamanlı olarak) mitofajiye yönlendirmeyi sağlar (Shirihai ve ark., 2015).

2.4.3. Mitokondriyal Hasar ve Kardiyotoksisite

İlaçların farklı dokulara ve organlara zarar verebileceği mekanizmalar arasında, mitokondriyal hasarın (disfonksiyon) birincil rol oynadığı düşünülmektedir. Mitokondriyal disfonksiyon, farklı ilaçların karaciğer, kalp ve iskelet kası gibi farklı dokuları etkileyen olumsuz etkileri indükleyebildiği önemli bir mekanizmadır. Mitokondrilerin düzgün çalışması, enerji üretimi, ve yağ asitleri ve amino asitler gibi farklı anahtar endojen substratların metabolizması için zorunludur. Kalp, önemli bir ATP kaynağı olan mitokondriyal oksidatif fosforilasyona dayanmaktadır ve vücutta en yüksek enerji dönüşüm oranlarına sahip organlardan biridir (Montaigne ve ark., 2015; Massart ve ark., 2018).

En ciddi vakalarda, ilaca bağlı mitokondriyal disfonksiyon hastaneye yatmayı gerektirebilir veya hastanın ölümüne yol açabilir. Ayrıca, bu olumsuz etkiler ilaçların pazardan veya klinik çalışmalarda daha erken çekilmesine neden olabilmektedir. Dykens ve ark. farmasötik olarak kullanıma uygun moleküllerin %35'inin mitotoksik olduğunu belirtmiştir (Dykens ve ark., 2007; Dykens ve Will, 2007). İlaça bağlı mitokondriyal toksisite, yağ asidi oksidasyonunun inhibisyonu, oksidatif fosforilasyon ve solunum zinciri aktivitesinin bozulması veya mitokondriyal membran bütünlüğünün

bozulması dahil olmak üzere farklı mekanizmalarla gerçekleşebilmektedir. Bazı ilaçlar ayrıca, ROS üretimi ve önemli mitokondriyal proteinlere kovalent olarak bağlanabilen reaktif metabolitlerin üretilmesi yoluyla mitokondriyal fonksiyonu bozabilmektedir.

Kardiyomiyositler kasılabilen yapıya sahip oldukları için ATP'ye ihtiyaçları fazladır ve bu sebeple mitokondriler miyokard dokusu homeostazında önemli bir role sahiptir. Mitokondri fonksiyonunda bozulma sonucunda kardiyomiyosit ve endotel hücre ölümü ve sonuç olarak kardiyovasküler disfonksiyon görülebilmektedir. Bu durumun ilaçların sebep olduğu kardiyotoksisitenin altında yatan sebeplerde biri olabileceği düşünülmektedir. Imatinib, Bevacizumab, Sunitinib ve Sorafenib gibi çeşitli antikanser ilaçların toksikolojik ve farmakolojik özellikleri sebebiyle, doğrudan veya dolaylı olarak, kalp mitokondriyal fonksiyonunu modüle ettiği bilinmektedir (Force ve ark., 2007b; Varga ve ark., 2015).

Kalp kası hücrelerinde kimyasal enerjinin fiziksel işe dönüştürüldüğü görülmektedir. Kalbin vücuda gerekli olan kanı pompalaması için gerekli enerjinin temeli ATP'nin hidrolizi ve Ca^{2+} bağımlı kasılma mekanizması arasındaki hassas ilişkiye dayanmaktadır (Bers, 2001). Ca^{2+} homeostazı çeşitli kanallar, taşıyıcılar ve ATPazlar gibi proteinler tarafından yönetilir. Kalp kasının kasılma mekanizmasını aktive etmek için gerekli olan Ca^{2+} kaynağı, *sarkoplazmik retikulum*dur (SR) (Rossi ve Dirksen, 2006). SR-mitokondri yakınlığındaki artış, mitokondriyal Ca^{2+} alımını artırarak TCA siklüs aktivitesi ve ATP sentezi için gerekli dehidrojenazların aktivasyonunu sağlar (Rossi ve Dirksen, 2006; Cárdenas ve ark., 2010).

Diğer taraftan ROS normal mitokondriyal solunumun yan ürünleridir ve kardiyomiyositlerdeki fizyolojik sinyal yollarında anahtar sinyal molekülleri olarak hizmet etmektedir. Mitokondriyal disfonksiyon sırasında büyük miktarlarda üretilen ROS, kardiyomiyosit hücre ölüm sinyal yollarını aktive edebilmektedir. Bu nedenle mitokondriler, ATP üretimi ve kullanımı arasında herhangi bir uyumsuzluğu önleyen kardiyomiyosit biyoenerjetikindeki kilit oyuncular (Montaigne ve ark., 2015).

TKİ ilaçların sebep olabileceği kardiyotoksik mekanizmalardan önemli bir tanesinin mitokondriyal toksisite olabileceği belirtilmektedir (French ve ark., 2010; Greineder ve ark., 2011; Tridente, 2017; Gorini ve ark., 2018). Tablo 2-5'te TKİ ilaçların mitokondriyal toksisitelerinin araştırıldığı çalışmalar derlenmiştir.

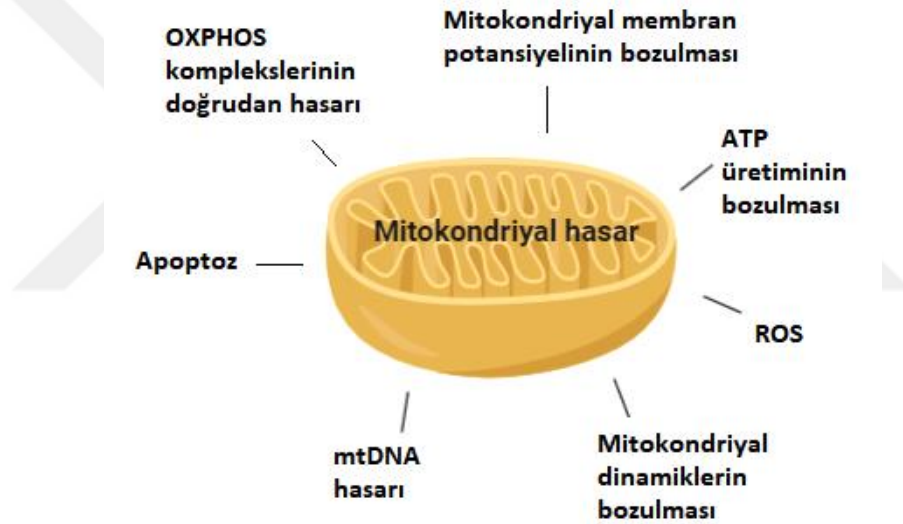
Tablo 2-5: Seçili Tirozin Kinaz İnhibitörü İlaçların Mitokondriyal Hasarlarına Dair Yapılmış Çalışmalar

Tirozin Kinaz İnhibitörü	Yayınlanmış Makale Sayısı*	Bulgular	Referanslar
İmatinib	63	MMP bozulması, Apoptoz, ATP inhibisyonu, Kompleks V inhibisyonu, Mitokondriyal şekil bozukluğu, Kalp yetmezliği (Sınıf 3-4)	(Damaraju ve ark., 2018; Kerkelä ve ark., 2006; Maharsy ve ark., 2014; Paech ve ark., 2017; Paech, Mingard, ve ark., 2018; Will ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2017)
Sorafenib	47	ATP sentezi inhibisyonu, Oksidatif fosforilasyon inhibisyonu, bozulmuş krista yapısı, Kompleks I ve III inhibisyonu, ROS üretimi, Kardiyotoksisite	(Bull ve ark., 2012; Damaraju ve ark., 2018; French, 2010; Huot ve ark., 2019; Mingard ve ark., 2018; Paech ve ark., 2018; Will ve ark., 2008)
Sunitinib	31	Mitokondriyal şişme ve membran bütünlüğü bozulması, MMP'nin bozulması, Otofaji, AMP kinaz inhibisyonu	(French, 2010; Gorini ve ark., 2018; Hasinoff ve ark., 2008; Jacob ve ark., 2016; Kerkela ve ark., 2009; Paech ve ark., 2017; 2018; Zhang ve ark., 2017; Zhao ve ark., 2010)
Regorafenib	7	Oksidatif fosforilasyon inhibisyonu, MMP düşmesi, artmış ROS üretimi, Kompleks II ve Kompleks V inhibisyonu, OPA1 inhibisyonu	(Huot ve ark., 2019; Mingard ve ark., 2018; Paech ve ark., 2017; Weng ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2017)
Lenvatinib	2	Mitokondriyal koruyucu proteinlerin ekspresyon inhibisyonu	(Roberts ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2017)

*PubMed arama motorunda “(ilaç ismi) AND ((mitochondrial toxicity) OR (mitochondrial damage))” şeklinde arama yapılarak bulunan makale sayısıdır. Örn: (lenvatinib) AND “((mitochondrial toxicity) OR (mitochondrial damage))”

Mitokondriyal Hasar Mekanizmaları ve Sonuçları

Mitokondriyal hasar; mitokondriyal solunum zinciri enzim aktivitelerinin doğrudan inhibisyonu, oksidatif fosforilasyon ayrışması (uncoupling), mitokondriyal DNA'nın replikasyonunda bir bozulma, mitokondriyal oksidatif/nitratif stresin artması, mitokondriyal dinamik dengelerinde değişiklikler görülmesi, ve mitokondriyal disfonksiyonun son aşaması olan mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) bozulması sonrasında gelişen apoptoz gibi sebeplerden dolayı meydana gelebilmektedir. Birbirleriyle ilişkili olan bu nedenlerden ötürü mitokondriyal ATP üretimi zarar görmekte ve bu durum ATP ihtiyacı yüksek olan kardiyomiyositleri olumsuz etkileyebilmektedir (Varga ve ark., 2015; Hargreaves ve ark., 2016). Şekil 2-7'de mitokondriyal hasarın başlıca mekanizmaları gösterilmiştir.



Şekil 2-7: Mitokondriyal hasar mekanizmaları

Mitokondrinin en önemli görevi oksidatif fosforilasyon ile ATP üreterek hücreye enerji sağlamaktır. Çoklu stres indükleyicilerinin ATP'nin tükenmesine neden olduğu ve kontrol altına alınmadığı takdirde hücre ve doku hasarına neden olduğu bilinmektedir (Leonard ve ark., 2014).

Elektronların Kompleks I ve III'e doğru akışı herhangi bir noktada bloke edildiğinde, ETZ Kompleksleri aşırı redükte olur, böylece normalden daha fazla elektron sızıntısına ve süperoksit anyonu aşırı üretimine yol açar. İlaça bağlı mitokondriyal ROS'un aşırı üretimi, oksidatif stres, lipid peroksidasyonu ve farklı mtDNA oksidatif hasarlarına sebep olabilmektedir. Bazı dokularda oksidatif stres,

inflamasyon ve fibrozise yol açabilmektedir (Igoudjil ve ark., 2006; Pessayre ve ark., 2010; Begriche ve ark., 2011; Massart ve ark., 2013; Meyer ve ark., 2013).

Mitokondrilerin oksidatif fosforilasyon ile ATP sentezini gerçekleştirebilmeleri için, membranlar arasında proton gradiyenti yaratarak MMP'yi korumaları şarttır. (Gergely ve ark., 2002; Perl ve ark., 2004; Zorova ve ark., 2018). Normal olarak sağlıklı hücreler ATP ve MMP seviyelerini korurlar. Bu stabilite hücrelerin sağlıklı çalışabilmesi için gereklidir. Fizyolojik durumlarda zaman zaman kısa süreli değişiklikler olmakla birlikte, her iki faktörde sürekli değişikliklerin olması durumunda hücreler hasar görmektedir (Zorova ve ark., 2018). MMP kaybının (gradientin + ile – arasındaki farkın düşmesi), miyokard enfarktüsü ve iskemi/reperfüzyon sonrası serebral enfarktüsün önemli bir mekanizması olduğu çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Hausenloy ve ark., 2002; Sims ve Muyderman, 2010; Sunaga ve ark., 2014).

MMP'nin düşmesi füzyonun inhibisyonuna ve fisyonun indüklenmesine yol açmaktadır. Özellikle mitokondriyal iç membranın füzyonu MMP'ye bağımlıdır ve MMP'nin düşmesiyle fisyon tetiklenmektedir. MMP'nin düşmesi ayrıca PARK-2 aracılı mitofüzinlerin degradasyonuna yol açabilir, sonuçta mitokondriyal füzyon engellenmiş olur (Meyer ve ark., 2017). Mitokondriyal dinamikler ve biyogenez/mitofaji hücre homeostazında rol alan hücre sağkalımı için son derece önemli düzenleyici işlemlerdir. Bu işlemlerde görülen değişiklikler ilaç indüklü mitokondriyal toksisitenin habercisi olabilmektedir (Meyer ve ark., 2017; Wu ve ark., 2019a).

Mitokondriyal dinamiklerle yakından ilişkisi olan mtDNA tarafından ETZ'de kritik işlevleri olan 13 tane protein kodlanmaktadır. MtDNA hasara karşı nükleer DNA'dan daha savunmasızdır (Hebert ve ark., 2010; Michael ve Van Houten, 1997) ve bunun sebebi olabilecek birkaç açıklama önerilmiştir:

- ✓ nDNA ile karşılaştırıldığında kompakt bir nükleozom yapısının olmaması
- ✓ Sınırlı mitokondriyal onarım yolları
- ✓ mtDNA'nın ROS üretiminin ana kaynağına olan yakınlığı

MtDNA hasarının, mitokondriyal disfonksiyona neden olduğu bilinmektedir (Martínez-Reyes ve ark., 2016). MtDNA kopya sayısındaki azalma böbrek hücreli karsinoma, karaciğer hastalığı, biliyer atrezi, tip 2 diyabet, kardiyomiyopati, meme kanseri ve multipl skleroz gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Montier ve ark., 2009).

Hücresel stresin varlığında ROS birikmesi ve MMP'nin bozulması, iç membranın parçalanmasına ve sonrasında hücrenin ölümüne gitmesine sebep olabilmektedir. Hasarlı mitokondrilerin mitofaji ile yok edilmesi hücreyi kurtarmaya yeterli gelmediği takdirde hücre genellikle ölümüne yani apoptoza programlanmaktadır (Hargreaves ve ark., 2016).

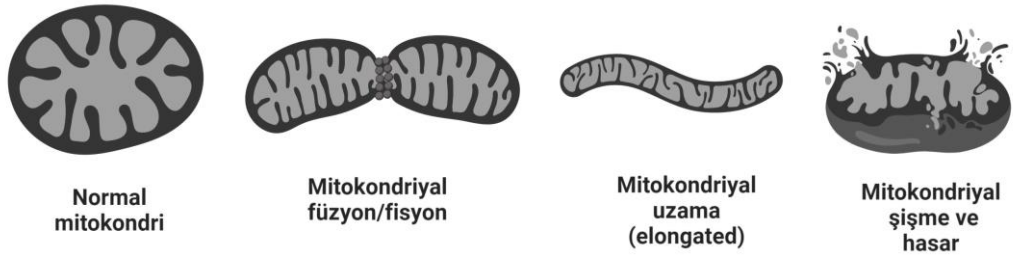
Apoptoz, intrinsik veya ekstrinsik yollarla düzenlenebilen programlanmış hücre ölümüdür. Ekstrinsik yolda hücre ölüm sinyalleşmesi meydana gelmekteyken intrinsik yolda mitokondri rol almaktadır, dolayısıyla bu yolağa “mitokondriyal ölüm yolağı” da denilmektedir (Ouyang ve ark., 2012). Mitokondriyal membran geçirgenliği apoptozda oldukça önemlidir. Membran geçirgenliği B-hücre lenfoma 2 (Bcl-2) protein ailesi tarafından kontrol edilmektedir. Bcl-2 ailesi pro-apoptotik ve anti-apoptotik olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Önemli bir mitokondriyal membran geçirgenliği artışı mitokondriyal permeabilite geçişi gözeneklerinin (mitochondrial permeability transition pore; MPTP) açılarak matriks içinde su birikmesine ve mitokondriyal şişmeyle birlikte dış zarın yırtılmasına neden olmaktadır. Ayrıca MPTP gözeneklerinin açılması sitokrom c (Sit c) gibi pro-apoptotik faktörlerin sitozole salınmasına yol açarak apoptozu başlatır. Sitozolda Sit c apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (APAF-1) ile bağlanarak apoptozom kompleksi oluşturur, ardından kaspas9 ve kaspaz 3 aktive olmaktadır (D'Arcy, 2019).

Büyük oranda Apoptoz signaling kinaz 1 (ASK1) tarafından kontrol edilen C-Jun N-terminal kinazlar (JNK) yolu bir “hücre ölümü” sinyal yoludur. JNK, mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK) kaskadının son kademe üyeleridir. Çeşitli hücresel ve çevresel stresler ASK1'in aktivasyonuna ve JNK'nin fosforilasyonuna yol açar. Enflamatuar sitokinler, UV ışınları, ROS gibi zararlı uyaranlar, ASK1 aracılığıyla oluşan JNK'yı aktive eder (Nishida ve ark., 2017). JNK sinyalleşmesi, ölüm reseptörleri tarafından başlatılan dışsal apoptotik yolağın yanı sıra mitokondride başlatılan içsel yola da dahil olmaktadır. Hem dışsal hem de içsel apoptotik uyaranlara yanıt olarak JNK, çeşitli pro- ve anti-apoptotik proteinlerin aktivitelerini etkileşime sokma ve modüle etme kabiliyeti ile önemli bir rol oynamaktadır. Nükleer ve mitokondriyal olayların koordineli olarak düzenlenmesi yoluyla JNK, apoptozun etkili bir şekilde uygulanmasını sağlar (Dhanasekaran ve Reddy, 2017).

Apoptozun gerçekleştirilemediği hücre kanser hücresine dönüşebilmektedir. Kanser hücrelerinde oksidatif fosforilasyon yerine glikoliz ile solunum gerçekleşmekte ve laktik asit oluşumu artmaktadır. Kemoterapi ajanlarının tümör hücresinin etrafındaki asit mantoyu aşamaması ve etkisiz kalması üzerine son yıllarda geliştirilen antikanser ajanlar tümör hücresinin moleküler kilit noktalarını hedefleyerek kanserin ilerlemesini durdurabileyi mümkün hale getirmiştir. Moleküler kilit noktalarından önemli bir kısmı hücre döngüsü regülasyonu ile ilgili yapılardır. Hücresel transformasyonu yönlendiren ana motorlardan biri, memeli hücre döngüsünün kontrolünün kaybıdır. Özellikle siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü (CDKN1A; P21 proteini) ve GADD45A'nın (büyüme durması ve DNA hasarına neden olabilen gen) yukarı regülasyonu ile hücre sırasıyla G1 ve G2 / M fazlarında durur (Leonard ve ark., 2014). P21 birçok uyarana cevap olarak hücre döngüsü durmasını teşvik eder. Hem bir sensör olarak hem de birden fazla sinyalin başlatıcısı olarak anti-proliferatif işlev görecektir şekilde rol oynamaktadır. Ayrıca, hücreler apoptoz gerçekleştirilemediği durumlarda kanserleşmemek için P21'in inhibisyonunu sağlayabilmektedir (Abbas ve Dutta, 2009; Dutta ve ark., 2015).

Mitokondrilerin hayatlarına devam etmesini veya degradasyona uğramasını düzenleyen proteazlar bulunmaktadır. Bunlardan önemli bir tanesi olan Lon proteaz (LONP1) mitokondriyal matriks içinde bulunur ve redoks homeostazını korumak için çeşitli mekanizmalara aracılık etmektedir. Hasar görmüş proteinlerin degradasyonuna aracılık eden LONP1'in ayrıca kardiyomiyositleri iskemi/reperfüzyon hasarından koruduğuna dair bulgulara ulaşılmıştır (Venkatesh ve ark., 2019).

Mitokondri morfolojisindeki değişikliklerin organelin işlevini nasıl etkilediğini araştıran ayrıntılı çalışmalarda, mitokondriler Transmisyon Elektron Mikroskopisi (TEM) ile incelenmektedir (Kerkelä ve ark., 2006; French ve ark., 2010; Eustaquio ve ark., 2018). Mitokondri, TEM görüntülerinde dört farklı şekilde saptanabilmektedir (Şekil 2-8).



Şekil 2-8: Saptanan mitokondriyal değişikliklerin şematik gösterimi

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi. Akım sitometrisi kullanarak mitokondriyal membran potansiyeli ölçümü Marmara Üniversitesi Genetik ve Metabolik Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'ndan hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi. TEM görüntüleme için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden hizmet alımına gidildi.

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Adenosin 5-trifosfat disodyum tuzu (ATP)	Sigma-Aldrich, A2383
Alexa Flour 594 konjugatı anti-rabbit sekonder antikor	Cell Signaling, 8889S
Amonyum persülfat	Sigma-Aldrich, A3678
Asetik asit	Merck, 100058
Blotlama kağıdı	ThermoFisher, 84783
Dietil eter	Merck, 100921
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Biomatik A2424
Ditiotreitol (DTT)	Biomatik, A2452
DMEM:F12 besiyeri	Gibco, 11320033
Etanol	Sigma-Aldrich, 32205
Fetal bovin serum (FBS)	Biochrom, S0115
Fosfat tamponu (10X)	Biochrom, L 1835

Glisin	WisentBioproducts,800-045
Hidroklorik asit (HCl)	Sigma-Aldrich, 320331
HRP konjugatı anti-mouse sekonder antikor	Santa Cruz Biotechnology (sc-2357)
HRP konjugatı anti-rabbit sekonder antikor	Santa Cruz Biotechnology (sc-516102)
HRP konjugatı β -aktin	Santa Cruz Biotechnology (sc-47778)
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Termo Fisher Scientific Inc (32106)
Hücre lizis tamponu (10X)	Cell Signaling, 9803S
İzopropil alkol	Tekkim, TK.090250.01000
LONP1 primer antikor	Cell Signaling, 28020S
Sitokrom c primer antikor	Santa Cruz Biotechnology (sc-13156)
P21 primer antikor	Santa Cruz Biotechnology (sc-469)
Metanol	Merck, 106008
MitoTracker Green FM boya	ThermoFisher, M7514
MTT	ThermoFisher
Nitroselüloz transfer membranı (0,22 μ m)	Santra Cruz, sc-3718
Nupage LDS örnek tamponu	Invitrogen, NP0008
Oksidatif Fosforilasyon (OXPHOS) primer antikor kokteyli	Abcam, ab110413

PBS	Gibco, 10010023
Penisilin/Streptomisin	Gibco, 15140122
Polivinilidin florür (PVDF) membran (0,22 µM)	ThermoFisher, 88520
Ponceau S	SantaCruz, sc-24974
Primer çiftleri	Sentromer DNA Teknolojileri
Protein markeri	Thermo Scientific, 26619
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Wisent Bioproducts, 800-100
Sodyum hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich, 71690
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich, 13423
Tetrametiletildiamin (TEMED)	ThermoFisher, 17919
Tripan mavisi	Sigma-Aldrich, T8154
Tris baz	Wisent Bioproducts, 600-125
Triton-X-100	Biomatik, A4025
Tween 20	Sigma-Aldrich, P9416
Yağsız süt tozu	BioShop, SK1400

3.1.2. Kitler

ATP Miktar tayini kiti	Thermo Scientific, A22066
BCA protein assay kiti	Intron Biotechnology

G-spin Total DNA Extraction Kit	Intron Biotechnology
High Pure RNA izolasyon kiti	Roche, 11828665001
Kemilüminesans substrat kit	Cell Signaling, 7003S
2X PowerUp Syber Green Master Mix	Thermo Fisher Scientific
RIPA lizis tampon kiti	Santa Cruz Biotechnology
Transcriptor First Strand cDNA sentez kiti	Roche, 04896866001

3.1.3. Cihazlar

-150 °C Dondurucu (Sanyo)

-20 °C Dondurucu (Bosch)

-80 °C Dondurucu (Sanyo U7386S)

Akım sitometrisi (FACSCalibur, Becton-Dickinson).

Ayarlanabilir Otomatik Pipetler (1-2,5 µL; 1-10 µL 10-100 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL) (Thermo Scientific)

Blok ısıtıcı (Stuart, SBH200D)

Biorad Chemidoc Jel Görüntüleme Sistemi

CO₂'li inkübatör (Nuarie, NU-5831)

Çalkalayıcı (IKA, MTS4)

Dikey elektroforez sistemi ve ıslak blotlama sistemi (Bio-Rad, Mini PROTEAN 1658030)

Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR) döngü cihazı (Qiagen, Rotor-Gene Q)

Güç Kaynağı (Bio-Rad, PowerPac)

Hassas terazi (Shimadzu, ATX224)

Kemiluminesans görüntüleme cihazı (Bio-Rad, ChemiDoc MP)

Multimode Plaka Okuyucu (EnSpire-PerkinElmer)

Laminar kabin (ScanLaf, Mars)

Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre (BioTek, Synergy H1)

Otoklav (Zealway, GR85DR)

pH metre (Hanna, H183141)

Real-Time PCR System StepOnePlus (Thermo Scientific Inc.)

Soğutmalı mikro santrifüj (Beckman Coulter, 22R)

Soğutmalı santrifüj (Sigma, 2-16K)

Spin santrifüj (Thermo Scientific, Espresso)

Termal döngü cihazı (Bio-Rad, C1000)

Ters faz ışık mikroskobu (Carl Zeiss, Primovert)

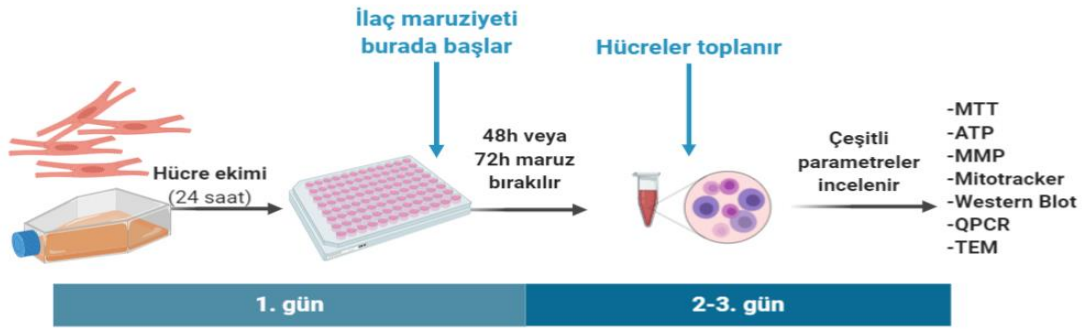
Transmisyon elektron mikroskobu (JEOL JEM 1220)

Ultra saf su cihazı (Thermo Scientific, Smart2Pure)

Vorteks (Clever Scientific)

3.2. Yöntem

H9c2 hücrelerinin kültüre edilerek çoğaltılmasının ardından belirlenen Lenvatinib ilaç konsantrasyonları ve sürelerde yapılan maruziyetler sonrasında hücrelerde meydana gelen değişiklikler, çeşitli parametreler incelenerek değerlendirildi (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: Çalışmanın özet deneysel şeması

3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.1.1. Hücre Dizisinin Kültür Edilmesi

ATCC'den temin edilen sıçan kardiyomiyosit H9c2 hücreleri kullanıldı. Hücreler uygun hücre kültürü kaplarında büyütüldükten sonra kriyojenik viallerde ara pasaj numaraları ile sıvı azot içerisinde saklandı.

Bu amaçla hücreler tripsin ile kaldırılıp 15 ml'lik falkonda 1500 rpm'de santrifüj edildi. Üst faz atıldıktan sonra üzerine mililitrede yaklaşık 1×10^6 hücre olacak şekilde %5 DMSO içeren besiyeri ilave edildi. Pipetaj yapıldıktan sonra kriyojenik viallere aktarıldı ve sıvı azot tankına dondurulmak üzere kaldırıldı.

Hücreler çalışmaya başlamadan önce hücre büyütmede kullanılan besiyerinde ve 37 °C'de ısıtıldı. Hücreler çözöldükten sonra kriyojenik vialden 15 mL'lik falkona aktarıldı ve hücre süspansiyonu üzerine yavaşça taze besiyeri ilave edildi. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilip üst faz atıldı. Hücre pelleti üzerine taze besiyeri ilave edildikten sonra pipetleme yapılarak hücreler süspande edildi ve büyütölmek üzere steril hücre kültürü kaplarına ekildi.

3.2.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler

H9c2 hücre hattı için besiyeri: DMEM besiyerine 50 mL inaktive edilmiş FBS (%10), 5 mL %1'lik antibiyotik çözöltisi eklenerek son hacim 500 mL olacak şekilde çalışma öncesinde taze hazırlandı.

Tripsin/EDTA çözeltisi (%0,2 / %0,04): 0,2 g tripsin ve 0,04 g EDTA tartılarak 100 mL bidistile suda çözündürüldü ve 0,22 µm steril naylon filtreden geçirilerek sterilize edildi. 15 mL'lik falkonlara bölünerek -20 °C'de saklandı.

Fetal sığır serumu (FBS): Hazır inaktive edilmiş FBS kullanıldı. Ancak, FBS inaktive edilmemiş ise; 56 °C'de 30 dk. inkübe edilerek inaktive edildi. 15 mL'lik falkonlara bölünerek -20 °C'de saklandı. Deney öncesinde 37 °C'de çözündürülerek kullanıldı. FBS, besiyerine eklenmeden önce 0,22 µm steril naylon filtreden geçirilerek sterilize edildi.

Antibiyotik çözeltisi [penisilin (100 U) / streptomisin (100 µg/mL) %10]: 1 mL penisilin (100U) / streptomisin (100 µg/mL) ana stok çözeltisinden alındı, 10 mL'ye CMF-PBS ile tamamlandı.

Hücre dondurma çözeltisi: 5 mL DMSO (%5, v/v), 9,5 mL FBS ve 0,95 mL %1'lik antibiyotik çözeltisi hücreler için uygun besiyeri ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.2.1.3. Hücrelerin Sayımı

Hücreler Tripan mavisi yöntemiyle sayıldı. Tripan mavisi hücre canlılık testinde, hücre zarı bütünlüğü bozulmamış canlı hücreler tripan mavisi boyasını hücre içine almazken, membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücrelerde boya hücre içerisine girer. Işık mikroskobu ile incelendiğinde canlı hücrelerin sadece membranları mavi renkli gözlenir. Diğer yandan ölü hücreler ise tamamıyla mavi renge boyanmış olarak görünürler.

Deneyin Yapılışı

Pasaj yapılacak hücreler tripsin ile kaldırılarak toplandı ve 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üst faz atıldı, hücreler 1 mL 1X PBS'te süspande edildi. 1:1 oranında tripan mavisi ile karıştırılan hücrelerin sayımı ışık mikroskobunda, Thoma lamı (hemositometre) adı verilen ve 1 mm² alana ve 0,1 mm derinliğe sahip 4×16 küçük kareden oluşan özel sayım lamaları kullanılarak gerçekleştirildi. 4×16 küçük kareye düşen ölü ve canlı hücreler sayıldı. Sayılan 4 alanın ortalaması alındı ve % canlılık hesaplandı.

Hesaplama yapılırken şu formül kullanıldı:

Hücre sayısı (mL): Sayılan hücre x 2 (Dilüsyon faktörü) x 10⁴ x hücre süspansiyonunun bulunduğu total hacim (mL)

3.2.2. Lenvatinib Çözeltilerinin Hazırlanması

Lenvatinib Stok Çözeltisinin Hazırlanması

50 mM: 5 mg Lenvatinib 234,2743 µL DMSO'da çözündürüldü, 50 µL'lik porsiyonlanarak -20 °C'de saklandı.

10 mM: 20 µL 50 mM Lenvatinib çözeltisi 80 µL DMSO ile seyreltildi. -20 °C'de saklandı.

Lenvatinib Maruziyet Konsantrasyonlarının Hazırlanması

10 mM Lenvatinib stok çözeltisinden, DMSO ile seyreltilerek 1 mM (1000 µM) Lenvatinib çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden seyreltilerek 0,5 mM (500 µM) ve 0,125 mM (125 µM) maruziyet konsantrasyonları hazırlandı. Bu konsantrasyonlar besiyeri içerisinde 1/100 oranında seyreltilerek son konsantrasyonlar 10 µM, 5 µM, 1,25 µM olacak şekilde hücre kültürü ortamına uygulandı.

3.2.3. Hücrelere Lenvatinib Maruziyet Uygulaması

İstenilen koşullarda ve sayıda çoğaltılan hücreler **1,25 µM, 5 µM, 10 µM** Lenvatinib dozlarına **48 saat ve 72 saat** süresince maruz bırakıldı. İlaç maruziyetleri sırasında DMSO konsantrasyonu %1'i geçmeyecek şekilde ayarlandı. Kontrol grubu hücreleri %1 DMSO içeren DMEM besiyerine aynı sürelerde maruz bırakıldı.

3.2.4. MTT Sitotoksite Testi

Deneyin Esası

MTT tetrazolyum bileşiğinin *in vitro* ortamda canlı hücre sayısını ölçmek için kullanılması ilk olarak 1983 yılında Mosmann tarafından tarif edilmiştir (Mosmann, 1983). Canlı ve mitokondriyal fonksiyonu bozulmamış hücrelerin MTT bileşiğindeki tetrazolyum halkasını mitokondriyal süksinat dehidrojenaz enzimi ile suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüştürülmesi esasına dayanır. MTT bileşiği kültür ortamında çözünür ve hücre membranından geçebilen bir yapıdadır. MTT 5 mg/mL konsantrasyonda PBS içinde hazırlanır ve doğrudan kültürdeki hücrelere eklenir. 3 saat inkübe edildikten sonra canlı hücreler, tetrazolyumu, hücrelerin içinde ve kültür ortamında biriken mor bir formazan kristaline indirger. 570 nm absorbansta ölçmeden

önce formazan kristal çökeltisi uygun çözücünde çözündürülür. Absorbans miktarı, canlı hücre sayısı ile orantılıdır.

Deneyde Kullanılan Kimyasallar

10 mM Lenvatinib Stok Çözeltisi

Negatif Kontrol Çözeltisi: DMSO

Pozitif Kontrol Çözeltisi: 100 µL Triton X-100 + 900 µL 1X PBS. -20 °C’de saklandı.

5 mg/mL MTT Çözeltisi: 50 mg MTT + 10 mL 1X PBS. Işıktan korunarak +4 °C’de saklandı.

Deneyin Yapılışı

96’lık mikropalakaya hücreler 1×10^4 /kuyucuk olacak şekilde ekildi ve 24 saat hücrelerin yapışması için beklenildi. İlaç maruziyeti uygulamak için kuyucuklardaki besiyerleri atıldı ve hücrelerin üzerlerine 99 µL DMEM besiyeri eklendi. Kuyucuklara tüm gruplar için 3 tekrar olacak şekilde 1 µL Lenvatinib (%1 DMSO içinde), 1 µL negatif kontrol (%1 DMSO), 1 µL pozitif kontrol (%0,1 Triton X-100) eklendi. Maruziyet süresi 48 ve 72 saat sonunda besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Kuyucuklara 100 µL taze besiyeri eklendi ve üzerine 20 µL MTT çözeltisi eklendi. Mikroplaka 2 dk orbital çalkalayıcıda 150 rpm ile çalkalanıp %5 CO₂ içeren 37 °C’deki inkübatörde 3 saat süreyle inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklardan MTT’li besiyeri uzaklaştırıldı ve kuyucuklara 100 µL DMSO eklendi. 150 rpm ile 10 dk çalkalanarak formazan kristalleri çözündürüldü. Oluşan rengin şiddeti (OD) mikropalaka okuyuculu spektrofotometre ile 590 nm dalga boyunda ölçüldü.

Hücre canlılığı aşağıdaki formül kullanılarak bulundu:

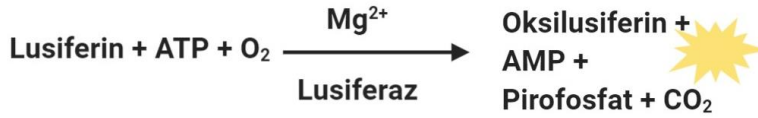
$$\% \text{ Canlılık} = (\text{örnek } OD_{590} - \text{pozitif kontrol } OD_{590}) / (\text{negatif kontrol } OD_{590} - \text{pozitif kontrol } OD_{590}) \times 100$$

3.2.5. ATP Miktar Tayini

Deneyin Esası

Adenozin trifosfat (ATP), metabolik olarak aktif tüm hücrelerde bulunan ve biyolojik sistemlerde enerji kaynağı olarak görev yapan moleküldür. Hücre ölümünden sonra hücrede ATP sentezi gerçekleşmez ve hücredeki mevcut ATP hızlıca yıkılır. Hücre içi ATP miktarı hücre canlılığının hassas bir göstergesidir. ATP miktarı

biyoluminesans yöntemi ile tayin edildi (Lomakina ve ark., 2015; Tokur ve Aksoy, 2017). Yöntem, luminesans özellik gösterebilen lusiferin maddesinin hücrede bulunan ATP varlığına bağlı olarak lusiferaz enzimiyle reaksiyona girmesine ve ortaya çıkan oksilüsiferinin yaydığı luminesansın 560 nm’de ölçülmesi esasına dayanır (Şekil 3-2).



Şekil 3-2: ATP miktar tayininin esası

Kullanılan Kimyasallar

Lizis Tamponu: 200 mM Tris (pH:7,5), 2 M NaCl, 20 mM EDTA, %0,2 Triton-X-100, %1 DTT. Kimyasal maddeler tartılarak 7 mL suda çözüldü ve 10 mL’ye tamamlandı. 2’şer mL’lik porsiyonlanarak -20 °C’de saklandı.

Standard Reaksiyon Çözeltisi: 8,9 mL H₂O, 0,5 mL 20X Reaksiyon Tamponu, 0,1 mL 0,1 M DTT, 0,5 mL 10 mM D-lusiferin, 2,5 µL lusiferaz karıştırılarak hazırlandı.

ATP çözeltileri: 5 mM ATP standard çözeltisinden 1 µM - 0,0315 µM ATP konsantrasyon aralığı su ile kademeli dilüsyon yapılarak hazırlandı.

Pozitif Kontrol: 200 µM H₂O₂ çözeltisi

Kit içeriği

Komponent A: 10 mM D-lusiferin (Kitte hazır olarak bulunan, D-lusiferin içeren şişeye 1 mL 1X Reaksiyon tamponu eklendi ve ışıktan korunarak -20 °C’de saklandı.)

Komponent B: Ateş böceği rekombinant lusiferaz (25 mM Tris asetattaki 5 mg/mL çözeltisi (pH:7,8), 0,2 M amonyum sülfat, % 15 (h/h) gliserol ve % 30 (h/h) etilen glikol)

Komponent C: 0,1 M Ditiyothreitol (DTT) (Kit içeriğinde hazır olarak bulunan, 25 mg DTT içeren şişeye 1,62 mL distile su eklenerek çözündürüldü ve 160 µL’lik porsiyonlara ayrılarak -20 °C’de saklandı)

Komponent D: 5 mM Adenozin 5’-trifosfat (ATP) (-20 °C’de saklandı.)

Komponent E: 20X Reaksiyon Tamponu (10 mL 500 mM Trisin tamponu (pH 7,8), 100 mM MgSO₄, 2 mM EDTA ve 2 mM sodyum azid (-20 °C’de saklandı)

Denevin yapılışı

Hücreler, 24 kuyucuklu plakaya 5×10^4 konsantrasyonda olacak şekilde ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hücrelere 800 µL besiyeri içerisinde kuyucuklardaki son konsantrasyon 10 µM, 5 µM ve 1,25 µM olacak şekilde Lenvatinib maruziyeti yapıldı. 48 ve 72 saat maruziyet süreleri sonunda besiyeri uzaklaştırıldı ve her kuyucuk 1X PBS ile yıkandı. Ardından 30 µL/kuyucuk lizis tamponu eklendi ve 5 dk boyunca çalkalanarak oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre bitiminde örnekler için her kuyucuktan 8 µL, standartlar için her konsantrasyondan 8 µL alınıp floresan ölçüme uygun platelere konuldu ve üzerine taze hazırlanmış 92 µL standart reaksiyon çözeltisi eklenerek karıştırıldı. Reaksiyonun ardından oksilüsiferinin yaydığı lüminesans 560 nm’de ölçüldü. Hazırlanan ATP standart eğrisi yardımıyla her bir örnekteki ATP miktarı hesaplandı. Kontrolün ATP içeriği %100 kabul edilerek, diğer örneklerdeki % ATP içeriği hesaplandı.

ATP Standart Ölçü Eğrisi

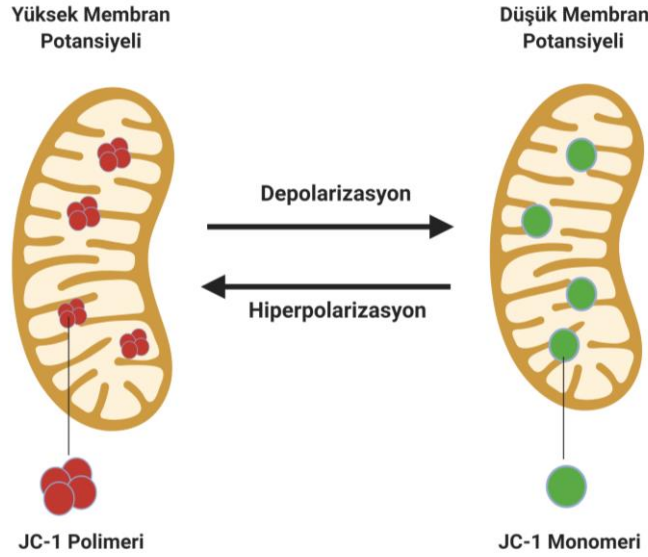
ATP Determination Kit (A22066)’te toz halde verilen ATP (komponent D) distile suda çözülerek 5 mM’lık stok ATP çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden 1 µM, 0,75 µM, 0,5 µM, 0,375 µM, 0,25 µM, 0,125 µM, 0,0625 µM, 0,0315 µM konsantrasyonlarında ATP standart çözeltileri hazırlandı. Floresan ölçüme uygun platelere standartların her konsantrasyonundan 8 µL alınıp üzerine taze hazırlanmış 92 µL standart reaksiyon çözeltisi eklenerek karıştırıldı. Reaksiyonun ardından lüminometre ile lüminesans şiddeti ölçüldü.

3.2.6. Mitokondri Membran Potansiyeli (MMP) Tayini

Denevin Esası

Tetraetilbenzimidazolkarbosiyanid iyodür (JC-1) kullanılarak akım sitometrisi ile ölçüm yapıldı. JC-1, polarize olmuş mitokondride biriken bir katyonik boyadır. Düşük membran potansiyeli olduğunda JC-1 monomer halindedir ve yeşil floresans (530±15 nm) verir. Yüksek membran potansiyelinde ise agregatlar oluşturarak kırmızı renkli emisyon (590±17.5 nm) vermektedir. Böylelikle, toplam agregat (kırmızı)

floresan sayısında bir azalma depolarizasyonun bir göstergesi iken, artış ise hiperpolarizasyonun bir göstergesidir (Gergely ve ark., 2002), (Şekil 3-3).



Şekil 3-3: JC-1 katyonik boyasının mitokondriyal membran potansiyeli tayinindeki çalışma prensibi

Deneyde Kullanılan Kimyasallar

0,2 mM JC-1 stok boya çözeltisi

PBS

Deneyin Yapılışı

Hücreler 25 cm²'lik flasklara 2,5x10⁵ yoğunlukta olacak şekilde ekildi. Hücrelere 5 mL besiyeri içerisinde flask içerisindeki son konsantrasyon 10 µM, 5 µM ve 1,25 µM olacak şekilde Lenvatinib maruziyeti yapıldı. 48 ve 72 saat maruziyet sonrasında tripsin ile hücreler kaldırılarak toplandı ve 5 dk 1500 rpm'de santrifüj edildi. Hücre pelleti üzerine 1X PBS eklendi ve hücreler süspande edilip FACS tüplerine alındıktan sonra 5 dk 1500 rpm'de santrifüj edildi. Ardından 2 µM son konsantrasyonda olacak şekilde JC-1 boyası eklendi. 37 °C'de CO₂'li ortamda 15 dk karanlıkta bekletilip 500 µL 1X PBS ile sulandırılarak akım sitometrisinde (FACSCalibur, Becton-Dickinson) FL1 (yeşil floresan-eksitasyon 488 nm, emisyon 530 nm) ve FL2 (kırmızı floresan-eksitasyon 488 nm, emisyon 585 nm) panelinde ölçüm yapıldı. Elde edilen sonuçlar BDsoftware (BD Biosciences) programı ile analiz edildi. Sonuçlar her grup için kırmızı/yeşil floresans ± standart sapma şeklinde verildi.

3.2.7. Mitokondriyal Kütle Tayini

Deneyin Esası

MitoTracker Green FM floresan boyası plazma membranını pasif difüzyonla geçerek mitokondrilerde biriken ve akım sitometresi yöntemi ile mitokondrileri görüntülemeye kullanılan bir boyadır.

Deneyde Kullanılan Kimyasallar

1 mM MitoTracker Green FM: 50 µg MitoTracker boya 74,42 µL DMSO ile çözündürüldü.

10 µM MitoTracker Green FM: 1 µL 1 mM MitoTracker Green FM boya 99 µL %10'luk DMSO ile karıştırıldı.

Boya karışımı: 100 µL 1 µM MitoTracker Green FM 4,9 mL DMEM besiyeri ile karıştırıldı.

Deneyin Yapılışı

Maruziyet sonrası hücreler 15 mL'lik santrifüj tüplerine toplandı ve 3000g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra hücre pelleti, 1X PBS ile yıkanması için 3000g'de 5 dk santrifüj yapıldı ve süpernatant atıldı. Hücre pelletleri üzerine boya karışımından 500 µL eklenip karıştırıldı. Oda sıcaklığında 15 dk karanlıkta inkübasyondan sonra 3000g'de 5 dk santrifüj yapıldı ve hücre pelleti üzerine 1 mL 1X PBS eklendi. Bu hücre-PBS süspansiyonu akış sitometresi tüplerine aktarıldı. Oluşan floresan ışığın şiddeti FL1 (eksitasyon 488 nm, emisyon 530 nm) kanalı ile akım sitometresinde ölçüldü. Elde edilen sonuçlar FlowJo v10 programı ile analiz edildi.

3.2.8. Protein Ekspresyon Analizi

3.2.8.1. Protein izolasyonu

Hücrelerden protein izolasyonu RIPA lizis tampon kiti (Santa Cruz Biotechnology) kullanılarak yapıldı. Üretici firmanın sağladığı kullanım talimatı doğrultusunda gerçekleştirildi.

Kit içeriği

Viyal 1: 1x lizis tamponu (1x TBS, %1 Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.004% sodium azide)

Viyal 2: 200mM Fenilmetilsülfonil florit (PMSF), DMSO'da çözündürülmüş

Viyal 3: Proteaz inhibitör kokteyli, DMSO'da çözündürülmüş

Viyal 4: 100 mM Sodyum ortovanadat, suda çözündürülmüş

RIPA Lizis Tamponu: Her 1 mL 1x lizis tamponu için 10 µL PMSF, 10 µL sodyum orthovanadat ve 15 µL proteaz inhibitör kokteyli eklenip karıştırıldı.

Denevin Yapılışı

Hücreler 75 cm²'lik flasklara 1×10^6 yoğunlukta ekildi. 24 saat sonra son konsantrasyon 10 µM, 5 µM ve 1,25 µM olacak şekilde Lenvatinib maruziyeti uygulandı. 48 ve 72 saatlik maruziyet sonrasında tripsin ile kaldırılıp toplanan hücreler 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Hücre pelleti üzerine yıkama yapmak amacıyla 1X PBS ilave edilip süspand edildi ve hücre süspansiyonu 1,5 mL'lik ependorflarda 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üst faz uzaklaştırıldıktan sonra hazırlanan RIPA lizis tamponu eklendi, karıştırıldıktan sonra 15 dk soğukta (buz üzerinde) bekletildi. Ardından -80 °C'de 3 kez dondur-çöz işlemi yapıldı. DNA ve RNA'dan kurtarmak amacıyla 3 kere 30 sn ultrasonik banyoda tutuldu. Ardından 14000 g'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra bu kez üst faz temiz ependorflara porsiyonlandı ve -80 °C'de saklandı.

3.2.8.2. İzole Edilen Proteinlerin Miktarlarının Ölçülmesi

Hücre lizatlarından izole edilen proteinlerin miktar ölçümü için bikinkoninik asit (BCA) Protein Tayin Kiti üretici kullanıldı.

Deneyin Esası

Cu^{2+} alkali ortamda proteinler tarafından Cu^{1+} 'e indirgenir. Bu yöntem, Cu^{1+} katyonunun BCA ile oluşturduğu kompleksin renk şiddetinin 562 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Oluşan renk protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Smith ve ark., 1985).

Kit İçeriği

BCA Reaktif A

BCA Reaktif B

2 mg/mL Bovin Serum Albumin

Deneyin Yapılışı

Standart eğri oluşturmak için öncelikle 2 mg/mL Bovin Serum Albumin bidistile su (ddH₂O) ile seyreltilerek standartlar hazırlandı. Reaktif A ve Reaktif B 50:1 oranında karıştırılarak çalışma çözeltisi hazırlandı. Standart ve örneklerden 10'ar µL 96 kuyucuklu mikropalakaya alındı. Standart ve örneklerin bulunduğu kuyucuklara 200 µL çalışma çözeltisi eklenip pipetleme yapılarak karıştırıldı. Mikropalaka 37 °C'de 30 dk inkübe edildikten sonra oluşan renk 562 nm'de mikropalaka okuyuculu spektrofotometre ile ölçüldü. Ardından standart eğri denklemi oluşturuldu ve izole edilen protein miktarları bu denkleme göre hesaplandı.

3.2.8.3. SDS-PAGE

Deneyin Esası

Elektroforez ile yürütülen jelde molekül ağırlıklarına göre proteinlerin ayrımının yapılmasıdır.

Kullanılan Kimyasallar

Örnek yükleme tamponu: 900 µL LDS örnek tamponu (4X) 100 µL β-Merkaptoetanol ile karıştırıldı.

Akrilamid jeller:

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8): 18,2 g Triz baz 90 mL ddH₂O ile çözündürüldü. pH %37'lik HCl ile 8,8'e ayarlandıktan sonra ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı. +4 °C'de saklandı.

1 M Tris-HCl (pH 6,8): 12,1 g Triz baz 90 mL ddH₂O ile çözündürüldü. pH %37'lik HCl ile 6,8'e ayarlandıktan sonra ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı. +4 °C'de saklandı.

%10 SDS: 1 g SDS ddH₂O ile çözündürülerek 10 mL'ye tamamlandı.

%10 APS: 0,11 g APS 1 mL ddH₂O ile çözündürüldü (deney öncesi taze hazırlandı)

%30'luk Akrilamid-Bis akrilamid çözeltisi

TEMED

SDS-PAGE protein markeri

Yürütme Tamponu: 6,06 g (50 mM) Tris baz, 28,52 g glisin (380 mM), 5 g SDS (% 0,5), 900 mL ddH₂O ile çözündürüldü. pH 8,5-8,7 %37'lik HCl ile ayarlandı ve son hacim 1 L'ye ddH₂O ile tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

Jellerin Hazırlanması

İzole edilen proteinlerin elektroforez ile yürütülmesi için akrilamid jeller (yürütme jeli ve ayırma jeli) hazırlandı. Bunun için önce 1,5 mm'lik SDS-PAGE jel hazırlama camlarının alt tarafından 6 cm yüksekliğe kadar yürütme jeli döküldü. Jel polimerize olduktan sonra ayırma jeli döküldü ve 10 veya 15 kuyucuklu taraklar takıldı. Jel tamamen polimerize olana kadar beklendi.

Yürütme Jeli (%12)

ddH₂O -- 3,3 mL
1,5 M Tris-HCl (pH: 8,8) --2,5 mL
%30 Akrilamid-bisakrilamid -- 4 mL
%10 SDS -- 100 µL
%10 APS -- 100 µL
TEMED -- 8 µL

Ayırma Jeli (%5)

ddH₂O -- 2,7 mL
1 M Tris-HCl (pH: 6,8) -- 500 µL
%30 Akrilamid-bisakrilamid -- 670 µL
%10 SDS -- 40 µL
%10 APS -- 40 µL
TEMED -- 8 µL

Protein konsantrasyonu belirlenmiş örneklerden 40 µg protein 1X örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı. Proteinlerin denatürasyonu için 95 °C'de 5 dk bekletildi (OXPHOS analizi için örnekler 50 °C'de 5 dk denatüre edildi). Örnekler soğutulduktan sonra elektroforez tankına yerleştirilmiş akrilamid jellerin 10 veya 15'lik taraklarla oluşturulmuş kuyucuklarına eşit hacimde yüklendi. Yükleme kontrolü olarak β-aktin kullanıldı. Yürütme tamponu eklendi. Proteinlerin yürümesini takip etmek için örneklerle eş zamanlı olarak bir kuyucuğa 3-5 µL protein markeri koyuldu. Proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlamak için +4°C'de önce 10 dk 120 V ile yürütüldü, daha sonra 100 V ile jelin sonuna gelene kadar yürütüldü.

3.2.8.4. Western Blot

Deneyin Esası

SDS-PAGE yöntemiyle ağırlıklarına göre ayrılan proteinlerin çeşitli işlemler ile membrana transferinden sonra proteine özgü işaretlenmiş antikorlar kullanılarak protein ekspresyonunun yarı kantitatif ya da kantitatif olarak analiz edilmesidir.

Kullanılan Kimyasallar

Transfer tamponu: 3,03 g Tris baz (25mM), 14,26 g glisin (190 mM) 800 mL ddH₂O ile çözündürüldükten sonra üzerine 200 mL metanol eklendi. +4 °C’de saklandı.

Nitroselüloz membran: Kullanım öncesi transfer tamponunda 5 dk bekletildi.

PVDF membran: Kullanım öncesi metanol içinde 10 dk bekletildi.

TBS (Tris Tamponu): 12,1 g Tris baz (100 mM), 8,76 g NaCl (150 mM) 900 mL ddH₂O ile çözündürüldükten sonra pH 7,5’e %37’lik HCl ile ayarlandı ve son hacim 1 L’ye ddH₂O ile tamamlandı.

TBST (%0,1 Tween-20 içeren TBS): 1 L TBS 1 mL Tween-20 ile karıştırıldı.

%5 Yağsız Süt Tozu Çözeltilisi: 5 g Yağsız süt tozu 100 mL TBST ile çözündürüldü.

Primer antikorlar: OXPHOS, sitokrom c, LONP1 ve P21 primer antikorlarından 5’er µL alınıp ayrı tüplerdeki 5 mL yağsız süt tozu çözeltisi ile karıştırıldı (1:1000).

Sekonder antikorlar: Anti-rabbit (sc-516102, Santa Cruz Biotechnology) ve Anti-mouse (sc-2357, Santa Cruz Biotechnology) HRP konjuge sekonder antikorlarından ayrı ayrı 0,5 µL alınıp 5 mL yağsız süt tozu çözeltisi ile karıştırıldı (1:10000).

Ponceau S boyası: 0,1 g Ponceau S 500 µL asetik asit ile çözündürüldükten sonra 50 mL’ye ddH₂O ile tamamlandı.

Denevin Yapılışı

Jellerdeki proteinlerin nitroselüloz veya PVDF membrana aktarılması için ıslak transfer sistemi uygulandı. Tank içerisinde transfer tampon bulunan sistemde proteinlerin membrana aktarımı +4 °C’de 75 sabit voltta 3 saat süre içerisinde gerçekleştirildi. Proteinlerin nitroselüloz membrana düzgün bir şekilde aktarılıp aktarılmadığını kontrol etmek için membran Ponceau S boya çözeltisine konuldu, TBST ile çalkalanarak yıkandı. Bloklama işlemi için membranlar oda sıcaklığında 1 saat %5 yağsız süt tozu çözeltisi içerisinde çalkalandı. Bloklamadan sonra membranlar 3 kez 5 dk TBST ile yıkandı. Yıkamanın sonrasında membranlar hedeflenen proteinlere özgü primer antikorlarla +4 °C’de gece boyunca çalkalanarak inkübe edildi. Ertesi gün membranlar tekrar 3 kez 5 dk TBST ile yıkandı. Ardından primer antikorun üretildiği canlıya özgü üretilmiş olan, HRP konjuge sekonder antikorlar ile 2 saat oda sıcaklığında

çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 3 kez 5 dk TBST ile yıkanan membranlar Kemilüminesans Substrat Kit (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate) ile 2 dk muamele edildi ve protein bantları Biorad Chemidoc Jel Görüntüleme Sistemi ile görüntülendi. Western blotlama ile elde edilen protein bantlarının yoğunlukları ImageJ programıyla analiz edildi. Kontrol olarak proteinler kendi β -aktin protein bantlarına oranlanarak normalize edildi.

3.2.9. RNA Düzeyinde Gen İfadesi Analizi

3.2.9.1. Total RNA İzolasyonu

Ticari olarak satışta bulunan High Pure RNA Isolation Kit kullanılarak kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi.

Kit İçeriği

Lizis-Bağlama tamponu: 4,5 M Guanidin-HCl ve 50 mM Tris-HCl ve %30 Triton X-100 (ağırlık/hacim) (pH: 6,6)

DNaz I (rekombinant, liyofilize): 10 KU liyofilize DNazI 550 μ L elüsyon tamponunda çözüldükten sonra porsiyonlanarak -20°C’de muhafaza edildi.

DNaz inkübasyon tamponu: 1 M NaCl ve 20 mM Tris-HCl (pH:7,0)

Yıkama tamponu I: 5 M Guanidin-HCl ve 20 mM Tris-HCl (pH 6,6)

Yıkama tamponu II: 20 mM NaCl + 2 mM Tris-HCl, (pH 7,5)

Elüsyon tamponu: RNaz içermeyen su

Filtreli ve Toplama tüpü

DNaz I hariç tüm kit içeriği oda ısısında muhafaza edildi.

Deneyin Yapılışı

75 cm²’lik hücre kültürü flasklarına 1x10⁶ hücre ekimi yapılarak 24 saat inkübe edildi. 3.2.2. başlığında açıklandığı gibi hazırlanan ilaç konsantrasyonlarında (1,25 μ M, 5 μ M ve 10 μ M Lenvatinib) maruziyet gerçekleştirildi. 48 saat ve 72 saat maruziyet sürelerinin sonunda hücreler tripsin ile kaldırılarak toplandı ve 15 mL’lik falkon tüplerine aktarıldı, 1500 rpm’ de 5 dk santrifüj edildi. Hücre pelletinin üzerine 1x10⁶ hücre/200 μ L olacak şekilde soğuk 1X PBS eklendi. Pipetaj yapıldıktan sonra 200 μ L hücre süspansiyonuna 400 μ L lizis tamponu eklenip karıştırıldı. Kit içerisinde verilen toplama tüpü ve filtreli tüp birleştirildikten sonra hazırlanan karışım filtreli tüpe aktarıldı ve 8000 g’de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpündeki elüat atıldı. Bir diğer steril endorfta 90 μ L DNaz I inkübasyon tamponu ve 10 μ L DNaz karıştırıldı.

Bu karışım filtreli tüpteki kartuşların yüzeyine eklendi ve oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. Ardından filtreli tüpe 500 µL yıkama tamponu I eklendi ve 8000 g'de 15 sn santrifüj edildikten sonra toplama tüpündeki elüat atıldı. Kartuşun üzerine 500 µL yıkama tamponu II eklenerek 8000 g'de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüpündeki elüat yine atıldı. Ardından filtreli tüpteki kartuşa 200 µL yıkama tamponu II eklenip 13000 g'de 2 dk santrifüj edildi. Filtreli tüp 1,5 mL'lik steril ependorf ile birleştirildi ve toplama tüpü atıldı. Filtreli tüpteki kartuşun üzerine 50 µL elüsyon tamponu eklenerek 8000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Elde edilen elüatın cDNA sentezinde kullanılmadan önce RNA miktarı ölçüldü ve sonraki deneylerde kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edildi.

3.2.9.2. RNA'nın Saflık ve Miktar Tayini

Hücre lizatlarından izole edilen RNA'ların miktarları mikrolaka okuyuculu spektrofotometrede Take-3 plate kullanılarak 260 ve 280 nm'de tayin edildi. RNA'ların saflığı ise A_{260}/A_{280} oranına göre hesaplandı. Oran 1,8-2 arasında olduğunda RNA'lar saf olarak kabul edildi.

3.2.9.3. cDNA Sentezi

Ticari olarak satışı bulunan Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Life Science) kullanılarak, kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi.

Kit İçeriği

Transkriptör revers transkriptaz: 200 mM potasyum fosfat ve 2 mM ditiyotritol olan % 0,2 Triton X-100 ve % 50 gliserol karışımı (pH=7,2)

Transkriptör revers transkriptaz reaksiyon tamponu (5X): 250 mM Tris-HCl ve 150 mM KCl ile 40 mM $MgCl_2$ bulunan karışım (pH=8,5)

RNaz inhibitörü: 20 mM Hepes-KOH ve 50 mM KCl ile 8 mM ditiyotritol bulunan % 50 gliserol karışımı (pH=7,6)

Deoksinükleotit karışımı: 10 mM, dATP, dGTP, dCTP, dTTP

Anchored-oligo (dT)18 primer

Random hekzamer primer

Kontrol RNA

Kontrol primer, insan porfobilinojen deaminaz (PBGD) karışımı: PBGD için 5 µM ileri (F) ve geri (R) primer

PZR kalite su

Deneyin Yapılışı

Saflığı ve miktarı belirlenen RNA örnekleri PZR kalite su ile seyreltilerek 1000 ng'a eşitlendi. 1000 ng total RNA örneği, 1 µL Ancored oligo, 2 µL Random hekzamer primer buz üzerinde steril, nukleaz içermeyen PZR tüplerine eklendi ve son hacim PZR kalite su kullanılarak 13 µL'ye tamamlanarak karıştırıldı. Primer karışımının denatürasyonu için örnekler termal döngü cihazında 65 °C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası örnekler buza alınarak üzerlerine 4 µL transkriptör revers transkriptaz reaksiyon tamponu, 0,5 µL RNaz inhibitörü, 2 µL deoksinükleotit karışımı, 0,5 µL transkripör revers transkriptaz eklendi ve dikkatlice karıştırıldı. cDNA sentezi için örnekler termal döngü cihazında 55 °C'de 30 dk, ardından revers transkriptaz enziminin inaktive edilmesi için 85 °C' de 5 dk inkübe edildi. Sentezlenen cDNA'lar buz üzerine alındı ve deneylerde kullanılmak üzere -20 °C' de saklandı.

3.2.9.4. Gen Ekspresyonunun Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR ile Belirlenmesi

Lenvatinib'e maruz bırakılan H9c2 hücrelerde, belirlenen genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için öncelikle primer sentezleri yapıldı (Tablo 3-1). Ardından ticari olarak satışı bulunan 2X PowerUp Syber Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak prosedürüne uygun analiz gerçekleştirildi.

Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Çalışmalarında Kullanılacak Primerlerin Seçilmesi

NCBI-Primer Blast veya Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) programları ve Rattus norvegicus elektronik veri bankası kullanılarak hedef gene spesifik primerler belirlendi. Primerlerin mRNA'ya özgü çoğalmasının kontrolü Santa Cruz Kaliforniya Üniversitesi'nin (UCSC) in siliko PZR arayüzü (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) vasıtasıyla gerçekleştirildi. Hedef mRNA'ya spesifik çoğaldığı belirlenen Northwestern Üniversitesi'ne ait OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) ve Sequence Manipulation Suite (https://www.genscript.com/sms2/pcr_primer_stats.html) programları kullanılarak saç tokası ya da dimer yapmayan primer çiftleri gerçek zamanlı PZR çalışması için belirlendi.

Tablo 3-1: Gen Ekspresyonu analizinde kullanılan primer çiftleri

Gen Adı	Forward primer (FP)	Reverse primer (RP)	Erime Derecesi (°C)
MFN1	AGAATTTCCTTGGGCTCCAT	AGAAAGGAGGTGGACGGTTT	59,9
MFN2	GTGACTGGACTCCCCAGAAA	ATCACAATGCCAGACACCAA	60
DRP1	GTAGGTGATCAGCCCCAAGGA	CATCTGGATCTACCTCTCTGGAA	60
FIS-1	AAATGATGCTACGCAGGCTT	CCTGGACCATGACCAAGTTT	59,9
OPA 1	GCATCTGGTTTCCCGAAGTA	GAGCCTTGCAGCTAACCTTG	60
SOD 2	CCTGACTATCTGAAAGCCATTG	CACAGTGCTGCAATGCTCTACAC	63,2
ASK-1	GAATCGCCTTCGAATCAAAC	TCCATCTTCATCCTCCCAAG	60
JNK	TCGGAGCATGAGCGTGTCT	AGACGGCTTCTCAGCGATCA	63
BETA AKTİN	ATGGTGGGTATGGGTCAGAA	CTTTTCACGGTTGGCCTTAG	60

Deneyin Esası

Gerçek zamanlı PZR sistemi çeşitli floresan boya ların DNA parçasına bağlanmasıyla oluşan floresansın şiddetinin ölçülmesi esasına dayanır. Ölçülen floresans şiddeti ilgili hedef genin ekspresyonu ile orantılıdır.

Kit içeriği**2X PowerUp Syber Green Master Mix**

Gene özgü Forward ve Reverse primerler: Tablo 3-1’de verilmiştir.

RNaz içermeyen su**Deneyin Yapılışı**

Her örnek için 10 ng cDNA, 5 µL 2X PowerUp Syber Green Master Mix, 500 nM forward ve reverse primer olmak üzere son hacim 10 µL/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu PZR cihazına uygun mikrolakaya dağıtıldı. Ardından Stepone Plus Cihazı kullanılarak gen ekspresyonu seviyesi kantitatif olarak belirlendi (Tablo 3-2 ve Tablo 3-3).

Tablo 3-2: Gerçek Zamanlı PZR Protokolü (60 °C)

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
UDG (urasil DNA glikozilaz) aktivasyonu	50 °C	2 dk	—
Dual-Lock DNA polimeraz	95 °C	2 dk	—
Denatürasyon	95 °C	15 sn	40
Primerlerin bağlanması ve zincirin uzaması	60 °C	1 dk	40

Tablo 3-3: Gerçek Zamanlı PZR Protokolü (63 °C)

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
UDG (urasil DNA glikozilaz) aktivasyonu	50 °C	2 dk	—
Dual-Lock DNA polimeraz	95 °C	2 dk	—
Denatürasyon	95 °C	15 sn	40
Primerlerin bağlanması ve zincirin uzaması	63 °C	1 dk	40

İlgili hedef genlerin ifadesindeki değişimler $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak hesaplandı (Livak ve Schmittgen, 2001). Cihaz tarafından ölçülen Ct (cycle treshold) değerinin kullanıldığı bu yöntemde ΔCT , $\Delta\Delta CT$ ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri hesaplanır. Her bir örnek için, hedef genin Ct değeri referans gen olarak kullanılan β -aktin'in Ct değerine normalize edilerek ΔCT değerleri hesaplandı. Hedef genlerin maruziyet grubu ΔCT değerleri, aynı genlerin kontrol grubunun ΔCT değerinden çıkarılarak $\Delta\Delta CT$ değeri hesaplandı. Daha sonra $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri hesaplandı. Gen ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre normalize edilerek relatif gen ekspresyon seviyeleri hesaplandı.

3.3. Mitokondriyal DNA İçeriğinin Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR ile Belirlenmesi

3.3.1.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu G-spin Total DNA Extraction Kit (Intron Biotechnology) kullanılarak ve kullanma talimatına uygun olarak gerçekleştirildi.

Kit içeriği:

CL tamponu

BL tamponu

WA tamponu

WB tamponu: Kullanmadan önce 40 mL absolü etanol ilave edildi.

CE tamponu

Spin column ve toplama tüpü

Liyofilize RNase A: 300 μ L ddH₂O' de çözüldü. Porsiyonlanarak -20 °C'de saklandı.

Liyofilize Proteinaz K: 1,1 mL ddH₂O çözüldü. Porsiyonlanarak -20 °C'de saklandı.

Denevin yapılışı:

75 cm²'lik hücre kültürü flasklarına 1×10^6 hücre ekimi yapıldı ve 24 saat inkübe edildi. 3.2.3 başlığında anlatıldığı şekilde 48 ve 72 saat lenvatinib maruziyeti uygulandı ve maruziyet süresi sonunda tripsinizasyon ile hücreler toplandı. 1300 rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Hücre pelleti üzerine 1X PBS ilave edilerek 1300 rpm' de 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan hücre pelleti üzerine 200 µL CL tamponu, 20 µL proteineaz K ve 5 µL RNase eklendi, iyice karıştırılıp vortekslendi. Hücrelerin parçalanması için hücre lizatı 15 dk 56 °C'de inkübe edildikten sonra 200 µL BL tamponu eklendi, iyice karıştırıldı ve karışım 70 °C'de 5 dk inkübe edildi. DNA'nın kırılmaması için bundan sonra vorteks işlemi yapılmadı. Karışıma 200 µL absolü etanol ilave edilip iyice karıştırıldı ve kısa bir spinleme yapıldı. Spin Column ve toplama tüpü birleştirildi ve hazırlanan karışım kolona konuldu, 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi, elüat atıldı. Kolona 700 µL WA tamponu eklenip 1300 rpm rpm'de 1 dk santrifüj edildi, elüat atıldı. Ardından kolona 700 µL WB tamponu eklendi, 1300 rpm rpm'de 1 dk santrifüj edildi, elüat atıldı. Membranın kuruması için 1 dk daha santrifüj yapıldıktan sonra kolon steril 1,5 mL'lik yeni ependorf ile birleştirildi. Membrana bağlanan DNA'nın elüsyonunu sağlamak için CE tamponu ilave edilip oda sıcaklığında 1 dk bekletildi. 1300 rpm rpm'de 1 dk santrifüj edildikten sonra filtrat deneylerde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

3.3.1.2. DNA'nın Saflık ve Miktar Tayini

Hücre lizatlarından izole edilen DNA'ların miktarı ve saflığını tayin etmek için mikropłaka okuyuculu spektrofotometrede Take-3 plate kullanılarak 260 ve 280 nm'de ölçüm yapıldı. 260 nm'de elde edilen ölçümler DNA miktarının belirlenmesinde kullanıldı. DNA'ların saflığı ise A_{260}/A_{280} oranına göre değerlendirildi. Oran 1,8-2 olduğunda DNA'lar saf olarak kabul edildi.

3.3.1.3. Mitokondriyal DNA İçeriğinin Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR ile Belirlenmesi

Mitokondriyal DNA (mtDNA) içeriği analizi mtDNA'ya (NADH dehidrojenaz) ve nükleer DNA'ya (β-aktin) özgü primer çiftleri kullanılarak (Tablo 3-4) ve Bölüm 3.2.9.4 anlatıldığı şekilde gerçek zamanlı PZR yöntemi ile gerçekleştirildi. MtDNA içeriği aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Quiros ve ark., 2018).

$$\Delta CT = C_{t_{\text{nükleer DNA geni}}} - C_{t_{\text{mtDNA geni}}}$$

$$MtDNA \text{ içeriği} = 2 \times 2^{\Delta CT}$$

Tablo 3-4: Mitokondriyal DNA içeriği analizi için kullanılan primer dizileri

Gen Adı	5'- 3'primer dizisi	Erime Derecesi (°C)
NADH dehidrojenaz (Kompleks I)	F: ACCTCACCCCCTTATCAACC	60,1
	R: GGAGCTCGATTTGTTTCTGC	60,0
BETA AKTİN	F: ATGGTGGGTATGGGTCAGAA	60,0
	R: CTTTTCACGGTTGGCCTTAG	59,7

3.3.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM)

Lenvatinib maruziyet grubu ve kontrol grubu hücrelerinde ve organellerinde meydana gelen değişiklikler TEM ile görüntülendi.

Geçirimli elektron mikroskobu veya Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) analizi için Bölüm 3.2.3'de anlatıldığı şekilde yapılan Lenvatinib maruziyetleri sonrasında hücreler tripsinizasyon ile veya scrapper ile 5×10^7 hücre/mL olacak şekilde toplandı. 15 mL'lik falkon tüplere alınarak 2 mL PBS ile karıştırıldı. 1000 g'de 10 dk santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı ve iki kez PBS ile karıştırılarak 1000 g'de 5'er dk. santrifüj edildi. Hücre pelleti daha sonra 0,1 M PBS içinde hazırlanmış % 2.5 Glutaraldehit (2 mL 0,1 M) içine alındı ve fiksasyon için bir gece boyunca 4°C'de bekletildi. Birinci fiksasyon sonrası hücreler PBS ile iki kez santrifüj edildi (1000 g'de 5 dk). PBS ile yapılan bu yıkamalar sonrası ikinci fiksasyon için hücreler %1'lik Osmiyum tetroksit (2mL) ile karıştırılıp 4°C'de 1 saat boyunca bekletildi. Fiksasyondan sonra hücreler iki kez PBS ile karıştırılarak 1000 g'de 5 dk santrifüj edildi. Pastör pipet yardımıyla %5' lik eriyik agar falkon tüp içerisindeki hücrelere eklendi ve karışımın donmaması için hızlıca homojen olana kadar karıştırıldı. Homojen hücre-agar karışımı lam üzerine küçük damlalar halinde damlatıldı ve donması için beklendi. Lam üzerindeki agar parçaları ufak parçalar halinde kesildi (bistüri ucu kullanarak) ve renkli şişeler içerisine alındı. Şişe içerisindeki hücrelere uranil asetat eklenerek 4°C'de 15 dk inkübe edildi. Daha sonra agara gömülü hücreler aşağıdaki alkol serilerinden geçirildi.

1. % 30 etil alkol 10 dakika (4°C)

2. % 50 etil alkol 10 dakika (4°C)
3. % 70 etil alkol 10 dakika (4°C)
4. % 90 etil alkol 10 dakika (4°C)
5. % 90 etil alkol 10 dakika (4°C)

Son seriden sonra hücreler saf propilen oksitte 4°C’de 10 dk bekletildi. Ardından pipet yardımıyla saf propilen oksit atıldı ve 1:1 oranında propilen oksit/epon karışımı ilave edilerek 4°C’de 10 dk bekletildi. Saf Epon karışımı eklendi ve hücreler 48 saat 4°C’de tutuldu. Epon muamlesinin ardından hücreler araldite gömüldü ve 60 °C’de 48 saat polimerize edildi. Örneklerden ultramikrotom ile 60 nm kalınlığında tam ince kesitler alındı. Bakır gridler üzerine alınan bu kesitler uranil asetat-kurşun sitrat ile boyandıktan sonra yapısal bulgular transmisyon elektron mikroskopunda JEOL JEM 1220 incelendi

3.3.3. İstatistiksel Analizler

Veriler "ortalama $\pm$ standart hata" olarak verildi. Gruplar arası farklılıkların karşılaştırılması SPSS 21.0 paket programı ve Graphpad Prism versiyon 8.00 programı ile yapıldı. Tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA, Analysis of Variance) takiben Tukey post-hoc testi yapıldı ve * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ olan sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi.

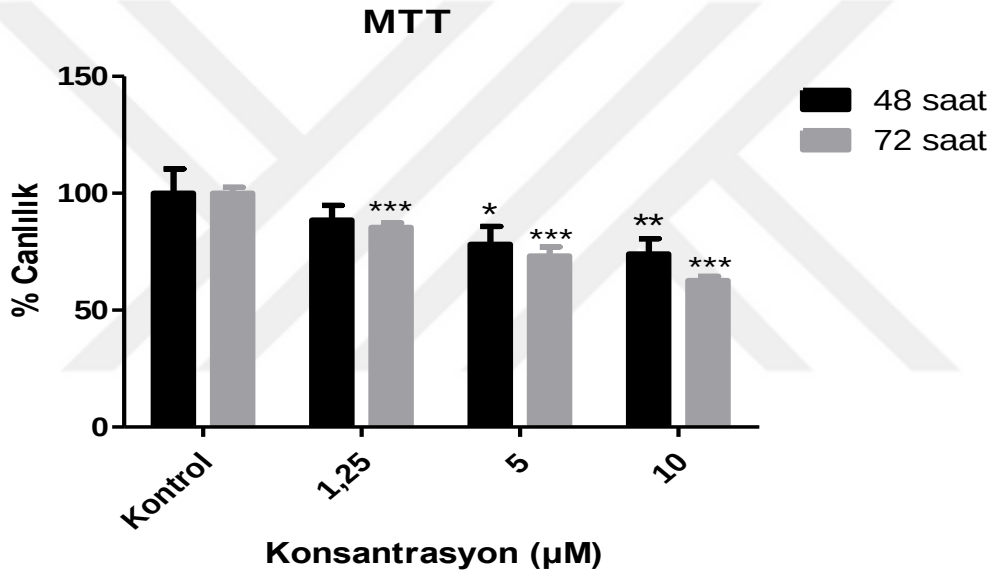
3.3.4. Şekiller ve Grafikler

Çalışmadaki görsellerin oluşturulmasında Biorender programı kullanıldı. Bulguların grafik olarak hazırlanmasında ise Graphpad Prism versiyon 8.00 programı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. MTT Sitotoksosite Testi Sonuçları

48 ve 72 saat Lenvatinib maruziyeti süsönrasında hücre canlılığında meydana gelen değışiklikler Şekil 4-1'de gösterilmiştir. 48 saat maruziyette 5 μ M ve 10 μ M Lenvatinib konsantrasyonları hücre canlılığında %22 ($p<0,05$) ve %26 ($p<0,01$ kontrole karşı) azalmaya neden olmuştur. 72 saat sonra hücre canlılığı doza bağı olarak sırasıyla %15, %27 ve %38 inhibe olmuştur ($p<0,001$).



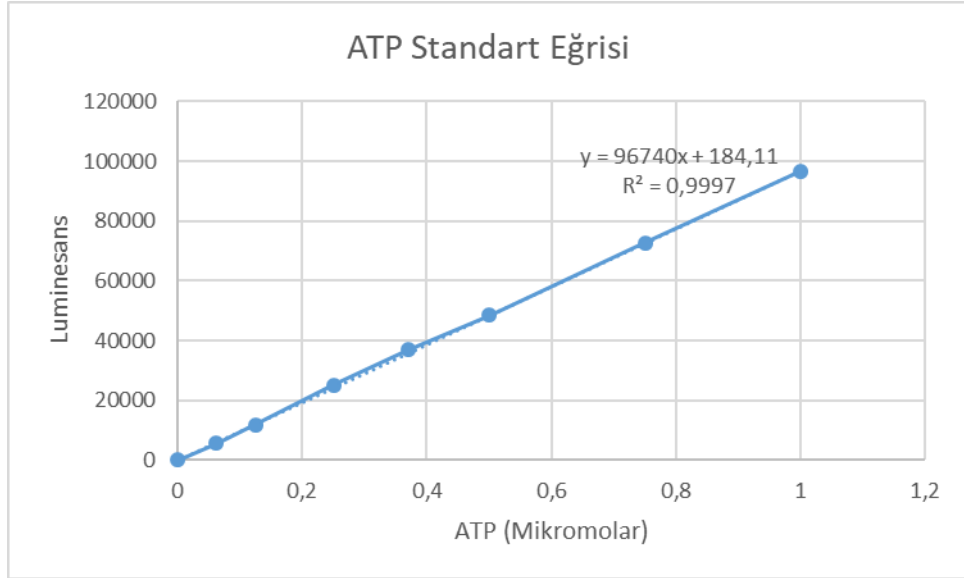
Şekil 4-1: 48 ve 72 saat Lenvatinib maruziyeti sonrası hücre canlılığında meydana gelen değışiklikler

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir.

4.2. ATP Miktarı

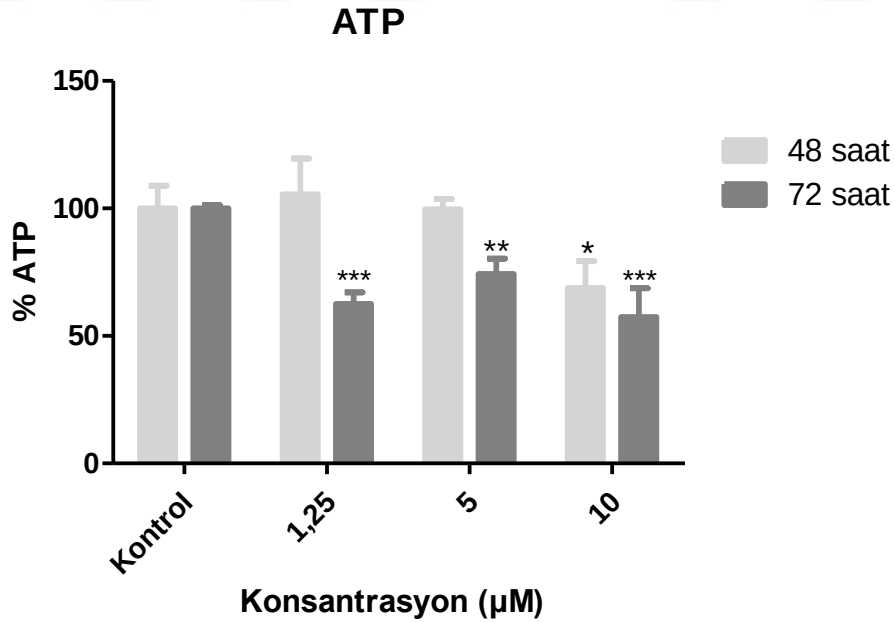
Bölüm 3.2.5 de anlatılan şekilde hazırlanan ATP standart ölçü eğrisindeki (Şekil 4-2) denkleme göre örneklerdeki ATP miktarı hesaplandı. Kontrol grubunun ATP miktarı 100 kabul edilerek, örneklerin %ATP miktarı hesaplandı.

Sonuçlar %ATP $\pm$ standart sapma şeklinde verildi.



Şekil 4-2: ATP standart ölçü eğrisi

Şekil 4-3’de görüldüğü gibi 48 saatlik Lenvatinib maruziyetinde sadece 10 μ M konsantrasyonda hücre içi ATP miktarı kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$). 72 saatlik maruziyette ise ATP miktarı her üç dozda da anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,01$) ($p < 0,001$).



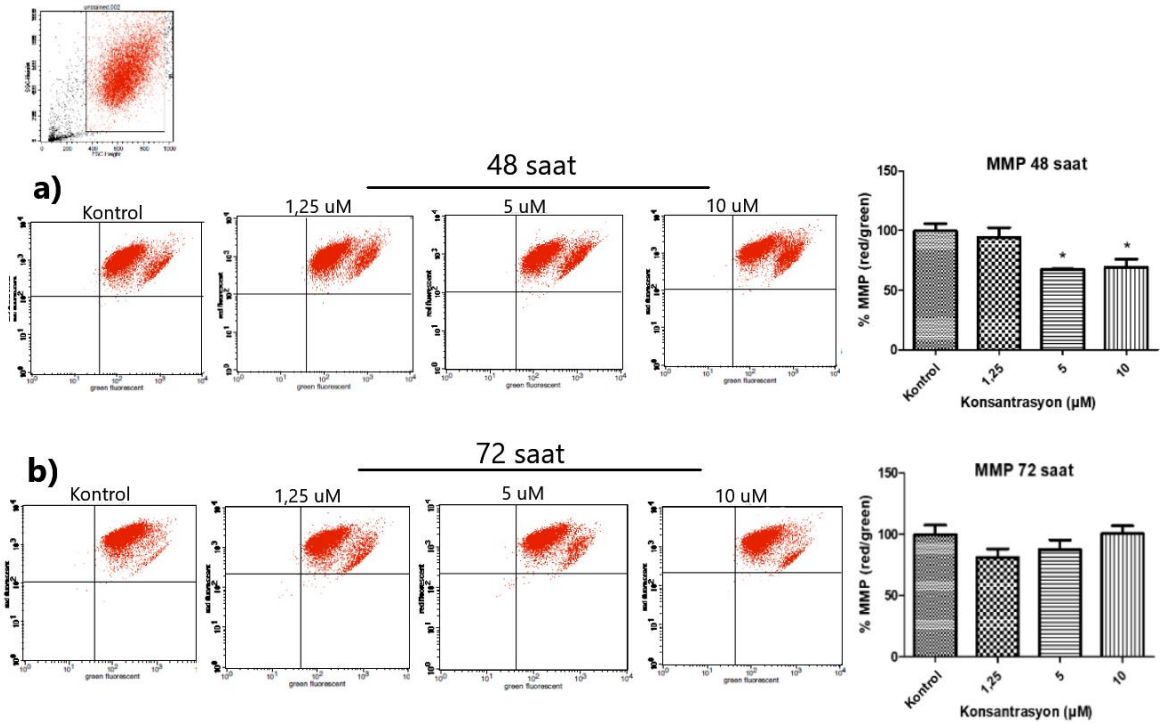
Şekil 4-3: 48 ve 72 saat Lenvatinib maruziyeti sonrası hücre içi ATP miktarında meydana gelen değişiklikler

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. * $p < 0,05$ ve ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir.

4.3. Mitokondriyal Membran Potansiyeli

Mitokondri membran potansiyeli (MMP) akış sitometresi ile tayin edildi. Mitokondri membran potansiyeli normal olan hücreler kırmızı floresan gösterirken, membran potansiyeli bozulmuş hücreler yeşil floresan gösterdi.

Lenvatinib, 48 saat maruziyet sonrasında 5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarda anlamlı düşüşe neden oldu ($p < 0,05$). 72 saat maruziyet sonrasında MMP’de tüm konsantrasyon gruplarında anlamlı bir düşüş görülmedi ($p > 0,05$) (Şekil 4-4).

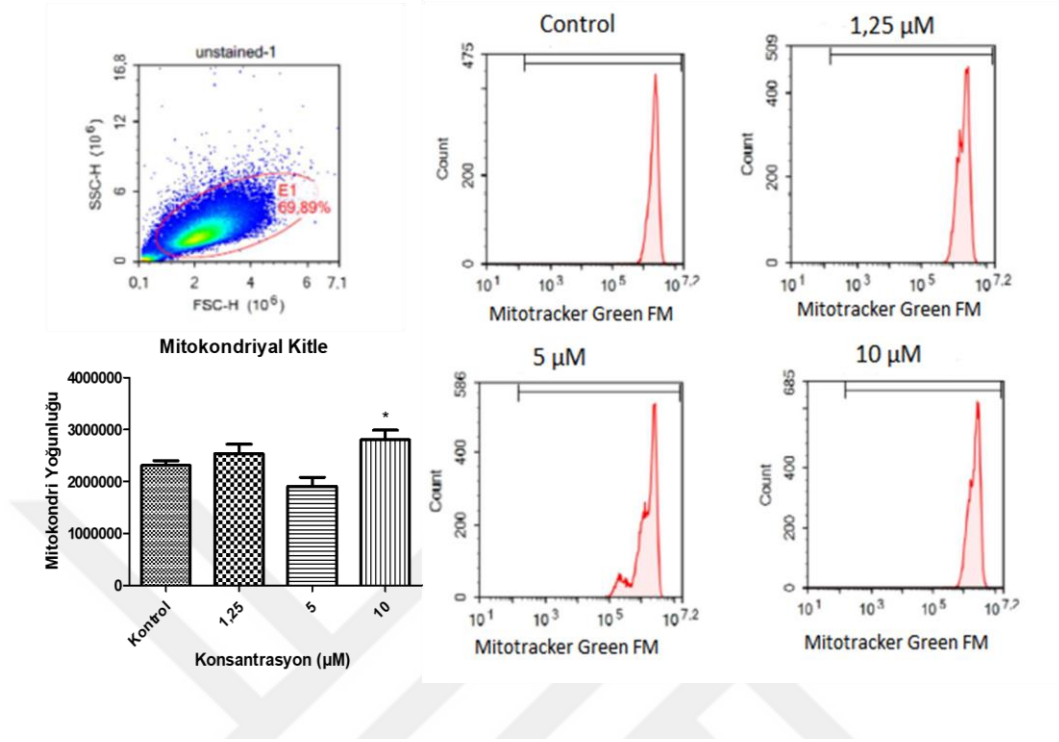


Şekil 4-4: Lenvatinib maruziyet sonrası mitokondriyal membran potansiyeli sonuçları a) 48 saat b) 72 saat

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. * $p < 0,05$ kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir.

4.4. Mitokondriyal Kütle Tayini

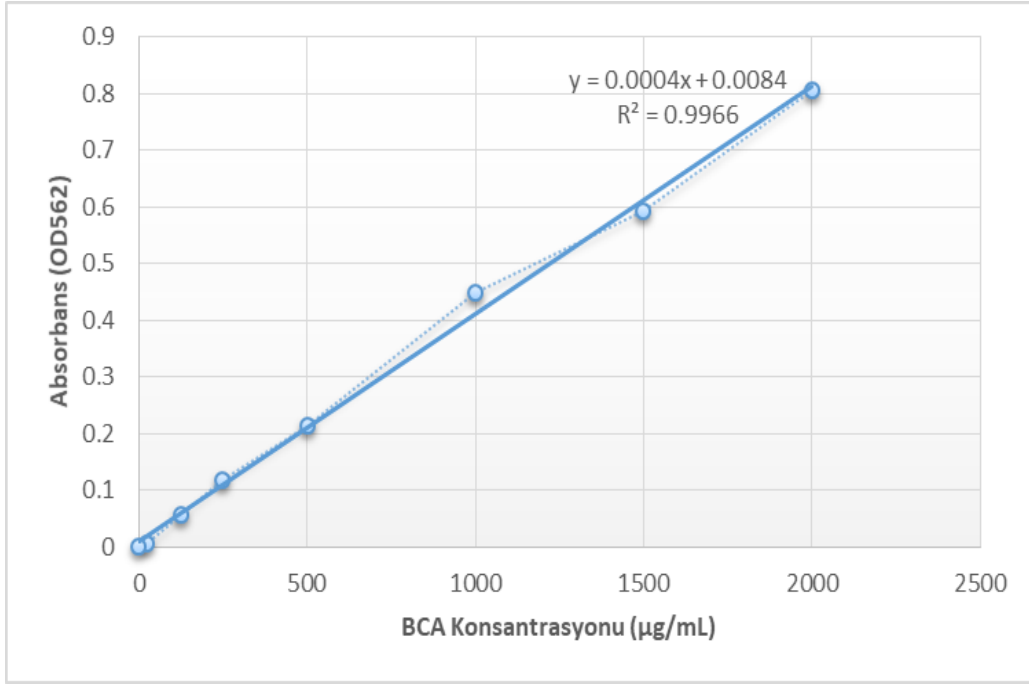
Hücrelerinin mitokondriyal kütleleri 48 saatlik maruziyet sonrasında akım sitometrisi yöntemi ile ölçüldü. Elde edilen sonuçlara göre Lenvatinib, 10 μ M konsantrasyonda mitokondri kütlesinde anlamlı artış yarattı ($p < 0,05$), diğer konsantrasyonlarda anlamlı bir değişiklik olmadı ($p > 0,05$), (Şekil 4-5).



Şekil 4-5: 48 saat Lenvatinib maruziyeti sonrası ölçülen mitokondriyal kütle tayini sonuçları

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. * $p < 0,05$ kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir.

Protein ekspresyon analizine geçmeden önce, hazırlanan hücre lizatlarının protein miktarları standart BCA çözeltileri kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisi ile hesaplandı. Hazırlanan ölçü eğrisi ve denklemi Şekil 4-6'de verildi. Eğri denkleminde örnek gruplarındaki protein miktarları hesaplandı.



Şekil 4-6: Protein standart ölçü eğrisi

48 ve 72 saat 1,25 µM, 5µM, 10 µM konsantrasyonlarda Lenvatinib maruziyeti yapılan H9c2 hücrelerinde ETZ proteinleri Kompleks I-V, Sitokrom c (Sit c), LONP1 ve P21 protein seviyeleri ölçüldü.

Kompleks I protein ekspresyon seviyesi 48 saatlik maruziyet sonucunda 1,25 µM konsantrasyonda anlamlı bir artış gösterdi ($p < 0,01$). 5 µM konsantrasyonda ise anlamlı değişim göstermedi ($p > 0,05$). 10 µM konsantrasyonda ekspresyon seviyesi anlamlı şekilde azalma gösterdi ($p < 0,05$). 72 saatlik maruziyet sonucunda Kompleks I seviyesi 1,25 µM konsantrasyonda yüksek derecede anlamlı bir artış gösterdi ($p < 0,001$), 5 µM konsantrasyonda ise anlamlı değişim göstermedi ($p > 0,05$). 10 µM konsantrasyonda ekspresyon seviyesi yüksek derecede anlamlı azalma gösterdi ($p < 0,001$), (Şekil 4-7).

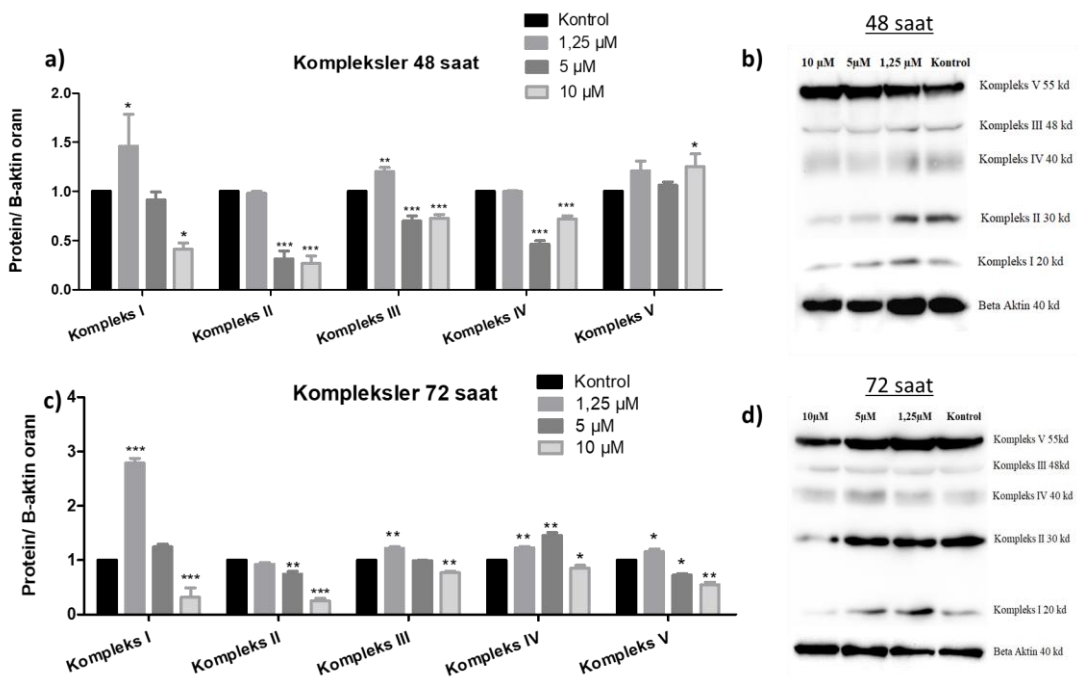
Kompleks II protein ekspresyon seviyesi 1,25 µM konsantrasyonda 48 ve 72 saatlik maruziyetler sonucunda anlamlı değişim göstermedi ($p > 0,05$), 5 µM ve 10 µM konsantrasyonlarda ise yüksek derecede anlamlı azalma gösterdi ($p < 0,01$), ($p < 0,001$), (Şekil 4-7).

Kompleks III protein ekspresyon seviyesi 1,25 µM konsantrasyonda 48 ve 72 saatlik maruziyetler sonucunda yüksek derecede anlamlı artış gösterdi ($p < 0,01$). 5 µM

konsantrasyonda 48 saat Lenvatinib maruziyeti sonrasında yüksek derecede anlamlı azalma gösterirken ($p<0,001$), 72 saat maruziyet sonunda anlamlı değişim göstermedi ($p>0,05$). 10 μM konsantrasyonda 48 ve 72 saatlik maruziyetler sonucunda ekspresyon seviyeleri yüksek derecede anlamlı azalma göstdedi ($p<0,001$), ($p<0,01$) (Şekil 4-7).

Kompleks IV protein ekspresyon seviyesi 1,25 μM konsantrasyonda 48 saatlik maruziyet sonucunda anlamlı değişim göstermezken ($p>0,05$), 72 saatlik maruziyet sonucunda yüksek derecede anlamlı artış göstdedi ($p<0,01$). 5 μM konsantrasyonda 48 saat maruziyet sonunda yüksek derecede anlamlı azalma gösterirken ($p<0,001$), 72 saat maruziyet sonunda yüksek derecede anlamlı artış gösterdi ($p<0,01$). 10 μM konsantrasyonda 48 saat maruziyet sonunda ekspresyon seviyesi yüksek derecede anlamlı ($p<0,001$), 72 saat maruziyet sonunda anlamlı azalma gösterdi ($p<0,05$), (Şekil 4-7).

Kompleks V protein ekspresyon seviyesi 48 saatlik maruziyet sonunda üç konsantrasyonda da artış gösterdi, artış 10 μM konsantrasyonda anlamlı oldu ($p<0,05$). 5 μM konsantrasyonda 48 saat maruziyet sonunda anlamlı olmayan artış, 72 saat sonunda ise anlamlı azalma gösterdi ($p<0,05$). 10 μM da 48 saat maruziyet sonunda ekspresyonda anlamlı ($p<0,05$) artış, 72 saat sonunda ise yüksek derecede anlamlı azalma gösterdi ($p<0,01$), (Şekil 4-7).

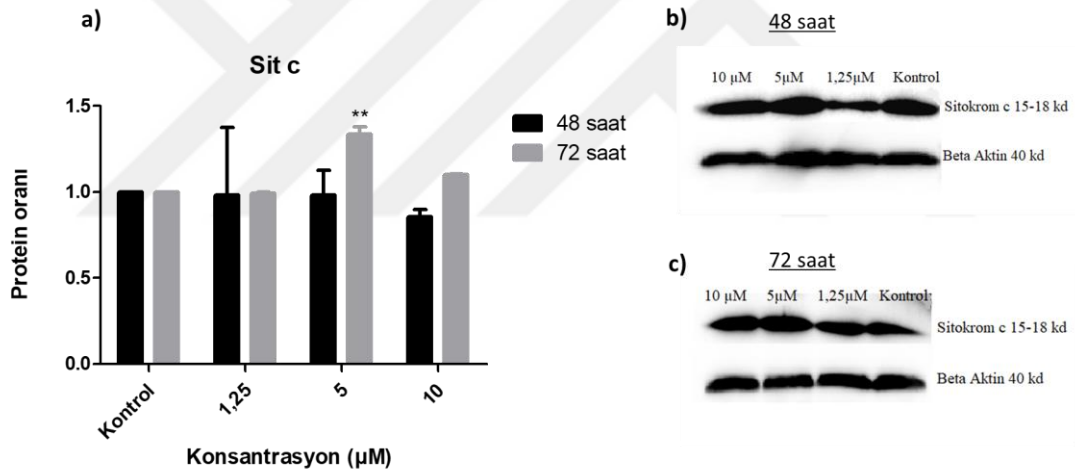


Şekil 4-7: Lenvatinib maruziyeti yapılan hücrelerde mitokondriyal komplekslerin ekspresyonlarında meydana gelen değişiklikler

- a) 48 saat maruziyet sonrası proteinlerin kontrole göre bar değişim grafiği
- b) 48 saat maruziyet sonrası proteinlerin ve yükleme kontrolü olarak β -aktinin örnek western blot görüntüsü
- c) 72 saat maruziyet sonrası proteinlerin kontrole göre bar değişim grafiği
- d) 48 saat maruziyet sonrası proteinlerin ve yükleme kontrolü olarak β -aktinin örnek western blot görüntüsü

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir.

Sit c protein ekspresyon seviyesi 48 saatlik maruziyet sonunda üç konsantrasyonda da anlamlı değişim göstermedi ($p>0,05$). 72 saat maruziyet sonunda ise sadece 5 μ M konsantrasyon yüksek derecede anlamlı bir artış gösterdi ($p<0,01$), (Şekil 4-8).

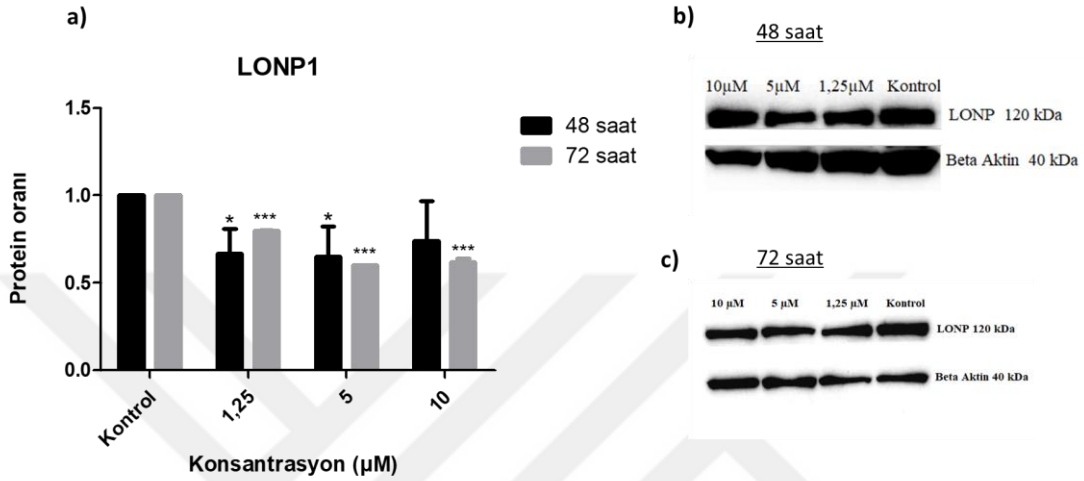


Şekil 4-8: Lenvatinib maruziyeti yapılan hücrelerde Sit c ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler

- a) 48 ve 72 saat maruziyet sonrası proteinlerin kontrole göre bar değişim grafiği
- b) 48 saat maruziyet sonrası proteinlerin ve yükleme kontrolü olarak β -aktinin örnek western blot görüntüsü
- c) 72 saat maruziyet sonrası proteinlerin ve yükleme kontrolü olarak β -aktinin örnek western blot görüntüsü

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, ve *** $p<0,001$ kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir.

LONP1 protein ekspresyon seviyesi 1,25 μ M ve 5 μ M konsantrasyonunda 48 saat maruziyet sonucunda anlamlı şekilde azalma gösterdi ($p<0,05$). 10 μ M konsantrasyonunda görülen azalma anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). 72 saat maruziyet sonrası protein ekspresyonu tüm konsantrasyonlarda yüksek derece anlamlı azalma gösterdi ($p<0,001$), (Şekil 4-9).

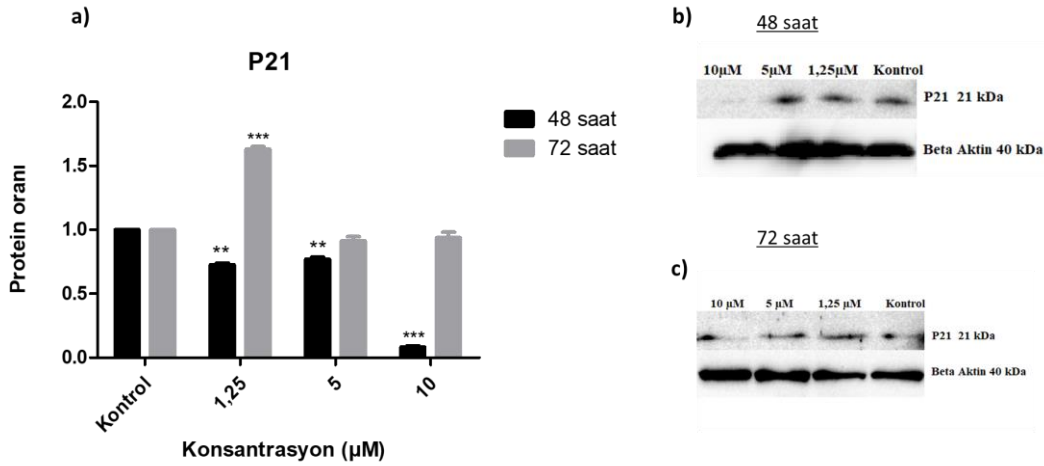


Şekil 4-9: Lenvatinib maruziyeti yapılan hücrelerde LONP1 ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler

- a) 48 ve 72 saat maruziyet sonrası proteinlerin kontrole göre bar değişim grafiği
- b) 48 saat maruziyet sonrası proteinlerin ve yükleme kontrolü olarak β -aktinin örnek western blot görüntüsü
- c) 72 saat maruziyet sonrası proteinlerin ve yükleme kontrolü olarak β -aktinin örnek western blot görüntüsü

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. * $p<0,05$ ve *** $p<0,001$ kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir.

P21 protein ekspresyon seviyesi 48 saat maruziyet sonrası tüm konsantrasyonlarda yüksek derece anlamlı azalma gösterdi ($p<0,01$) ($p<0,001$). 72 saat maruziyet sonrasında ekspresyon 1,25 μ M konsantrasyonunda yüksek derecede anlamlı artış gösterdi ($p<0,001$), diğer iki konsantrasyonda anlamlı değişim göstermedi ($p>0,05$), (Şekil 4-10).



Şekil 4-10: Lenvatinib maruziyeti yapılan hücrelerde P21 ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler

- a) 48 ve 72 saat maruziyet sonrası proteinlerin kontrole göre bar değişim grafiği
b) 48 saat maruziyet sonrası proteinlerin ve yükleme kontrolü olarak β -aktinin örnek western blot görüntüsü
c) 72 saat maruziyet sonrası proteinlerin ve yükleme kontrolü olarak β -aktinin örnek western blot görüntüsü

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$ kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir.

4.6. RNA Düzeyinde Gen İfadesi Analizi Sonuçları

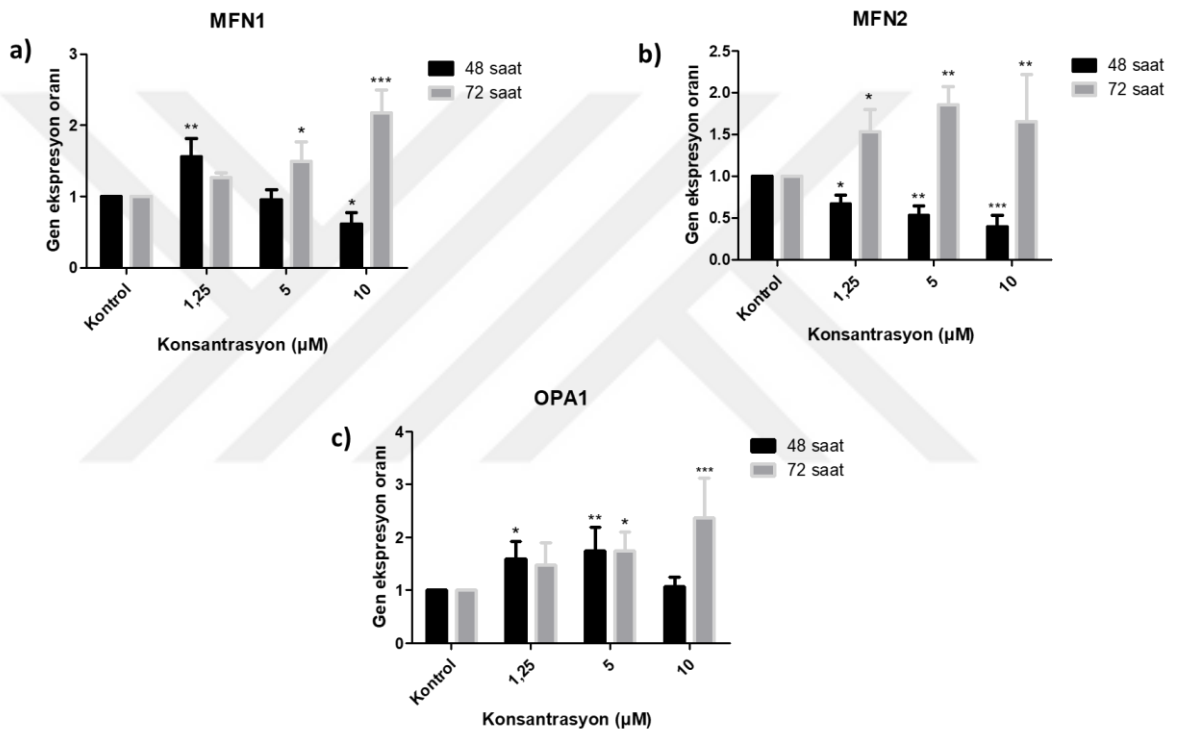
48 ve 72 saat 1,25 μ M, 5 μ M, 10 μ M konsantrasyonlarda Lenvatinib maruziyeti yapılan H9c2 hücrelerinde mitokondri dinamiklerinde rol oynayan genler MFN1, MFN2, OPA1, DRP1, FIS1; apoptoz yolağında rol oynayan genler ASK1 ve JNK; mitokondriyal antioksidan enzim SOD2 genlerinin ekspresyonu ölçüldü.

48 Saatlik Lenvatinib maruziyeti sonunda 1,25 μ M konsantrasyonda füzyon genlerinden MFN1 ekspresyon seviyesinde anlamlı artış görüldü ($p < 0,01$). 5 μ M konsantrasyonda anlamlı bir değişim gözlenmedi ($p > 0,05$), 10 μ M maruziyette ise anlamlı şekilde azalma görüldü ($p < 0,05$). 72 saat maruziyet sonunda ise 5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarda anlamlı artışlar görüldü ($p < 0,05$) ($p < 0,001$) (Şekil 4-11a).

Diğer bir füzyon geni olan MFN2 ekspresyon seviyesinde 48 saat maruziyet sonrasında doza bağlı anlamlı azalmalar görüldü ($p < 0,05$) ($p < 0,01$) ($p < 0,001$). 72 saat

maruziyet sonunda ise 5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarda anlamlı artışlar görüldü ($p<0,01$) (Şekil 4-11b).

Diğer bir füzyon geni olan OPA1 geni ekspresyon seviyesinde 48 saat Lenvatinib maruziyetinden sonra 1,25 μ M ve 5 μ M konsantrasyonlarında anlamlı artışlar gözlemlendi ($p<0,05$) ($p<0,01$), 10 μ M konsantrasyonda ise anlamlı bir değişim olmadı ($p>0,05$). 72 saatlik maruziyet sonrasında ekspresyon seviyesinde 1,25 μ M konsantrasyonda anlamlı bir değişim görülmedi ($p>0,05$), 5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarda anlamlı artışlar görüldü ($p<0,05$) ($p<0,001$) (Şekil 4-11c).



Şekil 4-11: Lenvatinib maruziyeti yapılan hücrelerde füzyon genleri ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler

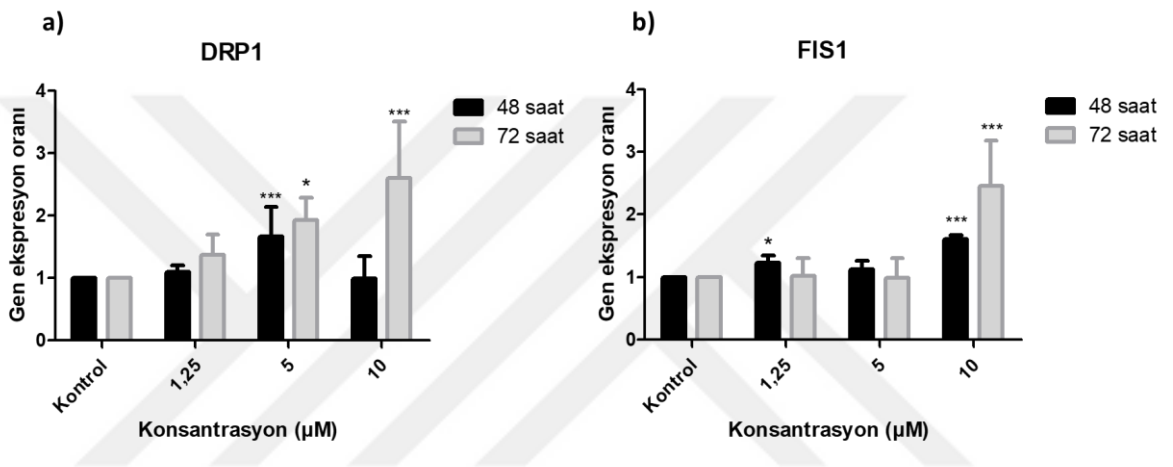
- a) 48 ve 72 saat maruziyet sonrası MFN1 geni kontrole göre bar değişim grafiği
- b) 48 ve 72 saat maruziyet sonrası MFN2 geni kontrole göre bar değişim grafiği
- c) 48 ve 72 saat maruziyet sonrası OPA1 geni kontrole göre bar değişim grafiği

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$ kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir.

Fisyon genlerinden DRP1 ekspresyon seviyesinde, 48 saat maruziyet sonrasında 5 μ M konsantrasyonda anlamlı artış saptandı ($p<0,001$), diğer iki konsantrasyonda anlamlı bir değişim olmadı ($p>0,05$). 72 saatlik maruziyet sonrasında ise 1,25 μ M

konsantrasyonunda ekspresyon seviyesinde anlamlı olmayan bir artış gözlemlendi ($p>0,05$), 5 μM ve 10 μM konsantrasyonlarda ise anlamlı artışlar saptandı ($p<0,05$) ($p<0,001$), (Şekil 4-12a).

FIS1 ekspresyon seviyesinde 48 saatlik maruziyet sonunda 1,25 μM ve 10 μM konsantrasyonlarda anlamlı artışlar gözlemlendi ($p<0,05$), ($p<0,001$), 5 μM konsantrasyonda anlamlı olmayan bir artış oldu ($p>0,05$). 72 saatlik maruziyet sonrasında ekspresyon seviyesi 10 μM konsantrasyonunda yüksek derecede anlamlı artış gösterdi ($p<0,001$), diğer iki dozda anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 4-12b).

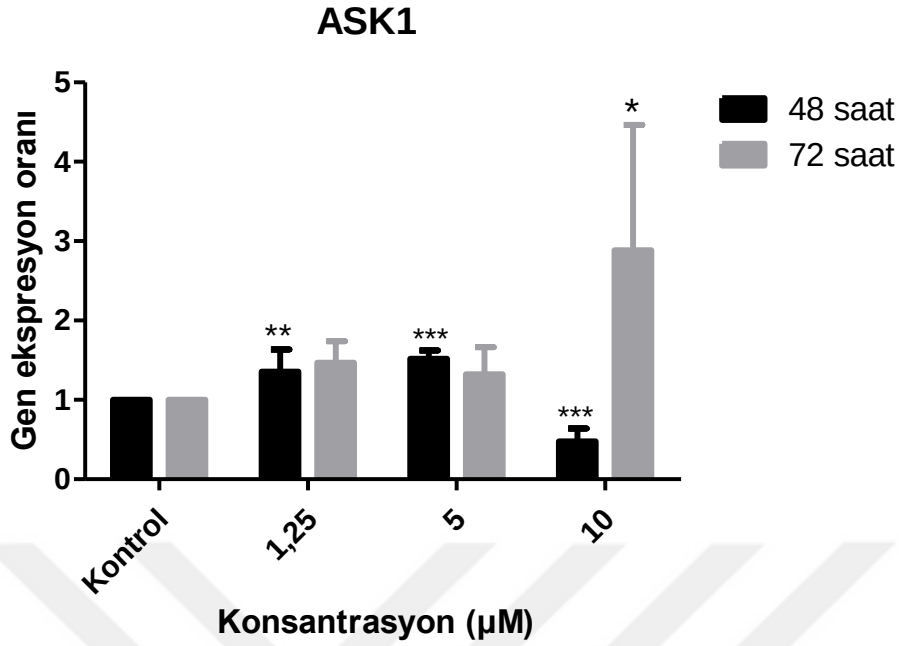


Şekil 4-12: Lenvatinib maruziyeti yapılan hücrelerde fisyon genleri ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler

- a) 48 ve 72 saat maruziyet sonrası DRP1 geni kontrole göre bar değişim grafiği
b) 48 ve 72 saat maruziyet sonrası FIS1 geni kontrole göre bar değişim grafiği

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. * $p<0,05$ ve *** $p<0,001$ kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir.

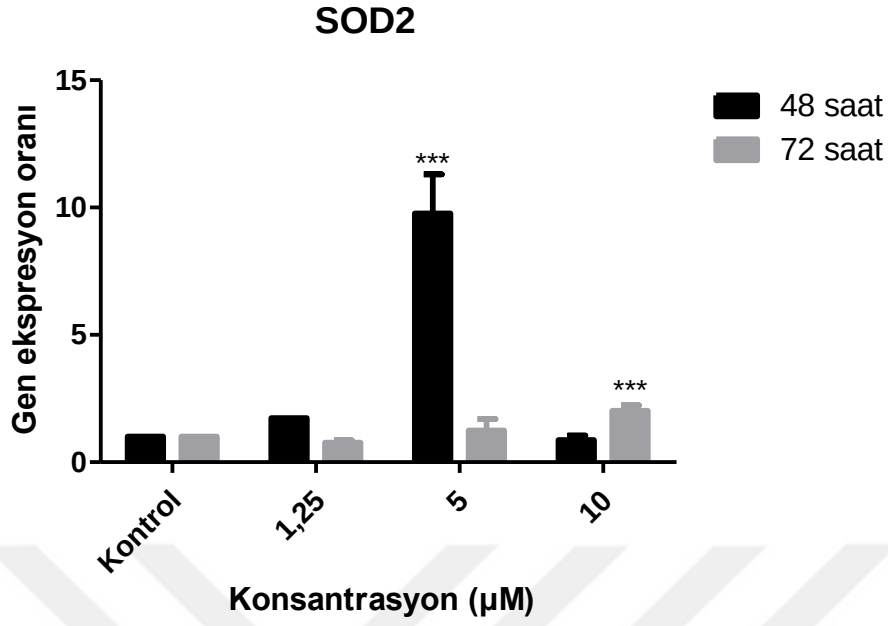
ASK1 ekspresyon seviyesinde 48 saatlik maruziyet sonunda 1,25 μM , 5 μM konsantrasyonlarında konsantrasyonlarda anlamlı artışlar gözlemlendi ($p<0,01$) ($p<0,001$), 10 μM konsantrasyonunda ise yüksek derecede anlamlı azalma görüldü ($p<0,001$). 72 saatlik maruziyet sonrasında ise ekspresyon sadece 10 μM konsantrasyon grubunda anlamlı artış gösterdi ($p<0,05$) (Şekil 4-13).



Şekil 4-13: 48 ve 72 saatlik 1,25 µM, 5 µM ve 10 µM Lenvatinib konsantrasyonlarına maruziyet sonrası ölçülen ASK1 gen ekspresyonunda görülen değişikliklerin grafiği.

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir.

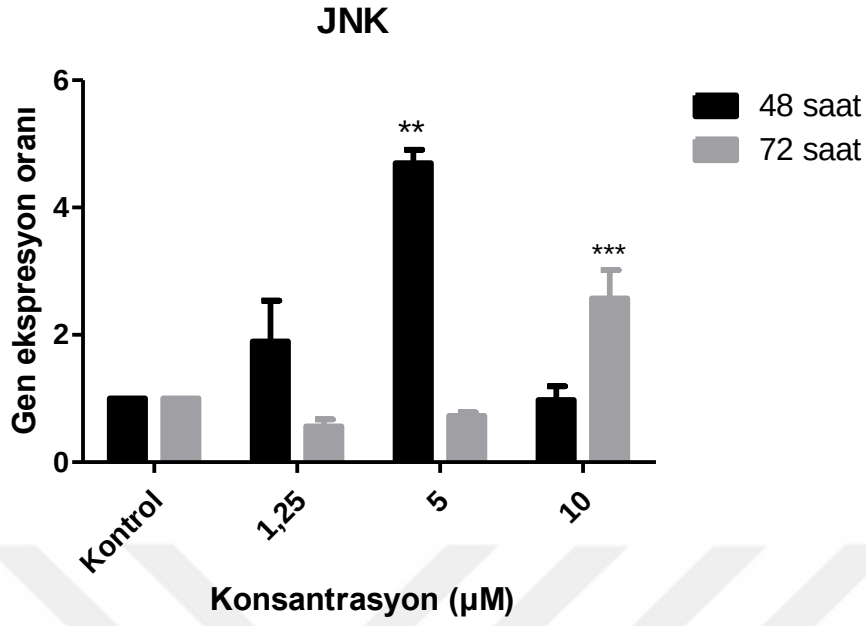
SOD2 ekspresyonunda 48 saatlik maruziyet sonrasında sadece 5 µM konsantrasyon grubunda yüksek derecede anlamlı artış gözlemlendi ($p<0,001$), 72 saat maruziyet sonrasında ise sadece 10 µM konsantrasyon yüksek derecede anlamlı artış gözlemlendi ($p<0,001$) (Şekil 4-14).



Şekil 4-14: 48 ve 72 saatlik 1,25 µM, 5 µM ve 10 µM Lenvatinib konsantrasyonlarına maruziyet sonrası ölçülen SOD2 gen ekspresyonunda görülen değişikliklerin grafiği.

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. *** $p < 0,001$ kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir.

JNK ekspresyonunda 48 saatlik maruziyet sonrasında sadece 5 µM konsantrasyonda, 72 saat maruziyet sonrasında ise 10 µM konsantrasyonda yüksek derecede anlamlı artışlar ($p < 0,01$) ($p < 0,001$) gözlemlendi (Şekil 4-15).

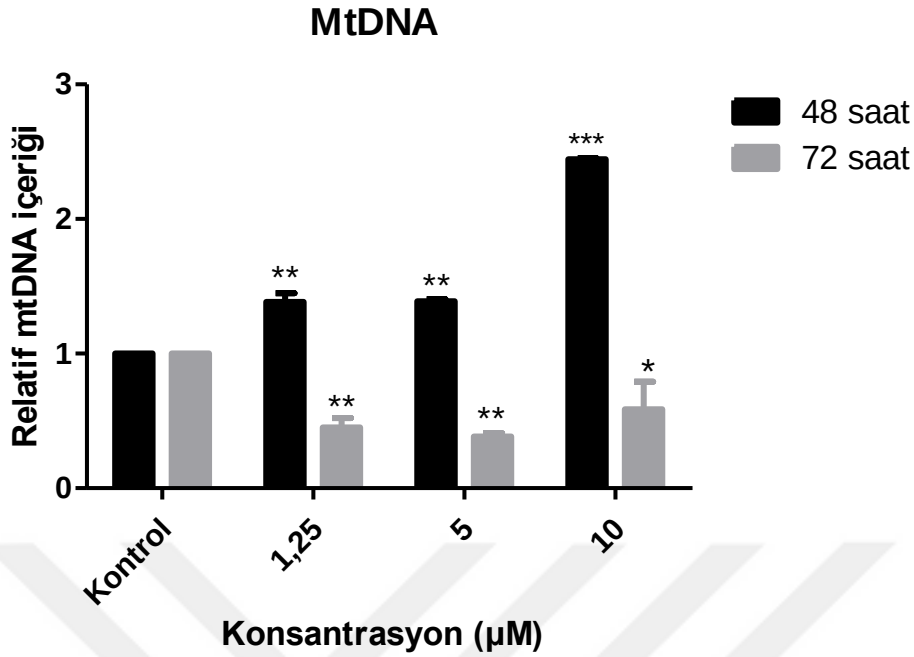


Şekil 4-15: 48 ve 72 saatlik 1,25 µM, 5 µM ve 10 µM Lenvatinib konsantrasyonlarına maruziyet sonrası ölçülen JNK gen ekspresyonunda görülen değişikliklerin grafiği.

Tüm sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. **p<0,01 ve ***p<0,001 kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir.

4.7. Mitokondriyal DNA İçeriği

Lenvatinib maruziyeti yapılan H9c2 hücrelerinin mtDNA içeriği 48 saat sonunda tüm konsantrasyonlarda anlamlı olarak artış gösterdi (p<0,001), (p<0,01); 72 saat maruziyet sonucu ise tüm dozlarda anlamlı azalma görüldü (p<0,01), (p<0,05), (Şekil 4-16).

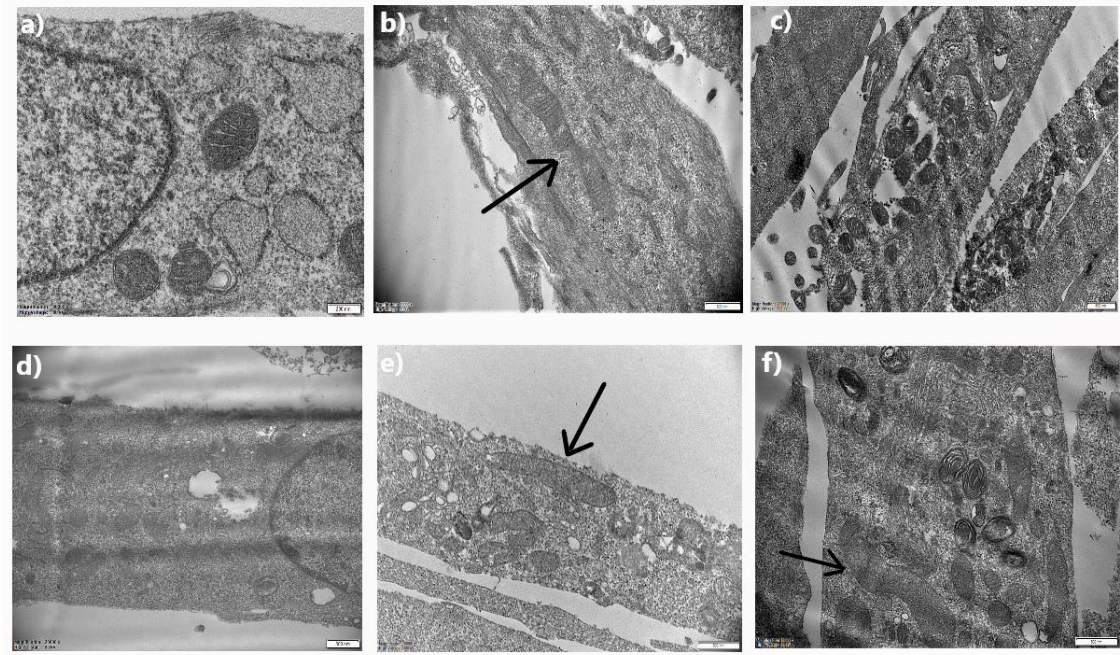


Şekil 4-16: 48 ve 72 saat 1,25 µM, 5 µM ve 10 µM Lenvatinib maruziyeti sonucunda ölçülen mtDNA içeriği

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$ kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir.

4.8. Transmisyon Elektron Mikroskopisi (TEM) Görüntüleri

Lenvatinib 48 saat 5 µM ve 10 µM maruziyeti sonucunda mitokondrilerde uzama, mitokondri yoğunluğunun artması ve mitokondriyal çift katlı membran yapısının bozulduğu gözlemlendi. 48 saat maruziyet sonunda 5 µM konsantrasyonda iki mitokondrinin birleşmiş olduğu veya bir mitokondrinin uzamış veya bölünmekte olduğu, 10 µM konsantrasyonda ise mitokondrilerin yoğunluğunun artmış olduğu ve mitokondriyal şekillerde bozukluk görüldü. 72 saat maruziyet sonucunda hem 5 µM hem 10 µM konsantrasyon görüntülerinde özellikle uzamış mitokondriler dikkat çekti (Şekil 4-17).



Şekil 4-17: 48 ve 72 saat Lenvatinib maruziyeti yapılan hücrelerin TEM görüntüleri

a) 48 saat maruziyet sonrası kontrol grubu, b) 48 saat 5 μ M maruziyet grubu, c) 48 saat 10 μ M maruziyet grubu, d) 72 saat maruziyet sonrası kontrol grubu, e) 72 saat 5 μ M maruziyet grubu, f) 72 saat 10 μ M maruziyet grubu. Ölçek: 200 nm ve 500 nm.

4.9. Tüm Bulguların Tablosu

Tablo 4-1’de yapılmış deneylerin bulgularında negatif kontrole kıyasla saptanan anlamlı farklar ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) topluca gösterilmiştir.

Tablo 4-1: 48 ve 72 saat 1,25 μ M, 5 μ M ve 10 μ M Lenvatinib Maruziyeti Sonucunda Elde Edilen Bulguların Özeti

Parametre			48 Saat			72 Saat		
İlaç Konsantrasyonları			1,25 μ M	5 μ M	10 μ M	1,25 μ M	5 μ M	10 μ M
Hücre Canlılığı Testleri	Sitotoksosite (MTT)		↔	↓	↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
	Hücre içi ATP Miktarı		↔	↔	↓	↓↓↓	↓↓	↓↓↓
Akış Sitometrisi Ölçümleri	Mitokondriyal Membran Potansiyeli (MMP)		↔	↓	↓	↔	↔	↔
	Total Mitokondri Kütlesi		↔	↔	↑	—	—	—
Protein Seviyesi	Kompleks I		↑	↔	↓	↑↑↑	↔	↓↓↓
	Kompleks II		↔	↓↓↓	↓↓↓	↔	↓↓	↓↓↓
	Kompleks III		↑↑	↓↓↓	↓↓↓	↑↑	↔	↓↓
	Kompleks IV		↔	↓↓↓	↓↓↓	↑↑	↑↑	↓
	Kompleks V		↔	↔	↑	↑	↓	↓↓
	Sit c		↔	↔	↔	↔	↑↑	↔
	LONP1		↓	↓	↔	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
RNA Düzeyinde Gen İfadesi	P21		↓↓	↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↔	↔
	Mitokondriyal Dinamikler	MFN1	↑↑	↔	↓	↔	↑	↑↑↑
		MFN2	↓	↓↓	↓↓↓	↑	↑↑	↑↑
		OPA1	↑	↑↑	↔	↔	↑	↑↑↑
		DRP1	↔	↑↑↑	↔	↔	↑	↑↑↑
		FIS1	↑	↔	↑↑↑	↔	↔	↑↑↑
	Mitokondriyal Genom (mtDNA)		↑↑	↑↑	↑↑↑	↓↓	↓↓	↓
	Apoptoz Sinyalizasyonu	ASK1	↑↑	↑↑↑	↓↓↓	↔	↔	↑
		JNK	↔	↑↑	↔	↔	↔	↑↑↑
	Antioksidan Enzim (SOD2)		↔	↑↑↑	↔	↔	↔	↑↑↑

↑ Artış belirlendi, ↓ Azalma belirlendi, ↔ Değişim belirlenmedi

(↑↑↑, ↓↓↓ p<0,001; ↑↑, ↓↓ p<0,01; ↑, ↓ p<0,05)

5. TARTIŞMA

Tirozin kinaz inhibitörü (TKİ) ilaçlar kanser hücrelerinde aktifleşmiş sinyal yollarını inhibe ederek kanserin uzun süre kontrol altında tutulmasında oldukça başarı sağlamıştır. Bu ilaçların genellikle sitotoksik ajanlara kıyasla daha güvenli ve etkin olarak kabul edilmelerine ve kanser tedavisinde onkolojik başarıyı arttırmalarına karşın kardiyotoksisite gibi ciddi yan etkilere sebep olabildikleri görülmüştür. Bu yan etkiler bazen hekim ve hastayı doz azaltmaya, tedaviyi sonlandırmaya ve alternatif tedavi seçimine zorlayabilmektedir. Kardiyovasküler komplikasyonların hayatı tehdit edebilecek düzeye gelebileceği göz önünde bulundurulduğunda, kanser tedavisi kaynaklı kardiyotoksisitenin değerlendirilmesi, moleküler mekanizmalarının aydınlatılması ve bu yan etkileri oluşturmayan ilaçların geliştirilmesi için yeni yaklaşımlara ihtiyaç vardır. TKİ kaynaklı kardiyotoksisite ile ilgili çeşitli hipotezler öne sürülmesine rağmen kardiyotoksisitenin moleküler mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir (Chen ve ark., 2008; Shim ve ark., 2017; Narayan ve Ky, 2018).

Kalp kasının aerobik metabolizmaya yüksek düzeyde bağlı olması ve kardiyak dokunun yüksek enerji kullanması nedeniyle kalp, mitokondriyal metabolizmayı veya homeostazı bozan ilaçlara karşı oldukça hassastır. Mitokondri fonksiyonunda bozulma sonucunda kardiyomiyosit ve endotel hücre ölümü ve sonuç olarak kardiyovasküler disfonksiyon görülebilmektedir. Bu durumun TKİ kaynaklı kardiyotoksisitenin altında yatan sebeplerden biri olabileceği düşünülmektedir. Imatinib, Bevacizumab, Sunitinib ve Sorafenib gibi çeşitli antikanser ilaçların toksikolojik ve farmakolojik özellikleri dolayısıyla, doğrudan veya dolaylı olarak, kalp mitokondriyal fonksiyonunu modüle ettiği belirtilmektedir (Force ve ark., 2007; French ve ark., 2010; Tridente, 2017; Gorini ve ark., 2018).

Lenvatinib, 2015 yılında radyoaktif iyot tedavisine dirençli diferansiye tiroid kanseri tedavisi için onay almış olan ve birden fazla tirozin kinaz reseptörünü inhibe eden etkili bir TKİ ilaçtır. Lenvatinib'in FDA tarafından onaylanmış diğer endikasyonları renal hücreli karsinoma; anrezektabl hepatoselüler karsinoma ve endometriyal karsinomadır (U.S. FDA, 2016a, 2016b). Ayrıca; melanoma, küçük moleküllü olmayan akciğer karsinoması, glioblastoma multiforme, yumurtalık ve endometriyal karsinomada solid tümörlere karşı monoterapi veya kombinasyon tedavisi

şeklinde kullanımı üzerine araştırmalar sürmektedir. Lenvatinib ile tedavi sırasında ortaya çıkan ve tedaviyi sonlandırmaya veya doz azaltılmasına sebep olan advers etkilerden en önemlilerinden biri kardiyotoksisitedir. Lenvatinib kullanan diferansiye tiroid kanseri hastalarının %7'sinde kardiyak disfonksiyon görüldüğü, bir diğer çalışmada ise ilacı kullanan renal hücreli karsinoma hastalarının % 10'unda kardiyak yetmezlik geliştiği, Faz III çalışmalarında hipertansif kriz ve kardiyak disfonksiyon bildirilmiştir (U.S. FDA ve CDER, 2015; Schlumberger ve ark., 2015; Scott, 2015). Lenvatinib'in neden olduğu kardiyotoksisitenin altında yatan nedenler tam olarak bilinmemektedir.

Bu çalışmada amaç, Lenvatinib'in kardiyotoksisitesine neden olan mekanizmaları H9c2 hücre hattında moleküler seviyede inceleyip aydınlatmaya çalışmaktır. Bu doğrultuda Lenvatinib'in, H9c2 hücrelerindeki sitotoksitesi, mitokondri membran potansiyeli, total mitokondri kütlesi, mitokondriyal fonksiyonda rol oynayan proteinlerin seviyeleri ile mitokondri dinamikleri ve biyogenezinde rol oynayan genler üzerine etkileri araştırılmıştır.

In vitro çalışmalar için faydalı alternatifler sağlayan az sayıda kardiyomiyosit hücre hattı vardır. Embriyonik sıçan sol ventrikülünden elde edilen ve enerji metabolizması açısından primer kardiyomiyositlere oldukça benzerlik gösteren H9c2 kardiyomiyosit hücre dizisi bu tür çalışmalarda uygun bir alternatif olarak kullanılmaktadır (Watkins ve ark., 2011; Kuznetsov ve ark., 2015; Bouitbir ve ark., 2019).

Çalışmada Lenvatinib'in H9c2 hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirmek için öncelikle MTT testi yapılmıştır. MTT testinde herhangi bir IC₅₀ değerine ulaşılammıştır, ancak Lenvatinib'in seçilen üç konsantrasyonda (10 µM, 5 µM ve 1,25 µM) 48 ve 72 saat maruziyette hücre canlılığını anlamlı ölçüde inhibe ettiği belirlenmiştir. Y79 (insan retinoblastoma) hücre hattında yapılan bir sitotoksite çalışmasında Lenvatinib'in 10 µM konsantrasyonuna 48 saat maruziyetin anlamlı bir sitotoksik etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Wei ve ark., 2018). 30 µM ve 50 µM konsantrasyonlardaki Lenvatinib'in tiroid ve karaciğer kanser hücre hatları üzerinde antiproliferatif etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Ferrari ve ark., 2018; Ogasawara ve ark., 2019). 48 saat Lenvatinib maruziyeti insan karaciğer kanseri hücre hattı Huh7 hücrelerinde 2 µM konsantrasyonda, HepG2 hücrelerinde ise 20 µM

konsantrasyonunda canlılığı anlamlı derecede inhibe etmiştir (Sasaki ve ark., 2020). C2C12 iskelet kası hücrelerinde Imatinib, Sorafenib and Sunitinib ilaçlarının IC₅₀ değerleri sırasıyla 20, 8 and 8 µM olarak bulunmuştur (Damaraju ve ark., 2018). Kardiyomiyosit hücreler ile diğer hücrelerin ilaç maruziyetine verdiği tepkilerin farklı olması, sahip oldukları kinaz ekspresyonu farklılığı ile birlikte oksidatif fosforilasyon ve ATP ihtiyacının farklı olmasına dayandırılmaktadır (Kerkelä ve ark., 2006; French ve ark., 2010).

Lenvatinib yukarıda adı geçen TKİ ilaçlar ile ortak farmakolojik hedefleri etkilemesine rağmen ilacın sebep olduğu moleküler değişikliklerin bu hedeflerden bağımsız olabileceği görülmektedir. French ve ark. Sunitinib, Sorafenib ve Pazopanib ilaçlarının miyokard fonksiyonu ve yapısı üzerine etkisini sıçanda incelemişlerdir. Sorafenib'in kardiyak anormalliklere sebep olduğu, fakat Sunitinib ve Pazopanib'in olmadığı belirtilmiştir. TEM analizlerinde Sorafenib'in bozulmuş krista yapısına yol açtığı; Sunitinib'in mitokondriyal şişme ve matrikste boşluklara sebep olduğu fakat Pazopanib'in bu etkileri olmadığı belirtilmiştir. Aynı çalışmanın yenidoğan sıçan kardiyomiyosit kültürleri ile gerçekleştirilen *in vitro* bölümünde Sunitinib maruziyetiyle MMP seviyesinin düştüğü, Sorafenib ve Pazopanib'de bu etkinin görülmediği belirtilmiştir. Hücre içi ATP miktarı ise Sunitinib ve Sorafenib maruziyetinde düşüş göstermiş, fakat Pazopanib maruziyetinden etkilenmemiştir. Sonuç olarak bu ilaçların kardiyotoksik etkilerinin VEGF inhibisyonuyla ilişkili bir sınıf etkisi olmadığı, mitokondriyal toksisiteyle ilgili olan başka kinazların inhibisyonuyla ilişkili olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (French ve ark., 2010).

Mitokondri miktarı kalpte; iskelet kası, beyin, böbrek ve karaciğere göre çok daha yüksek seviyededir. Toplam kardiyomiyosit hacminin ~% 30'unu mitokondriler oluşturmaktadır. Vücuttaki kanı pompalamak için gerekli olan sürekli kardiyak kontraktiletiyi sağlayan kardiyomiyositlerin ATP'ye gereksinimleri çok fazladır (Venkatesh ve Suzuki, 2020). Bu gereksinim ancak sağlıklı mitokondriyal homeostaz ile karşılanır. Mitokondrinin en önemli görevi oksidatif fosforilasyon ile ATP üreterek hücreye enerji sağlamaktır. Hücre içi ATP konsantrasyonu, hücrenin apoptoz veya nekroz ile ölme kararlarında anahtar rol oynamaktadır (Leist ve ark., 1997). Çoklu stres indükleyicilerinin ATP'nin tükenmesine neden olduğu ve kontrol altına alınmadığı takdirde hücre ve doku ölümüne neden olduğu bilinmektedir (Leonard ve ark., 2014). Çalışmamızda Lenvatinib'e 48 saat maruziyet sonunda en yüksek konsantrasyonda, 72

saat maruziyet sonrası ise çalışılan tüm konsantrasyonlarda hücre içi ATP miktarı anlamlı ölçüde azalmıştır. H9c2 hücrelerinde yapılan bir çalışmada Imatinib, Dasatinib, Sunitinib, ve Sorafenib'in 24 saat maruziyet sonrası hücre içi ATP seviyesi üzerine etkileri incelenmiş ve ATP miktarını anlamlı ölçüde inhibe ettikleri kaydedilmiştir (Will ve ark., 2008).

Mitokondrilerin oksidatif fosforilasyon ile ATP sentezini gerçekleştirebilmeleri için, membranlar arasında proton gradiyenti yaratarak mitokondriyal membran potansiyelini (MMP) korumaları şarttır. Elektron transport zinciri (ETZ) proteinleri tarafından üretilen MMP, oksidatif fosforilasyon sırasında ATP depolama sürecinde önemli bir bileşendir (Gergely ve ark., 2002; Perl ve ark., 2004; Zorova ve ark., 2018). Normal olarak sağlıklı hücreler ATP ve MMP seviyelerini korurlar. Bu stabilite hücrelerin sağlıklı çalışabilmesi için gereklidir. Fizyolojik durumlarda zaman zaman kısa süreli değişiklikler olmakla birlikte, her iki faktörde sürekli değişikliklerin olması durumunda hücreler hasar görmektedir (Zorova ve ark., 2018). MMP kaybının, miyokard enfarktüsü ve iskemi/reperfüzyon sonrası serebral enfarktüsün önemli bir mekanizması olduğu çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Hausenloy ve ark., 2002; Sims ve Muyderman, 2010; Sunaga ve ark., 2014). Bir TKİ olan Nilotinib'in 0,1-15 μ M konsantrasyon aralığında H9c2 hücrelerine 24 saat maruziyet sonucu MMP'de anlamlı düşmeye sebep olduğu belirtilmiştir (Lekes ve ark., 2016). Kardiyotoksik etkileri kanıtlanmış bir antikanser ilaç olan Doxorubicin H9c2 hücrelerinde MMP'nin bozulmasına ve mitokondriyal hasara sebep olmuştur (Rharass ve ark., 2016). Primer hepatositlerin kullanıldığı bir çalışmada 2,5-10 μ M konsantrasyon aralığında Regorafenib maruziyetinin oksidatif fosforilasyonu ve MMP'yi bozduğu, ATP seviyesini düşürdüğü, AMP-aktive protein kinazı aktive ettiği, otofajiyi indüklediği ve nekroza sebep olduğu bulunmuştur (Weng ve ark., 2015). Mingard ve ark. ise HepG2 hücrelerinde yaptıkları çalışmada Regorafenib ve Sorafenib'in hücre içi ATP oranını ve MMP'yi düşürerek mitokondriyal oksidatif metabolizmayı bozduklarını ve hücrelerde apoptoza sebep olduklarını kaydetmiştir (Mingard ve ark., 2018). İzole edilmiş sıçan karaciğer hücresi mitokondrilerinde test edilen 31 farklı kinaz inhibitörünün beş tanesinin (Regorafenib, Ceritinib, Dabrafenib, Sorafenib ve Cabozantinib) MMP'yi düşürdüğü ve Lenvatinib de dahil olmak üzere diğer test edilen ilaçların ise bir değişiklik yapmadıkları saptanmıştır (Zhang ve ark., 2017). Çalışmamızda, MMP 48

saatlik maruziyet sonrası 5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarda anlamlı düşüş göstermiş, ancak 72 saat maruziyet sonrasında görülen değişiklikler anlamlı bulunmamıştır.

ETZ proteinlerinin seviyelerindeki değişiklikler ile MMP ve dolayısıyla ATP üretiminin bozulması arasında sıkı bir ilişki bulunmaktadır (Leipnitz ve ark., 2018). TKİ ilaçlardan Sorafenib, Sunitinib ve Imatinib'in H9c2 ve C2C12 hücrelerinde Kompleks II, Kompleks III ve Kompleks V'i inhibe ettiği (Will ve ark., 2008; Damaraju ve ark., 2018); HepG2 hücrelerinde ise Sorafenib'in Kompleks I ve III'ü, Ponatinib'in Kompleks I ve II'yi, Regorafenib' ise Kompleks I'i inhibe ettiği ve MMP'yi düşürdüğü belirlenmiştir (Paech ve ark., 2018). Zhang ve ark. 31 adet kinaz inhibitörüyle yaptıkları çalışmada mitokondriyal ETZ komplekslerinden en fazla Kompleks I'in inhibe olduğunu göstermişlerdir (Zhang ve ark., 2017).

Çalışmamızda 48 saat maruziyet sonrasında 10 μ M konsantrasyonda komplekslerin (I-IV) protein seviyelerindeki düşüşe paralel olarak MMP ve ATP miktarı da azalmıştır. 72 saat maruziyet sonrasında 10 μ M konsantrasyonda tüm komplekslerin (I-V) protein seviyelerinde düşüş belirlenmiştir, benzer şekilde ATP miktarları da düşmüştür, ancak MMP seviyesindeki azalma anlamlı bulunmamıştır. MMP seviyesindeki bu durum uzun süre maruziyette membran potansiyeli bozulan hasarlı mitokondrilerin degradasyonundan sonra hayatta kalmayı başaran mitokondrilerde, hayatta kalabilmenin ön şartı olarak MMP'de görülen bir iyileşme olarak değerlendirilebilir. H9c2 hücrelerinin kullanıldığı bir çalışmada bozulmuş MMP'nin düzeltilmesinin kardiyomiyositleri nekrozdan koruduğu belirtilmiştir (Sunaga ve ark., 2014). Sunaga ve ark., bu çalışmalarında ATP-duyarlı potasyum kanalının aktivasyonu, GSK-3 β aktivitesinin azaltılması veya artmış ROS üretiminin baskılanması ile önemli ölçüde MMP iyileşmesi sağlayarak hücrelerin hayatta kalmasını kolaylaştırmışlardır.

ETZ'de kritik işlevleri olan 13 tane protein mtDNA tarafından kodlanmaktadır. mtDNA hasarının, mitokondriyal disfonksiyona neden olduğu bilinmektedir (Martínez-Reyes ve ark., 2016). Santos ve ark., normal insan fibroblast (NHF) hücreleriyle yaptıkları çalışmada mtDNA'da görülen lezyonlarla MMP düşmesi arasında bir korelasyon olduğunu belirtmiş, depolarizasyon görülmüş hücrelerde önemli miktarda mtDNA hasarı saptamışlardır (Santos ve ark., 2003). Diğer taraftan. mtDNA kopya sayısındaki azalma böbrek hücreli karsinom, karaciğer hastalığı, biliyer atrezi, tip 2

diyabet, kardiyomiyopati, meme kanseri ve multipl skleroz gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Montier ve ark., 2009). mtDNA azalmasına kıyasla mtDNA çoğalmasının neden olduğu hastalıklar daha az yaygındır, bununla birlikte mtDNA delesyonlarının kompanse edici bir etkisi olarak mtDNA'da artış olabileceği bildirilmiştir (Bai ve Wong, 2005).

Çalışmamızda 48 saatlik ilaç maruziyeti sonrasında mtDNA'da bütün dozlarda görülen anlamlı artış, hücrelerin hasarı kompanse etmek için verdikleri bir cevap olarak yorumlanabilir. 72 saat sonra mtDNA seviyesinde tüm dozlarda gözlenen inhibisyonun, ETZ protein (I-V) seviyelerinde azalmaya yol açtığı ve mitokondriyal toksisiteyi başlattığı görülmektedir. Bir çalışmada mtDNA oranı düşürülmüş H9c2 hücrelerinin strese karşı daha dayanıklı olduğu bulunmuştur (Lee ve ark., 2015). 72 saatlik Lenvatinib maruziyeti sonrasında ölçülen MMP düzelmesi ve mtDNA oranının düşmesi kardiyomiyositlerdeki mitokondrilerin ATP ihtiyacını kompanse etme mücadelesinin azalması şeklinde de yorumlanabilir.

Lenvatinib H9c2 hücrelerine 48 saat maruziyet sonunda, 10 μ M maruziyet grubunda mitokondriyal kütleyi anlamlı derecede artırmıştır. Bu artışın, hücrenin artan ATP ihtiyacına karşı cevabı olduğu, ancak yeterli olmadığı düşünülebilir. Diğer yandan, artmış olan Kompleks V'in mitokondri içerisine aldığı protonlar, azalmış olan ETZ Kompleksleri (Kompleks I-IV) tarafından zarın dışına yeterince pompalanamamıştır. Böylelikle membranın iki tarafı arasındaki proton farkı azalarak MMP'nin düşmüş olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda 72 saatlik maruziyet sonrası Kompleks V'in enzimatik aktivitesinin inhibisyonu MMP depolarizasyonunda görülen düzelmenin sebebi olabilir. Kompleks V'in inhibisyonunun elektrokimyasal gradyanın kullanımını azaltarak MMP hiperpolarizasyonuna ve bu şekilde ATP tükenmesine yol açtığı belirtilmektedir (Gergely ve ark., 2002). Kompleks V, ATP hidroliz enerjisini kullanarak protonları mitokondriyal matriksten zarlar arası boşluğa pompalamak suretiyle MMP hiperpolarizasyonuna neden olabilmekte ve bu durum oksidatif fosforilasyonun ATP sentezinden ayrışmasına (uncoupling) sebep olabilmektedir (Perl ve ark., 2004). Yaptığımız western blot protein ölçümü sonucumuzda 72 saat 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarında saptadığımız Kompleks V inhibisyonu da bu bilgiyi destekler niteliktedir.

Teorik olarak, MMP kaybı, hücre için iki tip tehdit oluşturmaktadır: İlki oksidatif fosforilasyon ve ATP üretiminin kaybı ve diğeri ise proapoptotik proteinlerin salınmasıdır (Tsujimoto, 1997). MMP kaybının, bazı sistemlerde apoptoz başlangıcı sırasında gerçekleşen bir olay olduğu gösterilmiştir. MMP'nin bozulması, ROS üretimi ve Sit c gibi proapoptotik proteinlerin mitokondriden sitozole salımına neden olur. Sit c mitokondriyal solunum zincirinin bir bileşenidir. Apoptoz sırasında, bu proteinlerin mitokondriden salınması, solunum zincirinin önemli bileşenlerinin kaybıyla sonuçlanır (Perl ve ark., 2004; Cao ve ark., 2007). Lenvatinib maruziyetinden sonra ölçtüğümüz Sit c protein düzeyinde 48 saatte anlamlı bir fark görülmemişken, 72 saatte sadece 5 μ M konsantrasyonunda anlamlı artış görülmüştür. 10 μ M konsantrasyonundaki artış anlamlı bulunmamıştır. Zhang ve ark.'nin karaciğer hücrelerinde yaptıkları çalışmada, Lenvatinib'in 68 μ M'a kadar olan konsantrasyonlarda Sit c seviyesinde bir değişikliğe yol açmadığı, aynı çalışmada denenen 19 TKİ ilacın da benzer etkiyi gösterdiği belirlenmiştir (Zhang ve ark., 2017). Çalışmamızda, Sit c protein seviyesinde 72 saat sonra görülen artış, maruziyet süresinin uzun olmasına ve kullandığımız hücrelerin kalp hücresi olmasına dayandırılabilir. Paech ve ark., yaptıkları çalışmada, Ponatinib, Regorafenib ve Sorafenib'in HepG2 hücrelerinde Sit c seviyesinde sırasıyla 5 μ M, 10 μ M, ve 2 μ M konsantrasyonlarında artışa sebep olduklarını bulmuştur (Paech ve ark., 2018).

Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1 (ASK1), apoptoz, hücre sağkalımı ve farklılaşma gibi çeşitli hücresel yanıtları düzenleyen MAPK yolunun önemli bir mediyatörüdür. Çeşitli hastalıkların patojenezinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Enflamatuvar sitokinler, UV ışınları, ROS gibi zararlı uyarılar, ASK1'in aktivasyonuna ve MAPK yolunun son üyesi olan JNK'nin fosforilasyonuna yol açarlar (Nishida ve ark., 2017). JNK-bağımlı yol, miyokardiyal hipertrofi ve kalbin iskemi/reperfüzyon hasarının patolojik mekanizmalarında önemli bir adımdır (Shvedova ve ark., 2018) JNK sinyalleme, ölüm reseptörleri tarafından başlatılan dışsal apoptotik yolağın yanı sıra mitokondride başlatılan içsel yola da dahil olmaktadır. Hem dışsal hem de içsel apoptotik uyarılara yanıt olarak JNK, çeşitli pro- ve anti-apoptotik proteinlerin aktivitelerini etkileşime sokma ve modüle etmede önemli bir rol oynamaktadır. Nükleer ve mitokondriyal olayların koordineli olarak düzenlenmesi yoluyla JNK, apoptozun etkili bir şekilde uygulanmasını sağlar (Dhanasekaran ve Reddy, 2017). JNK aktivasyonunun hücresel solunumu ve ATP üretimini yavaşlatarak mitokondriyal

fonksiyonu olumsuz etkileyebileceği belirtilmektedir (Dougherty ve ark., 2004). Heslop ve ark., Sorafenib'in HepG2 hücrelerinde JNK aktivasyonu ve MMP depolarizasyonu ile ilişkili mitokondriyal disfonksiyona yol açtığını belirlemişlerdir (Heslop ve ark., 2020). Çalışmamızda birbiriyle ilişkili bu iki genin (ASK1 ve JNK) ekspresyonları incelendiğinde, ASK1'in 72 saat maruziyet sonrası artma eğilimi gösterdiği ve 10 μ M maruziyette her iki gen düzeyinde bu artışın anlamlı olduğu görülmektedir. ASK1 ve JNK gen ekspresyonlarında gözlenen bu artışın apoptatik yolağı uyardığı anlaşılmaktadır. 72 saat sonra Sit c de gözlenen artış eğilimi bu sonucu doğrular niteliktedir.

JNK aktivasyonunun ROS oluşmasına, mitokondriyal disfonksiyona ve kardiyomiyositlerin kaybına yol açtığı bildirilmektedir (Shvedova ve ark., 2018; Heslop ve ark., 2020). Perfüzyon çözeltisine katalaz ve süperoksit dismutaz enzimlerinin eklenmesinin, kardiyomiyositlerde JNK aktivasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Shvedova ve ark., 2018). Ayrıca; ETZ proteinlerinden özellikle I ve III komplekslerinin işlevini inhibe eden toksik maddeler, mitokondriyal ROS üretimini artırabilmektedir (Dröse ve Brandt, 2012). Çalışmamızda ETZ protein seviyelerinde her iki maruziyet süresinde görülen inhibisyon ROS üretiminin artmış olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim ROS'un ortamdan uzaklaştırılması için görev alan antioksidan enzimlerden mitokondriyal SOD2 ekspresyonu bizim çalışmamızda 48 saat 5 μ M ve 72 saat 10 μ M konsantrasyon gruplarında artış göstermiştir; fakat diğer yandan SOD2 geninde anlamlı değişiklik saptanmayan maruziyet gruplarında da ETZ proteinlerinde inhibisyon görülmüştür. Paech ve ark. çalışmalarında mitokondriyal ROS üretimindeki artışa rağmen, SOD2'nin protein ekspresyonunda önemli bir artış görmemişler ve bunu 24 saat olan maruziyet süresinin SOD2 düzeyine yansıyacak kadar uzun olmadığına dayandırmışlardır (Paech ve ark., 2018). Bizim çalışmamızda maruziyet süresi daha uzun olmasına rağmen yine de tüm maruziyet gruplarında SOD2 gen seviyesinde beklenen artış görülmemiştir. Bu ilişkinin tam olarak doğrulanması için TKİ ilaç indüklü oksidatif stres parametrelerinin daha ayrıntılı incelenmesi gerekir.

Diğer taraftan mtDNA, histon içermediğinden ve ROS üretim bölgesine yakın bir konumda bulunduğu için oksidatif hasara karşı nükleer DNA'dan daha hassastır. mtDNA hasarlandığı takdirde, kritik mitokondriyal proteinlerin hatalı transkripsiyonları sebebiyle oksidatif stres dolaylı olarak indüklenebilir ve böylelikle ROS üretiminin kısır

döngüsüne yol açarak hücre ölümüne giden yolu tetikler (Hebert ve ark., 2010).

Hücre döngüsü regülasyonu, özellikle siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü P21 proteininin yukarı regülasyonu ile hücreyi G1 fazında durdurmakla gerçekleştirilir (Leonard ve ark., 2014). Diğer yandan DNA hasarı, apoptoz inhibisyonunun üstesinden gelmek için P21 degradasyonuna sebep olabilmektedir. Sitoplazmada P21 proteini ASK1 ile etkileşip apoptoz inhibitörü olarak etki edebilmektedir (O'Reilly, 2005). P21 proteini ve/veya mRNA ekspresyon seviyelerinin analizi, ekzojen kimyasal ve radyasyonun potansiyel zararlı etkilerini değerlendirmeyi amaçlayan toksikolojik çalışmalarda sıklıkla yapılmaktadır. Çalışmamızda P21 proteini 48 saat maruziyette tüm konsantrasyonlarda azalma göstermiştir. P21 proteinindeki bu inhibisyon hücrelerin büyümeyi durdurma işlevini azaltarak hücrelerin apoptoza gitmesini kolaylaştırma çabası olarak düşünülebilir. Bu bulgular Lenvatinib'in 48 saatlik maruziyette P21 proteini üzerinde inhibe edici etkisi olduğunu, 72 saat maruziyette ise etkinin azaldığını göstermektedir. Doxorubicin ilacının P21 proteozomal degradasyonu ile mitokondriyal disfonksiyona yol açarak kardiyomiyosit apoptozunu indüklediği belirtilmektedir. Aynı çalışmada P21'in indüksiyonu ile Doxorubicin kaynaklı kardiyotoksisteye karşı koruma sağlanabileceği belirtilmiştir (Cheng ve ark., 2015). TKİ ilaçların bazılarının CDK inhibitörlerini indükleyerek etki ettiği bilinmektedir. Örneğin, BCR-ABL1 tirozin kinaz inhibitörü Radotinib'in P21 ve P27'yi indükleyerek ve CDK2-4-6'yı inhibe ederek hücre döngüsünü durdurduğu bildirilmektedir (Heo ve ark., 2016).

LONP1 mitokondriyal matriks içinde bulunan ve mitokondrilerin hayatlarına devam etmesi veya degradasyona uğraması gibi çeşitli mekanizmalara aracılık eden bir proteazdır. LONP1 proteini ve/veya mRNA ekspresyonunun kardiyak stres veya yaralanma sırasında artış gösterdiği konusunda genel bir fikir birliği olmasına rağmen, LONP1'in kardiyak hasarı teşvik ettiği yönünde de çelişkili sonuçlar vardır. LONP1 kaybının entegre bir stres tepkisinin sonucu olduğunu belirten Rendón ve Shoubbridge, aynı zamanda mtDNA'nın azalmasına da sebep olduğunu belirtmişlerdir (Rendón ve Shoubbridge, 2018). Diğer taraftan LONP1'in mitokondriyal matriks içinde redoks homeostazını korumak için çeşitli mekanizmalara aracılık edebildiği kardiyomiyositleri iskemi/reperfüzyon hasarından koruduğu (Venkatesh ve ark., 2019), piruvat dehidrojenaz (PDH) ve ETZ Komplekslerinin aktivitesini düzenleyerek kalp stresini ve yaralanmayı en az düzeye indirmek için kalpte enerji metabolizmasını yeniden

programladığı belirtilmektedir (Crewe ve ark., 2016; Nimmo ve ark., 2019). Bir diğer çalışmada, LONP1'in inaktivasyonunun ETZ proteinlerinde oksidatif hasara neden olduğu, bu durumun mitokondriyal solunum etkinliğini azalttığı ve kalpte kasılma fonksiyon bozukluğuna neden olduğu gösterilmiştir. Mitokondriyal fonksiyonu korumak ve oksidatif modifikasyonun neden olduğu hasarı hafifletmek için oksidatif stres sırasında LONP1 fonksiyonunun gerekli olduğu belirtilmektedir (Hoshino ve ark., 2014). Çalışmamızda LONP1 ekspresyonunda hem 48 saat hem de 72 saat maruziyette görülen azalmanın ortaya çıkan yüksek stresten ve bu stres ile baş edilememesinden kaynaklandığı düşünülebilir. LONP1 kaybı aynı zamanda 72 saatlik maruziyet sonrasında görülen mtDNA inhibisyonunu da tetiklemiş olabilir.

Mitokondriler oldukça dinamik organellerdir, ihtiyaç duyulan ATP miktarına bağlı olarak sayıları artabilmekte veya azalabilmektedir. Bu durum fizyon ve füzyon denilen prosesler ile gerçekleşmektedir (Westermann, 2010; Lee ve ark., 2012). Ayrıca mitokondriyal füzyon ve fisyon, mitokondriyal proteinlerin, lipidlerin ve genom değişimi yoluyla hasarlı mitokondrilerin ortadan kaldırılmasındaki kalite kontrol mekanizmalarından biridir (Chen ve Karantza, 2011; Anand ve ark., 2013). Hücrelerin strese karşı verdiği tepkilere en iyi ışık tutacak olan mitokondriyal dinamiklerle ilişkili genlerdir (Zemirli ve ark., 2018). Mitokondriyal füzyon ve fisyonun kardiyomiyositlerin homeostazını düzenlediği bilinmektedir. Mitokondriyal dış zar füzyonunda rol alan proteinler MFN1 ve MFN2'dir. İç zar füzyonunda OPA1 görevlidir. Mitokondriyal fisyonda ise DRP1 ve FIS1 proteinleri rol oynamaktadır. Mitokondriyal füzyonun önemli GTPase proteinleri olan MFN1/2 ve OPA1'in kardiyak hipertrofiyi ve iskemi/reperfüzyon hasarını bastırmak için gerekli olduğu bildirilmektedir. Mitokondriyal krista yapısının stabilizasyonunda önemli görevi olan OPA1, ayrıca mitokondriyal solunum fonksiyonunu düzenlemekte, Sit c salınımını engelleyerek anti-apoptotik etki yapmakta ve ROS üretimini engellemektedir (Fan ve ark., 2020).

Stressiz koşullarda, mitokondriyal füzyonla ilişkili proteinlerin ekspresyonu, yetişkin fare kalbindeki fisyonla ilişkili proteinlerden daha yüksek bulunmuştur (Song, ve ark., 2015a). Mitokondriyal füzyon genlerinde görülen ekspresyon artışının, kardiyomiyositlerin talebini karşılayan oksidatif fosforilasyon kapasitesinin korunmasına katkıda bulunduğu ve hücrenin strese karşı verdiği koruyucu cevap mekanizmasından birisi olduğu düşünülmektedir (Youle ve Van Der Bliek, 2012).

Diğer taraftan düşük doz ve kronik maruziyetlerde füzyonda artış ve fisyonunda hafif artış görülür, böylelikle mitokondriyal ağın güçlenmesi ve hasarlı bileşenlerin uzaklaştırılması sağlanır (Westermann, 2010). Genel olarak düşük doz kronik maruziyetlerde kısa dönemde adaptif cevaplar görülür. Adaptif ve kompanse edici cevapları toksik cevap/patolojik değişimlerden ayırt etmek zor olsa da, füzyon genlerinde toksik maddenin düşük dozunda adaptif cevap olarak artış görülebileceği, fisyon genlerinde ise stres durumunda artış görülebileceği bildirilmektedir (Hoffmann ve ark., 2013).

Çalışmada MFN1, MFN2 ve OPA1 genlerinin ekspresyonunda 72 saat maruziyet sonrası doza bağlı olarak görülen artış kronik stres durumuna cevap, 48 saatte düşük dozda MFN1 ve OPA1 'deki ekspresyon artışı ise kompanse edici bir cevap olarak değerlendirilebilir. Diğer taraftan Sit c ekspresyonundaki artışın fazla olmaması OPA1 ekspresyonundaki artışın sonucu olabilir. Varanita ve ark., yaptıkları çalışmada, fare kalp hücrelerinde artmış OPA1 seviyesinin iskemi reperfüzyon hasarından koruduğunu, ROS üretimini ve Sit c salınımını azalttığını saptamışlardır (Varanita ve ark., 2015). MFN1 ve OPA1'in artması insan fibroblast hücrelerinde azalmış glikoliz, artmış oksijen tüketim oranı ve artmış ATP seviyeleriyle ilişkilendirilmiştir (Mean Son ve ark., 2017). OPA1'in azalması ise insan, sıçan ve fare kalp hücrelerinde kalp yetmezliğiyle sonuçlanmıştır (Chen ve ark., 2009, 2012; Wai ve ark., 2015).

ETZ komplekslerinin inhibisyonunun, artmış mitokondriyal ROS ve azalmış MMP'ye sebep olarak mitokondriyal fisyon için tetikleyici olduğu belirtilmektedir (Westermann, 2010; Youle ve Van Der Bliek, 2012; Paech ve ark., 2017; Paech ve ark., 2018). Huot ve ark., birbirine kimyasal yapı olarak benzer iki TKİ ilacın, Sorefenib ve Regorafenib'in *in vivo* olarak kronik uygulanması sonucu kardiyak anormalliklerle birlikte kardiyak kas hücrelerinde OPA1 seviyelerinde anlamlı azalma kaydetmiştir (Huot ve ark., 2019). Bir diğer çalışmada, HepG2 hücrelerinde Regorafenib'in OPA1 protein inhibisyonuna ve Ponatinib'in FIS1 artışına yol açtığı belirtilerek, Komplekslerin inhibisyonu sonucunda ROS oluşumunun arttığı, MMP'nin düştüğü ve koruyucu mekanizma olarak füzyondan fisyona yönelimin olduğu sonucuna varılmıştır (Paech ve ark., 2018). Aynı çalışmada hücreler morfolojik olarak da incelenmiş ve fisyonun arttığı saptanmıştır. Bu bulgulara benzer olarak, çalışmamızda 48 saat 5 ve 10 μ M konsantrasyon gruplarında Kompleks proteinlerinde inhibisyon ve MMP düşüşü, 5

μM grubunda SOD2 gen artışı görülmüştür. Hem mitokondriyal kütle analizinde, hem de TEM görüntülerimizde 48 saat 10 μM grubunda görülen artmış mitokondri sayısı fisyonun arttığını göstermektedir. Fisyon gen seviyelerinde artma eğilimi ile birlikte füzyon genlerinde inhibisyon görülmüştür. 48 saat maruziyetinin diğer konsantrasyon gruplarında MFN1 ve MFN2 seviyelerinde inhibisyon görülmekle beraber, Paech ve ark.'nın çalışmasından farklı olarak, OPA1 seviyesinde inhibisyon görülmemiştir. Ayrıca çalışmamızda, mitokondriyal dinamiklerdeki değişiklikler Paech ve ark.'ndan farklı olarak gen seviyesinde değerlendirilmiş, protein seviyeleri ölçülmemiştir. Bizim çalışmamızda Lenvatinib'in 48 saatte hücre içi ATP'yi ve MMP'yi düşürmesiyle birlikte OPA1 seviyesinde görülen artış koruyucu bir etki olabilir.

Kalp hücrelerinde oldukça önemli işlevi olan MFN2'nin Ras-Raf-ERK1/2 yolağını inhibe ederek düz kas hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı belirtilmiştir (Chen ve ark., 2004). Ras-Raf-ERK1/2 sinyal yolağı kardiyak hipertrofinin gelişiminde de önemli bir yolaktır. Çeşitli *in vitro* ve *in vivo* modellerde MFN2 azalmasının bu yolağı aktifleştirerek kalp hipertrofisine yol açtığı belirlenmiştir (Fang ve ark., 2007; Chen ve ark., 2013, 2011). 12 haftalık leptin reseptörü eksik diyabetik farelerden elde edilmiş kalpte ve yüksek glikozlu/yağlı besiyerinde büyütülmüş kardiyomiyositlerde azalmış MFN2 ve mitokondriyal fisyonda azalmış ekspresyon görülmüştür (Hu ve ark., 2019). Ayrıca, MFN2'nin yokluğunda, mitofajik kalite kontrolde görevli PINK1-PARKIN yolunun kesildiği, anormal mitokondri birikimi ve kardiyak toksisite olduğu belirtilmiş, MFN2'nin kardiyak mitokondrilerin kalite kontrolü için gerekli olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Chen ve ark., 2013). Bu bilgiler ışığında, 48 saat maruziyet süresinde tüm dozlarda saptadığımız MFN2 ekspresyon azalmasının ve 10 μM konsantrasyondaki MFN1 inhibisyonunun, mitokondriyal füzyon ile birlikte mitokondriyal kalite kontrolünü engelleyerek kardiyotoksisiteye yol açabilecek mekanizmalardan biri olduğu düşünülebilir.

Kardiyomiyositlerde homeostazın korunmasında ve mitofajik süreçte füzyon ve fisyon mekanizmalarının entegre bir şekilde çalışması son derece önemlidir. MMP'nin bozulması füzyon olayını olumsuz yönde etkilemektedir (Zorova ve ark., 2018). Çalışmamızda 48 saatlik maruziyette bozulmuş olan MMP ve MFN1/2 inhibisyonu nedeniyle mitofajinin düzgün gerçekleştirilemediği, ancak 72 saatlik maruziyet

sonrasında MMP'deki düzelmeye ve füzyon genlerinin ekspresyonlarındaki artışa bağlı olarak mitofajik yolağın aktif hale geldiği düşünülebilir.

Mitokondriyal dinamiklerin; mitokondriyal ağın kontrol edilme sürecinin yanında, kardiyomiyositlerde mitokondriyal ayıklama, rejenerasyon ve onarımı düzenleyen entegre bir organel kalite kontrol sürecinde rol aldığı belirtilmektedir (Song ve ark., 2015a). DRP1 inhibisyonunun, mitokondriyal uzamaya, hasarlı mitokondri birikmesine ve kardiyomiyositlerde artan apoptoza neden olduğu belirtilmiştir (Ikeda ve ark., 2015). Diğer yandan, DRP1 aracılı fisyonun Sit c salınımı ve apoptoz sinyal yolağının aktivasyonu ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Song ve ark., 2015b). DRP1 ekspresyonunda 48 saat maruziyette 5 μ M dozda ve 72 saat tüm dozlarda doza bağlı artış görülmüştür. Benzer şekilde FIS1 ekspresyonu her iki maruziyet sonrasında artma eğilimi göstermiş ve 10 μ M daki artış anlamlı bulunmuştur. Sit c seviyesinde 10 μ M konsantrasyonda 72 saat maruziyet sonrası görülen artış, ASK1 ve JNK artışı ile birlikte bu koşullarda apoptoz yolağının aktif hale gelmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Fisyon genlerindeki artışların ilaç indüklü kardiyotoksisitenin nedenleri olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda; diyabetli hastalarda miyokardiyal kontraktıl disfonksiyonun, mitokondriyal fisyondaki artış ile ilişkili olabileceği, ayrıca reperfüzyonda artan DRP1 oranının ileride kardiyak yetmezliğe sebep olabileceği bulunmuştur. DRP1'i inhibe ederek post-travmatik ve diyabet indüklü kardiyak disfonksiyondan koruma sağlandığı, ayrıca reperfüzyonun başlangıcında aşırı mitokondriyal fisyonun akut inhibisyonunun kalbi iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyabileceği belirtilmiştir (Ong ve ark., 2010; Disatnik ve ark., 2013; Ding ve ark., 2018a; Ding ve ark., 2018b).

Mitokondriyal fisyonun inhibe edilmesinin kalbi koruyucu olduğuna dair farklı çalışmalar da mevcuttur. Maneechote ve ark., sıçanlarda akut kardiyak iskemi/reperfüzyon hasarından sonra fisyonun inhibe edilmesinin mitokondriyal disfonksiyon ve mitokondriyal dinamiklerdeki dengesizliği düzelterek azalmış enfarktüs boyutu ve sonuçta iyileşmiş sol ventrikül fonksiyonu sağladığını bulmuştur (Maneechote ve ark., 2018). Ayrıca H9c2 hücrelerinde yapılan bir çalışmada DRP1 inhibisyonunun doxorubicin indüklü kardiyak hasardan koruma sağlandığı belirlenmiştir (Catanzaro ve ark., 2019). Uzun ömür ve sağlıklı yaşlanmanın mitokondriyal dinamiklerle olan ilişkisi üzerine yapılan çalışmalar da bulunmaktadır.

(Sharma ve ark., 2019). *Drosophila melanogaster* ile yapılan bir deneyde DRP1'i orta yaşta kısa süreli indükleyerek daha uzun ömürlü olmaları sağlanmıştır (Rana ve ark., 2017).

Mitokondriyal fonksiyonların sağlıklı bir şekilde yürütmesi mitokondriyal bütünlüğün sağlanması ile mümkündür. Mitokondriyal dinamikler arasındaki uyumsuzluk bu dengenin bozulmasına yola açabilir. Çalışma sonuçlarımızdan Lenvatinib'in hücrelerde strese yol açtığı ve füzyon/ fisyon dengesini bozarak hasarlı mitokondriler oluşturduğu görülmektedir. TEM ile alınmış mitokondri görüntülerinde 48 saat maruziyet sonrası özellikle artmış fisyonun işareti olan mitokondriler saptanmıştır. Bu durum füzyon genlerinde ölçülen inhibisyon ve fisyon genlerindeki artış ile paralellik göstermektedir. 72 saatte ise uzamış mitokondriler ve mitokondriyal şişme ve hasar dikkat çekmektedir.

Lenvatinib'in mitokondriyal toksisitesini araştıran iki tane çalışma yapılmıştır ve her iki çalışmada da karaciğer hücreleri kullanmıştır. Zhang ve ark. yaptıkları çalışmada, 20,4 μ M Lenvatinib'in 30 dakika maruziyet sonunda mitokondriyal oksijen tüketimini anlamlı derecede azalttığı, ancak ETZ Komplekslerinin aktivitesinde, MMP ve Sit c seviyelerinde bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır (Zhang ve ark., 2017). Bu parametreler ile ilgili elde ettiğimiz farklı sonuçlar kullanılan hücrenin özelliği ve maruziyet süresinin uzun olması ile açıklanabilir.

Lenvatinib ile ilgili yapılmış diğer çalışmada ise Roberts ve ark., Lenvatinib'in histon deasetilaz inhibitörü Entinostat ile birlikte kullanıldığında karaciğer kanser hücrelerinde mitokondriyal koruyucu proteinlerin (BCL-XL ve MCL-1) ekspresyonunu inhibe ettiğini bulmuştur. Bu çalışmada karaciğer kanserinde tedavi amacıyla mitokondriyal toksisite hedeflenmiştir, fakat normal (sağlıklı) hücrelerdeki hedef dışı toksik etki araştırılmamıştır (Roberts ve ark., 2020).

Yapılan literatür taramasına göre Lenvatinib'in kardiyotoksitesinin moleküler yollarının aydınlatılmasına yönelik *in vitro* bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlardan; Lenvatinib'in H9c2 hücrelerinde, maruziyet süresine bağlı olarak hücresel strese yol açtığı ve bunun sonucunda mitokondriyal membran potansiyelini, mitokondriyal proteinleri ve ATP sentezini etkilediği, ROS üretimini artırdığı, mitokondriyal dinamikleri de bozmak suretiyle mitokondriyal hasarı indüklediği düşünülebilir. Bulgularımızın Lenvatinib ve diğer TKİ ilaçlarla tedavi

sırasında sıklıkla karşılaşılan ve önemli bir yan etki olan kardiyotoksisitenin moleküler mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlaması beklenmektedir.



KAYNAKLAR

- Abbas, T. ve Dutta, A. (2009). P21 in cancer: Intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer*, **9**(6), 400–414.
- Abrams, T. J., Lee, L. B., Murray, L. J., Pryer, N. K., Cherrington, J. M., Grande-Pulido, E. ve Antón-Aparicio, L. (2003). SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer. *Molecular cancer therapeutics*, **2**(5), 471–8.
- Ahn, J. ve Kim, J. (2012). Mechanisms and Consequences of Inflammatory Signaling in the Myocardium. *Current Hypertension Reports*, **14**(6), 510–516.
- Albini, A., Pennesi, G., Donatelli, F., Cammarota, R., Flora, S. De ve Noonan, D. (2010). Cardiotoxicity of anticancer drugs: the need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention. *Journal of the National Cancer Institute*, **102**(1).
- Alexander, S., Fabbro, D., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J., Veale, E., ... Davies, J. (2019). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2019/20: Enzymes. *British Journal of Pharmacology*, **176**(S1), S297–S396.
- Anand, R., Langer, T. ve Baker, M. J. (2013). Proteolytic control of mitochondrial function and morphogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, **1833**(1), 195–204.
- Ancker, O. V., Wehland, M., Bauer, J., Infanger, M. ve Grimm, D. (2017). The adverse effect of hypertension in the treatment of thyroid cancer with multi-kinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**(3), 625.
- Arighi, E., Borrello, M. G. ve Sariola, H. (2005). RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, **16**(4–5), 441–467.
- Bai, R.-K. ve Wong, L.-J. C. (2005). Simultaneous Detection and Quantification of Mitochondrial DNA Deletion(s), Depletion, and Over-Replication in Patients with Mitochondrial Disease, **7**(5), 613–622.
- Begriche, K., Massart, J., Robin, M.-A., Borgne-Sanchez, A. ve Fromenty, B. (2011). Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: Mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *Journal of Hepatology*, **54**,

773–794.

- Bers, D. M. (2001). *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. Developments in Cardiovascular Medicine (C. 237). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Bhullar, K. S., Lagarón, N. O., McGowan, E. M., Parmar, I., Jha, A., Hubbard, B. P. ve Rupasinghe, H. P. V. (2018). Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Molecular Cancer*, **17**(48), 1–20.
- Billemont, B., Medioni, J., Taillade, L., Helley, D., Meric, J. B., Rixe, O. ve Oudard, S. (2008). Blood glucose levels in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib. *British journal of cancer*, **99**(9), 1380–1382.
- Bouitbir, J., Alshaikhali, A., Panajatovic, M. V., Abegg, V. F., Paech, F. ve Krähenbühl, S. (2019). Mitochondrial oxidative stress plays a critical role in the cardiotoxicity of sunitinib: Running title: Sunitinib and oxidative stress in hearts. *Toxicology*, **426**, 152281.
- Bruheim, S., Kristian, A., Uenaka, T., Suo, Z., Tsuruoka, A., Nesland, J. M. ve Fodstad, Ø. (2011). Antitumour activity of oral E7080, a novel inhibitor of multiple tyrosine kinases, in human sarcoma xenografts. *International Journal of Cancer*, **129**(3), 742–750.
- Bull, V. H., Rajalingam, K. ve Thiede, B. (2012). Sorafenib-induced mitochondrial complex i inactivation and cell death in human neuroblastoma cells. *Journal of Proteome Research*, **11**(3), 1609–1620.
- Burstein, H. J., Krilov, L., Aragon-Ching, J. P., Baxter, N. N., Chiorean, E. G., Chow, W. A., ... Dizon, D. S. (2017). Clinical cancer advances 2017: Annual report on progress against cancer from the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology*, **35**(12), 1341–1367.
- Cao, J., Liu, Y., Jia, L., Zhou, H. M., Kong, Y., Yang, G., ... Zhong, L. F. (2007). Curcumin induces apoptosis through mitochondrial hyperpolarization and mtDNA damage in human hepatoma G2 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, **43**(6), 968–975.
- Cárdenas, C., Miller, R. A., Smith, I., Bui, T., Molgó, J., Müller, M., ... Foskett, J. K.

- (2010). Essential Regulation of Cell Bioenergetics By Constitutive InsP 3 Receptor Ca²⁺ Transfer to Mitochondria. *Cell*, **142**(2), 270–283.
- Catanzaro, M. P., Weiner, A., Kaminaris, A., Li, C., Cai, F., Zhao, F., ... Liang, Q. (2019). Doxorubicin-induced cardiomyocyte death is mediated by unchecked mitochondrial fission and mitophagy. *The FASEB Journal*, **33**, 11096–11108.
- Chen, K. H., Guo, X., Ma, D., Guo, Y., Li, Q., Yang, D., ... Tang, J. (2004). Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders. *Nature Cell Biology*, **6**(9), 872–883.
- Chen, L., Gong, Q., Stice, J. P. ve Knowlton, A. A. (2009). Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. *Cardiovascular Research*, **84**, 91–99.
- Chen, L., Liu, T., Tran, A., Lu, X., Tomilov, A. A., Davies, V., ... Knowlton, A. A. (2012). OPA1 Mutation and Late-Onset Cardiomyopathy: Mitochondrial Dysfunction and mtDNA Instability. *Journal of the American Heart Association*, **1**(5), e003012.
- Chen, M. H., Kerkelä, R. ve Force, T. (2008). Mechanisms of cardiac dysfunction associated with tyrosine kinase inhibitor cancer therapeutics. *Circulation*, **118**(1), 84–95.
- Chen, N. ve Karantza, V. (2011). Autophagy as a therapeutic target in cancer. *Cancer Biology and Therapy*, **11**(2), 157–168.
- Chen, Y., Dorn II, G. W. ve Needleman Professor, S. K. (2013). PINK1-Phosphorylated Mitofusin 2 is a Parkin Receptor for Culling Damaged Mitochondria NIH Public Access. *Science*, **340**(6131), 471–475.
- Chen, Y., Liu, Y., Dorn II, G. W. ve Needleman Professor, S. K. (2011). Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis. *Circ Res*, **109**(12), 1327–1331.
- Cheng, Z., Dimichele, L. A., Rojas, M., Vaziri, C., Mack, C. P. ve Taylor, J. M. (2015). Focal adhesion kinase antagonizes doxorubicin cardiotoxicity via p21. *J Mol Cell Cardiol*, **67**, 1–11.
- Chinnery, P. F. ve Hudson, G. (2013). Mitochondrial genetics. *British Medical Bulletin*, **106**, 135–159.

- Chu, T. F., Rupnick, M. A., Kerkela, R., Dallabrida, S. M., Zurakowski, D., Nguyen, L., ... Chen, M. H. (2007). Cardiotoxicity associated with tyrosine kinase inhibitor sunitinib. *Lancet (London, England)*, **370**(9604), 2011–9.
- Cohen, P. (2002). Protein kinases - The major drug targets of the twenty-first century? *Nature Reviews Drug Discovery*, **1**(4), 309–315.
- Crewe, C., Schafer, C., Lee, I., Kinter, M. ve Szweda, L. I. (2016). Regulation of Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 in the Heart through Degradation by the Lon Protease in Response to Mitochondrial Substrate Availability *. *The Journal of Biological Chemistry*, **292**(1), 305–312.
- Curigliano, G., Cardinale, D., Dent, S., Criscitiello, C., Aseyev, O., Lenihan, D. ve Cipolla, C. M. (2016). Cardiotoxicity of anticancer treatments: Epidemiology, detection, and management. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **66**(4), 309–325.
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, **43**(6), 582–592.
- Damaraju, V. L., Kuzma, M., Cass, C. E., Putman, C. T. ve Sawyer, M. B. (2018). Multitargeted kinase inhibitors imatinib, sorafenib and sunitinib perturb energy metabolism and cause cytotoxicity to cultured C2C12 skeletal muscle derived myotubes. *Biochemical Pharmacology*, **155**, 162–171.
- Dhanasekaran, D. N. ve Reddy, E. P. (2017). JNK-signaling: A multiplexing hub in programmed cell death. *Genes&Cancer*, **8**(9–10), 682. www.impactjournals.com/Genes&Cancer adresinden erişildi.
- Ding, M., Feng, N., Daishi Tang, |, Feng, J., Li, Z., Jia, M., ... Pei, J. (2018). Melatonin prevents Drp1-mediated mitochondrial fission in diabetic hearts through SIRT1-PGC1 α pathway. *J Pineal Res*, **65**(2), e12491.
- Ding, M., Ning, J., Feng, N., Li, Z., Liu, Z., Wang, Y., ... Pei, J. (2018). Dynamin-related protein 1-mediated mitochondrial fission contributes to post-traumatic cardiac dysfunction in rats and the protective effect of melatonin. *Journal of Pineal Research*, **64**(1), e12447.
- Disatnik, M.-H., Ferreira, J. C. B., Campos, J. C., Atia, ; K, Gomes, S., Dourado, P. M. M., ... Mochly-Rosen, D. (2013). Acute Inhibition of Excessive Mitochondrial

- Fission After Myocardial Infarction Prevents Long-term Cardiac Dysfunction. *Journal of American Heart Association*, **2**(5), e000461.
- Dougherty, C. J., Kubasiak, L. A., Frazier, D. P., Li, H., Xiong, W., Bishopric, N. H. ve Webster, K. A. (2004). Mitochondrial signals initiate the activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by hypoxia-reoxygenation. *The FASEB Journal*, **18**(10), 1060–1070.
- Dröse, S. ve Brandt, U. (2012). Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **748**, 145–169.
- Dutto, I., Tillhon, M., Cazzalini, O., Stivala, L. A. ve Prosperi, E. (2015). Biology of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A: molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Archives of Toxicology*, **89**(2), 155–178.
- Dyken, J. A., Marroquin, L. D. ve Will, Y. (2007, Mart). Strategies to reduce late-stage drug attrition due to mitochondrial toxicity. *Expert Review of Molecular Diagnostics*.
- Dyken, J. A. ve Will, Y. (2007). The significance of mitochondrial toxicity testing in drug development. *Drug Discovery Today*, **12**(17–18), 777–785.
- Eura, Y., N., I., Sadaki, Y. ve Mihara, K. (2003). Two Mitofusin Proteins, Mammalian Homologues of FZO, with Distinct Functions Are Both Required for Mitochondrial Fusion. *Journal of Biochemistry*, **134**(3), 333–344.
- Eustaquio, T., Wang, C., Dugard, C. K., George, N. I., Liu, F., Slikker, W., ... Paredes, A. M. (2018). Electron microscopy techniques employed to explore mitochondrial defects in the developing rat brain following ketamine treatment. *Experimental Cell Research*, **373**(1–2), 164–170.
- Fan, H., He, Z., Huang, H., Zhuang, H., Liu, H., Liu, X., ... Feng, D. (2020). Mitochondrial Quality Control in Cardiomyocytes: A Critical Role in the Progression of Cardiovascular Diseases, **11**.
- Fang, L., Moore, X. L., Gao, X. M., Dart, A. M., Lim, Y. L. ve Du, X. J. (2007). Down-regulation of mitofusin-2 expression in cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. *Life Sciences*, **80**(23), 2154–2160.

- Ferrari, S. M., Bocci, G., Di Desidero, T., Elia, G., Ruffilli, I., Ragusa, F., ... Fallahi, P. (2018). Lenvatinib exhibits antineoplastic activity in anaplastic thyroid cancer in vitro and in vivo. *Oncology Reports*, **39**(5), 2225–2234.
- Force, T. ve Kolaja, K. L. (2011). Cardiotoxicity of kinase inhibitors: The prediction and translation of preclinical models to clinical outcomes. *Nature Reviews Drug Discovery*, **10**(2), 111–126.
- Force, T., Krause, D. S. ve Van Etten, R. A. (2007). Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nature Reviews Cancer*, **7**(5), 332–344.
- French, K. J., Coatney, R. W., Renninger, J. P., Hu, C. X., Gales, T. L., Zhao, S., ... Davis, C. B. (2010). Differences in Effects on Myocardium and Mitochondria by Angiogenic Inhibitors Suggest Separate Mechanisms of Cardiotoxicity. *Toxicologic Pathology*, **38**(5), 691–702.
- Gergely, P., Grossman, C., Niland, B., Puskas, F., Neupane, H., Allam, F., ... Perl, A. (2002). Mitochondrial Hyperpolarization and ATP Depletion in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, **46**(1), 175–190.
- Gorini, S., De Angelis, A., Berrino, L., Malara, N., Rosano, G. ve Ferraro, E. (2018). Chemotherapeutic Drugs and Mitochondrial Dysfunction: Focus on Doxorubicin, Trastuzumab, and Sunitinib. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2018**, 1–15.
- Greineder, C. F., Kohnstamm, S. ve Ky, B. (2011). Heart Failure Associated with Sunitinib: Lessons Learned from Animal Models. *Current Hypertension Reports*, **13**(6), 436–441.
- Hall, P. S., Harshman, L. C., Srinivas, S. ve Witteles, R. M. (2013). The Frequency and Severity of Cardiovascular Toxicity From Targeted Therapy in Advanced Renal Cell Carcinoma Patients. *JACC: Heart Failure*, **1**(1), 72–78.
- Hanahan, D. ve Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**(1), 57–70.
- Hanahan, D. ve Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, **144**(5), 646–674.
- Hargreaves, I. P., Al Shahrani, M., Wainwright, L. ve Heales, S. J. R. (2016). Drug-

- Induced Mitochondrial Toxicity. *Drug Safety*, **39**(7), 661–674.
- Hartmann, J. T., Haap, M., Kopp, H.-G. ve Lipp, H.-P. (2009). Tyrosine Kinase Inhibitors-A Review on Pharmacology, Metabolism and Side Effects. *Current Drug Metabolism*, **10**(5), 470–481.
- Hasinoff, B. B., Patel, D. ve O'Hara, K. A. (2008). Mechanisms of myocyte cytotoxicity induced by the multiple receptor tyrosine kinase inhibitor sunitinib. *Molecular pharmacology*, **74**(6), 1722–8.
- Hausenloy, D. J., Maddock, H. L., Baxter, G. F. ve Yellon, D. M. (2002). Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovascular Research*, **55**(3), 534–543.
- Hebert, S. L., Lanza, I. R. ve Sreekumaran Nair, K. (2010). Mitochondrial DNA Alterations and Reduced Mitochondrial Function in Aging. *Mech Ageing Dev.*, **131**(7–8), 451–462.
- Heo, S. K., Noh, E. K., Gwon, G. D., Kim, J. Y., Jo, J. C., Choi, Y., ... Kim, H. (2016). Radotinib inhibits acute myeloid leukemia cell proliferation via induction of mitochondrial-dependent apoptosis and CDK inhibitors. *European Journal of Pharmacology*, **789**, 280–290.
- Heslop, K. A., Rovini, A., Hunt, E. G., Fang, D., Morris, M. E., Christie, C. F., ... Maldonado, E. N. (2020). JNK activation and translocation to mitochondria mediates mitochondrial dysfunction and cell death induced by VDAC opening and sorafenib in hepatocarcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*, **171**, 113728.
- Hoffmann, R. F., Zarrintan, S., Brandenburg, S. M., Kol, A., de Bruin, H. G., Jafari, S., ... Heijink, I. H. (2013). *Prolonged cigarette smoke exposure alters mitochondrial structure and function in airway epithelial cells. Respiratory Research* (C. 14).
- Hor Yue Tan, N. W. and Y. F. V. W. T. H. (2019). Cancer Management by Tyrosine Kinase Inhibitors: Efficacy, Limitation, and Future Strategies. *Tyrosine Kinases as Druggable Targets in Cancer.*, **IntechOpen**, 13.
- Hoshino, A., Okawa, Y., Ariyoshi, M., Kaimoto, S., Uchihashi, M., Fukai, K., ... Matoba, S. (2014). Oxidative post-translational modifications develop LONP1 dysfunction in pressure overload heart failure. *Circulation: Heart Failure*, **7**(3),

500–509.

- Hu, L., Ding, M., Tang, D., Gao, E., Li, C., Wang, K., ... Li, Y. (2019). Targeting mitochondrial dynamics by regulating Mfn2 for therapeutic intervention in diabetic cardiomyopathy. *Theranostics*, **9**, 13.
- Huot, J. R., Essex, A. L., Gutierrez, M., Barreto, R., Wang, M., Waning, D. L., ... Bonetto, A. (2019). Chronic Treatment with Multi-Kinase Inhibitors Causes Differential Toxicities on Skeletal and Cardiac Muscles. *Cancers*, **11**(4), 571.
- Hussein, Z., Mizuo, H., Hayato, S., Namiki, M. ve Shumaker, R. (2017). Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Lenvatinib, an Orally Active, Small-Molecule, Multitargeted Tyrosine Kinase Inhibitor. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **42**(6), 903–914.
- Igoudjil, A., Begriche, K., Pessayre, D. ve Fromenty, B. (2006). Mitochondrial, metabolic and genotoxic effects of antiretroviral nucleoside reverse-transcriptase inhibitors. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, **5**(3), 273–292.
- Ikeda, Y., Shirakabe, A., Maejima, Y., Zhai, P., Sciarretta, S., Toli, J., ... Sadoshima, J. (2015). Endogenous Drp1 Mediates Mitochondrial Autophagy and Protects the Heart Against Energy Stress. *Circulation Research*, **116**(2), 264–278.
- Jacob, F., Yonis, A. Y., Cuello, F., Luther, P., Schulze, T., Eder, A., ... Hansen, A. (2016). Analysis of Tyrosine Kinase Inhibitor-Mediated Decline in Contractile Force in Rat Engineered Heart Tissue. *PLOS ONE*, **11**(2), e0145937.
- Jechlinger, M., Beug, H., Grünert, S., Sommer, A., Moriggl, R., Seither, P., ... Cordon-Cardo, C. (2006). Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *The Journal of Clinical Investigation*, **116**(6).
- Jensen, B., Parry, T., Huang, W., Ilaiwy, A., Bain, J., Muehlbauer, M., ... Willis, M. (2017). Non-Targeted Metabolomics Analysis of the Effects of Tyrosine Kinase Inhibitors Sunitinib and Erlotinib on Heart, Muscle, Liver and Serum Metabolism In Vivo. *Metabolites*, **7**(4), 31.
- Jiao, Q., Bi, L., Ren, Y., Song, S., Wang, Q. ve Wang, Y. shan. (2018). Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Molecular Cancer*, **17**(1), 36.

- Kerkelä, R., Grazette, L., Yacobi, R., Iliescu, C., Patten, R., Beahm, C., ... Force, T. (2006). Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nature Medicine*, **12**(8), 908–916.
- Kerkela, R., Woulfe, K. C., Durand, J.-B., Vagnozzi, R., Kramer, D., Chu, T. F., ... Force, T. (2009). Sunitinib-induced cardiotoxicity is mediated by off-target inhibition of AMP-activated protein kinase. *Clinical and translational science*, **2**(1), 15–25.
- Krajewska, J., Kukulska, A. ve Jarzab, B. (2015). Drug safety evaluation of lenvatinib for thyroid cancer. *Expert Opinion on Drug Safety*, **14**(12), 1935–1943.
- Krajewska, J., Paliczka-Cieslik, E. ve Jarzab, B. (2017). Managing tyrosine kinase inhibitors side effects in thyroid cancer. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism*, **12**(2), 117–127.
- Kudo, M., Finn, R. S., Qin, S., Han, K.-H., Ikeda, K., Piscaglia, F., ... Cheng, A.-L. (2018). Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet*, **391**(10126), 1163–1173.
- Kuznetsov, A. V, Javadov, S., Sickinger, S., Frotschnig, S. ve Grimm, M. (2015). H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation HHS Public Access Author manuscript. *Biochim Biophys Acta*, **1853**(2), 276–284.
- Lavanya, V., Adil, M., Ahmed, N., Rishi, A. K. ve Jamal, S. (2014). Small molecule inhibitors as emerging cancer therapeutics. *Integr Cancer Sci Therap*, **1**(3), 39–46.
- Lee, J., Giordano, S. ve Zhang, J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: Cross-talk and redox signalling. *Biochemical Journal*, **441**(2), 523–540.
- Lee, P. S. ve Secord, A. A. (2014). Targeting molecular pathways in endometrial cancer: A focus on the FGFR pathway. *Cancer Treatment Reviews*, **40**(4), 507–512.
- Lee, S. R., Heo, H. J., Jeong, S. H., Kim, H. K., Song, I. S., Ko, K. S., ... Han, J. (2015). Low abundance of mitochondrial DNA changes mitochondrial status and renders cells resistant to serum starvation and sodium nitroprusside insult. *Cell*

Biology International, **39**(7), 865–872.

- Leipnitz, G., Mohsen, A.-W., Karunanidhi, A., Seminotti, B., Roginskaya, V. Y., Markantone, D. M., ... Vockley, J. (2018). Evaluation of mitochondrial bioenergetics, dynamics, endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk, and reactive oxygen species in fibroblasts from patients with complex I deficiency OPEN. *Scientific Reports*, **8**(1165), 1–14.
- Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kühnle, S. ve Nicotera, P. (1997). Intracellular Adenosine Triphosphate (ATP) Concentration: A Switch in the Decision Between Apoptosis and Necrosis. *J. Exp. Med*, **185**(8), 1481–1486.
- Lekes, D., Szadvari, I., Krizanova, O., Lopusna, K., Rezuchova, I., Novakova, M., ... Babula, P. (2016). Nilotinib Induces ER Stress and Cell Death in H9c2 Cells. *Physiol. Res*, **65**, 505–514.
- Leonard, M. O., Limonciel, A. ve Jennings, P. (2014). Stress Response Pathways. *In vitro Toxicology Systems* içinde (ss. 433–458). Humana Press, New York, NY.
- Liesa, M., Palací'n, M., Palací'n, P. ve Zorzano, A. (2009). Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease.
- Livak, K. J. ve Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, **25**(4), 402–408.
- Lomakina, G. Y., Modestova, Y. A. ve Ugarova, N. N. (2015). Bioluminescence assay for cell viability. *Biochemistry (Moscow)*, **80**(6), 701–713.
- Lorusso, L., Pieruzzi, L., Biagini, A., Sabini, E., Valerio, L., Giani, C., ... Elisei, R. (2016). Lenvatinib and other tyrosine kinase inhibitors for the treatment of radioiodine refractory, advanced, and progressive thyroid cancer. *OncoTargets and therapy*, **9**, 6467–6477.
- Maharsy, W., Aries, A., Mansour, O., Komati, H. ve Nemer, M. (2014). Ageing is a risk factor in imatinib mesylate cardiotoxicity. *European Journal of Heart Failure*, **16**, 367–376.
- Maneechote, C., Palee, S., Kerdphoo, S., Jaiwongkam, T., Chattipakorn, S. C. ve Chattipakorn, N. (2018). Differential temporal inhibition of mitochondrial fission

- by Mdivi-1 exerts effective cardioprotection in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Clinical Science*, **132**(15), 1669–1683.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. ve Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, **298**(5600), 1912–1934.
- Marcinkowska, E. ve Gocek, E. (2016). Tyrosine Kinase Signaling Pathways in Normal and Cancer Cells. *Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors* içinde (ss. 1–25).
- Martínez-Reyes, I., Diebold, L. P., Kong, H., Schieber, M., Huang, H., Hensley, C. T., ... Chandel, N. S. (2016). TCA Cycle and Mitochondrial Membrane Potential Are Necessary for Diverse Biological Functions. *Molecular Cell*, **61**(2), 199–209.
- Massart, J., Begriche, K., Buron, N., Porceddu, M., Borgne-Sanchez, A. ve Fromenty, B. (2013). Drug-Induced Inhibition of Mitochondrial Fatty Acid Oxidation and Steatosis. *current pathobiology Rep*, **1**, 147–157.
- Massart, J., Borgne-Sanchez, A. ve Fromenty, B. (2018). Drug-induced mitochondrial toxicity. *Mitochondrial Biology and Experimental Therapeutics* içinde (ss. 269–295). Springer International Publishing.
- Mean Son, J., Sarsour, E. H., Kakkerla Balaraju, A., Fussell, J., Kalen, A. L., Wagner, B. A., ... Goswami, P. C. (2017). Mitofusin 1 and optic atrophy 1 shift metabolism to mitochondrial respiration during aging. *aging cell*, **16**, 1136–1145.
- Mellor, H. R., Bell, A. R., Valentin, J. P. ve Roberts, R. R. A. (2011). Cardiotoxicity associated with targeting kinase pathways in cancer. *Toxicological Sciences*, **120**(1), 14–32.
- Meyer, J. N., Leung, M. C. K., Rooney, J. P., Sendoel, A., Hengartner, M. O., Kisby, G. E. ve Bess, A. S. (2013). Mitochondria as a Target of environmental Toxicants. *Toxicological Sciences*, **134**(1), 1–17.
- Meyer, J. N., Leuthner, T. C. ve Luz, A. L. (2017). Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. *Toxicology*, **391**, 42–53.
- Michael, F. ve Van Houten, B. (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Cell Biology*, **94**, 514–519.
- Mingard, C., Paech, F., Bouitbir, J. ve Krähenbühl, S. (2018). Mechanisms of toxicity

- associated with six tyrosine kinase inhibitors in human hepatocyte cell lines. *Journal of Applied Toxicology*, **38**(3), 418–431.
- Montaigne, D., Hurt, C. ve Nevriere, R. (2012). Mitochondria Death/Survival Signaling Pathways in Cardiotoxicity Induced by Anthracyclines and Anticancer-Targeted Therapies. *Biochemistry Research International*, **2012**, 12.
- Montaigne, D., Maréchal, X., Lacroix, D. ve Staels, B. (2015). From cardiac mitochondrial dysfunction to clinical arrhythmias. *International Journal of Cardiology*, **184**, 597–599.
- Montier, C. L. L., Deng, J. J. ve Bai, Y. (2009). Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *Journal of Genetics and Genomics*, **36**(3), 125–131.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**(1–2), 55–63.
- Narayan, V. ve Ky, B. (2018). Common Cardiovascular Complications of Cancer Therapy: Epidemiology, Risk Prediction, and Prevention. *Annual Review of Medicine*, **69**(1), 97–111.
- National Institutes of Health. (2018). *Imatinib*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/adresinden_erişildi.
- National Institutes of Health. (2019). Search of: lenvatinib | lenvima - List Results - ClinicalTrials.gov. 25 Ekim 2019 tarihinde <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?recrs=&cond=lenvima&term=lenvatinib&cntry=&state=&city=&dist=> adresinden erişildi.
- National Institutes of Health. (2020). Targeted Cancer Therapies Fact Sheet - National Cancer Institute. 11 Kasım 2019 tarihinde <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies/targeted-therapies-fact-sheet> adresinden erişildi.
- Nimmo, G. A. M., Venkatesh, S., Pandey, A. K., Marshall, C. R., Hazrati, L.-N., Blaser, S., ... Yoon, G. (2019). Bi-allelic mutations of LONP1 encoding the mitochondrial LonP1 protease cause pyruvate dehydrogenase deficiency and profound

- neurodegeneration with progressive cerebellar atrophy. *Human Molecular Genetics*, **28**(2), 290–306.
- Nishida, T., Hattori, K. ve Watanabe, K. (2017). The regulatory and signaling mechanisms of the ASK family. *Advances in Biological Regulation*, **66**, 2–22.
- Nunnari, J. ve Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: In sickness and in health. *Cell*, **148**, 1145–1159.
- O'Reilly, M. A. (2005). Redox activation of p21Cip1/WAF1/Sdi1: A multifunctional regulator of cell survival and death. *Antioxidants and Redox Signaling*, **7**, 108–118.
- OECD Indicators (Ed.). (2017). Health at a Glance 2017 OECD INDICATORS.
- Ogasawara, S., Mihara, Y., Kondo, R., Kusano, H., Akiba, J. ve Yano, H. (2019). Antiproliferative effect of lenvatinib on human liver cancer cell lines in vitro and in vivo. *Anticancer Research*, **39**(11), 5943–5982.
- Ong, S.-B., Subrayan, S., Lim, S. Y., Yellon, D. M., Davidson, S. M. ve Hausenloy, D. J. (2010). Inhibiting Mitochondrial Fission Protects the Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation*, **121**(18), 2012–2022.
- Orphanos, G. S., Ioannidis, G. N. ve Ardavanis, A. G. (2009). Cardiotoxicity induced by tyrosine kinase inhibitors. *Acta Oncologica*, **48**(7), 964–970.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F.-T., Zhou, T.-T., Liu, B. ve Bao, J.-K. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis.
- Paech, F., Abegg, V. F., Duthaler, U., Terracciano, L., Bouitbir, J. ve Krähenbühl, S. (2018). Sunitinib induces hepatocyte mitochondrial damage and apoptosis in mice. *Toxicology*, **409**, 13–23.
- Paech, F., Bouitbir, J. ve Krähenbühl, S. (2017). Hepatocellular Toxicity Associated with Tyrosine Kinase Inhibitors: Mitochondrial Damage and Inhibition of Glycolysis. *Frontiers in Pharmacology*, **8**, 367.
- Paech, F., Mingard, C., Grünig, D., Abegg, V. F., Bouitbir, J. ve Krähenbühl, S. (2018). Mechanisms of mitochondrial toxicity of the kinase inhibitors ponatinib, regorafenib and sorafenib in human hepatic HepG2 cells. *Toxicology*, **395**, 34–44.

- Perl, A., Gergely, P., Nagy, G., Koncz, A. ve Banki, K. (2004). Mitochondrial hyperpolarization: A checkpoint of T-cell life, death and autoimmunity. *Trends in Immunology*, **25**(7), 360–367.
- Pessayre, D., Mansouri, A., Berson, A. ve Fromenty, B. (2010). Mitochondrial involvement in drug-induced liver injury. *Handbook of Experimental Pharmacology* içinde (C. 196, ss. 311–365). Springer New York LLC.
- Prashant, M. ve Chan, D. C. (2016). Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *The Journal of Cell Biology*, **212**, 379–387.
- Quiros, P. M., Goyal, A., Jha, P. ve Auwerx, J. (2018). Analysis of mtDNA/nDNA ratio in mice. *Current Protocols in Mouse Biology*, **7**(1), 47–54.
- Raica, M. ve Cimpean, A. M. (2010). Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for Antitumor and Antiangiogenic Therapy. *Pharmaceuticals*, **3**, 572–599.
- Rambold, A. S., Kostecky, B., Elia, N. ve Lippincott-Schwartz, J. (2011). Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**(25), 10190–10195.
- Rana, A., Oliveira, M. P., Khamoui, A. V, Aparicio, R., Rera, M., Rossiter, H. B. ve Walker, D. W. (2017). Promoting Drp1-mediated mitochondrial fission in midlife prolongs healthy lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Nature Communications*, **8**(1), 1–14.
- Rapsomaniki, E., Timmis, A., George, J., Pujades-Rodriguez, M., Shah, A. D., Denaxas, S., ... Hemingway, H. (2014). Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases: lifetime risks, healthy life-years lost, and age-specific associations in 1·25 million people. *Lancet (London, England)*, **383**(9932), 1899–1911.
- Rendón, O. Z. ve Shoubridge, E. A. (2018). LONP1 Is Required for Maturation of a Subset of Mitochondrial Proteins, and Its Loss Elicits an Integrated Stress Response. *Molecular and Cellular Biology*, **38**(20), e00412-17.
- Rharass, T., Gbankoto, A., Canal, C., Gizem, K., Bijoux, A., Panáková, D. ve Ribou,

- A.-C. (2016). Oxidative stress does not play a primary role in the toxicity induced with clinical doses of doxorubicin in myocardial H9c2 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **413**.
- Ripoli, A., Pingitore, A., Favilli, B., Bottoni, A., Turchi, S., Osman, N. F., ... Iervasi, G. (2005). Does subclinical hypothyroidism affect cardiac pump performance?: Evidence from a magnetic resonance imaging study. *Journal of the American College of Cardiology*, **45**(3), 439–445.
- Roberts, J. L., Poklepovic, A., Booth, L. ve Dent, P. (2020). The multi-kinase inhibitor lenvatinib interacts with the HDAC inhibitor entinostat to kill liver cancer cells. *Cellular Signalling*, **70**, 109573.
- Roskoski, R. (2015). A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacological Research*, **100**, 1–23.
- Roskoski, R. (2019a). Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors. *Pharmacological Research*, **144**, 19–50.
- Roskoski, R. (2019b). Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update. *Pharmacological Research*, **152**, 19–50.
- Rossi, A. E. ve Dirksen, R. T. (2006). Sarcoplasmic reticulum: The dynamic calcium governor of muscle. *Muscle and Nerve*, **33**(6), 715–731.
- Santos, J. H., Hunakova, L., Chen, Y., Bortner, C. ve Van Houten, B. (2003). Cell sorting experiments link persistent mitochondrial DNA damage with loss of mitochondrial membrane potential and apoptotic cell death. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(3), 1728–1734.
- Sasaki, R., Kanda, T., Fujisawa, M., Matsumoto, N., Masuzaki, R., Ogawa, M., ... Moriyama, M. (2020). Different mechanisms of action of regorafenib and lenvatinib on toll-like receptor-signaling pathways in human hepatoma cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(9), 3349.
- Sawyers, C. (2004). Targeted cancer therapy. *Nature*, **432**(7015), 294–297.
- Scheffler, I. E. (2011). *Mitochondria*. John Wiley & Sons.
- Schlessinger, J. ve Ullrich, A. (1992). Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron*, **9**(3), 383–391.

- Schlumberger, M., Jarzab, B., Cabanillas, M. E., Robinson, B., Pacini, F., Ball, D. W., ... Sherman, S. I. (2016). A phase II trial of the multitargeted tyrosine kinase inhibitor lenvatinib (E7080) in advanced medullary thyroid cancer. *Clinical Cancer Research*, **22**(1), 44–53.
- Schlumberger, M., Tahara, M., Wirth, L. J., Robinson, B., Brose, M. S., Elisei, R., ... Sherman, S. I. (2015). Lenvatinib versus Placebo in Radioiodine-Refractory Thyroid Cancer. *New England Journal of Medicine*, **372**(7), 621–630.
- Schrepfer, E. ve Scorrano, L. (2016). Molecular Cell Review Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism. *Molecular Cell*, **61**, 683–694.
- Scott, L. J. (2015). Lenvatinib: First global approval. *Drugs*, **75**(5), 553–560.
- Shah, R. R. ve Morganroth, J. (2015). Update on Cardiovascular Safety of Tyrosine Kinase Inhibitors: With a Special Focus on QT Interval, Left Ventricular Dysfunction and Overall Risk/Benefit. *Drug Safety*, **38**(8), 693–710.
- Sharma, Arpit, Smith, H. J., Yao, P. ve Mair, W. B. (2019). Causal roles of mitochondrial dynamics in longevity and healthy aging. *EMBO reports*, **20**(12).
- Sharma, Arun, BurrIDGE, P. W., McKeithan, W. L., Serrano, R., Shukla, P., Sayed, N., ... Wu, J. C. (2017). High-throughput screening of tyrosine kinase inhibitor cardiotoxicity with human induced pluripotent stem cells. *Science Translational Medicine*, **9**(377).
- Shim, J. V., Chun, B., van Hasselt, J. G. C., Birtwistle, M. R., Saucerman, J. J. ve Sobie, E. A. (2017). Mechanistic systems modeling to improve understanding and prediction of cardiotoxicity caused by targeted cancer therapeutics. *Frontiers in Physiology*, **8**, 651.
- Shirihai, O., Song, M. ve Dorn, G. W. (2015). How mitochondrial dynamism orchestrates mitophagy. *Circulation research*, **116**(11), 1835–1849.
- Shvedova, M., Anfinogenova, Y., Atochina-Vasserman, E. N. ve Schepetkin, I. A. (2018). c-Jun N-Terminal Kinases (JNKs) in Myocardial and Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Frontiers in Pharmacology*, **1**, 715.
- Sims, N. R. ve Muyderman, H. (2010). Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of*

- Disease*, **1802**(1), 80–91.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., ... Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, **150**(1), 76–85.
- Song, M., Gong, G., Burelle, Y., Gustafsson, A. B., Kitsis, R. N., Matkovich, S. J., ... Needleman Professor, S. K. (2015). Interdependence of Parkin-Mediated Mitophagy and Mitochondrial Fission in Adult Mouse Hearts HHS Public Access. *Circ Res*, **117**(4), 346–351.
- Song, M., Mihara, K., Chen, Y., Scorrano, L. ve Dorn II, G. W. (2015). Mitochondrial fission and fusion factors reciprocally orchestrate mitophagic culling in mouse hearts and cultured fibroblasts. *Cell Metabolism*, **21**(2), 273–285.
- Sudasena, D., Dinu, ·, Balanescu, V., Donisan, T., Hassan, · Saamir, Palaskas, N., ... Iliescu, · Cezar. (2012). Fulminant Vascular and Cardiac Toxicity Associated with Tyrosine Kinase Inhibitor Sorafenib. *Cardiovascular Toxicology*, **19**(4), 382–387.
- Sunaga, D., Tanno, M., Kuno, A., Ishikawa, S. ve Ogasawara, M. (2014). Accelerated Recovery of Mitochondrial Membrane Potential by GSK-3b Inactivation Affords Cardiomyocytes Protection from Oxidant-Induced Necrosis. *PLoS ONE*, **9**(11), 112529.
- Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V. ve Prudent, J. (2018). Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in Biochemistry*, **62**(62), 341–360.
- Tokur, O. ve Aksoy, A. (2017). In Vitro Sitotoksosite Testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **6**(1), 112–118.
- Touyz, R. M. ve Herrmann, J. (2018). Cardiotoxicity with vascular endothelial growth factor inhibitor therapy. *npj Precision Oncology*, **2**(1), 13.
- Tridente, G. (2017). *Adverse events and oncotargeted kinase inhibitors*. Academic Press.
- Tsujimoto, Y. (1997). Apoptosis and necrosis: Intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death and Differentiation*, **4**, 429–434.
- Tzagoloff, A. (2012). *Mitochondria*. Springer Science and Business Media.

- U.S. FDA. (2016a). FDA Approves Lenvima (lenvatinib) for the Treatment of Patients with Advanced Renal Cell Carcinoma. 25 Ekim 2019 tarihinde <https://www.drugs.com/newdrugs/fda-approves-lenvima-lenvatinib-patients-advanced-renal-cell-carcinoma-4382.html> adresinden erişildi.
- U.S. FDA. (2016b). LENVATINIB approved lable, **13**, 1–5. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/206947s003lbl.pdf adresinden erişildi.
- U.S. FDA. (2019). Lenvima (lenvatinib) FDA Approval History - Drugs.com. *Lenvima (lenvatinib) FDA Approval History - Drugs.com*. 25 Ekim 2019 tarihinde <https://www.drugs.com/history/lenvima.html> adresinden erişildi.
- U.S. FDA ve CDER. (2015). *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION*. www.fda.gov/medwatch. adresinden erişildi.
- Vaidya, T., Kamta, J., Chaar, M., Ande, A. ve Ait-Oudhia, S. (2018). Systems pharmacological analysis of mitochondrial cardiotoxicity induced by selected tyrosine kinase inhibitors. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, **45**(3), 401–418.
- Varanita, T., Soriano, M. E., Romanello, V., Zaglia, T., Quintana-Cabrera, R., Semenzato, M., ... Scorrano, L. (2015). The Opa1-dependent mitochondrial cristae remodeling pathway controls atrophic, apoptotic, and ischemic tissue damage. *Cell Metabolism*, **21**(6), 834–844.
- Varga, Z. V, Ferdinandy, P., Liaudet, L. ve Pacher, P. (2015). Drug-induced mitochondrial dysfunction and cardiotoxicity. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **309**(9), H1453-67.
- Venkatesh, S., Li, M., Saito, T., Tong, M., Rashed, E., Mareedu, S., ... Suzuki, C. K. (2019). Mitochondrial LonP1 protects cardiomyocytes from ischemia/reperfusion injury in vivo. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **128**, 38–50.
- Venkatesh, S. ve Suzuki, C. K. (2020). Cell stress management by the mitochondrial LonP1 protease – Insights into mitigating developmental, oncogenic and cardiac stress. *Mitochondrion*, **51**, 46–61.
- Wai, T., García-Prieto, J., Baker, M. J., Merkwirth, C., Benit, P., Rustin, P., ... Langer,

- T. (2015). Imbalanced OPA1 processing and mitochondrial fragmentation cause heart failure in mice. *Science*, **350**(6265).
- Wai, T. ve Langer, T. (2016). Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **27**, 105–117.
- Wallace, D. C., Fan, W. ve Procaccio, V. (2010). Mitochondrial Energetics and Therapeutics. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, **5**(1), 297–348.
- Watkins, S. J., Borthwick, G. M. ve Arthur, H. M. (2011). The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, **47**(2), 125–131.
- Webster, J. D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Kaneene, J. B., Miller, R., Resau, J. H. ve Kiupel, M. (2006). The Role of c-KIT in Tumorigenesis: Evaluation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors 1. *Neoplasia*, **8**, 104–111.
- Wei, X., Zhang, T., Yao, Y., Zeng, S., Li, M., Xiang, H., ... Yang, J. (2018). Efficacy of Lenvatinib, a multitargeted tyrosine kinase inhibitor, on laser-induced CNV mouse model of neovascular AMD. *Experimental Eye Research*, **168**, 2–11.
- Weng, Z., Luo, Y., Yang, X., Greenhaw, J. J., Li, H., Xie, L., ... Shi, Q. (2015). Regorafenib impairs mitochondrial functions, activates AMP-activated protein kinase, induces autophagy, and causes rat hepatocyte necrosis. *Toxicology*, **327**, 10–21.
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **11**(12), 872–884.
- Will, Y., Dykens, J. A., Nadanaciva, S., Hirakawa, B., Jamieson, J., Marroquin, L. D., ... Jessen, B. A. (2008). Effect of the Multitargeted Tyrosine Kinase Inhibitors Imatinib, Dasatinib, Sunitinib, and Sorafenib on Mitochondrial Function in Isolated Rat Heart Mitochondria and H9c2 Cells. *Toxicological Sciences*, **106**(1), 153–161.
- Wu, N. N., Zhang, Y., Ren, J. ve Martin, P. M. (2019). Mitophagy, Mitochondrial Dynamics, and Homeostasis in Cardiovascular Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

- Yang, B. ve Papoian, T. (2018). Preclinical approaches to assess potential kinase inhibitor-induced cardiac toxicity: Past, present and future. *Journal of Applied Toxicology*, **38**, 790–800.
- Youle, R. J. ve Van Der Bliek, A. M. (2012). Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress HHS Public Access. *Science*, **337**(6098), 1062–1065.
- Yu, R., Jin, S.-B., Lendahl, U., Nistér, M. ve Zhao, J. (2019). Human Fis1 regulates mitochondrial dynamics through inhibition of the fusion machinery. *the EMBO Journal*, **38**, e99748.
- Zemirli, N., Morel, E. ve Molino, D. (2018). Mitochondrial dynamics in basal and stressful conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**(2), 564.
- Zhang, J., Yang, P. L. ve Gray, N. S. (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, **9**(1), 28–39.
- Zhang, Salminen, A., Yang, X. ve Luo, Y. (2017). Effects of 31 FDA approved small-molecule kinase inhibitors on isolated rat liver mitochondria. *Archives of Toxicology*, **91**(8), 2921–2938.
- Zhao, Y., Xue, T., Yang, X., Zhu, H., Ding, X., Lou, L., ... He, Q. (2010). Autophagy plays an important role in Sunitinib-mediated cell death in H9c2 cardiac muscle cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **248**(1), 20–27.
- Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., ... Author, A. B. (2018). Mitochondrial membrane potential HHS Public Access Author manuscript. *Anal Biochem*, **552**, 50–59.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ANTİNEOPLASTİK İLAÇ LENVATİNİB KAYNAKLI KARDİYOTOKSİSİTENİN MOLEKÜLER ETKİ MEKANİZMALARI AÇISINDAN İN VİTRO İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%5	%1	%0	%5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	Submitted to Karadeniz Teknik University Öğrenci Ödevi	<%1
3	Submitted to Istanbul Medipol Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
4	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<%1
5	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
6	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
7	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	<%1
8	link.springer.com İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ayşenur	Soyadı	GÜNAYDIN AKYILDIZ
Doğ.Yeri	Bahçelievler, İstanbul	Doğ.Tar.	17.03.1992
Email	gunaydinaysenur@gmail.com	Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji A.D.	2020
Yük.Lis.	-	-
Lisans	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2015
Lise	Özel Safiye Sultan Anadolu Lisesi	2010

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	2018-2020

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	-	(Yökdil) 97,5
Arapça	Orta	Orta	Orta	-	Qasid 5. Seviye sertifikası

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	88	80	-
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayınlr

Guler, E. M., Bektay, M. Y., **Gunaydin Akyildiz, A.**, Sisman, B. H., Izzettin, F. V., & Kocyigit, A. (2020). Investigation of DNA damage, oxidative stress, and inflammation in synthetic cannabinoid users. *Human & Experimental Toxicology*, 0960327120930057.

Boran, T., **Gunaydin, A.**, Jannuzzi, A. T., Ozcagli, E., & Alpertunga, B. (2019). Celastrol pretreatment as a therapeutic option against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicology research*, 8(5), 723-730.

Kitap Bölümleri (Çeviri)

Günaydin A. Kozmesötikler ve Kozmetik İçerikler. Kısım G: Diğer İçerikler (Bölüm 57-63; Koenzim Q10, Coffeeberry, Bal/Propolis/Arı Sütü, İdebenon, Melatonin, Nane), Baumann L.S., Solaklıoğlu Z., Gürel M.S., Editör, McGraw-Hill Companies , İstanbul, ss.190-240, 2018

Tebliğler

Sözlü Bildiriler

Gunaydin Akyildiz A., Boran T., Jannuzzi A. T., Alpertunga B. Cardiotoxicity Induced by Tyrosine Kinase Inhibitors. 10th International Congress of the Turkish Society of Toxicology, Antalya, Türkiye, 16 - 19 October 2019, ss.72

Gunaydin A. The Ongoing Ethical Debate: Mitochondrial Donation. Health Culture and the Human Body, 5th International Symposium, 4-6 October 2018, Istanbul TURKEY, İstanbul, Türkiye, 04 October 2018, ss.20-21

Gunaydin A., Alpertunga B. Impacts of Environmental Chemicals on Reproductive System. Turk-Hellen Toxicology Congress, İzmir, Türkiye, 21 October 2015, ss.28

Poster Bildiriler

Lacin N., Yilmaz A., **Gunaydin A.**, Erdemir H.G., Topcu G., Tunali M., Cotinus coggygia, a Promising Plant for a New Mouthwash, J Dent Res (Spec Iss 2020):2057

Gunaydin Akyildiz A., Boran T., Jannuzzi A. T., Alpertunga B. In Vitro Investigation of the Antineoplastic Agent Lenvatinib Induced Cardiotoxicity in Terms of Mitochondrial Toxicity. Society of Toxicology 58th Annual Meeting and ToxExpo, Baltimore, Amerika Birleşik Devletleri, 10 March 2019, ss.252

Boran T., **Gunaydin A.**, Jannuzzi A. T., Özçağlı E., Alpertunga B. Assessing the role of celastrol on cisplatin induced nephrotoxicity under in vitro conditions. 53rd Congress of the European Societies of Toxicology, Bratislava, Slovakya, 10 September 2017, ss.257

Günaydin A., Alpertunga B. Elektronik Sigaralar Güvenli Mi? 3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi, İstanbul, Türkiye, 26 April 2017, ss.918-919

Ödüller/Burslar

Yüksek Öğrenim Kredi ve Yurtlar Kurumu Doktora Bursu, Ocak 2016-2019

Bezm-i Âlem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mezuniyet Birinciliği Ödülü, Haziran 2015

Bezm-i Âlem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi %100 Eğitim Bursu, 2010-2015

Sertifikalar

SPSS Uygulamalı Temel İstatistik Eğitimi, Yıldız Teknik Üniversitesi. Uzaktan Eğitim, 24 Nisan-18 Mayıs, 2018

Workshop on 3Rs “2D, 3D Liver, Skin, Eye and Intestinal Regulatory Models” TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Kocaeli, Türkiye 2-3 Kasım, 2017

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Kursu, Bezm-i Âlem Vakıf Üniversitesi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi, İstanbul, Türkiye, 22-30 Ağustos, 2016

V. Moleküler Tıpta Kullanılan Teknikler Kursu, İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma, Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye, 13 Mayıs, 2016

