

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ (VETERİNER) DOKTORA PROGRAMI
VTF-2017-0001

DOKSORUBİSİN KARDİYOTOKSİSİTESİNİN
ÖNLENMESİNDE DEKSRAZOKSAN VE SİLİMARİN
ETKİNLİĞİNİN KARŞILAŞTIRMALI OLARAK
ARAŞTIRILMASI

EMRAH İPEK
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Recai TUNCA

AYDIN-2017

KABUL VE ONAY SAYFASI



TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında bilgi birikimi, tecrübesi ve desteğini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Recai TUNCA'ya; doktora eğitimi sırasında değerli görüş ve tecrübeleri ile bana ışık tutan Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Serap BİRİNCİOĞLU, Prof. Dr. Nihat TOPLU, Doç. Dr. Hamdi AVCI ve Yrd. Doç. Dr. Erkmen TUĞRUL EPİKMEN'e; tez süresince göstermiş olduğu anlayış için Patoloji Anabilim Dalı araştırma görevlisi Ayşe Nur AKKOÇ'a; laboratuvar çalışmaları sırasında vermiş olduğu desteklerden dolayı Adnan Menderes Üniversitesi Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Başkanı Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Çiğdem YENİSEY'e, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN'e, Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma görevlisi Burçin İrem ABAS'a ve Veteriner Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı doktora öğrencisi Göksel DOĞAN'a; istatistiksel analizlerin yapılmasında vermiş olduğu desteklerden dolayı Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Aykut GÖKTÜRK ÜNER'e; tez izleme komitesi üyesi olarak vermiş olduğu destek ve katkıları için Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ferda AKAR'a; tezimin yürütülmesi için gerekli mali desteği sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Başkanlığı'na; bu aşamaya gelmemde çok büyük katkıları olan babam Mehmet İPEK'e; her koşulda yanımda olan, desteklerini her zaman hissettiğim annem Recebiye İpek, kardeşlerim Gülden İPEK ve Furkan İPEK'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
RESİMLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. ANT Kardiyotoksisitesinde Kalp Dokusunda Karşılaşılan Histopatolojik Değişiklikler.....	5
2.2. ANT Kardiyotoksisitesinden Sorumlu Mekanizmalar.....	5
2.2.1. ANT Kardiyotoksisitesinde Serbest Radikallerin Rolü.....	6
2.2.2. ANT Kardiyotoksisitesinde Demir İyonunun Rolü.....	8
2.2.3. ANT Kardiyotoksisitesinde Topoizomerase Enziminin Rolü.....	10
2.2.3.1. Topoizomerase enziminin yapısı ve izoformları.....	11
2.2.3.2. Topoizomerase enziminin katalitik döngüsü.....	14
2.2.3.3. Çift zincir kırıkları.....	14
2.2.3.4. Histon proteinleri.....	16
2.3. Silimarin.....	18
2.3.1. Deve Dikeni Bitkisinin Özellikleri.....	19
2.3.2. Silimarinin Kimyasal Yapısı ve Farmakolojik Özellikleri.....	19
2.3.3. Silimarinin Kalp Hastalıklarına Karşı Koruyucu Etkileri.....	20
2.4. Kalp Kasının Kasılmasında Görevli Proteinler.....	24
2.4.1. Aktin ve Miyozin İplikçiklerinin Moleküler Yapısı.....	25
2.4.2. Kalp Kasının Kasılma Mekanizması.....	26
2.4.3. Troponinler.....	26
2.4.3.1. Troponin C.....	27
2.4.3.2. Troponin I.....	27

2.4.3.3. Troponin T.....	28
2.4.4. ANT'nin Kardiyotoksik Etkilerinin Saptanmasında Troponinlerin Kullanımı.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1. Deney Hayvanları.....	33
3.2. Deney Tasarımı.....	33
3.3. Nekropsi ve Histopatolojik İnceleme.....	35
3.4. İmmunohistokimyasal İnceleme.....	36
3.5. İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	38
3.6. İmmunoblotlama (Western blotting).....	39
3.6.1. Dokuların Homojenizasyonu, Total Protein İzolasyonu ve Protein Miktarının Belirlenmesi.....	41
3.6.2. SDS-PAGE Jelinin Hazırlanması ve Elektroforezis İşlemi.....	41
3.6.3. Ayırıştırılan Proteinlerin PVDF Membrana Transferi.....	42
3.6.4. Antikor ile İnkübasyon.....	43
3.6.5. Görüntüleme ve Analiz.....	43
3.7. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	44
3.7.1. RNA İzolasyonu.....	45
3.7.2. RNA Kalite Kontrolü.....	46
3.7.3. Komplementer DNA Sentezi.....	46
3.7.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	47
3.8. İstatistiksel Analiz.....	48
4. BULGULAR.....	49
4.1. Haftalara Göre Canlı Ağırlık Değişimleri.....	49
4.2. Makroskopik Bulgular.....	50
4.3. Histopatolojik Bulgular.....	50
4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	53
4.4.1. Kalp Dokusunda Troponin T İmmunoreaktivitesi.....	53
4.4.2. Kalp Dokusunda Troponin I İmmunoreaktivitesi.....	55
4.4.3. Kalp Dokusunda γ H ₂ Ax İmmunoreaktivitesi.....	58
4.4.4. Kalp Dokusunda TopII β İmmunoreaktivitesi.....	59
4.5. İmmunoblotlama Sonuçları.....	61
4.5.1. Kalp Dokusu Örneklerinde Troponin I İfade Düzeyi.....	62

4.5.2	Kalp Dokusu Örneklerinde Troponin T İfade Düzeyi.....	64
4.5.3.	Kalp Dokusu Örneklerinde γ H ₂ Ax İfade Düzeyi.....	67
4.6.	Kantitatif Eş Zamanlı PCR Sonuçları.....	68
4.6.1.	TopII β Geninin Amplifikasyon Verimliliği.....	70
4.6.2.	β -aktin Geninin Amplifikasyon Verimliliği.....	72
4.6.3.	Kalp Dokusu Örneklerinde TopII β Enziminin Gen İfade Düzeyi.....	74
5.	TARTIŞMA.....	75
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	81
KAYNAKLAR.....		83
ÖZGEÇMİŞ.....		100



SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP	: Adenozin difosfat
ALT	: Alanin aminotransferaz
ANT	: Antrasiklin
AST	: Aspartat aminotransferaz
ATP	: Adenozin trifosfataz
cDNA	: Komplementer DNA
CK	: Kreatin kinaz
CK-MB	: Kreatin kinaz MB izoenzimi
cTn	: Kardiyak troponin
DEKS	: Dekstrozoksan
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DOKS	: Dokсорubisin
F aktin	: Fibriler aktin
Fe⁺³	: Ferrik demir
fs	: Hızlı kasılan iskelet kası
g	: Gram
G aktin	: Globüler aktin
ip	: İntraperitoneal
LDH	: Laktat dehidrogenaz
PVDF	: Poliviniliden florür
P_i	: Yüksek enerjili fosfat
qPCR	: Kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
ROS	: Serbest oksijen radikalleri
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
SİL	: Silimarin
Tn	: Troponin
Top	: Topoizomeraz
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	DOKS'un kimyasal yapısı.....	4
Şekil 2.	Kardiyak hücrelere alındıktan sonra DOKS'un yapısında meydana gelen değişiklikler.....	7
Şekil 3.	ANT grubu ilaçların kardiyak hücrelerde hasar oluşturma mekanizmaları.....	10
Şekil 4.	TopII β enziminin yapısı ve kesim noktaları.....	12
Şekil 5.	TopII enziminin hücre döngüsünün farklı aşamalarındaki ifade düzeyi...	13
Şekil 6.	TopII β enziminin katalitik döngüsü.....	14
Şekil 7.	TopII-DNA kesim kompleksinin hücreler üzerindeki etkileri.....	15
Şekil 8.	DNA hasarının tamirinde görevli proteinler.....	16
Şekil 9.	DEKS'in DOKS kardiyotoksitesine karşı koruyucu etkilerinden sorumlu mekanizmalar.....	18
Şekil10.	Kalbin gelişimi sırasında (embriyonel ve fetal dönem) kasılabilir proteinlerde meydana gelen izoform değişimleri.....	27
Şekil 11.	cTnI'nın yapısı ve transkripsiyon sonrası yapısında meydana gelen değişiklikler.....	28
Şekil 12.	cTnT'nin yapısı, fonksiyonel ve alternatif kesim bölgeleri ile transkripsiyon sonrası yapısında meydana gelen değişiklikler.....	29
Şekil 13.	cTnT izoformları ile bu izoformları kodlayan ekzonlar.....	30
Şekil 14.	Deney grupları ve deney hayvanları üzerinde yapılan uygulamalar.....	34
Şekil 15.	Allred skorlama sistemi.....	38
Şekil 16.	Deney süresince gruplar arası haftalık ağırlık değişimleri.....	49
Şekil 17.	Deney gruplarında karşılaşılan histopatolojik değişikliklerin semikantitatif analizi.....	52
Şekil 18.	Deney gruplarında TnT immunoreaktivitesi ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar.....	54
Şekil 19.	Kalp dokusunda TnT immunoreaktivitesi ile kardiyomiyopati skoru arasındaki korelasyon.....	54
Şekil 20.	Deney gruplarında TnI immunoreaktivitesi ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar.....	56

Şekil 21.	Kalp dokusunda TnI immunoreaktivitesi ile kardiyomiyopati skoru arasındaki korelasyon.....	57
Şekil 22.	Deney gruplarında γ H ₂ Ax boyanma skoru ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar.....	58
Şekil 23.	Deney gruplarında TopII β boyanma skoru ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar.....	60
Şekil 24.	BSA standartlarının absorbands değerleri ve bu değerler ile hesaplanan $y=mx+b$ denklemi.....	61
Şekil 25.	Deney gruplarında TnI ifade düzeyleri ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar.....	62
Şekil 26.	Kalp dokusu örneklerinde TnI ifade düzeyleri.....	59
Şekil 27.	Deney gruplarında TnI ifade düzeylerinin kontrol grubuna göre kat değişim değerleri.....	63
Şekil 28.	Kalp dokusu örneklerinde TnI immunoreaktivitesi ile TnI immunblotlama sonuçları arasındaki korelasyon.....	64
Şekil 29.	Deney gruplarında TnT ifade düzeyleri ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar.....	65
Şekil 30.	Kalp dokusu örneklerinde TnT ifade düzeyleri.....	65
Şekil 31.	Deney gruplarında TnT ifade düzeylerinin kontrol grubuna göre kat değişim değerleri.....	66
Şekil 32.	Kalp dokusunda TnT immunoreaktivitesi ile TnT immunblotlama sonuçları arasındaki korelasyon.....	66
Şekil 33.	Deney gruplarında γ H ₂ Ax ifade düzeyleri ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar.....	67
Şekil 34.	Kalp dokusu örneklerinde γ H ₂ Ax ifade düzeyleri.....	67
Şekil 35.	Deney gruplarında γ H ₂ Ax ifade düzeyinin kontrol grubuna göre kat değişim değerleri.....	68
Şekil 36.	Kalp dokularından elde edilen total RNA'ların %1.5'lik formaldehid-agaroz jeldeki görüntüsü.....	70
Şekil 37.	Log5 tabanına göre sulandırılmış cDNA sulandırılmalarına ait TopII β geni amplifikasyon eğrileri.....	71
Şekil 38.	cDNA sulandırılmalarına ait C _T değerleri ile çizilen standart eğri grafiği...	71
Şekil 39.	cDNA dilüsyonlarının %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüleri.....	72

Şekil 40.	Log5 tabanına göre sulandırılmış cDNA sulandırmalarına ait β -aktin geni amplifikasyon eğrileri.....	72
Şekil 41.	cDNA sulandırmalarına ait C_T değerleri ile çizilen standart eğri grafiği.....	73
Şekil 42.	cDNA dilüsyonlarının %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüleri.....	73
Şekil 43.	TopII β gen ifade düzeyinin gruplar arası kat değişim değerleri.....	74



RESİMLER DİZİNİ

- Resim 1.** Deney gruplarında kalp dokusunda karşılaşılan histopatolojik değişiklikler. Hematoksilen-eozin. **A.** DOKS grubu, Kardiyomiyositlerde yaygın vakuoler dejenerasyon, hiyalin dejenerasyonu ve nekrozu ve miyositolizis, **B.** Miyokardiyumda fokal alanlar şeklinde olmak üzere kardiyomiyositlerde hiyalin dejenerasyonu ve nekrozu, DOKS-DEKS grubu, **C.** Endokardiyumun hemen altındaki az sayıda kas telinde hiyalin dejenerasyonu ve nekrozu. DOKS-SİL grubu, **D.** Kontrol grubu. 40x..... 52
- Resim 2.** Kalp dokusunda TnT immunoreaktivitesi, Polimer metot. **A.** Kardiyomiyositlerin tamamına yakınında TnT immunoreaktivitesinde belirgin azalma, DOKS grubu. **B.** DOKS grubu ile karşılaştırıldığında kardiyomiyositlerdeki TnT kaybının belirgin olarak daha az olduğu görülmekte, DOKS-SİL grubu, **C.** DOKS-DEKS grubu, **D.** Kardiyomiyositlerde tamamına yakınında yoğun TnT immunoreaktivitesi, SİL grubu. 20x..... 55
- Resim 3.** Kalp dokusunda TnI immunoreaktivitesi, Polimer metot. **A.** Kardiyomiyositlerin tamamına yakınında TnI immunoreaktivitesinde belirgin azalma, DOKS grubu. **B.** DOKS grubu ile karşılaştırıldığında kardiyomiyositlerdeki TnI kaybının belirgin olarak daha az olduğu görülmekte, DOKS-DEKS grubu, **C.** DOKS-SİL grubu, **D.** Kardiyomiyositlerde tamamına yakınında yoğun TnI immunoreaktivitesi, SİL grubu. 20x..... 57
- Resim 4.** Kalp dokusunda $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ immunoreaktivitesi, Polimer metot, **A.** Kardiyomiyositlerin tamamına yakınında yoğun $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ immunreaktivitesi, DOKS grubu, **B.** DOKS grubu ile karşılaştırıldığında, $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ immunopozitif kardiyomiyositlerin hem sayısında hem de boyanma yoğunluğunda azalma, DOKS-DEKS grubu, **C.** DOKS-SİL grubu, **D.** Kardiyomiyositlerin çok azında hafif $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ immunoreaktivitesi, Kontrol grubu, 40x..... 59
- Resim 5.** Kalp dokusunda TopII β immunoreaktivitesi, Polimer metot, **A.** Kardiyomiyositlerin tamamına yakınında yoğun $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ immunreaktivitesi, DOKS grubu, **B.** Kontrol grubu (D) ile karşılaştırıldığında, TopII β immunopozitif kardiyomiyositlerin hem sayısında hem de boyanma yoğunluğunda azalma, DOKS-DEKS grubu, **C.** DOKS-SİL, **D.** Kontrol grubu, 20x..... 60

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1.	Histopatolojik değışikliklerin yaygınlığının değeriendirilmesinde kullanılan skorlama sistemi.....	36
Tablo 2.	İmmunohistokimyasal boyamalarda kullanılan birincil antikorların spesifitesi, firma bilgileri ve dilüsyon oranları.....	37
Tablo 3.	İmmunblotlama testinde kullanılan malzemeler.....	39
Tablo 4.	Ayırıcı jel bileşenleri ve miktarları.....	42
Tablo 5.	Paketleyici jel bileşenleri ve miktarları.....	42
Tablo 6.	İmmunblotlamada kullanılan birincil antikorların spesifitesi, firma bilgileri ve dilüsyon oranları.....	43
Tablo 7.	İmmunblotlamada kullanılan ikincil antikorların ürün kodu, firma bilgileri ve dilüsyon oranları.....	43
Tablo 8.	qPCR testinde kullanılan sarf malzemeler, ürün kodu ve firma bilgileri.	44
Tablo 9.	cDNA sentezinde kullanılan malzemeler ve miktarları.....	47
Tablo 10.	cDNA sentez aşamaları ve bu aşamalardaki sıcaklık ve bekleme süreleri.....	47
Tablo 11.	PCR işleminde kullanılan malzemeler ve miktarları.....	47
Tablo 12.	PCR aşamaları ve bu aşamalardaki sıcaklık ve bekleme süreleri.....	48
Tablo 13.	Gruplar arası haftalık ağırlık değışimleri ve istatistiksel analiz.....	50
Tablo 14.	Kalp dokusunda TnT, TnI, γ H ₂ Ax ve TopII β immunoreaktivitesi ile gruplar arası istatistiksel farklılıklar.....	53
Tablo 15.	Kalp dokusu örneklerinde TnT, TnI ve γ H ₂ Ax ifade düzeyleri ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar.....	61
Tablo 16.	Kalp dokusu örneklerinden izole edilen total RNA konsantrasyonları....	68
Tablo 17.	Kalp dokusu örneklerinde TopII β enziminin gen ifade düzeyleri.....	74

ÖZET

DOKSORUBİSİN KARDİYOTOKSİSİTESİNİN ÖNLENMESİNDE DEKSRAZOKSAN VE SİLİMARİN ETKİNLİĞİNİN KARŞILAŞTIRMALI OLARAK ARAŞTIRILMASI

**İpek E. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Patoloji (Veteriner)
Doktora Tezi, Aydın, 2017.**

Antrasiklinler (ANT) grubunda yer alan Doksorubisin (DOKS), pek çok kansere karşı oldukça etkili olmasına rağmen, diğer kanser ilaçları gibi çok sayıda yan etkileri bulunmaktadır. Bu yan etkiler arasında hayatı tehdit etmesi bakımından en önemlisi kardiyotoksik yan etkidir. DOKS'un kardiyotoksik etkilerinin önlenmesi ya da azaltılmasında kullanılan Deksraksozan (DEKS)'in tıpkı DOKS gibi Topoizomeras (Top) II enziminin katalitik inhibitörü olması nedeniyle, bu ilaçların birlikte kullanılması durumunda DOKS'un kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin azalabileceği endişesine neden olmuştur. Bu bakımdan, DOKS kardiyotoksitesine karşı kalbi koruyucu etkileri olan ancak TopII enziminin aktivitesi üzerinde etkisi olmayan yeni ajanlara ihtiyaç duyulduğu açıktır. Bu nedenle bu çalışmada antioksidan özelliklere sahip Silimarin (SİL)'in DOKS kardiyotoksitesine karşı kalbi koruyucu etkileri DEKS ile karşılaştırmalı olarak araştırıldı. Ayrıca, SİL'in kalbi koruyucu etkisinde TopIIβ enziminin rolü değerlendirildi. Bu amaçla, 45 adet 6-8 haftalık Balb/c ırkı fare rastgele seçilerek 6 gruba ayrıldı. Grup I (Kontrol grubu, n=5): Bu gruptaki hayvanlara toplamda 6 hafta süren deneyin ilk 2 ve son 2 haftasında haftada iki doz olmak üzere intraperitoneal (ip) yolla serum fizyolojik (SF) uygulandı. Ayrıca, deney süresi boyunca hergün gavajla SF uygulandı. Grup II (DOKS grubu, n=10): Bu gruptaki hayvanlara deneyin ilk 2 ve son 2 haftasında haftada iki doz olmak üzere ip yolla 3 mg/kg dozda DOKS uygulandı. Grup III (DEKS grubu, n= 5): Bu gruptaki hayvanlara deneyin ilk 2 ve son 2 haftasında haftada iki doz olmak üzere ip yolla 30 mg/kg dozda DEKS uygulandı. Grup IV (DOKS+DEKS grubu, n= 10): Bu gruptaki hayvanlara deneyin ilk 2 ve son 2 haftasında haftada iki doz olmak üzere ip yolla 3 mg/kg dozda DOKS uygulanmasına ilaveten DOKS uygulamalarından 30 dakika önce intraperitoneal yolla 30 mg/kg dozda DEKS uygulandı. Grup V (SİL grubu, n=5): Bu gruptaki hayvanlara 6 hafta boyunca hergün gavajla 100 mg/kg dozda SİL uygulandı. Grup VI (DOKS+SİL grubu, n=10): Bu gruptaki hayvanlara deneyin ilk 2 ve son 2 haftasında haftada iki doz olmak üzere ip yolla 3 mg/kg dozda

DOKS uygulanmasına ilaveten deney süresi boyunca hergün gavajla 100 mg/kg dozda SİL uygulandı.

DOKS grubunda kalp dokusunda karşılaşılan en belirgin histopatolojik değişiklikler; kardiyomiyositlerde sitoplazmik vakuolizasyon, hiyalin nekrozu ve miyositolizis şeklindeydi. Miyokardiyumda diffuz dağılım gösteren bu değişikliklere çoğunlukla sol ventrikulus duvarı ve interventriküler septumda rastlandı. DEKS ve SİL uygulamalarının kalp dokusunda karşılaşılan histopatolojik değişikliklerin hem yaygınlığını hem de şiddetini belirgin olarak azalttığı saptandı. TnT ve TnI birincil antikorları ile boyanan kalp kesitleri değerlendirildiğinde; DOKS grubunda hem TnI hem de TnT immunoreaktivitesinin oldukça azaldığı ortaya kondu ($p<0,001$). DEKS ve SİL uygulamalarının Tn kayıplarını belirgin olarak azalttığı dikkati çekti ($p<0,001$). DNA hasarını gösteren $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ ifadesi değerlendirildiğinde; DOKS grubunda kardiyak hücrelerin tamamına yakınında yoğun $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ ifadesi saptandı ($p<0,001$). DEKS ve SİL uygulamalarının $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ ifadesini belirgin olarak azalttığı ortaya kondu ($p<0,001$). Deney grupları TopII β enzim düzeyi bakımından karşılaştırıldığında; DEKS ve SİL uygulamalarının kalp dokusu örneklerinde TopII β enzim düzeyini belirgin olarak azalttığı görüldü. Bununla birlikte, DEKS grubunda TopII β enzim düzeyi SİL grubuna göre daha az idi.

Bu sonuçlar, SİL'in kardiyak hücrelerde TopII β enziminin ifadesini azaltarak DOKS kardiyotoksitesine karşı koruyucu etki gösterdiğini düşündürdü.

Anahtar Kelimeler: Deksraksozan, Doksorubisin, Kardiyotoksitesite, Silimarin, Topoizomeraz

ABSTRACT

COMPARATIVE INVESTIGATION OF THE EFFICIENCY OF DEXRAZOXANE AND SILYMARIN IN RATS WITH DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOTOXICITY

Ipek E. Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Department of Pathology (Veterinary), Doctorate/Ph.D. Program, Aydin, 2017.

Anthracyclines, including Doxorubicin (DOX) and idarubicin, also known as Topoisomerase (Topo) ‘poisons’, are one of the most effective anti-cancer agents. Cardiotoxicity, commonly encountered adverse effect, may limit their use. DOX exert its effect on tumour cells mostly through inhibition of DNA TopII α enzyme activity. Dexrazoxane (DEX) is the only clinically approved drug by the the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for the prevention of DOX-induced cardiotoxicity. Because of DEX is also an established catalytic inhibitor of TopoII enzyme, the use of DEX against DOX-induced cardiotoxicity lead to concern that DEX might interfere with the antitumor activity of DOX. Therefore, there is a need for new agents that can be used safely against the cardiotoxicity of DOX which does not inhibit the activity of the Topo enzyme. The aim of this study was to investigate whether Silymarin (SLY) may protect against DOX induced cardiotoxicity and assess its effect on TopII enzyme activity. Forty five male Balb/c, 6-8 weeks of age, mice were randomly divided into 6 groups. The mice in group I (control group, n=5) received intraperitoneal (ip) serum physiologic (twice each week) in the first two week and last two week of the experiment, which lasted 6 weeks. The mice in group II (group DOX, n=10) received DOX (3 mg/kg, ip) (twice each week) in the first two week and last two week of the experiment. The mice in group III (group DEX, n=5) received DEX (30 mg/kg, ip) (twice each week) in the first two week and last two week of the experiment. The mice in group IV (group DOX + DEX, n=10) received DEX (30 mg/kg, ip) 30 mins before each DOX dose. The mice in group V (group SLY, n=5) received daily SLY (100 mg/kg, by oral gavage) for 6 weeks. The mice in group VI (group DOX + SLY, n=10) received daily SLY (100 mg/kg, by oral gavage) for 6 weeks and they also received DOX (3 mg/kg, ip) (twice each week) in the first two week and last two week of the experiment.

Histological examination of the myocardium from the DOX group showed diffuse myocardial damage spread throughout the LV free wall and interventricular septum. The most prominent histopathological changes in affected cardiomyocytes are cytoplasmic vacuolization in cardiomyocytes, hyaline degeneration and necrosis and myocytolysis. Heart tissue sections stained with TnI and TnT antibodies revealed that DOX led to a significant reduction in the percentage of both TnI and TnT immunoreactivity ($p<0,001$). It has been noted that the administration of DEX and SLY resulted in a reduction in Tn loss ($p<0,001$). A significant increase in the percentage of $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ expression was detected in the DOX-treated group compared to the control ($p<0,001$). SLY and DEX treatment led to a significant reduction in the percentage of $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ expression ($p<0,001$). When the experimental groups were compared each other in terms of the expression of TopII β , it was determined that DEX and SYL administrations caused a significant reduction in the levels of TopII β expression in the heart tissue samples. However, TopII β expression was lower in group DEX than that of group SYL.

The results indicate that SYL shows protective effects on DOX-induced cardiotoxicity by decreasing TopII β gene expression in cardiomyocytes.

Key Words: Cardiotoxicity, Dexrazoxane, Doxorubicin, Slymarine, Topoisomerase

1. GİRİŞ

Doksorubisin (DOKS); antrasiklinler (ANT) grubunda yer alan, pek çok kansere (solid tümörler, lösemi, lenfoma, meme kanseri gibi) karşı oldukça etkili kemoterapötik bir ajandır (Minotti ve ark, 2004; van Dalen ve ark, 2008; Octavia ve ark, 2012). Bu ilacın çok sayıda yan etkisi vardır; bu yan etkiler arasında hayatı tehdit etmesi nedeniyle en önemlisi kardiyotoksik yan etkidir. DOKS kardiyotoksitesinde kalp dokusunda şekillenen morfolojik değişiklikler iyi bilinmesine rağmen, bu ilacın hangi mekanizma(lar) üzerinden kardiyotoksitesiteye yol açtığı tam olarak bilinmemektedir. Bu konuda çok sayıda hipotez ileri sürülmektedir (Minotti ve ark, 2004; Simunek ve ark, 2009; Sawyer ve ark, 2010; Octavia ve ark, 2012). Yakın zamanda yapılan kapsamlı bir çalışmada; bu ilacın kardiyomiyositlerde Topoizomerez (Top) II β enziminin DNA'ya bağlanması ile oluşan geçici çift zincir kırıklarını kalıcı hale getirerek bu hücrelerin ölümüne yol açtığı ortaya konmuştur (Zhang ve ark, 2012).

DOKS kardiyotoksitesinin önlenmesi ya da azaltılmasında iki temel yaklaşım bulunmaktadır: 1. DOKS'un kümülatif dozunu azaltmak, 2. DOKS kardiyotoksitesine karşı kalbi koruyucu ilaçlar kullanmak (van Dalen ve ark, 2008). Deksraksan (DEKS), DOKS'un kardiyotoksik etkilerinin azaltılmasında kullanılan klinik olarak etkisi kanıtlanmış tek ilaçtır (Wouters ve ark, 2005). DEKS'in kalbi koruyucu etkilerini aydınlatmaya yönelik yapılan ilk çalışmalarda, bu ilacın kardiyomiyositlerde demir iyonlarını şelatlayarak DOKS kardiyotoksitesine karşı kalbi koruduğu ileri sürülmüştür (Van Vleet ve ark, 1980; Herman ve ark, 1981). Buna karşın, demir şelatlama gücü bakımından DEKS'e nazaran daha güçlü bileşiklerin DOKS kardiyotoksitesine karşı koruyucu etkilerinin olmaması ya da DEKS'e nazaran daha az koruyucu etkili olmaları nedeniyle DEKS'in DOKS kardiyotoksitesine karşı kalbi koruyucu etkisinde henüz aydınlatılmamış mekanizmaların olduğunu düşündürmüştür (Simunek ve ark, 2005; Sterba ve ark, 2006). Nitekim Lyu ve ark 2007, DEKS'in kardiyomiyositlerde TopII β enzime bağlanarak DOKS'un bu enzime bağlanmasını önlediğini, bu sayede DOKS'un kardiyak hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini önlediğini ortaya koymuşlardır.

DOKS kanser hücrelerinde TopII α enziminin DNA sarmalına bağlanması ile oluşan geçici çift zincir kırıklarını kalıcı hale getirerek bu hücrelerin ölümüne neden olur (Gewirtz, 1999; Larsen ve ark, 2003; Minotti ve ark, 2004). Bu ilacın kardiyotoksik

etkilerinin azaltılması amacıyla kullanılan DEKS'in de tıpkı DOKS gibi TopII enziminin katalitik inhibitörü olması nedeniyle (Roca ve ark, 1994; Lyu ve ark, 2007), bu ilaçların birlikte kullanılması durumunda DOKS'un kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin azalabileceği endişesine neden olmuştur (Vejpongsa ve Yeh, 2014). Bu bakımdan, DOKS kardiyotoksitesine karşı kalbi koruyucu etkileri olan ancak TopII enziminin aktivitesi üzerinde etkisi olmayan ya da DEKS'e nazaran daha az etkisi olan yeni ajanlara ihtiyaç duyulduğu açıktır.

Silybum marianum L. Gaertner (deve diken) bitkisi, halk arasında başta karaciğer ve safra kesesi rahatsızlıkları olmak üzere pek çok rahatsızlıkta (sıtma ateşi, menstrüasyon şikayetleri, varikoz, emziren annelerde süt salgısını artırma gibi) uzun süredir kullanılmaktadır (Dunnick ve ark, 2011). Silimarin (SİL), deve diken bitkisinin tohumlarından ekstrakte edilen yapısal olarak bilinen en az yedi adet flavolignan (silibin, izosilibin, silidianin, silikristin ve izosilikristin) ile bir adet flavonolden (taksifolin) oluşan kompleks bir karışımdır (Kroll ve ark, 2007). Bu bileşiğin bitkinin terapötik etkilerinden sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (Wellington ve Jarvis, 2001; Kroll ve ark, 2007). SİL oldukça güçlü bir antioksidan olup hücrede normal metabolizma sırasında oluşan ya da patolojik durumlarda miktarı artan serbest oksijen radikallerini temizleyerek bu maddelerin hücreye zarar vermesini önler (Karimi ve ark, 2006; Anastopoulos ve ark, 2013). SİL'in DOKS ile oluşturulan akut kardiyotoksitesiteye karşı koruyucu etkilerinin olduğu bilinmesine rağmen (El-Shitany ve ark, 2008; Cecen ve ark, 2011) kronik DOKS kardiyotoksitesine karşı kalbi koruyucu etkileri bilinmemektedir. Bu nedenle, bu çalışmada; 1. SİL'in yetişkin Balb/c ırkı farelerde DOKS ile oluşturulan kronik kardiyotoksitesiteye karşı kalbi koruyucu etkileri değerlendirildi, 2. DEKS, DOKS'un kardiyotoksik etkilerinin azaltılmasında kullanılan klinik olarak etkinliği kanıtlanmış tek ilaç olduğundan SİL'in DOKS kardiyotoksitesine karşı muhtemel koruyucu etkileri DEKS ile karşılaştırıldı, 3. SİL'in DOKS kardiyotoksitesine karşı muhtemel koruyucu etkilerinde TopIIβ enziminin rolü araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

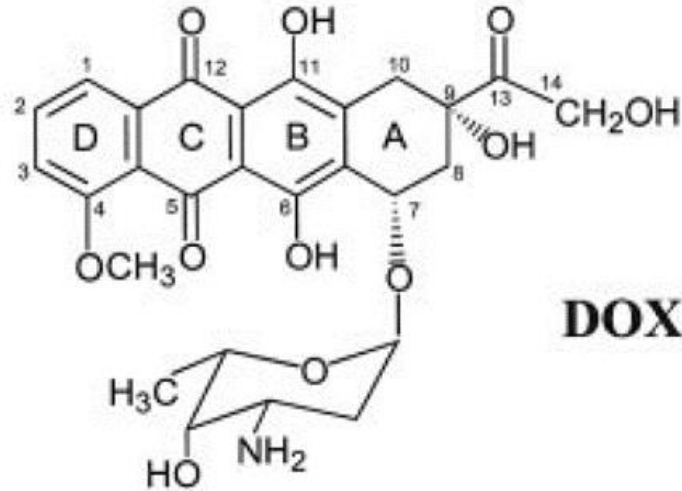
Kanser, günümüzün en önemli sağlık problemlerinden biridir. Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü'nün 2012 yılı verilerine göre, Amerika'da 13,7 milyon kanser hastası bulunmaktadır ve bu sayının 2022'de 18 milyonu bulacağı tahmin edilmektedir (Siegel ve ark, 2012). Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların istenmeyen çok sayıda yan etkileri vardır. Amerika Ulusal Sağlık ve Beslenme Dairesinin yürüttüğü bir çalışmada; 7 yıl süreyle izlenen 1807 kanser hastasının %33'ünün kemoterapötik ilaçların kardiyotoksik yan etkileri nedeniyle hayatını kaybettiği belirlenmiştir (Ning ve ark, 2012).

ANT grubu ilaçlar pek çok kansere karşı oldukça etkili olmasına, bu gruptaki ilaçların pek çok yan etkileri bulunmaktadır. İlacın kullanım süresi ve dozuna bağlı olarak değişen bu yan etkiler arasında hayatı tehdit etmesi nedeniyle en önemlisi kardiyotoksik yan etkidir (Lefrak ve ark, 1973; Broader ve ark, 2008; Perez ve ark, 2008; Migrino ve ark, 2008). Bu gruptaki ilaçların yol açtığı kardiyotoksik etkiler, kardiyotoksitenin görülme zamanına göre akut, subakut ve kronik olmak üzere üçe ayrılır. Akut kardiyotoksik etki, ilacın damar içi infüzyonu sırasında ya da ilacın infüzyonundan çok kısa bir süre sonra ortaya çıkar. Bu etki ilacın verilmesi sonlandırıldığı takdirde geri dönüşümlüdür (Broader ve ark, 2008). Subakut kardiyotoksik etki, ilacın kesilmesinden 1 yıl sonra ortaya çıkar (Perez ve ark, 2008). Kronik kardiyotoksik etki, ilacın kesilmesinden yıllar sonra (yaklaşık 15 yıl) ortaya çıkar ve geri dönüşümsüz konjestif kalp yetmezliğine neden olur (Lefrak ve ark, 1973). ANT grubu ilaçlarla tedavi gören hastaların %5-19'unda konjestif kalp yetmezliği şekillendiği bilinmektedir (Migrino ve ark, 2008).

ANT grubu ilaçlarla tedavide konjestif kalp yetmezliği gelişme ihtimali, ilacın kümülatif dozuna bağlı olarak değişmektedir (Allen, 1992). Bunun yanı sıra; yaş (Biancaniello ve ark, 1980; Godoy ve ark, 1997; Hershma ve ark, 2008), cinsiyet (Lipshultz ve ark, 1995), başka hastalıkların bulunması gibi risk faktörleri, tedavi gören hastalarda kalp yetmezliği gelişme ihtimalini etkilemektedir. Kadınların erkeklere göre, 65 yaş üstü yaşlılar ile 4 yaşın altındaki çocukların diğer yaş gruplarına göre ANT grubu ilaçlara daha duyarlı olduğu bilinmektedir (Biancaniello ve ark, 1980; Lipshultz ve ark, 1995; Godoy ve ark, 1997; Hershma ve ark, 2008). Hipertansiyon, şeker hastalığı, karaciğer yetmezliği gibi kronik hastalıklar da ANT grubu ilaçlara bağlı şekillenen miyokardiyal hasarın şiddetini etkilediği bilinmektedir (Hershma ve ark, 2008).

ANT grubu ilaçlardan ilk keşfedileni daunorubisindir. Bu bileşik, *Streptomyces peucetius*'un fermentasyon ürünüdür. Daunorubisin ismi, İtalya'da bileşiğin keşfedildiği bölgede Roma öncesi dönemde yaşayan Dauni kabilesinin ismi ile Fransızcada yakut anlamına gelen rubis sözcüklerinin birleştirilmesiyle türetilmiştir (Weiss, 1992). 1960 yılında başlayan klinik denemelerde ilacın akut lösemi ve lenfoma tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir. Buna karşın, kısa bir süre sonra ilacın ölümcül kardiyotoksisiteye neden olduğu belirlenmiştir (Tan ve ark, 1967). Adriamisin, mutant *Streptomyces peucetius*'un fermentasyon ürünüdür. Adriamisin ismi Adriyatik denizine atfen konulmuştur. Adriamisin ismi daha sonra DOKS olarak değiştirilmiştir. Bu bileşiğin, terapötik indeksi daunorubisine göre daha yüksektir. Ancak bu bileşiğin de daunorubisin gibi kardiyotoksik etkileri bulunmaktadır (Arcamone ve ark, 1969; Di Marco ve ark, 1969).

DOKS kimyasal olarak aglikon (şeker içermeyen yapı) ve aglikona glikozidik bağ ile bağlı şeker molekülünden (daunosamin) oluşmaktadır (Şekil 1). Tetrasiklik halka yapısındaki aglikonun farklı halkalarına çeşitli moleküller bağlıdır. Bunlar; B ve C halkalarındaki hidrokinon ve kinon motifleri, D halkasındaki metil grubudur (Minotti ve ark, 2004).



Şekil 1. DOKS'un kimyasal yapısı (Minotti ve ark, 2004)

2.1. ANT Kardiyotoksisitesinde Kalp Dokusunda Karşılaşılan Histopatolojik Değişiklikler

İnsan ve deney hayvanlarında (fare, sıçan, tavşan, köpek) DOKS kardiyotoksisitesinde kalp dokusunda karşılaşılan histopatolojik değişiklikler oldukça benzerdir (Mettler ve ark, 1977; Billingham ve ark, 1978; Olson ve Capen, 1978; Herman ve Ferrans, 1998; Lencova-Popelova ve ark, 2014). DOKS kardiyotoksisitesinde kalp dokusunda şekillenen en belirgin histopatolojik değişiklikler, kardiyomiyositlerde sitoplazmik vakuolizasyon (vakuoler dejenerasyon) ve miyositolizis şeklindedir; bu değişikliklere miyokardiyumda multifokal alanlar halinde rastlanır (Mettler ve ark, 1977; Billingham ve ark, 1978). Her iki değişiklikte geri dönüşümlüdür. Sitoplazmik vakuolizasyon, sarkoplazmik retikulumun membranöz kese ya da kanallarındaki genişlemeden ileri gelir (Berridge ve ark, 2013). Bu değişiklikte, kardiyomiyositlerin sitoplazmasında değişen büyüklüklerde keskin kenarlı boya almayan boşluklar (vakuoller) şekillenir; bu vakuollerin sayı ve büyüklükleri miyokardiyal hasarın şiddeti arttıkça artar (Herman ve ark, 1981; 1985; 1994; Berridge ve ark, 2013; Lencova-Popelova ve ark, 2014). Miyositolizis kas kasılmasında görevli proteinlerin (özellikle kalın iplikçiklerin) yıkımlanmasından ileri gelir (Berridge ve ark, 2013). Bu değişiklikte; kardiyomiyositlerin sitoplazmaları soluk kırmızı görülür, kas tellerinde enine çizgilenmeler seçilemez; yani kas telleri enine çizgilenmelerini kaybeder (Herman ve ark, 1981; 1985; 1994; Berridge ve ark, 2013). Şiddetli etkilenen kardiyomiyositlerin sitoplazmaları şişkin görünümündedir ve yıkımlanmış miyofibrillerin kalıntılarını içerir (Lencova-Popelova ve ark, 2014). Bununla birlikte, miyositolizis en iyi elektron mikroskopik inceleme ile ortaya konur, bu değişikliğin görüldüğü kimi kardiyomiyositlerde sitoplazmik vakuolizasyon da görülebilir (Herman ve ark, 1981; 1985; 1994; Berridge ve ark, 2013). Kardiyomiyositlerde şekillenen bu değişikliklere çoğunlukla sol ventrikulus duvarı ve interventriküler septumda rastlanır, sağ ventrikulus ise belirgin olarak daha az etkilenir (Van Vleet ve Ferrans, 1980; Van Vleet ve ark, 1980; Lencova-Popelova ve ark, 2014).

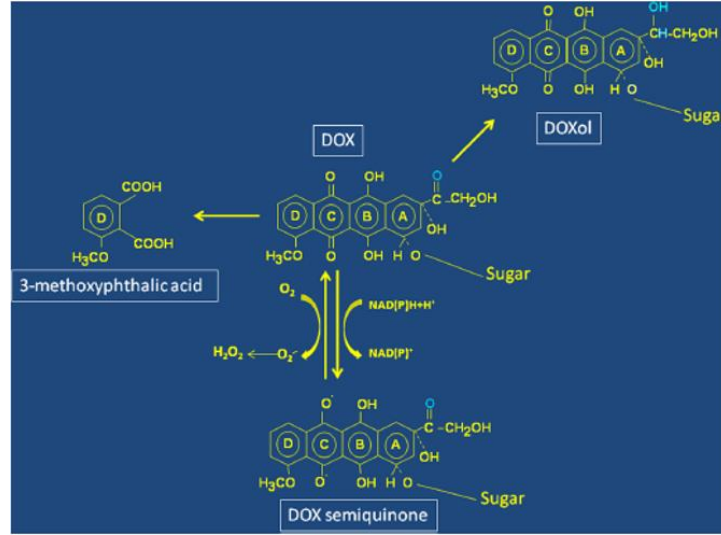
2.2. ANT Kardiyotoksisitesinden Sorumlu Mekanizmalar

ANT grubu ilaçların kardiyotoksik yan etkileri daunorubisinin keşfedilmesinden kısa bir süre sonra belirlenmesine rağmen, bu gruptaki ilaçların hangi mekanizmalar üzerinden kardiyotoksisiteye neden olduğu henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu

gruptaki ilaçların kardiyotoksik etkisinden sorumlu tutulan çok sayıda mekanizma ileri sürülmüştür (Minotti ve ark, 2004; Simunek ve ark, 2009; Octavia ve ark, 2012; Gammella ve ark, 2014). Bu mekanizmalardan hangisinin ilacın kardiyotoksik etkisinden birincil olarak sorumlu olarak tam olarak bilinmemektedir (Gammella ve ark, 2014).

2.2.1. ANT Kardiyotoksitesinde Serbest Radikallerin Rolü

DOKS'un yapısındaki kinon motifinin bir elektron alarak indirgenmesi, ara ürün olarak semikinon serbest radikalının oluşumuna neden olur. Semikinon radikali oldukça kararsız bir bileşiktir. Bu bileşik, yapısındaki eşlenmemiş elektronu oksijene aktararak tekrar kinon yapısına döner; oksijen ise elektron alarak süperoksit radikaline ($O_2^{\bullet-}$) indirgenir. $O_2^{\bullet-}$ oldukça kararsızdır ve kendiliğinden veya süperoksit dizmutaz enziminin aktivitesi ile dizmutasyona uğrar ve bu reaksiyon sonucunda hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijen açığa çıkar. H_2O_2 , düşük toksisiteli ve oldukça kararlı (stabil) bir moleküldür, buna karşın H_2O_2 ve $O_2^{\bullet-}$, Haber-Weiss reaksiyonu ile toksik hidroksil radikaline ($OH^{\bullet}$) dönüşebilir. Kinon ve semikinon arasındaki bu dönüşüm (redoks siklusu) sürekli devam eder, bu da aşırı miktarda serbest oksijen radikalının (ROS) oluşmasına neden olur. ROS yapısında eşlenmemiş elektron taşıyan ve diğer biyolojik moleküllerle reaksiyona girme eğiliminde olan maddelerdir. Oksidanların aşırı arttığı veya antioksidanların bunları uzaklaştırmakta yetersiz kaldığı durumlarda bu radikaller hücrenin önemli yapı ve bileşenleriyle (lipid, protein, DNA ve karbonhidrat) reaksiyona girerek hücrenin ölümüne yol açar (Doroshov, 1983; Minotti ve ark, 1998; 1999; Xu ve ark, 2005; Hasinoff ve Herman, 2007; Simunek ve ark, 2009; Vejpongsa ve Yeh, 2014). Şekil 2'de DOKS'un kardiyak hücrelere alındıktan sonra yapısında meydana değişiklikler görülmektedir.



Şekil 2. Kardiyak hücrelere alındıktan sonra DOKS'un yapısında meydana gelen değişiklikler.

DOKS'un yapısındaki kinon-semikinon arasındaki redoks döngüsü aşırı miktarda ROS oluşumuna neden olur. DOKS'un yapısındaki karbonil grubunun (mavi ile işaretlenmiştir) iki elektron alarak indirgenmesi sonucu DOKS DOKSole dönüşür. DOKS ayrıca peroksidazlar tarafından katalizlenen bir reaksiyonla oksidatif olarak yıkımlanabilir, bunun sonucu son ürünü olarak 3-metoksifitalik asid açığa çıkar (Gammella ve ark, 2014).

DOKS, yapısındaki karbonil grubunun (karbon atomu ile oksijen atomunun çift bağ yapması sonucu oluşan fonksiyonel grup) karbonil redüktaz enzimi aracılığıyla alkole indirgenmesi sonucu doksole dönüşür. Bu bileşik DOKS'a göre hem kalpte daha uzun süre kalır hem de daha fazla birikir. Doksolün DOKS'un kronik kardiyotoksik etkilerinden sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (Gammella ve ark, 2014). Nitekim, karbonil redüktaz enzimini kodlayan genlerdeki polimorfizm ile kardiyovasküler hastalıklara bağlı mortalite arasında bir ilişki olduğu ortaya konmuştur (Blanco ve ark, 2008). Ayrıca, DOKS peroksidazlar tarafından katalizlenen bir reaksiyonla oksidatif olarak yıkımlanabilir, bunun sonucu son ürünü olarak 3-metoksifitalik asid açığa çıkar. 3-metoksifitalik asidin DOKS'a göre daha az toksik olduğu kültüre edilen kardiyomiyositlerde ve fareler üzerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. DOKS'un oksidatif yıkımlanması, kinon-semikinon arasındaki redoks döngüsü sonucu açığa çıkan toksik maddelerinin oluşumunu önler. Böylece DOKS'un kardiyak hücrelerde oluşturduğu hasar azaltılır (Menna ve ark, 2010; Gammella ve ark, 2014).

Kardiyolipin, mitokondri iç membranında bulunan fosfolipid yapısında negatif yüklü bir bileşiktir. Bu molekül elektron transportunda görevli proteinlerin aktivitesi için gereklidir (Schlame ve ark, 2000). ANT grubu ilaçlar, kardiyolipine yüksek afinite gösterirler ve bu bileşik ile hemen hemen geri dönüşümsüz kompleks oluşturarak mitokondri iç membranında birikirler (Goormaghtigh ve ark, 1980). Bu ilaçların kardiyolipine geri dönüşümsüz bağlanması, elektron transportunda görevli proteinlerin (sitokrom c oksidaz, mitokondriyel kompleks I-III) aktivitesini bozarak elektronların solunum zinciri boyunca akışını önler ve oksijene elektron transferinin artmasına neden olur. Elektronların oksijene transferi sonucu oluşan serbest radikaller mitokondri membranına zarar vererek enerji üretiminin azalmasına neden olur (Priebe ve ark, 1983). Kalp dokusunu oluşturan hücrelerin enerji ihtiyacının %90'ı mitokondri tarafından karşılanmaktadır (Ventura-Clapier ve ark, 2004). Kardiyak hücrelerde enerji üretiminin azalması bu hücrelerde mitokondriyal şişkinlik ve miyelin figürlerinin birikmesi gibi ultrastruktural patolojik değişikliklere yol açar (Keizer ve ark, 1990; Cole ve ark, 2006). Ayrıca, ANT grubu ilaçlar karnitin transferinden sorumlu membran proteinlerinin fonksiyonunu bozarak mitokondriyel fonksiyonunun azalmasına katkıda bulunur (Kashfi ve ark, 1990). Bu ilaçların kardiyak hücrelerde mitokondriyel hasara yol açtığına dair çok sayıda deneysel çalışma bulunmaktadır. Buna karşın, bu sonuçların elde edildiği çalışmalarda kardiyotoksisite oluşturmak için kullanılan ANT dozunun klinikte kanserli hastaların tedavisinde kullanılan ilaç dozunun çok üstünde olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, ANT kardiyotoksisitesini aydınlatmaya yönelik yapılan bu çalışma sonuçlarından elde edilen bilgilere şüphe ile yaklaşılmaktadır (Papadopoulou ve ark, 1999; Minotti ve ark, 2004).

2.2.2. ANT Kardiyotoksisitesinde Demir İyonunun Rolü

Demir iyonunun ANT grubu ilaçların kardiyotoksik etkilerindeki rolünü belirlemeye yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır (Minotti ve ark, 1999; Xu ve ark, 2005; Simunek ve ark, 2009). *In vitro* ortamda gerçekleştirilen çalışmalarda DOKS ile oluşturulan sitotoksisitenin şiddetinin hücre kültür vasatına demir eklenmesi ile arttığı belirlenmiştir (Hershko ve ark, 1993; Link ve ark, 1996). Diyetteki demir miktarının DOKS kardiyotoksisitesi üzerindeki etkilerini belirlemeye yönelik yapılan bir çalışmada; DOKS'a bağlı miyokardiyal hasarın şiddetinin yüksek demir içeren diyetle beslenen sıçanlarda

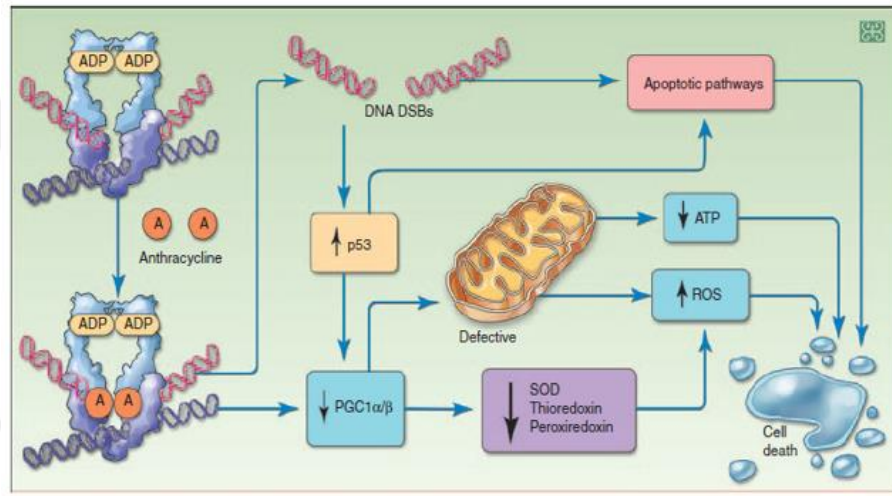
diyetinde normal düzeyde demir bulunanlara göre daha fazla olduğu ortaya konmuştur (Panjrath ve ark, 2007).

DOKS'un ferrik demir (Fe^{+3}) ile bağlanması sonucu DOKS-Fe^{+3} kompleksi oluşur. Ortamda indirgeyici ajanların varlığında (glutasyon, indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, sitokrom p450 redüktaz gibi) bu kompleks bir elektron alarak doksorubisin- Fe^{+2} kompleksine indirgenir. Bu kompleks yapısındaki eşlenmemiş elektronu oksijene aktararak eski haline geri döner, oksijen ise elektron alarak $\text{O}_2^{\cdot-}$ indirgenir. $\text{O}_2^{\cdot-}$ oldukça kararsızdır ve kendiliğinden veya süperoksid dizmutaz enziminin aktivitesi ile dizmutasyona uğrar ve bu reaksiyon sonucunda hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijen açığa çıkar. H_2O_2 , düşük toksisiteli ve oldukça kararlı (stabil) bir moleküldür, buna karşın H_2O_2 ve $\text{O}_2^{\cdot-}$, Haber-Weiss reaksiyonu ile toksik hidroksil radikaline ($\text{OH}^{\cdot}$) dönüşebilir. DOKS-Fe^{+3} ile DOKS-Fe^{+2} arasındaki redoks döngüsü sürekli devam eder, sonuçta oluşan aşırı miktardaki serbest radikaller kardiyotoksisiteye neden olur (Hasinoff ve Herman, 2007).

Demir şelatlama özelliğindeki bileşiklerin (EDTA ve ICF-159) DOKS kardiyotoksitesine karşı koruyucu etkilerinin olduğu ilk kez (Herman ve ark 1972) tarafından saptanmıştır. O tarihten günümüze kadar çok sayıda demir şelatörü bileşiğin DOKS kardiyotoksitesine karşı koruyucu etkileri değerlendirilmiştir (Hasinoff ve ark, 1998). Bu bileşikler arasında DOKS'un kardiyotoksik etkilerini en fazla azaltan ilacın DEKS olduğu ortaya konmuştur (Herman ve ark, 1988). Günümüzde DOKS'un kardiyotoksik etkilerinin azaltılmasında kullanılan klinik olarak onaylanmış tek ilaç DEKS'tir. Bu bileşik hücre içine girdiğinde hidrolize olur, bunun sonucu demir şelatlama özelliğindeki diasit diamid açığa çıkar. Hücre içinde serbest ve bağlı halde bulunan demir iyonlarının DEKS ile bağlanması sonu DOKS demir iyonlarına bağlanamaz, sonuçta DOKS-Fe^{+3} ile DOKS-Fe^{+2} arasındaki redoks döngüsü ve hücre için son derece toksik radikallerin oluşması önlenmiş olur. (Hasinoff ve Herman, 2007). Buna karşın, demir şelatlama gücü bakımından DEKS'e nazaran daha güçlü bileşiklerin DOKS kardiyotoksitesine karşı koruyucu etkilerinin olmaması, DEKS'in DOKS kardiyotoksitesine karşı kalbi koruyucu etkisinde henüz aydınlatılmamış mekanizmaların olduğunu düşündürmüştür (Martin ve ark, 2009; Vejpongsa ve Yeh, 2014).

2.2.3. ANT Kardiyotoksitesinde Topoizomeraz Enziminin Rolü

TopII enzimi, DNA sarmalının eşlenmesi (replikasyon) ya da yazılımı (transkripsiyon) sırasında DNA sarmalında meydana gelen düğüm ve yumak oluşumu ile karakterize topolojik problemlerin giderilmesinde görevlidir (Wang ve Liu, 1990; Wang, 1996). DOKS kardiyomiyositlerde TopII β enziminin DNA sarmalına bağlanması ile oluşan geçici çift zincir kırıklarını kalıcı hale getirir. DNA sarmalındaki kalıcı çift zincir kırıkları DNA tamir mekanizmalarının devreye girmesi ile düzeltilemez, buna bağlı olarak hücre ölüme sürüklenir (Zhang ve ark, 2012; Vejpongsa ve Yeh, 2014). DOKS'un kardiyomiyositlerde hasar oluşturma mekanizmaları Şekil 3'te sunulmuştur.



Şekil 3. ANT grubu ilaçların kardiyak hücrelerde hasar oluşturma mekanizmaları.

DOKS, TopII enziminin normal katalitik döngüsünü bozar, bu da DNA sarmalında kalıcı çift zincir kırıklarına neden olur, bu kırıklar DNA tamir mekanizmaları ile düzeltilemediği takdirde hücrede apoptotik yollar aktive olur. DOKS TopII enzimi bağımlı bir yolla oksidatif fosforilasyon, mitokondriyal biyogenezis ve p53 yolağında görevli transkriptomların ifadesinde değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler sonucu hücrede aşırı miktarda ROS açığa çıkar, mitokondriyal ATP üretimi azalır ve apoptozis uyarılır (Vejpongsa ve Yeh, 2014).

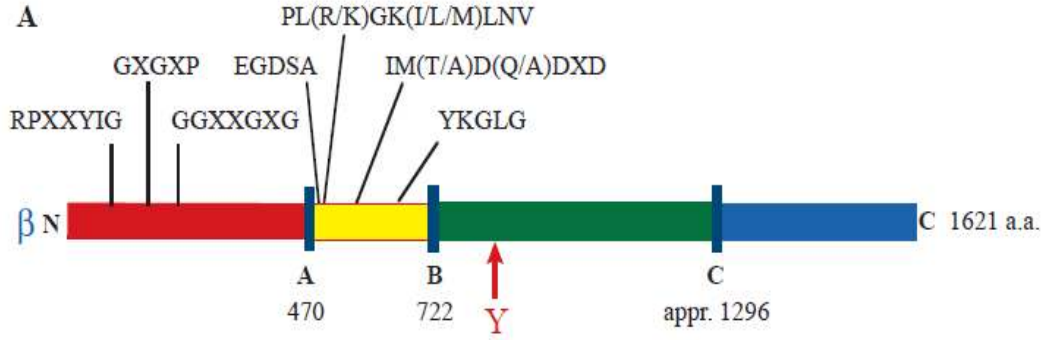
ANT grubu ilaçların kardiyak hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelini değiştirerek bu organelde yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu gruptaki ilaçların mitokondri'de hasara yol açarak kardiyotoksisiteye neden olduğu ileri sürülmektedir (Wallace, 2003; Tokarska-Schlattner ve ark, 2006). DOKS'un yapısındaki kinon motifinin redoks döngüsüne girmesi ile oluşan aşırı miktardaki serbest

radikallerin mitokondride hasara neden olduğu ileri sürülmektedir (Doroshov, 1983; Keizer ve ark, 1990; Vejpongsa ve Yeh, 2014). DOKS kardiyotoksitesinde mitokondri'de meydana gelen hasarda TopII β enziminin rolünün araştırıldığı bir çalışmada kardiyak hücrelerde TopII β geni silinen fareler kullanılmıştır. DOKS uygulamasından sonra kardiyak miyositlerde şekillenen mitokondriyal hasar değerlendirildiğinde; normal (wild-type) farelerde mitokondride şişkinlik ve miyelin figürlerinin birikimi şeklinde tanımlanan patolojik değişiklikler görülürken, TopII β geni silinenlerde mitokondriyal hasar belirlenmemiştir (Zhang ve ark, 2012). Bu sonuçlar, DOKS kardiyotoksitesinde mitokondride meydana gelen hasarda TopII β enziminin de rolü olduğunu göstermektedir.

Zhang ve ark 2012, kalp dokusunda TopII β geni silinen farelerde DOKS ile oluşturdukları kardiyoksisitede, bu farelerin kalp dokusunda ROS miktarının normal farelere göre %70 oranında daha az olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca normal farelerin kalp dokusunda süperoksit dizmutaz, peroksiredoksin ve thipredoksin gibi antioksidan enzimleri kodlayan genlerin ifade düzeyinin TopII β geni silinen farelere göre 1,5 kat daha az olduğunu saptamışlardır. Sonuç olarak, DOKS kardiyotoksitesinde kalp dokusunda artan ROS miktarında antioksidan enzimlerin gen ifadesinin azalmasının sorumlu olduğunu; bu genlerin ifadesinin azalmasında ise, TopII β enziminin rolü bulunduğunu ortaya koymuşlardır (Vejpongsa ve Yeh, 2014).

2.2.3.1. Topoizomeraz enziminin yapısı ve izoformları

TopII enzimi, birbiriyle eş iki alt üniteden (homodimerik) oluşur. Her alt ünite, üç farklı fonksiyonel bölgeden oluşur. Bunlar; 1. N-terminal bölge, 2. merkezi bölge (aktif merkez) ve 3. C-terminal bölgedir. Bu bölgeler birbirinden proteolitik kesim noktalarına göre ayrılır (Austin ve Marsh, 1998; Champoux, 2001). TopII β enziminin fonksiyonel bölgeleri ve bu fonksiyonel bölgeleri birbirinden ayıran kesim noktaları Şekil 4'te sunulmuştur.



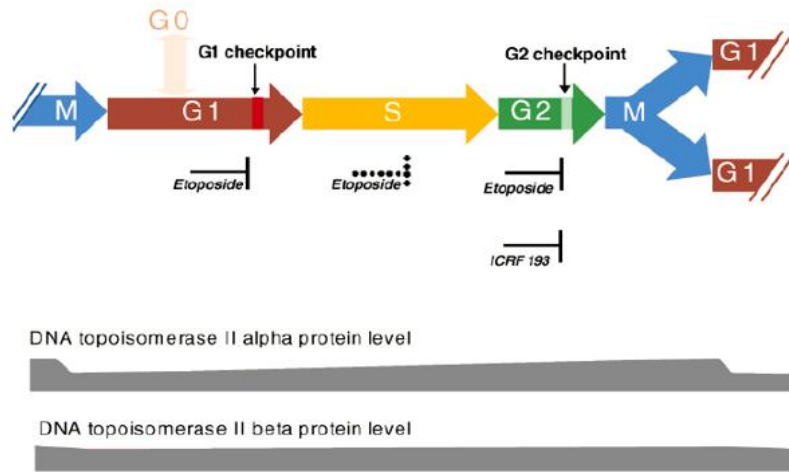
Şekil 4. TopIIβ enziminin yapısı ve kesim noktaları.

TopIIβ enzimi yapısal olarak farklı bölgelerden oluşur. Bu bölgeler proteolitik enzimlerin kesim noktalarına (A, B ve C ile işaret edilmiştir) göre birbirinden ayrılır; TopIIβ enziminin bölümleri şekil üzerinde farklı renklerle boyanmıştır. Enzimin N-terminal bölgesi (ATPaz aktivitesine sahiptir) kırmızı ile, A-B bölgesi sarı ile, B-C bölgesi yeşille, C-terminal bölgesi mavi ile renklendirilmiştir. Enzimin aktif merkezinde yer alan tirozin aminoasidi (Y) kırmızı okla işaret edilmiştir (Austin ve Marsh, 1998).

TopII enziminin N-terminal bölgesi, ATPaz aktivitesine sahiptir; bu bölge enzimin katalitik aktivite göstermesi için gerekli olan koenzimin (ATP) bağlanması ve hidrolizinden sorumludur (Austin ve Marsh, 1998; Schoeffler ve Berger, 2008). Merkezi bölge, enzimin aktif bölgesidir ve tirozil rezidüsü içerir. DNA sarmalının çift ipliğinin geçici olarak kesildiği ve yeniden birleştirildiği yer enzimin bu bölgesidir. Bu bölgede bulunan tirozin aminoasidi ile DNA'nın şeker fosfat omurgası arasında kurulan fosfotirozin bağı sonucu DNA sarmalı kesilir (Sander ve Hsieh, 1983; Zechiedrich ve ark, 1989; Austin ve Marsh, 1998; Schoeffler ve Berger, 2008).

Omurgalı canlılarda TopII enziminin α ve β olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. Bu izoformlar farklı genler tarafından kodlanmaktadır ve izoformların moleküler ağırlıkları da birbirinden farklıdır: α izoformu 170 kDa iken, β izoformu 180 kDa moleküler ağırlığındadır (Drake ve ark, 1989). TopII enziminin izoformları, immünolojik olarak birbirinden farklıdır, bu izoformlara spesifik antikorlar üretilmektedir. Bununla birlikte, TopII izoformlarının proteolitik (SV8 proteaz ile) kesim paternleri birbirinden farklıdır. Bu sonuç, TopII α 'nın, TopII β 'nin proteolizi sonucu oluşmadığını göstermektedir (Drake ve ark, 1987). Top enziminin izoformları, farklı genler tarafından kodlanmaktadır. TopII α 'yı kodlayan gen, 17. kromozom üzerinde bulunur; TopII β 'yi kodlayan gen ise, 3. kromozomdadır (Austin ve Marsh, 1998).

TopII izoformlarının ifadesi hücre çeşitleri arasında farklılık göstermektedir. TopII α enzimi hızlıca çoğalan hücrelerde (kanser hücresi gibi) fazla miktarda ifade edilir (Hsiang ve ark, 1988; Woessner ve ark, 1991). Bu enzimin fazla miktarda ifade edildiği hücrelerin DOKS'un sitotoksik etkilerine daha duyarlı olduğu belirlenmiştir (Guano ve ark, 1999). TopII β enzimi ise, hücrelerin bölünme durumuna bakılmaksızın hemen hemen bütün hücrelerde (kardiyomiyosit gibi) ifade edilir (Hsiang ve ark, 1988; Woessner ve ark, 1991). Kalp dokusunda TopII enziminin α izoformu çok az ifade edilirken, β izoformunun ifadesi oldukça fazladır (Capranico ve ark, 1992). TopII enziminin miktarı, hücre döngüsünün evresine göre de değişmektedir; TopII α enzimi, hücre döngüsünün G1 evresinde en düşük miktardadır; bu enzimin miktarı hücre döngüsünün ilerlemesi ile birlikte artar; G2/M evresinde en yüksek seviyesine çıkar. TopII β enziminin miktarı ise, hücre döngüsünün evreleri boyunca değişmez (Austin and Marsh, 1998; Gao ve ark, 1999). Şekil 5'te TopII enziminin hücre döngüsünün farklı aşamalarındaki ifade düzeyi görülmektedir.



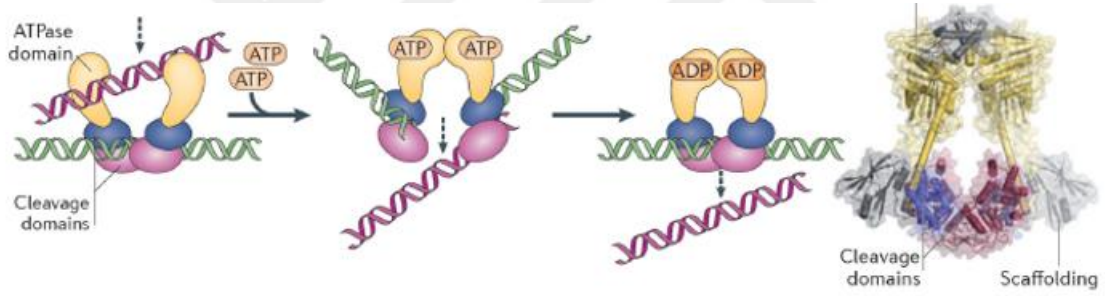
Şekil 5. TopII enziminin hücre döngüsünün farklı aşamalarındaki ifade düzeyi.

TopII enziminin ifade düzeyi ve fosforilasyon durumu hücre döngüsünün aşamasına göre değişir. Üstteki şekilde hücre döngüsünün aşamaları gösterilmiştir; hücre döngüsünün G1 aşamasında hücre büyür ve hücrede yeni proteinler sentezlenir, S aşamasında ise, DNA eşlenmesi meydana gelir. TopII enzimi, DNA eşlenmesi ve transkripsiyon gibi işlemler sırasında DNA ipliklerinde meydana gelen topolojik problemlerin giderilmesinde görevlidir. Hücre döngüsünün G2 aşamasında kromatin kondensasyonu meydana gelir, M aşamasında kardeş kromatitler ayrılır. TopII enzimi kromatin kondensasyonu ve kardeş kromatitlerin ayrılması işlemlerinde de görevlidir.

TopII β enzim düzeyinin hücre döngüsünün evreleri boyunca değişmediği görülmektedir (Austin ve Marsh, 1998).

2.2.3.2. Topoizomeraz enziminin katalitik döngüsü

TopII enziminin katalitik döngüsü birbirini takip eden pek çok aşamadan oluşur (Şekil 6). İlk aşamada TopII enzimi DNA sarmalına bağlanır. Enzim ile DNA'nın şeker fosfat omurgası arasında fosfotirozin bağı kurulur ve bunun sonucu DNA sarmalı geçici olarak kesilir. TopII enzimi, kesilen DNA'nın 5' ucuna bağlı olarak kalır ve oluşan bu yapıya topII-DNA kesim kompleksi adı verilir. Takiben enzime ATP'nin bağlanması, enzimde yapısal değişikliklere yol açar ve kesilmeyen diğer DNA sarmalı kesilen DNA sarmalının arasından geçer. Kesilen DNA sarmalı yeniden birleştirilir. TopII enzimi ise, başka bir katalitik döngüyü başlatmak üzere eski haline geri döner (Wang, 1996; Schmidt ve ark, 2010).



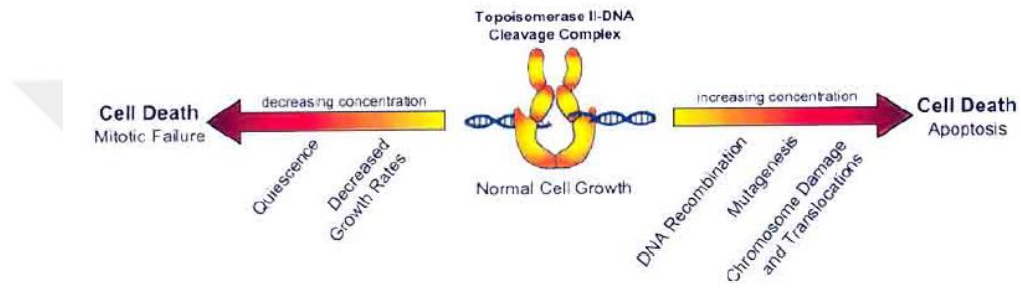
Şekil 6. TopII β enziminin katalitik döngüsü.

TopII enzimi katalitik döngüsü enzime iki adet DNA segmentinin bağlanması ile başlar (birinci aşama), ikinci aşamada TopII enzimi DNA ipliklerden birini keser (yeşil ile gösterilen DNA ipliği), üçüncü aşamada ise DNA ipliğinin kesilmesi ile oluşan aralıktan diğer DNA ipliği (kırmızı ile gösterilen DNA ipliği) geçirilir. Son aşamada ise, döngünün ikinci aşamasında kesilen DNA ipliğinin kesik uçları birleştirilerek döngü tamamlanır (Vos ve ark, 2011).

2.2.3.3. Çift zincir kırıkları

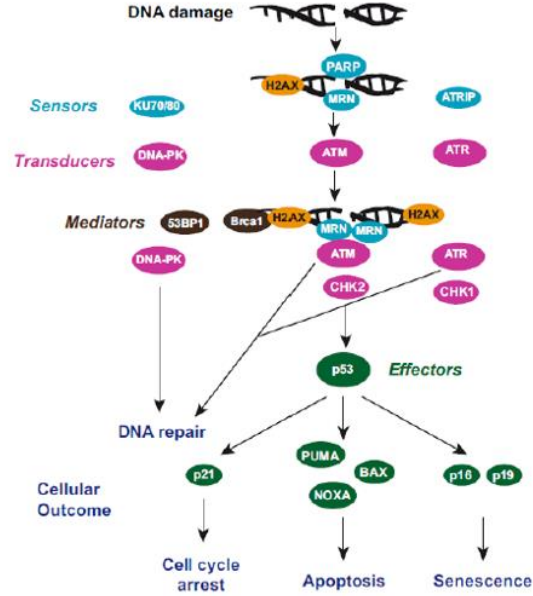
DNA sarmalının her iki zincirinde fosfodiester bağlarının kırılması sonucu meydana gelen çift zincir kırıkları oldukça tehlikelidir. Tamir edilmeyen tek bir çift zincir kırığı bile hücrenin ölümüne neden olabilir (Jackson, 2002; Sonoda ve ark, 2006;

Hallstrom, 2007). Çok sayıda fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörün DNA’da çift zincir kırıkları oluşturduğu bilinmektedir (Smider ve Chu, 1997; Jackson, 2001). Normal koşullarda TopII enziminin aktivitesi sırasında meydana gelen az sayıdaki çift iplik kırıkları hücreler tarafından tolere edilebilir (Wang, 1996; Burden ve Osheroﬀ, 1998; Fortune ve Osheroﬀ, 2000). ANT grubu ilaçlar, TopII enziminin DNA sarmalına bağlanması ile oluşan kesim kompleksini kararlı hale getirir (Şekil 7); bu etki ile meydana gelen çok sayıdaki kalıcı çift zincir kırıkları DNA tamir mekanizmaları ile düzeltilemez, bunun sonucu hücre ölüme sürüklenir (Baguley ve Ferguson, 1998; Felix, 1998; Kaufmann, 1998; Holden, 2001; Pommier, 2006).



Şekil 7. TopII-DNA kesim kompleksinin hücreler üzerindeki etkileri (Wilstermann ve Osheroﬀ, 2003)

Çift zincir kırıklarının tamiri birbirini takip eden çok aşamalı bir süreçtir (Şekil 8). Çift zincir kırıklarında kırık uçları, MRN kompleksi adı verilen üçlü protein kompleksi (MRE11-RAD50-NBS1) tarafından tanınır (Sun ve ark, 2005; Dupr’e ve ark, 2006; Srivastava ve ark, 2009). MRN kompleksi, fosfoinozotid-3 kinaz ilişkili kinaz (PIKK) ailesinde yer alan ATM (ataxia teleangiectasia mutated), ATR (ATM ve Rad3-related) ve DNA-bağımlı protein kinaz (DNA-PK)’ların kırık bölgesine yerleşmesini sağlar. Bu moleküller, hücre siklusunun düzenlenmesinde ve DNA’nın tamirinde görevli proteinlerin (H₂Ax, BRCA1, 53BP1, MDC1, Chk1 ve Chk2) fosforillenmesinden ve hasar bölgesine çekilmesinden sorumludur (Rogakou ve ark, 1998; Helt ve ark, 2005). DNA’daki çift zincir kırıkları, homolog rekombinasyon ve homolog olmayan uç birleştirme yöntemlerinden biri ile tamir edilir (Sonoda ve ark, 2006).



Şekil 8. DNA hasarının tamirinde görevli proteinler (Blanpain ve ark, 2011).

2.2.3.4. Histon proteinleri

DNA heliksi, histon proteinleri tarafından oluşturulan merkezi bir çekirdek etrafında sarılmıştır. DNA heliksi ve histon proteinleri tarafından oluşturulan bu yapıya nükleozom adı verilir. Histon proteinleri, H₁ histonlar ve nükleozomal histonlar (H₂A, H₂B, H₃ ve H₄) olmak üzere iki gruba ayrılır. Her nükleozomda H₂A, H₂B, H₃ ve H₄ histonlarından ikişer tane bulunur (Foster ve Downs, 2005). H₂A protein ailesinde; H₂A1, H₂A2, H₂Ax, H₂Az ve daha birçok varyant yer almaktadır (Ausio ve Abbott, 2002). İnsanlarda, H₂AX varyantının tüm H₂A proteinleri içindeki oranı %10'dur; buna karşın, diğer memeli canlılarda bu oran %2-25 arasında değişmektedir. H₂A protein ailesindeki varyantlar birbirlerinden yalnızca birkaç aminoasit rezidüsü bakımından farklılık gösterir. H₂Ax'ın karboksi terminal kuyruğunda 139. pozisyonda serin rezidüsü, 140. pozisyonda ise, glutamin rezidüsü bulunur; bu yapı, SQ motifi olarak bilinir (Rogakou ve ark, 1998).

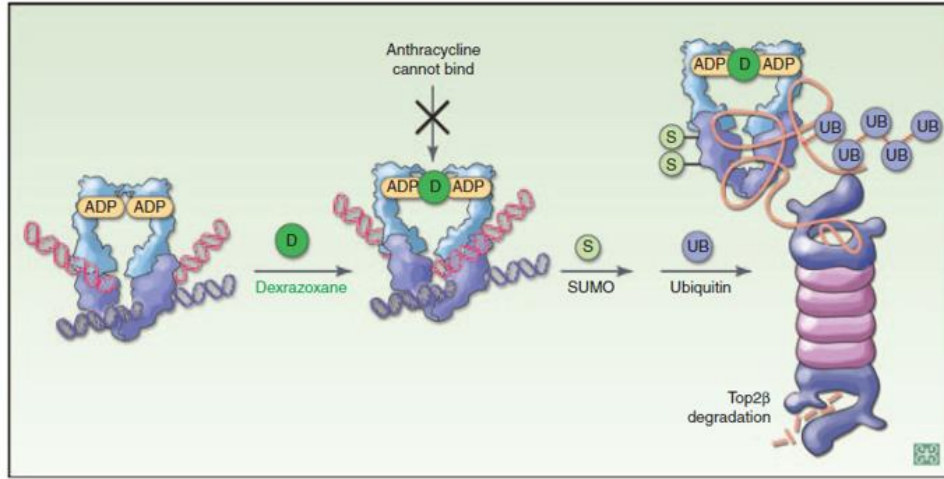
Kromatin oldukça dinamik bir yapıdır. DNA'nın eşlenmesi, yazılımı, rekombinasyonu ve tamiri gibi hücresel işlemler sırasında kromatinin katlanması ve yoğunlaşması değiştirilerek bu işlemlere katılan moleküllerin DNA sarmalına kolay bir şekilde ulaşması sağlanır. Kromatinin yoğunlaşma derecesi histon proteinleri tarafından düzenlenir (Li ve ark, 2007). Çift zincir kırıklarının tamirinde görevli moleküllerin kırık bölgesine ulaşabilmesi için kromatin yapısının gevşemesi gerekmektedir (Dinant ve ark,

2008; Ohnishi ve ark, 2009). Bu durum histon proteinlerinde meydana gelen değişiklikler sayesinde mümkün olur.

DNA’da çift zincir kırığının oluşmasından çok kısa bir süre (yaklaşık 1-3 dk) sonra histon proteinlerden H₂Ax, C-terminal kuyruğundaki serin rezidüsünden (139. sırada bulunur) fosforillenir. Bu reaksiyon H₂A protein ailesindeki diğer varyantlarda meydana gelmez. H₂AX’in fosforillenmiş formu γ H₂Ax olarak adlandırılır (Rogakou ve ark, 1998; Pilch ve ark, 2003; Helt ve ark, 2005; Lowndes ve Toh, 2005). γ -H₂Ax, DNA tamirinde görevli moleküllerin (53BP1, BRCA1, MDC1 gibi) kırık bölgesine çekilmesinde görev alır (Kobayashi, 2004; Rossetto ve ark, 2010).

DNA’da çift zincir kırıklarının varlığı H₂Ax’in fosforilasyon durumuna göre belirlenebilir. DNA’daki çift zincir kırıklarında H₂Ax fosforillendiği için, bu molekülün varlığının belirlenmesi çift zincir kırıklarının varlığı için özgül bir indikatördür (Ohnishi ve ark, 2009). DNA’daki çift zincir kırıklarında kırık bölgesinde γ H₂Ax varlığı özgül antikolarla ayrı ayrı nükleer odaklar şeklinde belirlenebilir. Her bir odak tek bir DNA çift zincir kırığını temsil ettiği için odakların sıklığı çift zincir kırığı miktarı, diğer bir deyişle DNA hasarı miktarı ile orantılıdır (Huang ve ark, 2005).

DOKS’un kardiyotoksik etkilerinin önlenmesi ya da azaltılmasında iki temel yaklaşım bulunmaktadır: 1. DOKS’un kümülatif dozunu azaltmak, 2. DOKS’un kardiyotoksik etkileri azaltan kalbi koruyucu ajanlar kullanmak (van Dalen ve ark, 2008). DOKS’un kardiyotoksik etkilerinin azaltılmasında kullanılan klinik olarak etkisi kanıtlanmış kalbi koruyucu tek ilaç DEKS’tir (Wouters ve ark, 2005). Şekil 9’da DEKS’in DOKS kardiyotoksitesine karşı kalbi koruyucu etkilerinden sorumlu mekanizmalar görölmektedir. DEKS, kardiyomiyositlerde TopII β enzimine bağlanarak DOKS’un bu enzime bağlanmasını önler, bu nedenle DOKS TopII β enzimine bağlanamaz, DEKS bu sayede DOKS’un kardiyak hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini önler. Diğer taraftan DOKS kardiyomiyositlerde antioksidan enzimlerin sentezinde görevli bir transkripsiyon faktörünün ifadesini azaltır, bu da hücrede antioksidan enzimlerin miktarının azalmasına neden olur. Bunun sonucu hücrede oksidatif fosforilasyon sırasında oluşan az sayıdaki ROS hücreden uzaklaştırılmaz, bu serbest radikaller de hücrenin önemli yapı ve bileşenleri ile reaksiyona girerek hücrenin ölümüne neden olur (Lyu ve ark, 2007).



Şekil 9. DEKS'in DOKS kardiyotoksitesine karşı koruyucu etkilerinden sorumlu mekanizmalar.

DEKS, DOKS'un TopIIβ-DNA kompleksine bağlanmasını önler. Ayrıca, DEKS TopII enziminin transkripsiyonun önler, bu da SUMO adı verilen proteazomal bir yolla bu enzimin yıkılma sürecini başlatır (Vejpongsa ve Yeh, 2014).

DOKS'un kanser hücrelerinde TopIIα enzimin DNA sarmalına bağlanması ile oluşan geçici çift zincir kırıklarını kalıcı hale getirerek bu hücrelerin ölümüne neden olduğu bilinmektedir (Gewirtz, 1999; Larsen ve ark, 2003; Minotti ve ark, 2004). DOKS'un kardiyotoksik etkilerinin azaltılması amacıyla kullanılan DEKS'in de tıpkı DOKS gibi TopII enziminin katalitik inhibitörü olması nedeniyle (Roca ve ark, 1994; Lyu ve ark, 2007), bu ilaçların birlikte kullanılması durumunda DOKS'un kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin azalabileceği endişesine neden olmuştur (Vejpongsa ve Yeh, 2014). Bu bakımdan, DOKS kardiyotoksitesine karşı kalbi koruyucu etkileri olan ancak TopII enziminin aktivitesi üzerinde etkisi olmayan ya da DEKS'e nazaran daha az etkisi olan yeni ajanlara ihtiyaç duyulduğu açıktır.

2.3. Silimarin

Deve diken bitkisi, halk arasında başta karaciğer ve safra kesesi rahatsızlıkları olmak üzere pek çok rahatsızlıkta (örneğin sıtma ateşi, menstrüasyon şikayetleri, varikoz, emziren annelerde süt salgısını artırma) kullanılmaktadır (Dunnick ve ark, 2011). Deve biken bitkisinin yapısındaki SİL'in bitkinin terapötik etkilerinden sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (Wellington ve Jarvis, 2001; Kroll ve ark, 2007). SİL oldukça güçlü bir antioksidan olup hücrede normal metabolizma sırasında oluşan ya da patolojik durumlarda

miktarı artan serbest oksijen radikallerini temizleyerek bu maddelerin hücreye zarar vermesini önler (Karimi ve ark, 2006; Anestopoulos ve ark, 2013). Antioksidan özelliğinin yanı sıra antiinflamatuvar (Nazemian, 2010), antifibrotik (Karimi ve ark, 2011), antineoplastik (Ramakrishnan ve ark, 2009), immunmodülatör (Taghiabadi ve ark, 2012) ve membran stabilize edici (Muthumani ve Milton Prabu, 2014) gibi pek çok etkisinin var olduğu hayvan ve insan çalışmaları ile gösterilmiştir.

2.3.1. Deve Dikeni Bitkisinin Özellikleri

Silybum marianum L. Gaertner, ülkemizde mübarek diken, akkız, deve dikeni, Meryem ana dikeni, yabani enginar, deve kengeli, sütlü kengel, kengel, kıbbun, şevkülmaryem gibi isimlerle bilinen, Papatyagiller (*Asteraceae*) ailesinde yer alan 40-150 cm boyunda, gövdesi köşeli, seyrek tüylü, 1-2 yıllık otsu bir bitkidir. Yaprakları soluk yeşil renkli, beyaz damarlı, kenarları dişli ve dikenlidir. Çiçekleri baş şeklinde bir aradadır, çoğunlukla mor renklidir, nadiren beyaz renkli de olabilir. Her bir çiçek yaklaşık 190 adet tohum yapar; bu da, her bitkide 6350 tohuma denk gelir. Meyvası 7 mm uzunlukta, esmer-siyah renklidir, sert kısa beyaz bir papüsü vardır, papüs tohumlar olgunlaştıktan sonra halka halinde düşer. Ülkemizde Akdeniz ve Karadeniz bölgesinde yaygın olarak yetişmektedir (Tanker ve ark, 2007).

2.3.2. Silimarinin Kimyasal Yapısı ve Farmakolojik Özellikleri

SİL, *Silybum marianum* L. Gaertner adı verilen bitkinin tohumlarından ekstrakte edilen yapısal olarak bilinen en az yedi adet flavolignan (silibin, izosilibin, silidianin, silikristin ve izosilikristin) ile bir adet flavololden (taksifolin) oluşan kompleks bir maddedir. Ham deve dikeni ekstraktının yaklaşık %65-80'inini SİL oluşturmaktadır, geri kalanı ise büyük oranda yağ asitlerinden oluşur (Kroll ve ark, 2007). SİL'in yapısında yer alan temel bileşen silibin (silibinin)'dir; bu bileşen SİL'in yapısal olarak %60'ını oluşturur (Boigk ve ark, 1997; Wellington ve Jarvis, 2001). Silibin ve SİL'in yapısındaki diğer flavolignanlar, taksifoline koniferil alkolün katılmasıyla oluşur (Kroll ve ark, 2007).

SİL'in farmakokinetik özelliklerini belirlemeye yönelik yapılan araştırmalardan elde edilen verilerin özetlendiği bir derlemede, bu kompleksin sindirim sisteminden zayıf bir şekilde emildiği, karaciğerde konjuge edildiği, safra ile atıldığı, bağırsakta bakteriler tarafından hidrolize edildiği ve bağırsaktan yeniden emildiği bildirilmiştir (Fraschini ve

ark, 2002). Silibinin mideden emilir, buna karşın sudaki çözünürlüğü çok az olduğundan dolayı emilimi oldukça düşüktür (Morazzoni ve ark, 1993). Erkek Sprague-Dawley ırkı sıçanlara gavajla silibinin (500 mg silibinin/kg) verildiğinde, bu maddenin doruk plazma konsantrasyonuna 0.5 saatte ulaştığı belirlenmiştir. Silibininin biyoyararlanımının %1'den daha az olduğu, bunun da bileşiğin emiliminin oldukça az olmasından ayrıca emilen silibininin yoğun bir şekilde konjuge olmasından ileri geldiği bildirilmiştir (Wu ve ark, 2007). Silibinin SİL kompleksi yerine silipide (silibinin fosfatidilkolin kompleksi) formunda verildiğinde silibininin biyoyararlanımının 10 kat arttığı saptanmıştır (Morazzoni ve ark, 1993). Silibininin vücutta dağılımının araştırıldığı deneysel bir çalışmada, erkek SENCAR ırkı farelere gavajla silibinin (50 mg/kg) verilmiştir. Serbest ve konjuge silibininin incelenen dokularda (karaciğer, akciğer, mide, pankreas, deri, prostat) 0.5-1 saatte doruk konsantrasyona ulaştığı ortaya konulmuştur. Dokulardan yarılanma ömrünün ise, serbest silibinin için 57-127 dakika, konjuge silibinin için ise 45-94 dakika olduğu belirlenmiştir (Zhao ve Agarwal, 1999).

2.3.3. Silimarinin Kalp Hastalıklarına Karşı Koruyucu Etkileri

Kalp hastalıkları tüm dünyada ölüm nedenleri arasında birinci sırada yer alır. Bu hastalıklara yönelik yeni tedavi yöntemleri arayışı araştırmacıları bitkisel tedavi yöntemlerine yönlendirmiştir (Rao ve Viswanath, 2007). Antioksidan özelliklere sahip bitkisel kaynaklı ürünlerin ilaçlar ile oluşturulan deneysel kardiyotoksisteye karşı koruyucu etkilerinin var olduğu çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir (Karimi ve ark, 2006; 2011; Sinha ve ark, 2008; Nabavi ve ark, 2012; Taghiabadi ve ark, 2012; Muthumani ve Milton Prabu, 2014). Oldukça güçlü bir antioksidan olan SİL'in kalp hastalıklarına karşı koruyucu etkilerinin olduğu *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla ortaya konulmuştur (Psotová ve ark, 2002; Chlopcikova ve ark, 2004; Zhou ve ark, 2006; El-Shitany ve ark, 2008; Cecen ve ark, 2011; El-Awady ve ark, 2011; Anestopoulos ve ark, 2013; Avci ve ark, 2017).

Doğada yaygın olarak bulunan arseniğin insanlar için en önemli maruziyet kaynağı içme suları ve gıdalardır. İçme sularında kabul edilebilir arsenik konsantrasyonu 10 ug/L'dir. Dünya'da yaklaşık 100 milyon insan arsenik zehirlenmesi riski ile karşı karşıyadır. (Moon ve ark, 2012). Kronik arsenik maruziyeti, kardiyomiyositlerde oksidatif strese neden olur; serbest oksijen radikalleri hücrenin önemli bileşenleri (lipid, protein, DNA ve karbonhidrat) ile reaksiyona girerek hücrenin zedelenmesine yol açar. Kronik

arsenik maruziyetinde şekillenen kardiyotoksistelerde bu mekanizmanın önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (Yamauchi ve ark, 2004; Manna ve ark, 2008; Alamolhodaei ve ark, 2015). Silibinin arsenik kardiyotoksitesine karşı koruyucu etkinliğinin araştırıldığı çalışmada; kardiyotoksiste oluşturmak için sıçanlara 4 hafta boyunca 5 mg/kg dozda sodyum selenit verilmiştir, bu hayvanlarda serum CK-MB ve LDH konsantrasyonu değerlendirildiğinde; her iki bileşenin de oldukça arttığı, dolayısıyla miyokardiyal hasarın şekillendiği ortaya konulmuştur. Silibinin (75 mg/kg/gün, 4 hafta boyunca, gavajla) sodyum selenit ile oluşturulan kardiyotoksisteye karşı koruyucu etkinliğinin olduğu belirlenmiştir (Muthumani ve Milton Prabu, 2014).

SİL'in antioksidan özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (Karimi ve ark, 2006). SİL'in temel bileşeni olan silibinin (Boigk ve ark, 1997; Wellington ve Jarvis, 2001) antioksidan özelliğini belirlemeye yönelik yapılan çalışmada; H9c2 hücrelerinde H₂O₂ ile oksidatif hasar oluşturulmuştur. H9c2 hücrelerinin silibinin ile iki saat preinkübasyonun bu hücreleri H₂O₂ ile oluşturulan hasara karşı koruduğu ortaya konulmuştur (Anestopoulos ve ark, 2013). Zhou ve ark (2006), silibinin H9c2 hücrelerinde izoproteronol ile oluşturulan hasara karşı koruyucu etkisini araştırmışlardır. Hücreler izoproteronole (10 µM) 48 saat süreyle maruz bırakıldığında hücrelerde belirgin morfolojik değişiklikler şekillenmiştir. Hücreler izoproteronol ile maruziyetten önce 1 saat silibinine maruz bırakıldığında ise, morfolojik değişikliklerin belirgin olarak azaldığı görülmüştür. Aynı çalışmada, izoproteronol ile maruziyetin hücre vasatında MDA miktarını belirgin olarak arttırdığı; silibinin ile preinkübasyonun ise, MDA miktarını belirgin olarak azalttığı ortaya konulmuştur. Bu sonuç, silibinin oksidatif stresi azaltarak hücreleri hasara karşı koruduğunu göstermektedir.

SİL'in ANT grubu ilaçlar tarafından oluşturulan akut miyokardiyal hasara karşı koruyucu etkilerinin olduğu bilinmektedir (El-Shitany ve ark, 2008). SİL kardiyomiyositlerde DOKS tarafından oluşturulan hasara karşı hücre membranını stabilize ederek, antioksidan özelliği sayesinde serbest radikalleri uzaklaştırarak ve demir iyonlarını tutarak koruyucu etki gösterir (Chlopckova ve ark, 2004). El-Shitany ve ark 2008, ANT kardiyotoksitesine karşı SİL'in koruyucu etkinliğini belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada; sıçanlarda tek doz DOKS (10 mg/kg) ile oluşturdukları akut kardiyotoksiste modelinde; bu hayvanların kalp dokusunda belirgin histopatolojik değişikliklerin şekillendiğini ortaya koymuşlardır. DOKS uygulamasından 7 gün önce başlayıp her gün

SİL (50 mg/kg) uygulanan grupta kalp dokusunda şekillenen histopatolojik değişikliklerin DOKS uygulanan gruba göre azaldığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada DOKS uygulanan grupta kalp dokusunda MDA seviyesinin kontrol grubuna göre %116 oranında arttığı ortaya konulmuştur. SİL uygulanan grupta ise, MDA seviyesinin DOKS uygulanan gruba göre %30 oranında azaldığı belirlenmiştir. ANT kardiyotoksisitesine karşı SİL'in koruyucu etkinliğini belirlemeye yönelik yapılan çalışmada, dişi Wistar albino ırkı sıçanlarda tek doz DOKS (10 mg/kg, ip) ile kardiyotoksisite oluşturulmuştur. DOKS uygulamasından 7 gün sonra kalp dokusu histopatolojik olarak değerlendirildiğinde; intersitisyel ödem ve kardiyomiyositlerde sitoplazmik vakuolizasyon görülmüştür. DOKS uygulamasından 5 gün önce başlayıp deney sonunda kadar her gün SİL (100 mg/kg, ip) uygulanan grupta kalp dokusunda şekillenen histopatolojik değişikliklerin DOKS uygulanan gruba göre belirgin olarak azaldığı belirlenmiştir (Cecen ve ark, 2011).

Psotová ve ark 2002, SİL ve SİL'in yapısındaki bileşenlerin (silibin, silidianin, silikristin) DOKS tarafından mikrozom ve mitokondri'de oluşturulan hasara karşı koruyucu etkisinin olduğunu göstermiştir. Ayrıca, silikristinin mikrozom üzerinde koruyucu etkisinin diğer bileşenlere göre daha fazla olduğu ortaya konmuştur. Test edilen bileşenlerin antilipoperoksidasyon aktiviteleri karşılaştırıldığında; en iyi inhibitörün SİL olduğu belirlenmiştir. SİL'in diğer bileşenlere göre daha fazla antilipoperoksidasyon aktivitesine sahip olması şu şekilde açıklamışlardır: SİL'in yapısında bulunan fakat test edilen diğer bileşenlerde bulunmayan flavonolden (taksifolin) ya da SİL'in yapısında bulunan fakat kimyasal olarak yapısı henüz aydınlatılmamış polifenollerden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür.

SİL ve SİL'in yapısındaki bileşenlerin (silibin, dehidrosilibin, silikristin ve silidianin) DOKS'a maruz bırakılan H9c2 hücrelerinde koruyucu etkisi araştırılmıştır. DEKS'in DOKS ile oluşturulan hasara karşı koruyucu etkinliği bilindiğinden dolayı bu bileşen kontrol olarak kullanılmıştır. Bu bileşenlerin hücreler üzerindeki toksik veya koruyucu etkileri hem mikroskopik hem de biyokimyasal olarak belirlenmiştir. Hücre membran bütünlüğü hücre kültür vasatında LDH düzeyi ölçülerek belirlenmiştir. LDH salınımı değerlendirildiğinde; silidianin diğer test edilen bileşenlere göre daha iyi koruma sağladığı ortaya konmuştur. Diğer bileşenlerin ise, DEKS'e yakın düzeyde koruma sağladığı ortaya konulmuştur. SİL ve SİL'in yapısındaki bileşenlerin DOKS ile oluşturulan oksidatif strese karşı H9c2 hücrelerini koruduğu belirlenmiştir. Bu bileşenlerin hücre membranını stabilize

ederek, serbest radikalleri uzaklaştırarak ve demir iyonlarını tutarak koruyucu etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Chlopcikova ve ark, 2004).

Sisplatin birçok kanserin (örneğin, testis, ovaryum, servikal, sidik kesesi ve akciğer kanseri gibi) tedavisinde yaygın olarak kullanılan oldukça etkili bir ilaçtır. Buna karşın, bu ilacın en önemli kısıtlayıcı yan etkisi kardiyotoksisitedir. Sisplatinin toksik etkisinde oksidatif stres ve apoptozisin önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir. Erkek albino sıçanlarda tek doz sisplatin (10 mg/kg, ip) ile oluşturulan deneysel kardiyotoksisiteye karşı SİL'in koruyucu etkinliği araştırılmıştır. Kardiyotoksisite oluşturmada önce 10 gün boyunca her gün SİL (100 mg/kg, gavajla) uygulanmıştır. SİL uygulanan grupta, serum LDH, CK-MB ve cTnI konsantrasyonlarının sisplatin uygulanan gruba göre belirgin olarak daha az olduğu ortaya konmuştur. Bu sonuç, SİL'in hücre membranını stabilize ederek hücre içi proteinlerin hücre dışına salınmasını önlediğini göstermektedir. Ayrıca, SİL'in hücre içinde antioksidan enzimlerin (SOD gibi) aktivitesini artırarak lipidlerin peroksidasyonunu önlediği ortaya konmuştur. Sisplatin hücrede oksidatif strese yol açar; serbest oksijen radikalleri ise, mitokondriyel DNA'da hasara neden olur. SİL'in mitokondriyel DNA hasarını azalttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, SİL'in sisplatin kardiyotoksisitesine karşı koruyucu etkisi olduğu ortaya konmuştur (El-Awady ve ark, 2011).

Siklofosfamid birçok kanserin (örneğin, lösemi, lenfoma, ovaryum kanseri, meme kanseri, nöroblastom gibi) tedavisinde kullanılan oldukça etkili bir antineoplastik ilaçtır (Avcı ve ark, 2017). Bu ilacın en önemli istenmeyen etkilerinden biri kardiyotoksisiteye yol açmasıdır (Sayed-Ahmed ve ark, 2014). Bu ilacın kardiyak hücreler üzerindeki toksik etkisinden serbest oksijen radikallerin sorumlu olduğu ileri sürülmektedir. Bu radikaller önemli hücresel yapı ve bileşenlerle (lipid, protein, DNA ve karbonhidrat) reaksiyona girerek hücrenin zedelenmesine yol açarlar (Saandeep ve ark, 2009; Motawi ve ark, 2010). Avcı ve ark 2017, siklofosfamid ile oluşturulan kardiyotoksisiteye karşı SİL'in koruyucu etkisini araştırmıştır. Yetişkin dişi Wistar albino ırkı sıçanlarda siklofosfamid (30 mg/kg/gün, 7 gün boyunca, intraperitoneal yolla) ile oluşturulan deneysel kardiyotoksistide SİL'in koruyucu etkisi araştırılmıştır. Kardiyotoksisite oluşturmada 7 gün önce başlanıp 14 gün boyunca her gün SİL (100 mg/kg, intraperitoneal) uygulanmıştır. Kalp dokusu histopatolojik olarak değerlendirildiğinde; siklofosfamid uygulanan grupta interstisyel ödem, miyokardiyum ve perikardiyumda kanamalar, kardiyak miyositlerde

dejenerasyon ve nekroz şeklinde şiddetli lezyonların şekillendiği belirlenmiştir. SİL uygulanan grupta ise, benzer lezyonlar görülmekle birlikte bu lezyonların şiddetinin siklofosfamid uygulanlardakine göre daha az olduğu belirlenmiştir. Siklofosfamid uygulanan gruba kıyasla; SİL uygulanan grupta kalp dokusunda MDA düzeyinin daha az olduğu, SOD düzeyinin ise daha fazla olduğu ortaya konulmuştur. Sonuç olarak, SİL kardiyak hücrelerde antioksidan enzimlerin düzeyini arttırarak lipidlerin peroksidasyonunu önlediği, dolayısıyla SİL'in siklofosfamid kardiyotoksitesine karşı koruyucu etkisinde bu mekanizmanın önemli rolü olduğu ortaya konmuştur.

2.4. Kalp Kasının Kasılmasında Görevli Proteinler

Kalp kası, birbirine paralel uzanan kardiyomiyosit (kas lifi) adı verilen özelleşmiş hücrelerden meydana gelir. Kas lifleri, birbirine paralel uzanan çok sayıda miyofibrillerden oluşur (Bayrak, 2013). Her bir miyofibril ise, yan yana ve alt alta düzgün bir dizilim gösteren aktin ve miyozin iplikçiklerinden oluşmuştur (Pınar, 2010; Bayrak, 2013). İplikçiklerin bu düzeninden, aktin iplikçiklerinin tam ortasından geçen Z membranı sorumludur (Pınar, 2010). İki Z membranı arasında kalan miyofibril bölümüne sarkomer denir (Bayrak, 2013). Sarkomer, kasın en küçük fonksiyonel birimidir (Leavis ve Gergely, 1984; Pınar, 2010). Kas kasılması sırasında, aktin ve miyozin iplikçikleri birbirine çapraz köprücüklerle bağlanır, iki elin parmaklarının birbiri içine girmesi gibi aktin iplikçikleri miyozin iplikçikleri üstünde kayar, bu da kasın boyunun ksalmasına diğer bir deyişle kas kasılmasına neden olur (Pınar, 2010; Bayrak, 2013).

Kalp kası, aktin ve miyozin iplikçiklerinin yan yana ve alt alta düzgün diziliminden dolayı histolojik kesitlerde açık ve koyu bantlar şeklinde enine çizgilenmeler gösterir (Pınar, 2010; Bayrak, 2013). Miyozin iplikçikleri koyu renkte kalın A bantlarını oluşturur. Aktin iplikçikleri ise, daha ince ve açık renkte I bantlarını oluşturur (Pınar, 2010). Kalp kası istirahat halinde iken, aktin iplikçikleri miyozin iplikçiklerinin iki ucunu hafifçe örter. Dolayısıyla miyozin iplikçiklerinin oluşturduğu koyu renkte A bandının iki ucu, aktin iplikçiklerinden dolayı daha da koyu renkte görülür. Miyozin iplikçiklerinin orta kısmı (aktin iplikçiklerinin uçlarını içermeyen bölge) uçlarına göre nispeten daha açık renkte görülür. İşte koyu renkteki A bandının orta kısmındaki nispeten daha açık bölgeye H bandı denir. Kas kasılmasının aktin iplikçiklerinin, miyozin iplikçikleri üzerinde kayması ile meydana geldiğini hatırlayınız, dolayısıyla, kas kasılması sırasında A bandının boyu

değişmez, I bandının boyu ise kısalır. Bununla birlikte, kas kasılması sırasında, aktin ve miyozin iplikçiklerinin boyu değişmez (Pınar, 2010; Bayrak, 2013).

2.4.1. Aktin ve Miyozin İplikçiklerin Moleküler Yapısı

Her bir miyozin iplikçığı 200'ün üstünde miyozin molekülünden oluşur. Her miyozin molekülü ise, iki ağır zincir (ağır meromiyozin) ve dört hafif zincir (hafif meromiyozin) olmak üzere altı adet polipeptit zincirinden oluşur (Pınar, 2010; Bayrak, 2013). Birbirinin üzerine sarılan iki ağır zincir, miyozin molekülünün kuyruğunu oluşturur. Miyozin moleküllerinin kuyrukları ise, demetler halinde toplanarak miyozin iplikçığının gövdesini oluşturur. Miyozin molekülünün hafif zincirleri kıvrılarak, miyozin iplikçığının gövdesinden dışarı doğru uzanan miyozin başını oluşturur (Bayrak, 2013). Kas kasılması sırasında, miyozin başları aktin iplikçikleri ile temas kurarak aktomiyozin köprücüklerini yaparlar (Pınar, 2010). Miyozin başları ATPaz enzim aktivitesine sahiptir. Bu enzim ATP'yi yıkar ve elde edilen yüksek enerjili fosfat bağları kas kasılması sırasında kullanılır (Pınar, 2010; Bayrak, 2013).

Her bir aktin iplikçığı; aktin, tropomiyozin ve troponin olmak üzere 3 adet proteinden oluşur (Pınar, 2010). Aktin iplikçığı, iki adet fibriler aktin (F aktin) proteininin birbiri üzerine sarılması ile oluşur. Her F aktin, globuler aktin (G-aktin) moleküllerinin art arda dizilerek polimerize olmasıyla oluşur (Holmes ve ark, 1990; Bayrak, 2013). Her aktin iplikçığı üzerinde, miyozin başının bağlandığı aktif bölgeler vardır. Kas kasılması sırasında, miyozin iplikçiklerinin başları aktin iplikçiklerinin aktif bölgeleri ile temas kurarak çapraz köprüler yapar (Pınar, 2010; Bayrak, 2013). Tropomiyozin iplikçığı, fibriler aktin proteinlerinin aktin iplikçığını oluşturmak üzere birbirinin üzerine sarılması ile oluşan oyuklar boyunca yerleşmiştir. Kas istirahat halinde iken, tropomiyozin iplikçikleri, aktin iplikçiklerinin aktif bölgelerini örter (Milligan ve Flicker, 1987). Tropomiyozin iplikçikleri boyunca düzenli aralıklarla yerleşen troponin (Tn) molekülleri, birbirine gevşek şekilde bağlı üç alt birimden oluşur. Bunlar; tropomiyozine bağlanan Tn-T (37 kDa), tropomiyozini inhibe eden Tn-I (24 kDa) ve kalsiyum bağlayan Tn-C (18 kDa) dir (Christenson ve ark, 1998; Wu ve ark, 1998; Kaneko ve ark, 1997). Tn-T, tropomiyozine Tn kompleksini bağlayan ve tropomiyozin için güçlü bir affiniteye sahip olan proteindir. Tn-I ise aktin filamenti için güçlü bir affiniteye sahiptir ve aktomiyozin ATPaz aktivitesinin bir inhibitörü olarak, aktin ve miyozin arasındaki ilişkiyi düzenler. Tn-C'de

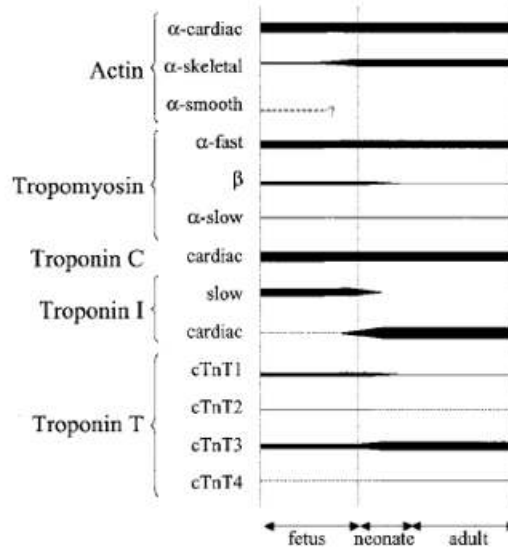
Tn kompleksinin kalsiyumu bağlayan bir ünitesidir (Christenson ve ark, 1998; Wu ve ark, 1998).

2.4.2. Kalp Kasının Kasılma Mekanizması

Kas kasılması, aktin iplikçiklerinin miyozin iplikçikleri üzerinde kayması ile meydana gelir (Bayrak, 2013). Kasılmayı başlatan ve sürdüren iyon kalsiyum (Ca^{+2}) dur. Kas kasılması sırasında, Ca^{+2} , yüksek bir affinite ile Tn-C'ye bağlanır. Aktive olan Tn-C, troponinin diğer alt ünitelerinde ve tropomiyozinde yapısal değişikliklere yol açar; tropomiyozin iplikçiği aktin iplikçiğinin etkin noktalarından ayrılır (Pınar, 2010). Böylelikle aktin iplikçiğinin aktif bölgeleri açığa çıkar. Bu sırada, miyozin başına bağlı ATP molekülü hidrolizlenir. ATP'nin hidrolizini hücre içinde artan Ca^{+2} 'un tetiklediği düşünülmektedir. ADP ve yüksek enerjili fosfat (ADP+Pi) taşıyan miyozin başları, aktin iplikçiklerinin aktif bölgelerine bağlanarak çapraz köprüler kurarlar ve miyozin başlarının eğilmesi kasın kasılmasına neden olur. Miyozin başının eğilmesini takiben, başa bağlı olarak bulunan ADP+Pi serbestleşir. Miyozin başının aktin iplikçiğinden ayrılması için ATP'ye ihtiyaç vardır. ATP'nin miyozin başına bağlanması, miyozin iplikçiğinin aktin iplikçiğinden ayrılmasına neden olur (Pınar, 2010; Bayrak, 2013).

2.4.3. Troponinler

Kalp kası ritmik bir şekilde sürekli olarak kasılmaktadır. Kalpteki kasılabilir proteinler kalbin ihtiyacını karşılamak için özelleşmişlerdir. Kalp kasında ifade edilen kasılabilir protein izoformları, kasılma özellikleri bakımından yavaş ve hızlı kasılan iskelet kasındakilerden farklıdır. Kalbin gelişimi sırasında (embriyonel ve fetal dönem) kasılabilir proteinlerde bir takım izoform değişimleri meydana gelir, bu değişimler Şekil 10'da sunulmuştur. Bu değişimler kalbin fonksiyonu açısından oldukça önemlidir (Marston ve Redwood, 2003).



Şekil 10. Kalbin gelişimi sırasında (embriyonel ve fötal dönem) kasılabilir proteinlerde meydana gelen izoform değişimleri (Marston ve ark, 2003).

2.4.3.1. Troponin C

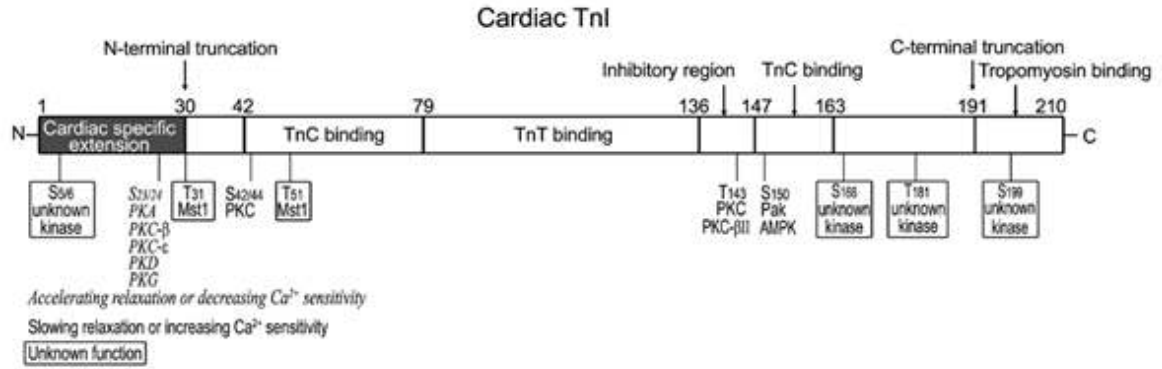
Troponin C (TnC), troponin kompleksinin kalsiyum bağlayan bileşenidir. Bu proteinin iki izoformu vardır. Kalp kasında ve yavaş kasılan iskelet kasında TnC izoformu aynıdır; bu izoform *TNNC1* geni tarafından kodlanır. TnC'nin diğer izoformu (fsTnC) ise, hızlı kasılan iskelet kası izoformudur; bu izoform *TNNC2* geni tarafından kodlanır. Fetal ve yetişkinlik döneminde kalp kasında TnC'de izoform değişimi meydana gelmez; yani kalbin gelişimi sırasında ve yetişkinlik döneminde ifade edilen TnC izoformu aynıdır (Filatov ve ark, 1999; Sheng ve Jin, 2014). Kalp kasında ve yavaş kasılan iskelet kasında ifade edilen TnC izoformu aynı olduğundan, bu izoform spesifik olarak miyokardiyal hasarın ortaya konulmasında kullanılamaz (Parmacek ve Solaro, 2004).

2.4.3.2. Troponin I

Troponin I, troponin kompleksinin inhibitör bileşenidir (Farah ve ark, 1994). TnI'nın ssTnI, fsTnI ve cTnI olmak üzere 3 izoformu bulunur. ssTnI, yavaş kasılan iskelet kasında; fsTnI, hızlı kasılan iskelet kasında; cTnI ise, kalp kasında ifade edilir. Bu izoformlar farklı genler tarafından kodlanır; ssTnI, *TNNI1*; fsTnI, *TNNI2*; cTnI ise, *TNNI3* geni tarafından kodlanır (Perry, 1999). *TNNI3* geni, 19. kromozomda (19q13.4) yer alır ve bu gen, sekiz ekzon ve yedi introndan oluşur. Ekzon 3, fsTnI ve ssTnI'yı ifade eden genlerde bulunmaz;

bu ekzon cTnI'nın diğer TnI izoformlarında bulunmayan N-terminal uzantısını kodlar (Bhavsar ve ark, 1996).

Kardiyak TnI yapısal olarak altı birimden oluşur (Li ve ark, 2004): (a) N-terminal uzantı (1-30 aa). Bu yapı, fsTnI ve ssTnI'da bulunmaz, cTnI'ya özeldir; (b) N-terminal bölge (42-79 aa). Bu yapı TnC'nin C bölgesine bağlanır; (c) TnT'ye bağlanan bölge (80-136 aa); (d) inhibitor peptid (128-147 aa). Bu yapı TnC ve tropomiyozin-aktine bağlanır; (e) TnC'nin N bölgesine bağlanan yapı (148-163) ve (f) C-terminal bölge (164-210). Bu yapı, TnI izoformları arasında ve farklı tür canlılar arasında büyük benzerlik göstermektedir (Jin ve ark, 2001; 2008). Şekil 11'de cTnI'nın yapısı ve transkripsiyon sonrası yapısında meydana gelen değişiklikler görülmektedir.

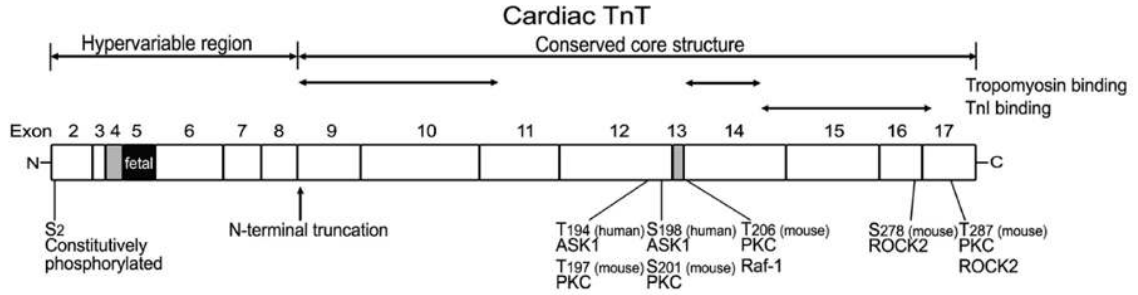


Şekil 11. cTnI'nın yapısı ve transkripsiyon sonrası yapısında meydana gelen değişiklikler (Sheng ve Jin, 2014).

2.4.3.3. Troponin T

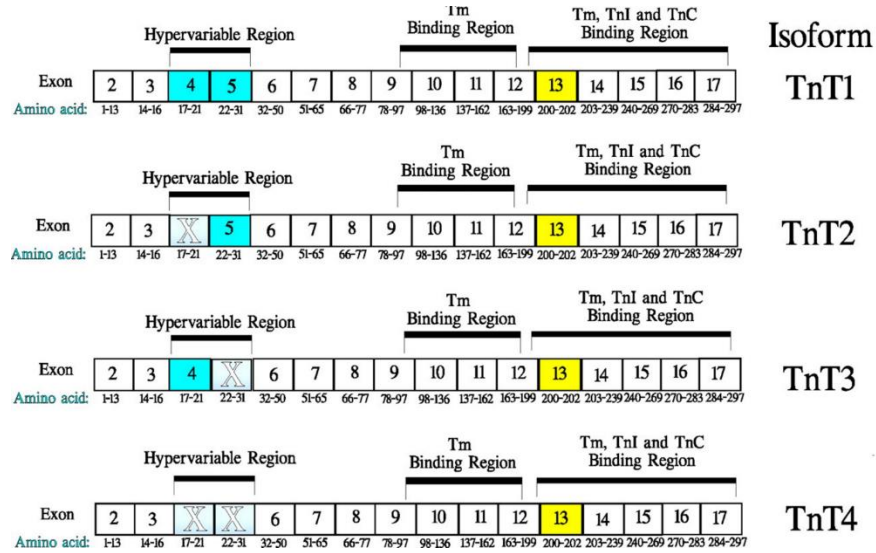
Troponin T, troponin kompleksinin tropomiyozin ile direkt olarak etkileşen tek bileşenidir, bu izoform troponin kompleksinin ince iplikçiklere bağlanmasına aracılık eder. İnsan ve diğer omurgalı canlılarda her biri farklı genler (*TNNT1*, *TNNT2*, *TNNT3*) tarafından kodlanan üç adet troponin T izoformu bulunur. *TNNT1* yavaş kasılan çizgili kasta (ssTnT), *TNNT2* kalp kasında (cTnT) ve *TNNT3* ise hızlı kasılan çizgi kasta (fsTnT) ifade edilen izoformu kodlamaktadır. cTnT ile fsTnT arasında N-terminal bölgeleri açısından farklılık bulunmaktadır. Bunlar; 1. fsTnT'nin cTnT'den 30 aminoasit daha kısa olması ve 2. cTnT, fsTnT'ye göre daha fazla sayıda asidik aminoasitde sahip olmasıdır (Cooper ve Ordahl, 1984; Jin ve ark, 1992). Şekil 12'de cTnT'nin yapısı, fonksiyonel bölgeleri ve alternatif kesim bölgeleri sunulmuştur. cTnT, yetişkin iskelet kasında ifade edilmez. Buna karşın, rejenere olan iskelet kasında cTnT ifade edilmektedir. İskelet kasında

patoloji görülen hastaların kanında cTnT izoformları belirlenebilir (Anderson ve ark, 1991).



Şekil 12. cTnT'nin yapısı, fonksiyonel ve alternatif kesim bölgeleri ile transkripsiyon sonrası yapısında meydana gelen değişiklikler (Sheng ve Jin, 2014).

Kardiyak TnT, *TNNT2* geni tarafından kodlanır. *TNNT2* geni, 1. Kromozomda (1q32.3) yer alır ve 17 ekzon ve 16 introndan oluşmaktadır (Farza ve ark, 1998). İnsanlarda kalp kasında TnT1, TnT2, TnT3 ve TnT4 olmak üzere dört farklı TnT izoformu bulunur (Şekil13). Bu izoformlar, ekzon 4 ve 5'in alternatif uçbirleştirme yöntemiyle biraraya gelmesiyle oluşur. TnT izoformları ve bu izoformları kodlayan ekzonlardaki farklılıklar şu şekildedir: TnT1 (ekzon 3 ve 4 bulunur), TnT2 (ekzon 4 bulunmaz), TnT3 (ekzon 5 bulunmaz) ve TnT4 (ekzon 4 ve 5 bulunmaz)'tür (Mesnard-Rouiller ve ark, 1997; Gomes ve ark, 2002). Ekzon 5 tarafından kodlanan aminoasit dizisi (EEEDWREDED) sadece fetal dönemdeki cTnT (TnT1 ve TnT2) izoformlarında bulunur; yetişkin dönemdekilerde (TnT3 ve TnT4) bulunmaz. Bu ekzonun alternatif kesim yöntemiyle çıkarılması, cTnT'nin kısalmasına ve TnT izoformunun daha asidik olmasına yol açar. TnT izoformunun yapısındaki bu değişiklikler troponin kompleksinin fonksiyonunu etkileyebilir. Bu izoformun ifadesi, miyositlerin maksimal kasılma gücünü ve Ca^{+2} 'a duyarlılığını artırır (Mcauliffe ve ark, 1990; Nassar ve ark, 1991; Gomes ve ark, 2004).



Şekil 13. cTnT izoformları ile bu izoformları kodlayan ekzonlar (Güçlü, 2006).

2.4.4. ANT'nin Kardiyotoksik Etkilerinin Saptanmasında Troponinlerin Kullanımı

Kardiyak miyositlerde şekillenen hasar sonucu hücrede yer alan proteinlerin kan dolaşımına salındığı bilinmektedir (Adamcova ve ark, 2007). Geleneksel olarak kreatin kinaz (CK) ve onun miyokardiyal izoenzimi (CK-MB) son zamanlara kadar akut miyokardiyal hasarın ortaya konulmasında 'altın standart' olarak kabul edilmekte ve bu veriler laktat dehidrogenaz (LDH), aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) seviyelerinin belirlenmesi ile desteklenmekteydi (Adams ve ark, 1994; Jaffe ve ark, 1996; Adamcova ve ark, 2007). Ancak, kardiyak miyositler dışında diğer dokularda da ifade edilen bu proteinlerin miyokardiyal hasarın yanı sıra diğer organlardaki çeşitli patolojik durumlarda da kandaki düzeyinin arttığının belirlenmesi, bu proteinlerin kardiyak hasarın ortaya konulmasında kullanımını sınırlandırmaktadır. Amerikan Kardiyoloji Koleji ve Avrupa Kardiyoloji Derneği kalp kasına daha spesifik, daha duyarlı ve daha uzun süre kanda kalmaları sebebiyle geleneksel CK-MB testlerinin yerini kardiyak troponin (cTn) testlerinin alması gerektiğini önermektedir (Alpert ve ark, 2000). Geleneksel yöntemlerle miyokardiyal hasarı ortaya koyan belirteçlere göre cTn'lerin en önemli avantajları; kalp kasına spesifite ve sensitivitesinin oldukça yüksek olması ve dolaşımında daha uzun süre kalması olarak açıklanabilir (O'Brien ve ark, 2008; Tunca ve ark, 2009). Bu yüksek spesifite ve sensitivitelerinden dolayı insanlarda miyokardiyal hasarın ortaya konulmasında, Tn'ler 'altın standart' olarak kabul edilmektedir (Adamcova ve ark, 2007; O'Brien ve ark, 2008).

Troponin (Tn)'ler çizgili kasların ince iplikçikleri üzerinde düzenli aralıklarla yerleşmiş ve çizgili kaslarda kasılmayı düzenleyen globüler yapıda protein kompleksleridir. (Christenson ve ark., 1998; Wu ve ark., 1998). Hem TnI'nın hem de TnT'nin farklı genler tarafından kodlanan üç adet izoformu bulunmaktadır. Bunlar; yavaş kasılan iskelet kası izoformu, hızlı kasılan iskelet kası izoformu ve kardiyak izoform (Adamcova ve ark, 2007). Kalp kasında ve yavaş kasılan iskelet kasında ifade edilen TnC izoformu aynı olduğundan, bu izoform spesifik olarak miyokardiyal hasarın ortaya konulmasında kullanılamaz (Parmacek ve Solaro, 2004). Buna karşın hem TnI hem de TnT'nin kardiyak izoformlarının sadece kalp kasında ifade edilmesi nedeniyle bu belirteçler miyokardiyal hasarın ortaya konulmasında önemli diyagnostik kriterlerden biridir (Perry, 1999; Gunes ve ark, 2005; Adamcova ve ark, 2007; Gunes ve ark, 2008; Tunca ve ark, 2008; 2009).

Troponinler zedelenmiş kardiyak miyositlerden kana -I, -C, -T kompleksleri (cTn-I-C-T üçlü kompleksi ve cTn-I-C ikili kompleksi) şeklinde ve serbest alt gruplar (cTn-I, cTn-C ve cTn-T) olarak salınırlar (Christenson ve ark, 1998; Wu ve ark, 1998). Kalp kasında meydana gelen hasardan kısa bir süre sonra kandaki konsantrasyonlarının yükselmesi, henüz klinik bulgular şekillenmeden bile miyokard zedelenmesinin ortaya konulmasında önemli bir ölçüt olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Gunes ve ark, 2005; 2008; O'Brien ve ark, 2008; Tunca ve ark, 2008; 2009). Normal koşullarda kardiyak miyositlerde herhangi bir dejenerasyon ya da nekroza ilişkin bir bulgu olmaksızın, kardiyomiyositlerdeki toplam cTn-I miktarının yaklaşık %2-4'ü sistolik kanda serbest olarak bulunur (Wu ve ark, 1998). Sağlıklı bir kalp kasında cTn-I'nın büyük bir bölümü kardiyomiyosit içinde yapısal olarak bağlı durumdadır ve sadece kardiyomiyositte meydana gelen dejenerasyon ve nekroz durumunda yıkılan hücreden salınır (Wallace ve ark, 2004; Tunca ve ark, 2008; 2009). İnsanlarda, Tn'ler miyokardiyal hasardan 5-7 saat gibi oldukça kısa bir süre sonra kanda tespit edilebilir ve hasarın 1-2 günü kandaki en üst seviyelerine ulaşır (Mair, 1999).

Tn'ler oldukça kararsızdırlar; bu proteinlerin yapısı çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar ile değişebilir. Örneğin, proteazlar aracılığıyla yıkımlanabilir, protein kinazlar (PKA, PKC) tarafından fosforillenebilir ya da oksitlenebilir. Bu proteinlerin yapısındaki değişiklikler diyagnostik testlerin doğruluğunu etkilemesi bakımından oldukça önemlidir. Bu yüzden Tn seviyesini belirlemek için kullanılan diyagnostik testler sadece Tn'lerin farklı epitoplarını

tanınması bakımından değil farklı troponin komplekslerini (örneğin T-I-C ya da C-I troponin kompleksleri gibi) tanınması ve Tn'lerin biyotransformasyonu sonu oluşan farklı molekülleri tanınması bakımından da farklıdır (Morjana, 1998; Katrukha ve ark, 1997).

Troponinler kardiyotoksik ilaçlarla oluşturulan deneysel miyokardiyal hasarın ortaya konulmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Herman ve ark, 1998; 1999; Adamcova ve ark, 1999; Bertinchant ve ark, 2000; 2003; Simunek ve ark, 2003; Herman ve ark, 2006; York ve ark, 2007; Cove-Smith ve ark 2014; Lencova ve ark 2014). Sıçanlarda izoproterenol ile oluşturulan deneysel kardiyotoksistide; özellikle düşük izoproterenol dozlarında kardiyak miyositlerde belirgin histopatolojik değişiklikler görülmeden önce serumda Tn konsantrasyonunun arttığı ortaya konmuştur (York ve ark, 2007). HE ile boyanan kalp kesitlerinde histopatolojik olarak dejenerasyon ve nekrozun görülmediği kardiyak miyositlerde Tn immunoreaktivitesinde belirgin azalmalar görülebilir. Ayrıca, miyokardiyal hasarın erken dönemlerinde kardiyak miyositlerde şekillenen hafif değişiklikleri belirlemek kolay değildir, bu değişiklikler kolayca gözden kaçabilir. Dolayısıyla kalp dokusunun immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesi hasarın başlangıç dönemlerinde kardiyomiyositlerde şekillenen hasarın ortaya konulması açısından oldukça önemlidir. Bu bağlamda, bu çalışmada miyokardiyumda şekillenen hasarı belirlemek ve deney grupları arasında miyokardiyal hasarın yaygınlığını karşılaştırmak için kalp dokusunda TnT ve TnI ifade düzeyi immunohistokimyasal ve immunoblotlama yöntemleri ile değerlendirildi.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

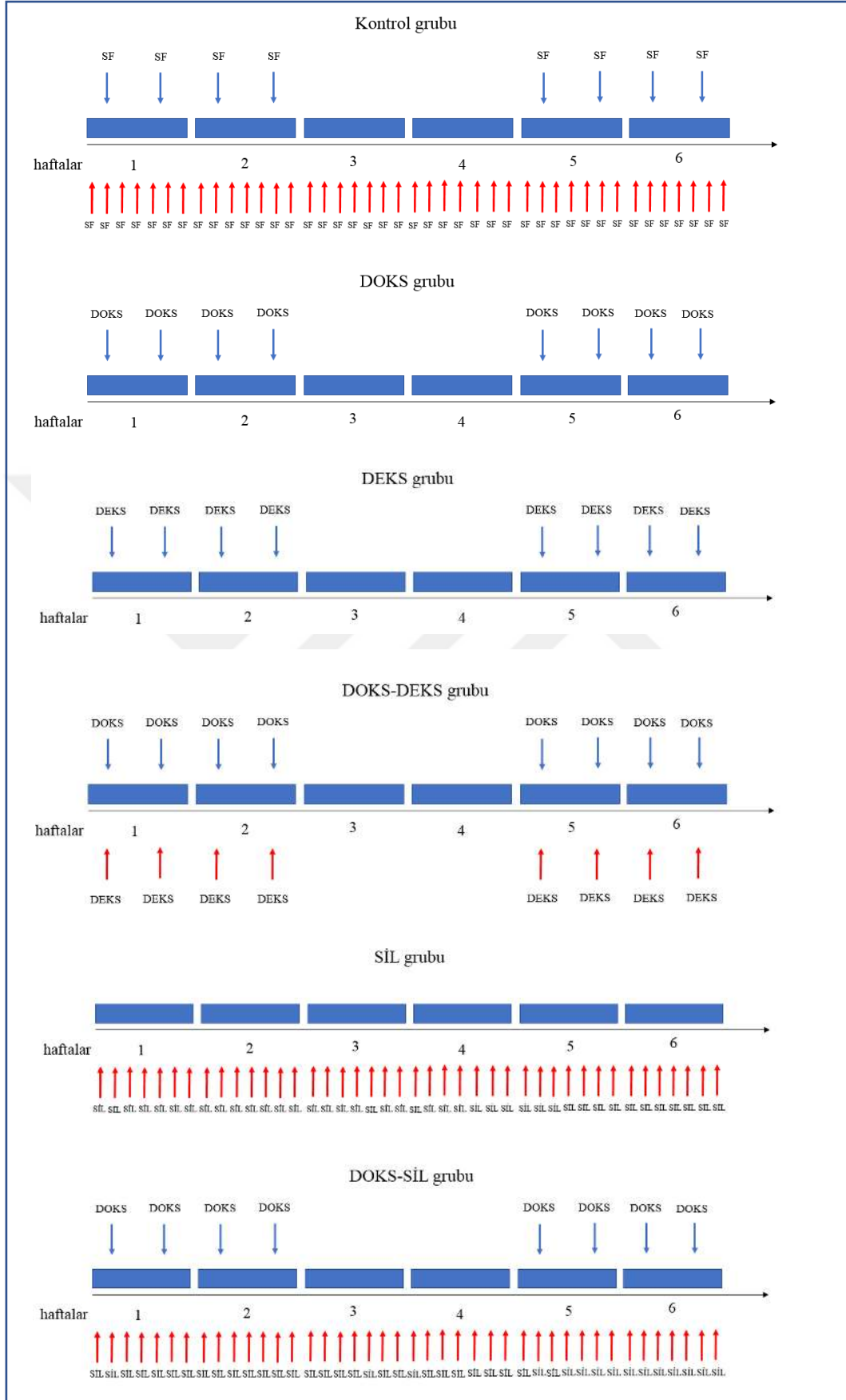
3.1. Deney Hayvanları

Çalışmanın tasarımı, Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından, 2014 yılı XI. oturumu ve 64583101/2014/189 sayılı kararı ile onaylanmıştır. Çalışmada Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş' den temin edilen 6-8 haftalık, ortalama $22,9 \pm 1,6$ ağırlığında 45 adet Balb/c ırkı erkek fare kullanıldı.

Deney süresi boyunca Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde 22 ± 2 °C sıcaklık, %50-70 nem ve 12/12 saat aydınlık/karanlık koşullarında, şeffaf polikarbonat kafeslerde barındırılan hayvanlar standart fare yemi ile beslendi, suya serbestçe ulaşmaları sağlandı.

3.2. Deney Tasarımı

Deney hayvanları rastgele seçilerek 6 grup oluşturuldu. Deney grupları ve deney hayvanları üzerinde yapılan uygulamalar Şekil 14'te sunuldu.



Şekil 14. Deney grupları ve deney hayvanları üzerinde yapılan uygulamalar

Grup I (Kontrol grubu, n=5): Bu gruptaki hayvanlara toplamda 6 hafta süren deneyin ilk 2 ve son 2 haftasında haftada iki doz olmak üzere intraperitoneal (ip) yolla serum fizyolojik (SF) uygulandı. Ayrıca, deney süresi boyunca hergün gavajla SF uygulandı.

Grup II (DOKS grubu, n=10): Bu gruptaki hayvanlara deneyin ilk 2 ve son 2 haftasında haftada iki doz olmak üzere ip yolla 3 mg/kg dozda DOKS (Adriamisin, Deva, Türkiye) uygulandı (Imondi ve ark, 1996)

Grup III (DEKS grubu, n= 5): Bu gruptaki hayvanlara deneyin ilk 2 ve son 2 haftasında haftada iki doz olmak üzere ip yolla 30 mg/kg dozda DEKS (Cardioxane, Clinical Healthcare, United Kingdom) uygulandı (Herman ve ark, 1981; 1985; 1994).

Grup IV (DOKS+DEKS grubu, n= 10): Bu gruptaki hayvanlara deneyin ilk 2 ve son 2 haftasında haftada iki doz olmak üzere ip yolla 3 mg/kg dozda DOKS uygulanmasına ilaveten DOKS uygulamalarından 30 dakika önce intraperitoneal yolla 30 mg/kg dozda DEKS uygulandı.

Grup V (SİL grubu, n=5): Bu gruptaki hayvanlara 6 hafta boyunca hergün gavajla 100 mg/kg dozda SİL (Sigma, United States) uygulandı.

Grup VI (DOKS+SİL grubu, n=10): Bu gruptaki hayvanlara deneyin ilk 2 ve son 2 haftasında haftada iki doz olmak üzere ip yolla 3 mg/kg dozda DOKS uygulanmasına ilaveten deney süresi boyunca hergün gavajla 100 mg/kg dozda SİL uygulandı. Ayrıca, DOKS ve SİL'in birlikte uygulandığında günlerde SİL uygulaması DOKS uygulamasından 1 saat önce yapıldı (Zhao ve Agarwal, 1999; Cecen ve ark, 2011; El-Awady ve ark, 2011).

Deneyin sonunda deney hayvanları ketamin (50 mg/kg) + ksilazin (5 mg/kg) anestezisi altında servikal dislokasyon yöntemiyle ötenazi edildi.

3.3. Nekropsi ve Histopatolojik İnceleme

Tüm hayvanların nekropsileri yapıldıktan sonra görülen makroskobik bulgular kaydedildi. Kalp çıkarıldıktan sonra kalp atımları duruncaya kadar soğuk (+4 °C) serum fizyolojik içinde bekletildi. Kalbin bazisinden apeksine doğru uzunlamasına kesit atılarak kalp iki parçaya ayrıldı (Morawietz ve ark, 2004); bir parçası immunoblotlama ve kantitatif gen ekspresyon çalışmalarında kullanılmak üzere sıvı azotta dondurulup çalışılincaya

kadar derin dondurucuda saklandı, diğer parça ise 12-24 saat %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edildi. Tespit edilen dokular trimlenerek doku takip kasetlerine yerleştirildi, 6-8 saat akan çeşme suyu ile yıkandı, doku takip cihazında takip edilerek (Leica TP1020) parafinde bloklandı. Parafine gömülen dokular mikrotom (Leica RM 2135) ile 5 µm kalınlığında kesilip, kesitler normal ve pozitif yükle yüklü lamlara alındı. Normal lamlara alınan kesitler, hematoxilen-eozin ile; pozitif yüklü lamlara alınan kesitler ise, immunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyandı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus BX51) incelendi, mikroskobik dijital fotoğraflar (Olympus C-5050) çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı.

Kalp dokusunda karşılaşılan histopatolojik değişiklikler, bu değişikliklerin şiddeti ve yaygınlığı temel alınarak oluşturulan kardiyomiyopati skoru adı verilen bir skorlama sistemi ile semikantitatif olarak değerlendirildi (Bertazzoli ve ark, 1979). Kardiyomiyositlerde şekillenen histopatolojik değişikliğin şiddeti şu şekilde skorlandı: 0: (herhangi bir lezyon yok), 1: (sitoplazmik vakuolizasyon+hiyalin dejenerasyonu), 2 (sitoplazmik vakuolizasyon+nekrotik değişiklikler). Belirlenen değişikliğin yaygınlığı ise Tablo 1'de sunulan şekilde skorlandı. Bu iki değer toplanarak bulunan değer o hayvanın kardiyomiyopati skoru olarak kaydedildi.

Tablo 1. Histopatolojik değişikliklerin yaygınlığının değerlendirilmesinde kullanılan skorlama sistemi

Yaygınlık	Skor
Patolojik değişiklik yok	0
Patolojik değişiklik tek tük birkaç hücrede görüldüğünde	1
Küçük hücre grupları şeklinde az sayıda alan etkilendiğinde	2
Küçük hücre grupları şeklinde çok sayıda alan etkilendiğinde	3
Miyokardiyum geniş alanlar halinde etkilendiğinde	4

3.4. İmmunohistokimyasal İnceleme

Parafine gömülen dokulardan alınan seri kesitlerde kardiyak troponin I tip 3, kardiyak troponin T tip 2, TopIIβ ve γH₂Ax ifadesini belirlemek amacıyla polimer tabanlı indirekt immunohistokimyasal boyama yöntemi kullanıldı. Bu kapsamda; kesitler, ksilol ve konsantrasyonu gittikçe azalan alkol serilerinden geçirilerek sırasıyla deparafinize ve

rehidre edildi. Bu aşamadan sonra uygulanan tüm işlemler arasında kesitler 3'er kez 5'er dakika TBS-T (pH: 7,6) solüsyonu ile yıkandı. Kesitler, metanolde hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 15 dakika inkübe edilerek dokuların endojen peroksidaz aktivitesi engellendi. Kesitler, 95 °C'ye ısıtılan Rodent decloaker (Biocare Medical Inc, ABD) solüsyonunda 30 dakika inkübe edilerek dokudaki antijenlerin açığa çıkması sağlandı. Kesitler, Rodent block M (Biocare Medical Inc, ABD) solüsyonu ile muamele edilip 30 dakika inkübe edilerek dokudaki spesifik olmayan boyanmalar engellendi. Dokudaki kardiyak troponin I tip 3, kardiyak troponin T tip 2, TopII β ve γ H₂Ax ifadesini belirlemek amacıyla, TBS-T'de hazırlanmış %3'lük BSA ile uygun konsantrasyonda sulandırılan birincil antikorlarla muamele edilen kesitler 37 °C'de 1 saat nemli kamarada inkübe edildi. Kullanılan birincil antikorların sulandırma oranları Tablo 2'de sunuldu. Bu işlemin takiben, keçi anti-tavşan-HRP polimer (Biocare Medical Inc, ABD) ikincil antikor ile muamele edilen kesitler oda sıcaklığında nemli kamarada 30 dakika inkübe edildi ve DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB Quanto chromogen and substrate, Thermo scientific, ABD) ile muamele edilip 5 dakika inkübe edilerek reaksiyon sonlandırıldı. Mayer hematoksilen (Sigma) ile karşıt boyama yapıldıktan sonra dokular konsantrasyonu gittikçe artan alkol serilerinden geçirilerek dehidre edildi. Ksilen ile şeffaflandırılan kesitler yapıştırıcı ile kapatıldı. Negatif kontrol için kesitler birincil antikor yerine bu antikorun sulandırılmasında kullanılan TBS-T solüsyonu ile muamele edildi. Bu işlem dışında diğer tüm işlemler yukarıda anlatıldığı şekilde uygulandı.

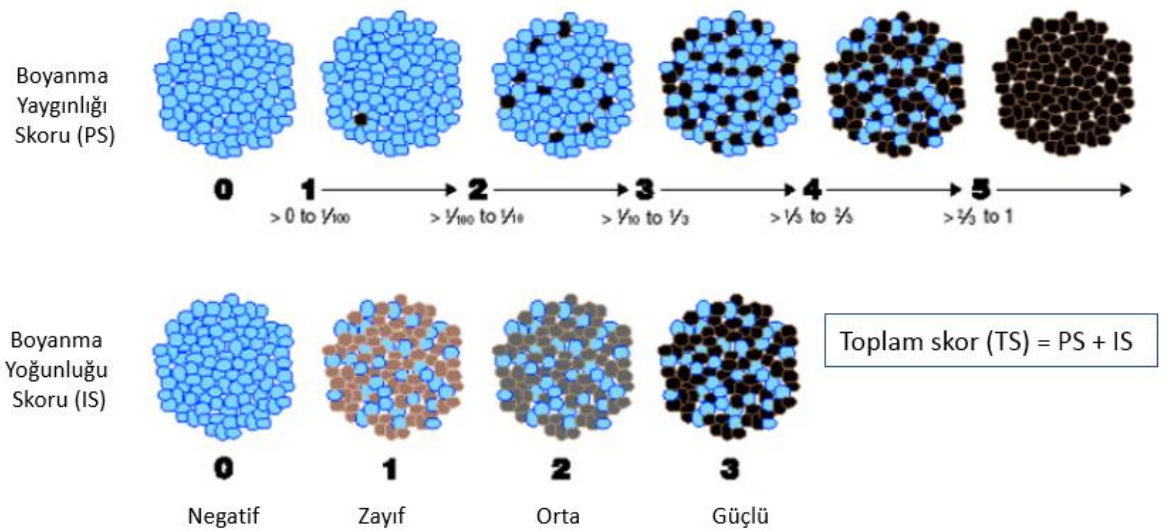
Tablo 2. İmmunohistokimyasal boyamalarda kullanılan birincil antikorların spesifitesi, firma bilgileri ve dilüsyon oranları

Antikor	Klon	Firma	Dilüsyon
Troponin I Type 3 (cardiac)	tavşan pAb IgG, NBP2-20734	Novusbio	1:250
Troponin T Type 2 (cardiac)	tavşan pAb IgG, NBP1-88070	Novusbio	1:250
TopIIβ	tavşan pAb IgG, NBP1-89527	Novusbio	1:250
γH₂Ax	tavşan pAb IgG, NBP1-19931	Novusbio	1:250

3.5. İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kalp dokusunda TnI ve TnT'nin immunoreaktivitesi incelenen alanlarda pozitif hücre sayısı temel alınarak oluşturulan değerlendirme sistemi ile belirlendi. Bu amaçla her bir kesit için ışık mikroskobunda 40'lık büyütmede, her biri 100 gridlik (10x10) ve toplamı 0.025 mm² ye eşit 10 ayrı alan rastgele seçilerek incelendi. Her alanda pozitif boyanan hücrelerin yüzde oranları belirlendi, incelenen 10 sahanın ortalaması alınarak bulunan değer o hayvanın verisi olarak kaydedildi.

Kalp dokusunda TopII β ve γ H₂Ax'in immunoreaktivitesi, incelenen alanlarda ağırlıklı boyanma yoğunluğu ile boyanma yaygınlığı esas alınarak oluşturulan Allred skorlama sistemi ile değerlendirildi (Qureshi ve Pervez, 2010). Bu skorlama sisteminin şematize edilmiş hali Şekil 15'de sunuldu. İncelenen alanlarda ağırlıklı boyanma yoğunluğu değeri şu şekilde belirlendi: 0 (herhangi bir boyanma yok), 1 (zayıf), 2 (orta), 3 (yoğun). Boyanma yaygınlığı değeri ise, ağırlıklı boyanma yoğunluğu değerinde boyanan hücrelerin tüm hücrelere oranı temel alınarak oluşturulan skorlama sistemi ile şu şekilde belirlendi: 0 (herhangi bir boyanma yok), 1 (1/100), 2 (1/100-1/10), 3 (1/10-1/3), 4 (1/3-2/3), 5 (2/3-1). Ağırlıklı boyanma yoğunluğu değeri ile boyanma yaygınlığı değeri toplanarak incelenen alanın Allred skoru belirlendi. Bu işlem rastgele seçilen 10 farklı alanda tekrarlandı, incelenen 10 alanın ortalaması alınarak bulunan değer o hayvanın verisi olarak kaydedildi.



Şekil 15. Allred skorlama sistemi (Qureshi ve Pervez, 2010'dan değiştirilerek alınmıştır).

3.6. İmmunoblotlama (Western Blotting)

Kalp dokusunda troponin I tip 3, troponin T tip 2, γ H₂Ax ve β -aktin proteinlerinin ifade düzeyi immunoblotlama yöntemi ile belirlendi (Kurien ve Scofield, 2015). Bu amaçla; kalp dokusundan izole edilen total protein karışımı, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrıştırıldı. Elektroforezis ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılan proteinler, yarı kuru (semi-dry) transfer sistemi ile poliviniliden florür (PVDF) membrana transfer edildi. Bu işlemi takiben PVDF membran, aranan proteine özgül birincil antikorlarla inkübe edildi. Daha sonra, PVDF membran yaban turbu peroksidaz (HRP) enzimi ile işaretlenmiş birincil antikora özgül ikincil antikorla inkübe edildi ve Enhanced ChemiLuminescence (ECL) solüsyonu ile inkübe edilerek reaksiyon sonlandırıldı. Protein bandları, ChemiDoc-ItR2 Imager (UVP) görüntüleme ve analiz programı ile değerlendirildi. İlgilenilen proteinin ifade düzeyi β -aktin proteininin ifade düzeyi ile normalize edilerek varsayılan birim (arbitrary unit) şeklinde hesaplandı. İmmunoblotlama testinde kullanılan malzemeler Tablo 3'te sunulmuştur.

Tablo 3. İmmunoblotlama testinde kullanılan malzemeler

Ürün	Ürün Kodu	Firma
RIPA Lysis tamponu	sc-24948	Santa Cruz
Smart BCA protein assay kit	21071	Intron
Trizma base	T-6066	Sigma-Aldrich
Sodium dodecyl sulfate	L-3771	Sigma-Aldrich
Acrylamide/Bis-acrylamide, %30 solution	A-3574	Sigma-Aldrich
Glycerol	G-5516	Sigma-Aldrich
Ammonium persulfate	A-3678	Sigma-Aldrich
N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine	T-7024	Sigma-Aldrich
Glycine	G-8898	Sigma-Aldrich
Ethanol, absolute	32221	Sigma-Aldrich
2-propanol	24137	Sigma-Aldrich
Immobilon-P Membrane, PVDF, 0.45 μ m, 26.5 cm x3.75 m roll	IPVH00010	Merck Millipore
Methanol	32213	Sigma-Aldrich
Skim milk powder	70166	Sigma-Aldrich
Bovine serum albümin	A2153	Sigma-Aldrich
Sodium chloride	31434	Sigma-Aldrich
Potassium chloride	104936	Merck Millipore
Tween-20	P1379	Sigma-Aldrich
Sodium hydroxide	106498	Merck Millipore
PageRuler Prestained protein ladder, 10 to 180 kDa	26616	ThermoFisher Scientific
Prestained protein ladder V	PL005	Geneaid
Luminata Crescendo Western HRP substrate	WBLUR0100	Merck Millipore
Luminata Forte Western HRP substrate	WBLUF0100	Merck Millipore

Metot

1. Elektroforezis İşleminde Kullanılan Çözeltiler

1.1. Ayırıcı jel çözeltisi (pH 8.8)

91 g Tris-base, distile su ile çözüldü. 20 ml %10 SDS (w/v) eklendi. Çözelti hacmi distile su ile 500 ml'ye tamamlandı. Çözeltinin pH'sı 6N HCl (~14 ml) ile 8.8'e ayarlandı. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

1.2. Paketleyici jel çözeltisi (pH 6.8)

30.5 g Tris-base, distile su ile çözüldü. 20 ml %10 SDS (w/v) eklendi. Çözelti hacmi distile su ile 500 ml'ye tamamlandı. Çözeltinin pH'sı 6N HCl (~30 ml) ile 6.8'e ayarlandı. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

1.3. Yürütme tamponu (10x, pH 8.6)

30 g Tris-base, 144 g glisin ve 15 g SDS, 1 L distile su ile çözüldü.

1.4. %40 (w/v) Amonyum persülfat (APS) çözeltisi

0.1 g APS, 250 µl distile su ile çözüldü. Çözelti 4°C'de muhafaza edildi.

1.5. SDS (%10) (w/v)

5 g SDS, 50 ml distile su ile çözüldü.

2. Transfer İşleminde Kullanılan Çözeltiler

2.1. Transfer tamponu

5.8 g Tris-base, 2.9 glisin, 3.75 ml %10 (w/v) SDS, 800 ml distile su ile çözüldü.

2.2. TBS (10x)

30.2 g Tris-base, 43.8 g NaCl, 0.9 g KCl 1 L distile su ile çözüldü.

3.6.1. Dokuların Homojenizasyonu, Total Protein İzolasyonu ve Protein Miktarının Belirlenmesi

Total protein izolasyonu RIPA Lizis tamponu (sc-24948, Santa Cruz, ABD) ile gerçekleştirildi. Total protein miktarı Smart BCA Protein Assay (Intron) kiti ile belirlendi. Bu amaçla;

1. Derin dondurucudan çıkarılan örnekler kuru buz üstünde çözünmeye bırakıldı, örnekler tartılarak her bir örnek için kullanılacak tampon çözelti miktarı hesaplandı.
2. Örnekler rotor-stator tip homojenizatör ile parçalandı.
3. Elde edilen homojenat 30 dakika kuru buz üstünde inkübe edildi.
4. Homojenat 12000 rpm'de 10 dakika santifüj edildi.
5. Süpernatant yeni tüplere aktarıldı, süpernatantın absorbens değeri protein miktarı bilinen BSA standartlarının absorbens değerleri ile kıyaslanarak elde edilen lizattaki total protein miktarı ug/ml cinsinden belirlendi.
6. Elde edilen lizat kullanılıncaya kadar derin dondurucuda saklandı.

3.6.2. SDS-PAGE Jelinin Hazırlanması ve Elektroforezis İşlemi

Cam tabakalar temizlenerek jel döküm standına yerleştirildi. İlgilenilen proteinin moleküler ağırlığına göre uygun konsantrasyonda ayırıcı jel çözeltisi (TnT ve TnI için %10'luk; γ H₂Ax için ise, %12'lik) hazırlandı. Ayırıcı jel bileşenleri Tablo 4'te sunuldu. Hazırlanan ayırıcı jel çözeltisi, cam tabakalar arasına dökülerek yüzeyi izopropanol ile kaplandı. Jelin polimerizasyonunu takiben jelin yüzeyindeki izopropanol döküldü ve jel yüzeyi distile su ile birkaç kez yıkandı. Bu işlemi takiben paketleyici jel çözeltisi hazırlandı. Paketleyici jel bileşenleri Tablo 5'te sunuldu. Hazırlanan paketleyici jel çözeltisi polimerleşen ayırıcı jel çözeltisi üstüne döküldü ve cam tabakalar arasına tarak yerleştirildi. Paketleyici jelin donmasının ardından taraklar çıkarıldı. Kuyucuklar yürütme tamponu (1x) ile yıkandı. Hazırlanan jel, dikey elektroforez tankına (Bio-Rad Mini) yerleştirilip tankın içine jel kasetinin yarısını geçmeyecek şekilde yürütme tamponu (1x) ilave edildi. Protein örnekleri, indirgeyici tampon (5x) ile karıştırılarak bu karışım 95 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Protein ağırlık belirteci ve örnekler kuyucuklara yüklendi.

Elektroforez için kullanılan jel başına 15-25 mAmp uygulandı. Brom fenol mavisi jelin alt ucuna varınca akım kesilerek elektroforezis işlemi sonlandırıldı.

Tablo 4. Ayırıcı jel bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Ayırıcı jel konsantrasyonu		
	%7,5	%10	%12
Distile su	4,7 ml	3,55 ml	2,45 ml
Ayırıcı jel çözeltisi	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml
%30 Akrilamid/bisakrilamid	3,75 ml	5 ml	6 ml
%10 SDS	150 µl	150 µl	150 µl
Gliserol	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
TEMED	12 µl	12 µl	12 µl
%40 APS	18 µl	18 µl	18 µl

Tablo 5. Paketleyici jel bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Miktar
Distile su	3.15 ml
Paketleyici jel çözeltisi	1.25 ml
%30 Akrilamid/bisakrilamid	0.5 ml
TEMED	6 µl
%40 APS	12 µl

3.6.3. Ayırılan Proteinlerin PVDF Membrana Transferi

Elektroforezis ile ayırılan proteinler, yarı kuru transfer sistemi (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Biorad) ile PVDF membrana transfer edildi. Bu amaçla; 6 adet Whatman filtre kağıdı 1x transfer tamponunda 5 dakika inkübe edildikten sonra transfer sistemine yerleştirildi. PVDF membran metanolde 5 dakika inkübe edilerek aktive edildi ve filtre kağıtlarının üstüne yerleştirildi. SDS-PAGE jelin ayırıcı jel tabakası, paketleyici jel tabakasından ayrılarak PVDF membranının üzerine yerleştirildi. 1x transfer tamponunda 5 dakika inkübe edilen 6 adet Whatman filtre kağıdı membranın üstüne yerleştirildi. Transfer modülünün kapağı kapatılarak 220 mAmp akımda 2 saat süreyle transfer işlemi gerçekleştirildi.

3.6.4. Antikor ile İnkübasyon

Transfer işlemini takiben, PVDF membran bloklama çözeltisinde (5 g yağsız süt tozu 100 ml TBS-T’de çözülerek hazırlandı) ile yatay çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi. Bloklama işlemi sonrası PVDF membran 3 kez 5’er dakika süreyle TBS-T solüsyonu ile yıkandı. Bu işlemi takiben PVDF membran, TBS-T’de hazırlanmış %3’lük BSA ile uygun konsantrasyonda sulandırılan birincil antikorlarla soğuk odada yatay çalkayıcıda gece boyu inkübe edildi. Çalışmada kullanılan birincil antikorların sulandırma oranları Tablo 6’da sunuldu. Bu işlemi takiben PVDF membran 3 kez 5’er dakika süreyle TBS-T solüsyonu ile yıkandı ve TBS-T’de hazırlanmış %3’lük BSA ile uygun konsantrasyonda sulandırılan birincil antikora uygun ikincil antikorla oda sıcaklığında yatay çalkayıcıda 1 saat inkübe edildi. Çalışmada kullanılan ikincil antikorlar ve sulandırma oranları Tablo 7’de sunuldu.

Tablo 6. İmmunoblotlamada kullanılan birincil antikorların spesifitesi, firma bilgileri ve dilüsyon oranları

Antikor	Klon	Firma	Dilüsyon
Troponin I Type 3 (cardiac)	tavşan pAb IgG, NBP2-20734	Novusbio	1:2500
Troponin T Type 2 (cardiac)	tavşan pAb IgG, NBP1-88070	Novusbio	1:250
γH₂Ax	tavşan pAb IgG, NBP1-19931	Novusbio	1:750
β-aktin	fare mAb IgG, NB600-501	Novusbio	1:1000

Tablo 7. İmmunoblotlamada kullanılan ikincil antikorların ürün kodu, firma bilgileri ve dilüsyon oranları

Antikor	Ürün kodu	Firma	Dilüsyon
Keçi-anti tavşan IgG-HRP	sc-2004	Santa Cruz	1:2500
Keçi-anti fare IgG-HRP	sc-2005	Santa Cruz	1:2500

3.6.5. Görüntüleme ve Analiz

İkincil antikor ile inkübasyonunun ardından PVDF membran 3 kez 5’er dakika süreyle TBS-T solüsyonu ile yıkandı. Bu işlemi takiben PVDF membran kurutma kağıdında kurutularak yıkama solüsyonu tamamen uzaklaştırıldı. Standart protein belirteçleri WesternSure Pen (LiCor) kalem ile çizildi. Daha sonra PVDF membran ECL solüsyonu ile 1-2 dakika muamele edilerek ChemiDoc-ItR2 Imager (UVP) cihazında görüntülendi ve bandların görüntüleri kaydedildi. Bu işlemin ardından PVDF membran 3

kez 5'er dakika süreyle TBS-T solüsyonu ile yıkanarak anti- β -aktin birincil antikoru ile gece boyu inkübe edildi. Daha sonra 3 kez 5'er dakika süreyle TBS-T solüsyonu ile yıkanan PVDF membran uygun ikincil antikorla 1 saat inkübe edilerek yukarıda anlatıldığı şekilde görüntülendi. Elde edilen bandlar yazılım programı ile analiz edildi.

3.7. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Kalp dokusunda TopII β geninin ifade düzeyi kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) testi ile belirlendi. Bu amaçla;

1. Kalp dokularından izole edilen total RNA'dan komplementer DNA (cDNA) sentez edildi.

2. Hedef (TopII β) ve referans (β -aktin) genin çoğaltılmasında kullanılan primer ve PCR reaksiyonunun verimliliği belirlendi. Bu amaçla; deney gruplarından rastgele seçilen bir hayvanın cDNA örneği log5 tabanında göre sulandırılarak (5^{-1} , 5^{-2} , 5^{-3} , 5^{-4} , 5^{-5}) seri dilüsyonlar hazırlandı. Hazırlanan cDNA dilüsyonları ile yapılan PCR işlemi sonucunda bulunan Threshold cycle (C_T) değerleri ile standart eğri grafiği çizilerek hedef ve referans genin verimliliği hesaplandı. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek beklenen büyüklükte ürünün çoğaltılıp çoğaltılmadığı belirlendi.

3. qPCR testi ile kalp dokusunda TopII β ve β -aktin geni ortalama C_T değerleri hesaplandı. TopII β geni ifade düzeyi, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü ile hesaplandı (Schmittgen ve Livak, 2008). PCR testinde kullanılan malzemeler Tablo 8'de sunuldu.

Tablo 8. qPCR testinde kullanılan sarf malzemeler, ürün kodu ve firma bilgileri

Ürün	Firma	Ürün Kodu
PureLink RNA mini kit	ThermoFisher Scientific	12183018A
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	M3148
2-propanol	Sigma-Aldrich	24137
Kloroform	Sigma-Aldrich	528730
Ultrapure agarose	ThermoFisher Scientific	16500500
Acetic acid	Sigma-Aldrich	A6283
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Sigma-Aldrich	E9884
GelRed Nucleic Acid Gel Stain	Biotium	41002
TrackIt™ 100 bp DNA Ladder	ThermoFisher Scientific	10488058

Tablo 8. qPCR testinde kullanılan sarf malzemeler, ürün kodu ve firma bilgileri (devamı)

6x NZYDNA loading dye	Nzytech	MB13101
MOPS (3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid)	Sigma-Aldrich	M8899
Sodium acetate trihydrate	Merck	1062651000
Formaldehyde solution	Sigma-Aldrich	252549
N,N-Dimethylformamide	Sigma-Aldrich	D4551
Diethyl pyrocarbonate	Sigma-Aldrich	D5758
Ethanol, absolute	Sigma-Aldrich	32221
Qubit RNA BR Assay Kit	ThermoFisher Scientific	Q10210
Qubit Assay Tubes	ThermoFisher Scientific	Q32856
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	ThermoFisher Scientific	4368814
TaqMan Universal Master Mix II	ThermoFisher Scientific	4368814
Actb gene expression assay	ThermoFisher Scientific	Mm02619580_g1
TopIIB gene expression assay	ThermoFisher Scientific	Mm00493776_m1

3.7.1. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu Purelink RNA mini kit (Thermo scientific, ABD) ile gerçekleştirildi. Bu amaçla;

1. Örneklerin homojenizasyonu iki aşamada gerçekleştirildi. İlk olarak sonikatör yardımıyla parçalanmış örnekler daha sonra sıvı azot ile hızlı bir şekilde dondurulup ısı blokta hızlıca çözülerek tamamen parçalandı. Bu işlemler hiç doku parçası görülmeyinceye kadar tekrarlandı.

2. Homojenat 12000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi.

3. Santrifüj sonrası süpernatant toplanarak yeni tüplere aktarıldı.

4. Süpernatantın üstüne süpernatant miktarı kadar %70’lik etanol eklenerek tüpler kısa süre vorteklendi.

5. Elde edilen karışım kolonlara yüklenip kolonlar 12000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi.

6. Kolonlar yeni santrifüj tüplerine yerleştirilip haznelerine birinci yıkama solüsyonu eklendi. Kolonlar santrifüj edildi. Kolonun altına geçen sıvı dökülerek kolonlar yeniden tüplere yerleştirildi.

7. Kolonların haznesine ikinci yıkama solüsyonu eklendi, kolonlar santrifüj edildi, altta geçen sıvı döküldü.

8. Kolonlar RNA'ların saklanacağı santrifüj tüplerine yerleştirildi, kolonun haznesine 30 µl RNase içermeyen distile su eklendi, kolonlar 2 dakika en yüksek devirde santrifüj edildi.

9. İzole edilen RNA'lar analiz edilinceye kadar derin dondurucuda saklandı.

3.7.2. RNA Kalite Kontrolü

İzole edilen total RNA miktarı, Qubit RNA broad range assay (Thermo scientific, ABD) kiti ile ölçüldü. Ölçüm işlemi her örnek için 3 kez tekrarlandı, bu üç değer ortalaması alınarak bulunan değer o örneğin derişimi olarak kaydedildi. İzole edilen RNA'ların bütünlüğü denatüre jel elektroforezi (%1.5 agaroz-formaldehid jel) ile kontrol edildi.

Her deney grubu için RNA havuzu oluşturuldu. RNA havuzu, aynı gruptaki hayvanlardan elde edilen RNA örnekleri eşit miktarlarda karıştırılarak elde edildi.

3.7.3. Komplementer DNA sentezi

Komplementer DNA sentezi High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo scientific, ABD) kiti ile üretici firmanın direktifleri takip edilerek gerçekleştirildi. cDNA sentezinde kullanılan her bir bileşen Tablo 9'da verilen miktarlarda karıştırılarak karışım hazırlandı. Kalıp olarak 1000 ng RNA kullanıldı. cDNA sentezi Tablo 10'da verilen koşullarda SimpliAmp Thermal Cyclers (Thermo scientific, ABD) cihazında gerçekleştirildi.

Tablo 9. cDNA sentezinde kullanılan malzemeler ve miktarları

Bileşenler	Miktar (µl)
10X RT buffer	2.0
25X dNTP (100 mM)	0.8
10X RT random primers	2.0
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1.0
Nucleas free water	
RNA	*
Toplam hacim	20

*: Her reaksiyon tüpünde total kalıp RNA miktarı 1000 ng olacak şekilde ayarlandı.

Tablo 10. cDNA sentez aşamaları ve bu aşamalardaki sıcaklık ve bekleme süreleri

	1.aşama (Primer bağlanması)	2.aşama (cDNA sentezi)	3.aşama (Denatürasyon)	4.aşama
Sıcaklık	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Süre	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

3.7.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Kalp dokusunda TopIIβ ve β-aktin geni ifade düzeyi qPCR testi ile belirlendi. PCR karışımı Tablo 11’de verildiği şekilde hazırlandı. PCR işlemi Tablo 12’de verilen koşullarda StepOnePlus™ Real Time PCR System (Applied biosystem, ABD) cihazında gerçekleştirildi.

Tablo 11. PCR işleminde kullanılan malzemeler ve miktarları

	Miktar (µl)	Final konsantrasyonu
TaqMan Universal Master Mix II	10.0	1X
TaqMan Assay, 20X	1.0	1X
cDNA template	1.0	50 ng
RNAse free water	9.0	-
Toplam miktar	20	-

Tablo 12. PCR aşamaları ve bu aşamalardaki sıcaklık ve bekleme süreleri

PCR (40 siklus)			
	Polimeraz aktivasyonu	Denatürasyon	Bağlanma/ Uzama
Sıcaklık (°C)	95	95	60
Süre (dk:sn)	10:00	00:15	1:00
Reaksiyon miktarı (µl)	20		

qPCR sonucunda kalp dokusu örneklerinde TopII β ve β -aktin geni ortalama C_T değerleri hesaplandı. TopII geni C_T değeri, β -aktin geni C_T değeri ile normalize edilerek bu genin ifadesi $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü ile hesaplandı (Schmittgen ve Livak, 2008).

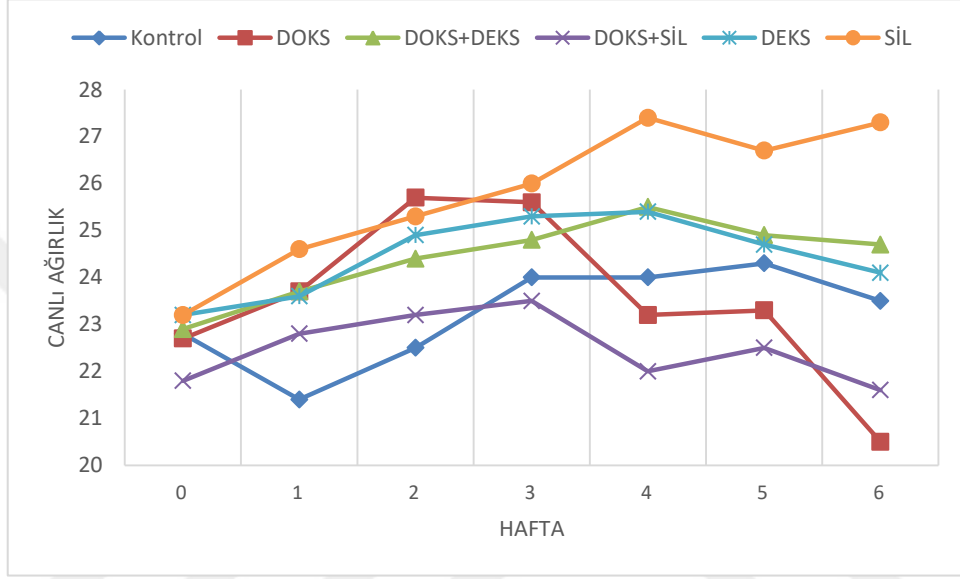
3.8. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS 22 (Inc., Chiago, II, USA) yazılımı ile analiz edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile, homojenitesi ise Levene's testi ile belirlendi. İmmunohistokimyasal incelemeler ve immunoblotlama testi sonucunda elde edilen veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi; gruplar arası istatistiksel farklılıklar post-hoc Tukey testi ile belirlendi. Deney hayvanları üzerinde yapılan uygulamaların hayvanların ortalama canlı ağırlıkları üzerine etkisi tekrarlı ölçümler için iki yönlü varyans analizi ile değerlendirildi; gruplar arası istatistiksel farklılıklar GLM prosedürlerinden post-hoc Tukey testi ile belirlendi. 0,05'ten küçük P değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Haftalara Göre Canlı Ağırlık Değişimleri

Deney süresince gruplar arası haftalık ortalama canlı ağırlık (g) değişimleri ve istatistiksel farklılıklar Şekil 16 ve Tablo 13’de ayrıntılı olarak sunuldu.



Şekil 16. Deney süresince gruplar arası haftalık ağırlık değişimleri

Gruplar arası haftalık ortalama canlı ağırlık değişimi 4. haftadan itibaren farklılık gösterdi. DOKS grubunda deneklerin ağırlıkları 3. haftadan itibaren azalmaya başladı. Bu gruptaki canlı ağırlıklar 6. haftada kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.001$). DOKS-DEKS grubunda deneklerin ağırlıkları ilk haftadan itibaren artma eğilimindeydi. Bu gruptaki canlı ağırlıklar 6. haftada DOKS grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$). DOKS-SİL grubunda deneklerin canlı ağırlıkları 4. haftadan itibaren azalma eğilimindeydi. Bu grup ile DOKS grubu arasında ortalama canlı ağırlık benzer bulundu ($p>0.05$). DEKS ve SİL grubunda deneklerin ağırlıkları ilk haftadan itibaren artma eğilimindeydi. SİL grubunda deneklerin canlı ağırlıkları 6. haftada kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

Tablo 13. Gruplar arası haftalık ağırlık değişimleri ve istatistiksel analiz

HAFTA	GRUP					
	Kontrol	DOKS	DOKS+DEKS	DOKS+SİL	DEKS	SİL
0	22,8±0,2	22,7±0,3	22,9±0,4	21,8±0,5	23,2±1,0	23,2±1,0
1	21,4±0,4	23,7±0,8	23,7±0,3	22,8±0,5	23,6±0,8	24,6±1,4
2	22,5±0,4	25,7±0,8	24,4±0,4	23,2±0,6	24,9±0,8	25,3±1,4
3	24,0±0,4	25,6±0,5	24,8±0,5	23,5±0,6	25,3±1,0	26,0±1,2
4	24,0±0,5 ^{abc}	23,2±0,6 ^{ab}	25,5±0,4 ^{bc}	22,0±0,5 ^a	25,4±1,1 ^{abc}	27,4±1,1 ^c
5	24,3±0,3 ^{abc}	23,3±0,5 ^{ab}	24,9±0,4 ^{abc}	22,5±0,3 ^a	24,7±1,2 ^{abc}	26,7±1,2 ^c
6	23,5±0,5 ^{bc}	20,5±0,7 ^a	24,7±0,4 ^{cd}	21,6±0,3 ^{ab}	24,1±1,1 ^{bcd}	27,3±1,0 ^d
P değerleri						
Zaman	<0.001					
Grup	0.001					
İnteraksiyon	<0.001					

*Aynı satırdaki farklı üst karakterler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

4.2. Makroskobik Bulgular

Nekropside; kontrol ve deney gruplarındaki hayvanlarda herhangi bir makroskobik değişikliğe rastlanmadı.

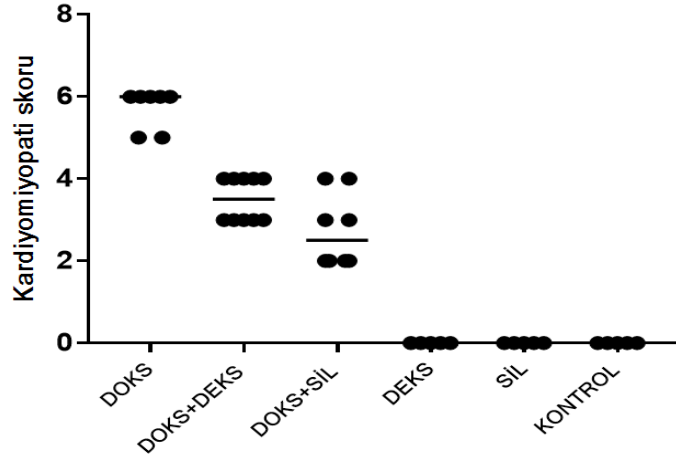
4.3. Histopatolojik Bulgular

Kontrol, SİL ve DEKS grubunda yer alan hayvanların kalp dokusunda herhangi bir histopatolojik değişikliğe rastlanmadı.

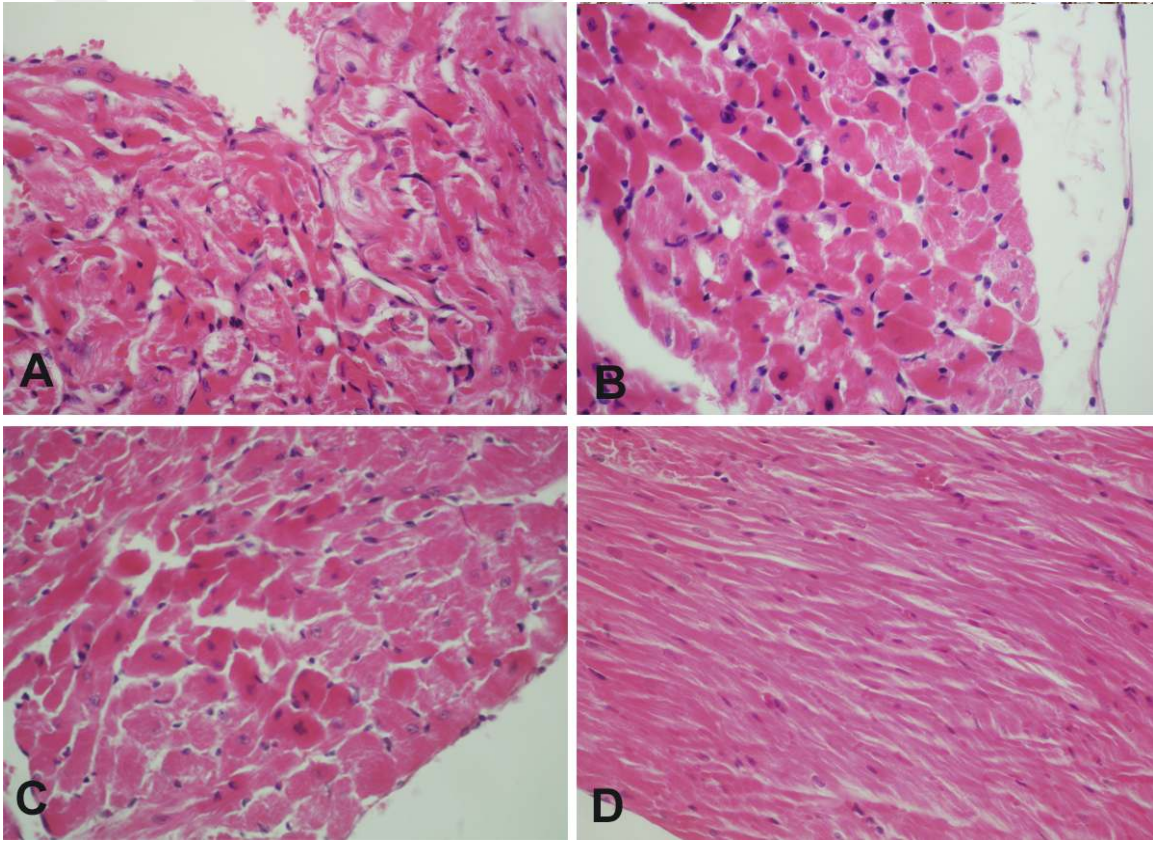
DOKS, DOKS+DEKS ve DOKS+SİL gruplarında kalp dokusunda hafiften şiddetliye değişen histopatolojik değişiklikler ile karşılaşıldı. Kalp dokusunda karşılaşılan histopatolojik değişiklikler; kardiyomiyositlerde sitoplazmik vakuolizasyon (vakuoler dejenerasyon), hiyalin dejenerasyonu ve nekrozu ve miyositolizis şeklindeydi. Sitoplazmik vakuolizasyon; kardiyomiyositlerin sitoplazmasında değişen büyüklüklerde keskin kenarlı boya almayan boşluklar şeklinde görülmekteydi. Bu değişiklik tek başına görülebilmekle birlikte çoğunlukla hiyalini değişiklik ya da miyositolizis ile birlikteydi. Hiyalin dejenerasyonu şeklinde tanımlanan değişiklikte; kas telleri enine çizgilenmelerini tamamen

kaybederek boylu boyunca homojen koyu kırmızı renkte görülmekteydi; şiddetli etkilenen nekroze olmuş kimi hücrelerin çekirdeği büzüşmüş ve hiperkromatik görünümde iken, kimi hücrelerin çekirdeği tamamen gözden silinmişti. Miyositolizis şeklinde tanımlanan değişiklikte; kardiyomiyositlerin sitoplazmaları soluk kırmızı görünümdeydi, kas telleri enine çizgilenmelerini tamamen kaybetmişti ya da güçlkle seçilebilmekteydi. Şiddetli etkilenen kardiyomiyositler şişkin görünümdeydi, çoğunlukla çekirdeğini kaybetmişti ve bu hücrelerin sitoplazmasında amorf yapılar şeklinde miyofibriler kalıntılar görülmekteydi.

DOKS grubunda kalp dokusunda karşılaşılan en belirgin histopatolojik değişiklikler; kardiyomiyositlerde sitoplazmik vakuolizasyon (vakuoler dejenerasyon), hiyalin dejenerasyonu ve nekrozu ve miyositolizis şeklindeydi (Resim 1A). Miyokardiyumda çoğunlukla diffuz dağılım gösteren bu değişikliklere özellikle sol ventrikulus ve interventriküler septumda rastlandı, sağ ventrikulus ise, belirgin olarak daha az etkilenmişti. Miyokardiyumda karşılaşılan histopatolojik değişiklikler, kardiyomiyopati skoru adı verilen skorlama sistemi ile semikantitatif olarak analiz edildiğinde; DOKS grubundaki hayvanlarında %71,4'ünde (7 hayvanın 5'inde) kardiyomiyopati skoru 6 iken, %28,6'sında 5 olarak belirlendi. DOKS+DEKS ve DOKS+SİL gruplarında karşılaşılan en belirgin histopatolojik değişiklikler; kardiyomiyositlerde sitoplazmik vakuolizasyon ve hiyalin dejenerasyonu şeklindeydi (Resim 1B-C). Bu değişikliklerin yaygınlığı iki grup arasında farklılık göstermekteydi; DOKS+DEKS grubunda bu değişikliklere miyokardiyumda çoğunlukla fokal alanlar şeklinde rastlanırken, DOKS+SİL grubunda endokardiyum ve epikardiyumun hemen altındaki tek tük kas tellerinde rastlandı. DOKS+DEKS grubundaki hayvanların %50'sinde (10 hayvanın 5'inde) kardiyomiyopati skoru 4 iken, %50'sinde 3 idi. DOKS+SİL grubundaki hayvanların %25'inde (8 hayvanın 2'sinde) kardiyomiyopati skoru 4, %25'inde kardiyomiyopati skoru 3, %50'sinde ise kardiyomiyopati skoru 2 idi (şekil 17).



Şekil 17. Deney gruplarında karşılaşılan histopatolojik değişikliklerin semikantitatif analizi.



Resim 1. Deney gruplarında kalp dokusunda karşılaşılan histopatolojik değişiklikler. Hematoksilen-eozin. **A.** DOKS grubu, Kardiyomiyositlerde yaygın (vakuoler dejenerasyon), hiyalin dejenerasyonu ve nekrozu ve miyositolizis, **B.** DOKS-DEKS grubu, miyokardiyumda fokal alanlar şeklinde olmak üzere kardiyomiyositlerde hiyalin dejenerasyonu ve nekrozu, **C.** DOKS-SİL grubu, endokardiyumun hemen altındaki az sayıda kas telinde hiyalin dejenerasyonu ve nekrozu. **D.** Kontrol grubu. 40x.

4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

Deney gruplarında TnT, TnI, γ H₂Ax ve TopII β immünoaktivitesi ile gruplar arası istatistiksel farklılıklar Tablo 14’te sunuldu.

Tablo 14. Kalp dokusunda TnT, TnI, γ H₂Ax ve TopII β immünoaktivitesi ile gruplar arası istatistiksel farklılıklar

GRUP	TnT	TnI	γ H ₂ Ax	TopII β
Kontrol	90,0 $\pm$ 3,5 ^c	90 $\pm$ 3,5 ^c	4,0 $\pm$ 0,1 ^c	6,1 $\pm$ 0,1 ^c
DOKS	40,0 $\pm$ 4,0 ^a	40 $\pm$ 4,0 ^a	7,0 $\pm$ 0,1 ^a	6,8 $\pm$ 0,1 ^a
DOKS+DEKS	68,5 $\pm$ 3,1 ^b	65,5 $\pm$ 3,6 ^b	6,0 $\pm$ 0,1 ^b	5,3 $\pm$ 0,1 ^b
DOKS+SİL	74,3 $\pm$ 3,1 ^b	70,6 $\pm$ 4,1 ^b	4,8 $\pm$ 0,1 ^c	5,9 $\pm$ 0,1 ^c
DEKS	90,0 $\pm$ 5,0 ^c	90 $\pm$ 3,5 ^c	4,8 $\pm$ 0,1 ^c	4,0 $\pm$ 0,1 ^d
SİL	96,0 $\pm$ 4,1 ^c	95 $\pm$ 5,0 ^c	4,3 $\pm$ 0,1 ^d	4,2 $\pm$ 0,1 ^d
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

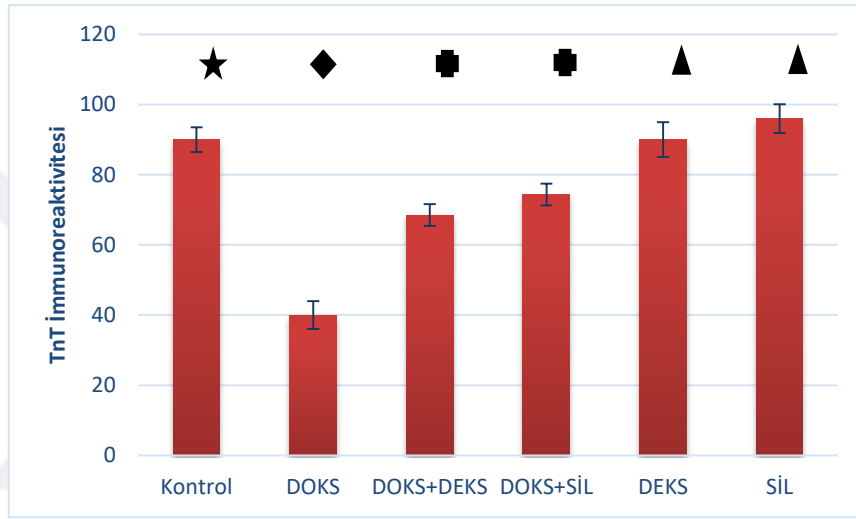
*Aynı sütundaki farklı üst karakterler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

†P: Bu değer tek yönlü varyans analizinden elde edilen değeri ifade etmektedir.

4.4.1. Kalp Dokusunda Troponin T İmmünoaktivitesi

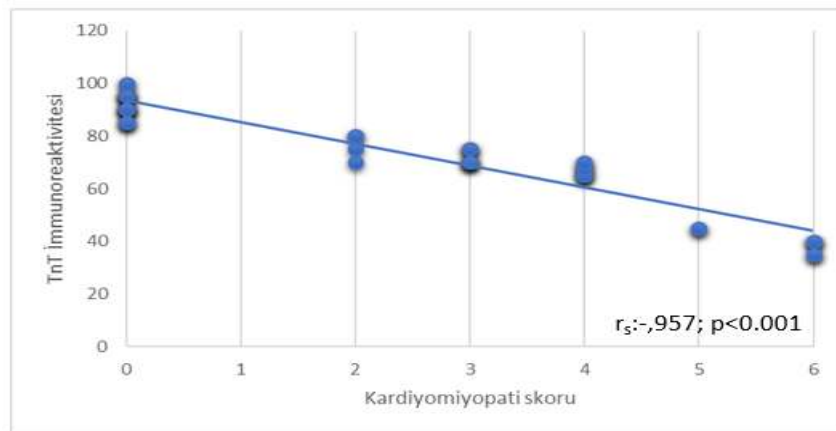
Deney gruplarında TnT immünoaktivitesi ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar Şekil 18’de sunuldu. Kardiyak miyositler dışında kalbin diğer hücrelerinde (kan damarları, kapakçıklar, adipositler) TnT immünoaktivitesine rastlanmadı. DOKS grubunda TnT immünoaktivitesi kontrol grubuna göre belirgin olarak daha az idi ($p < 0,001$). HE ile boyanan kesitlerde hiyalin dejenerasyonu ve miyositolizis şeklinde histopatolojik değişikliklerin görüldüğü kardiyomiyositlerin tamamına yakınında TnT immünoaktivitesinin zayıf olduğu, çok azında ise TnT immünoaktivitesinin tamamen kaybolduğu görüldü. Bu durum miyokardiyumda alacalı bir TnT immünoaktivitesi şeklinde göze çarpmaktaydı (Resim 2A). Üstelik, histopatolojik olarak herhangi bir değişikliğin görülmediği kimi kardiyak miyositlerde de TnT immünoaktivitesinin azaldığı dikkati çekti. DOKS-SİL ve DOKS-DEKS gruplarında TnT kayıpları DOKS grubuna göre belirgin olarak daha az idi (Resim 2B-C), diğer bir deyişle DOKS-SİL ve DOKS-DEKS gruplarında TnT immünoaktivitesi DOKS grubuna göre daha fazla idi ($p < 0,001$). DOKS-SİL ve DOKS-DEKS grupları TnT immünoaktivitesi bakımından karşılaştırıldığında ise, DOKS-SİL grubunda TnT immünoaktivitesinin DOKS-DEKS’e göre daha fazla olduğu belirlendi ($p < 0,05$). SİL grubunda kardiyomiyositlerin tamamına

yakınında yoğun TnT immunoreaktivitesi görüldü (Resim 3D). Kontrol ve DEKS grubunda endokardiyum ve epikardiyumun hemen altındaki kimi kardiyak miyositlerde TnT kayıpları görüldü. TnT kayıplarının görüldüğü bu hücrelerde histopatolojik olarak herhangi bir değişikliğe rastlanmadı. Kontrol, DEKS ve SİL grupları arasında TnT immunoreaktivitesi bakımından istatistiksel olarak farklılık yoktu ($p>0,05$). Kalp dokusunda TnT immunoreaktivitesi ile kardiyomiyopati skoru arasında negatif bir korelasyonun olduğu ($r_s:-,957$; $p<0.001$), kardiyomiyopati skoru arttıkça TnT immunoreaktivitesinin ters orantılı bir şekilde azaldığı ortaya kondu (Şekil 19).

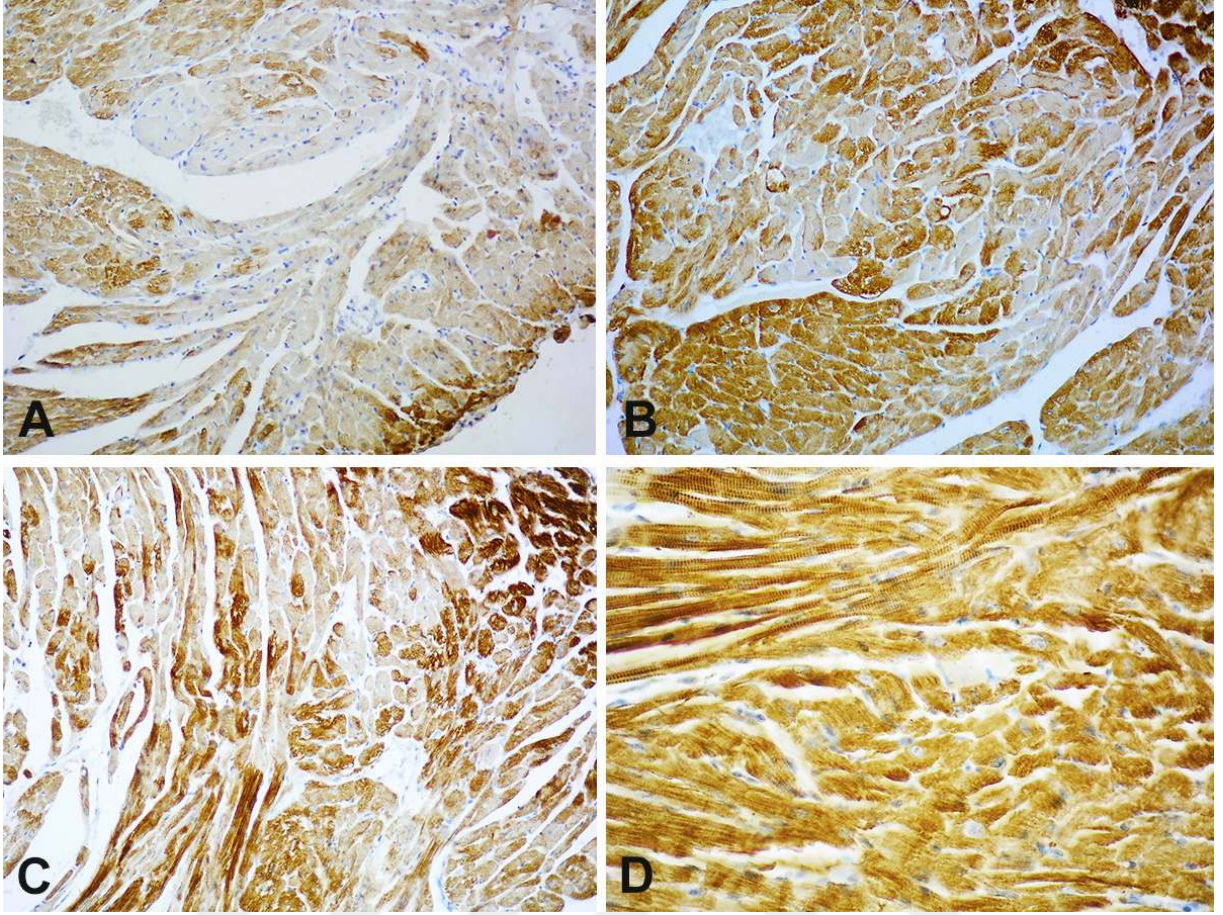


*Sütunların üstündeki farklı işaretler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

Şekil 18. Deney gruplarında TnT immunoreaktivitesi ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar



Şekil 19. Kalp dokusunda TnT immunoreaktivitesi ile kardiyomiyopati skoru arasındaki korelasyon

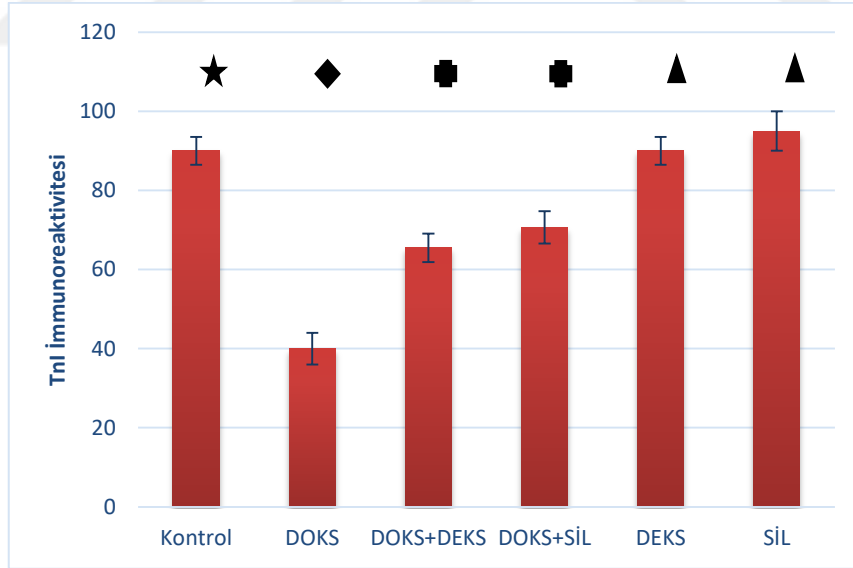


Resim 2. Kalp dokusunda TnT immunoreaktivitesi, Polimer metot. **A.** Kardiyomiyositlerin tamamına yakınında TnT immunoreaktivitesinde belirgin azalma, DOKS grubu. **B.** DOKS grubu ile karşılaştırıldığında kardiyomiyositlerdeki TnT kaybının belirgin olarak daha az olduğu görülmekte, DOKS-SİL grubu, **C.** DOKS-DEKS grubu, **D.** Kardiyomiyositlerin tamamına yakınında yoğun TnT immunoreaktivitesi, SİL grubu. 20x.

4.4.2. Kalp Dokusunda Troponin I İmmunoreaktivitesi

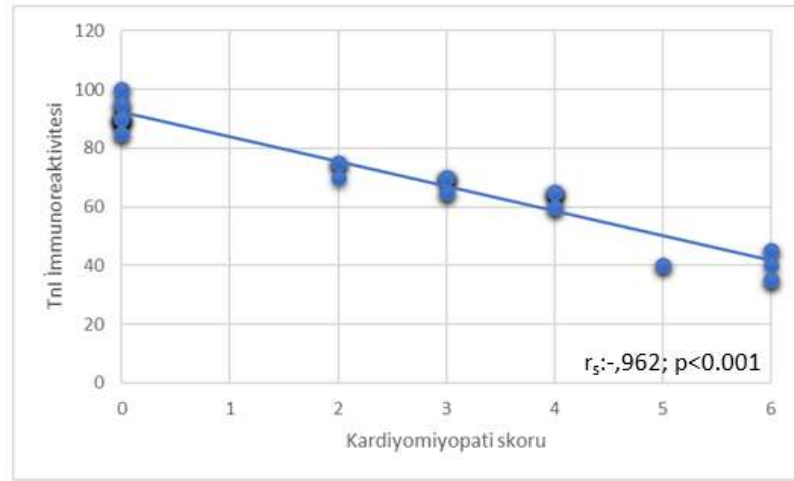
Deney gruplarında TnI immunoreaktivitesi ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar Şekil 20’de sunuldu. Kardiyak miyositler dışında kalbin diğer hücrelerinde (kan damarları, kapakçıklar, adipositler) TnI immunoreaktivitesine rastlanmadı. DOKS grubunda TnI immunoreaktivitesi kontrol grubuna göre belirgin olarak daha az idi ($p<0.001$). HE ile boyanan kesitlerde hiyalin dejenerasyonu ve miyositolizis şeklinde histopatolojik değişikliklerin görüldüğü kardiyomiyositlerin tamamına yakınında TnI immunoreaktivitesinin zayıf olduğu, çok azında ise TnI immunoreaktivitesinin tamamen kaybolduğu görüldü. Bu durum miyokardiyumda alacalı bir TnI immunoreaktivitesi

şeklinde göze çarpmaktaydı (Resim 3A). Üstelik, histopatolojik olarak herhangi bir değişikliğin görülmediği kimi kardiyak miyositlerde de TnI immünoreaktivitesinin azaldığı dikkati çekti. DOKS-SİL ve DOKS-DEKS gruplarında TnI kayıpları DOKS grubuna göre belirgin olarak daha az idi (Resim 3B-C), diğer bir deyişle DOKS-SİL ve DOKS-DEKS gruplarında TnI immünoreaktivitesi DOKS grubuna göre daha fazla idi ($p<0,001$). DOKS-SİL ve DOKS-DEKS grupları TnI immünoreaktivitesi bakımından karşılaştırıldığında ise, DOKS-SİL ve DOKS-DEKS grupları arasında TnI immünoreaktivitesi bakımından istatistiksel olarak bir farklılığın olmadığı belirlendi ($p>0,05$). SİL grubunda kardiyomiyositlerin tamamına yakınında yoğun TnI immünoreaktivitesi görüldü (Resim 3D). Kontrol ve DEKS grubunda ise, endokardiyum ve epikardiyumun hemen altındaki kimi kardiyak miyositlerde TnI kayıpları görüldü. TnI kayıplarının görüldüğü bu hücrelerde histopatolojik olarak herhangi bir değişikliğe rastlanmadı. Kontrol, DEKS ve SİL grupları arasında TnI immünoreaktivitesi bakımından istatistiksel olarak farklılık yoktu ($p>0,05$). Kalp dokusunda TnI immünoreaktivitesi ile kardiyomiyopati skoru arasında negatif bir korelasyonun olduğu ($rs: -,962$; $p<0,001$), yani kardiyomiyopati skoru arttıkça TnI immünoreaktivitesinin ters orantılı bir şekilde azaldığı ortaya kondu (Şekil 21).

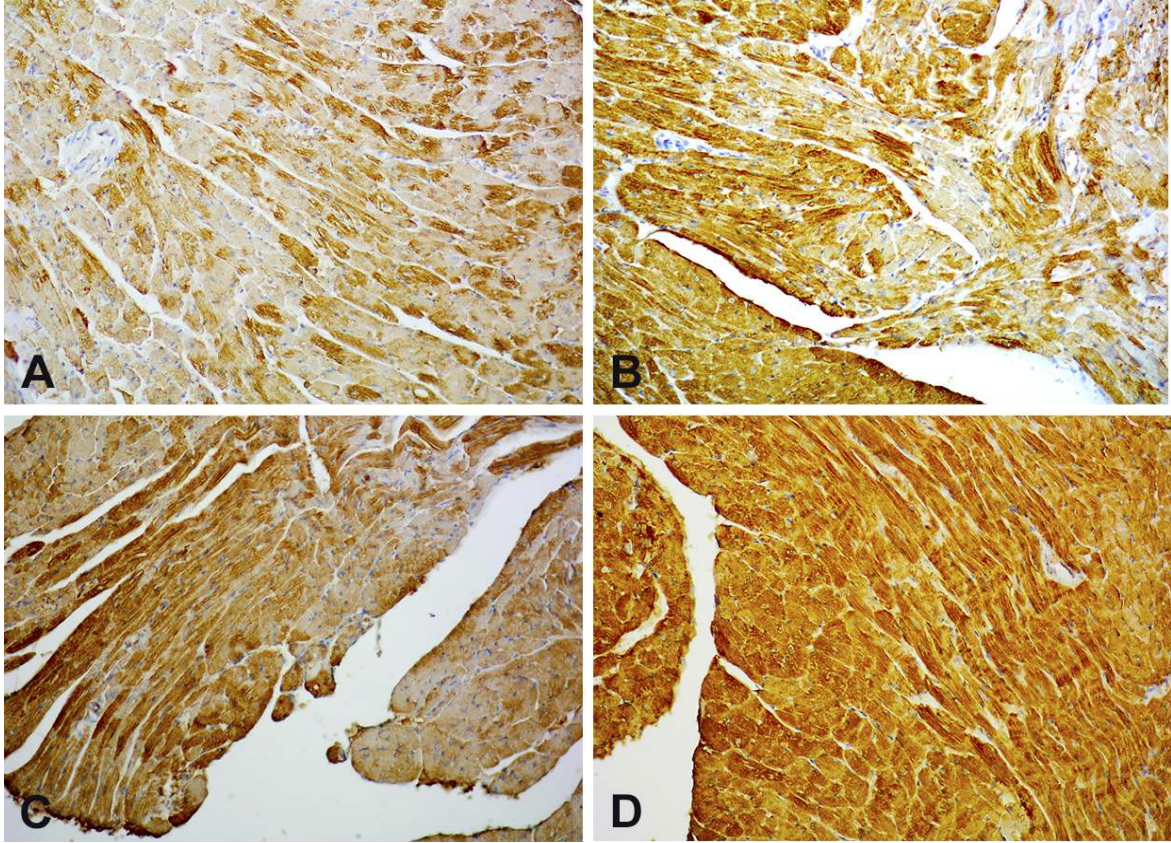


*Sütunların üstündeki farklı işaretler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

Şekil 20. Deney gruplarında TnI immünoreaktivitesi ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar



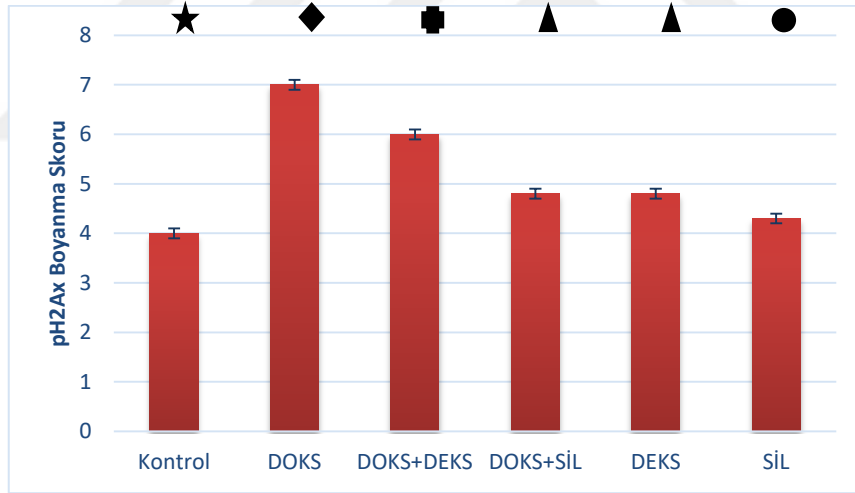
Şekil 21. Kalp dokusunda TnI immunoreaktivitesi ile kardiyomiyopati skoru arasındaki korelasyon



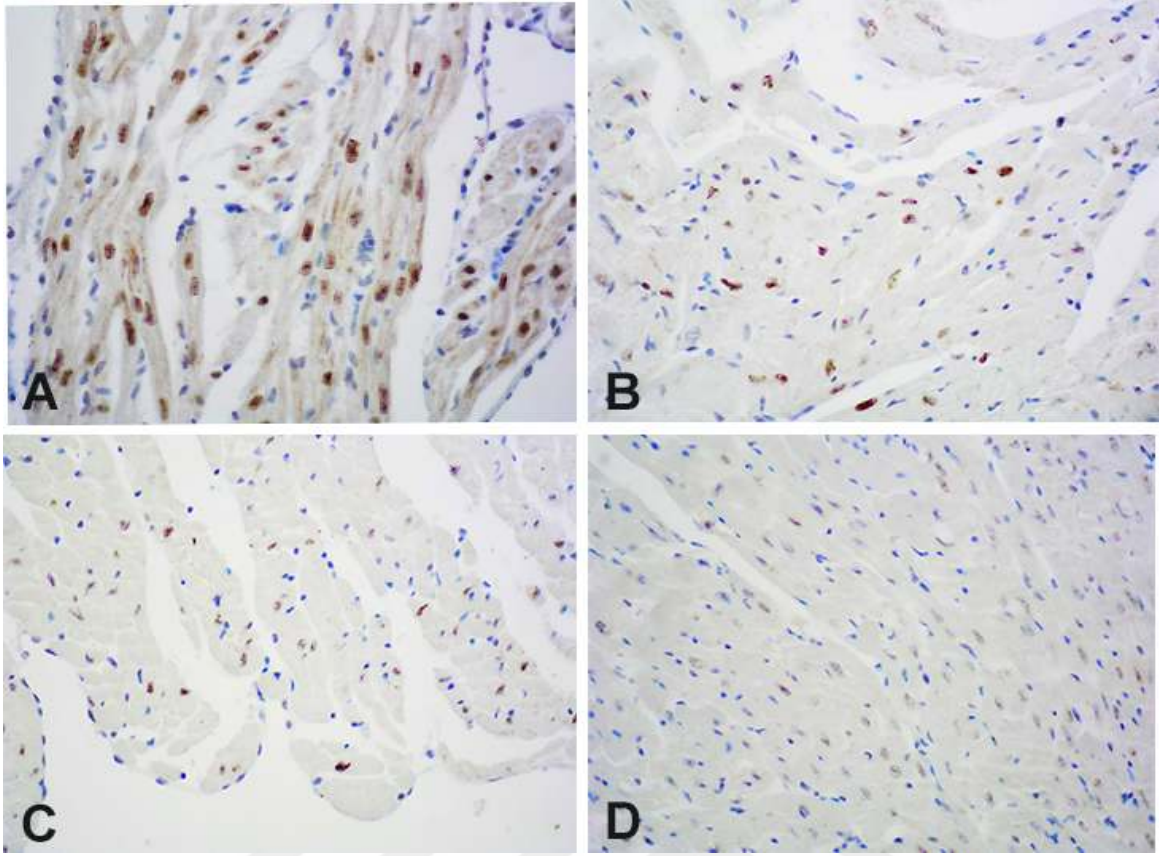
Resim 3. Kalp dokusunda TnI immunoreaktivitesi, Polimer metot. **A.** Kardiyomiyositlerin tamamına yakınında TnI immunoreaktivitesinde belirgin azalma, DOKS grubu. **B.** DOKS grubu ile karşılaştırıldığında kardiyomiyositlerdeki TnI kaybının belirgin olarak daha az olduğu görülmekte, DOKS-DEKS grubu, **C.** DOKS-SİL grubu, **D.** Kardiyomiyositlerin tamamına yakınında yoğun TnI immunoreaktivitesi, SİL grubu. 20x.

4.4.3. Kalp Dokusunda $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ İmmunoreaktivitesi

Deney gruplarında $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ immunoreaktivitesi ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar Şekil 22’de sunuldu. Kalp dokusunda $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ boyanma skoru Allred skorlama sistemi ile semikantatif olarak değerlendirildiğinde; DOKS grubunda $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ boyanma skorunun diğer tüm gruplara göre belirgin olarak fazla olduğu belirlendi ($p<0.001$) (Resim 4A). Boyanma skoru incelenen alanlarda değişmekle birlikte $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ immunopozitif reaksiyonlar kalbi oluşturan tüm hücre tiplerinde görüldü. HE ile boyanan kesitlerde hiyalin dejenerasyonu ve miyositolizis şeklinde histopatolojik değişikliklerin görüldüğü kardiyomiyositlerde $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ ’in boyanma yoğunluğunun arttığı belirlendi. Ayrıca, histopatolojik olarak herhangi bir değişikliğin görülmediği kimi kardiyak miyositlerde de $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ ’in boyanma yoğunluğu arttığı saptandı. DOKS-DEKS ve DOKS-SİL gruplarında $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ boyanma skorunun DOKS grubuna göre belirgin olarak daha az olduğu belirlendi ($p<0.001$) (Resim 4B-C). DOKS-SİL grubunda $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ boyanma skoru DOKS-DEKS grubuna göre belirgin olarak daha az idi ($p<0.001$).



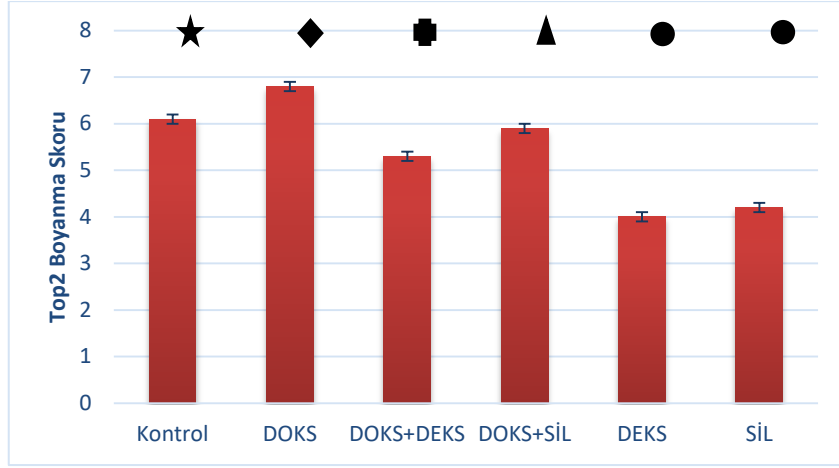
Şekil 22. Deney gruplarında $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ boyanma skoru ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar



Resim 4. Kalp dokusunda $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ immunoreaktivitesi, Polimer metot, **A.** Kardiyomiyositlerin tamamına yakınında yoğun $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ immunreaktivitesi, DOKS grubu, **B.** DOKS grubu ile karşılaştırıldığında, $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ immunopozitif kardiyomiyositlerin hem sayısında hem de boyanma yoğunluğunda azalma, DOKS-DEKS grubu, **C.** DOKS-SİL grubu, **D.** Kardiyomiyositlerin çok azında hafif $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ immunoreaktivitesi, Kontrol grubu, 40x

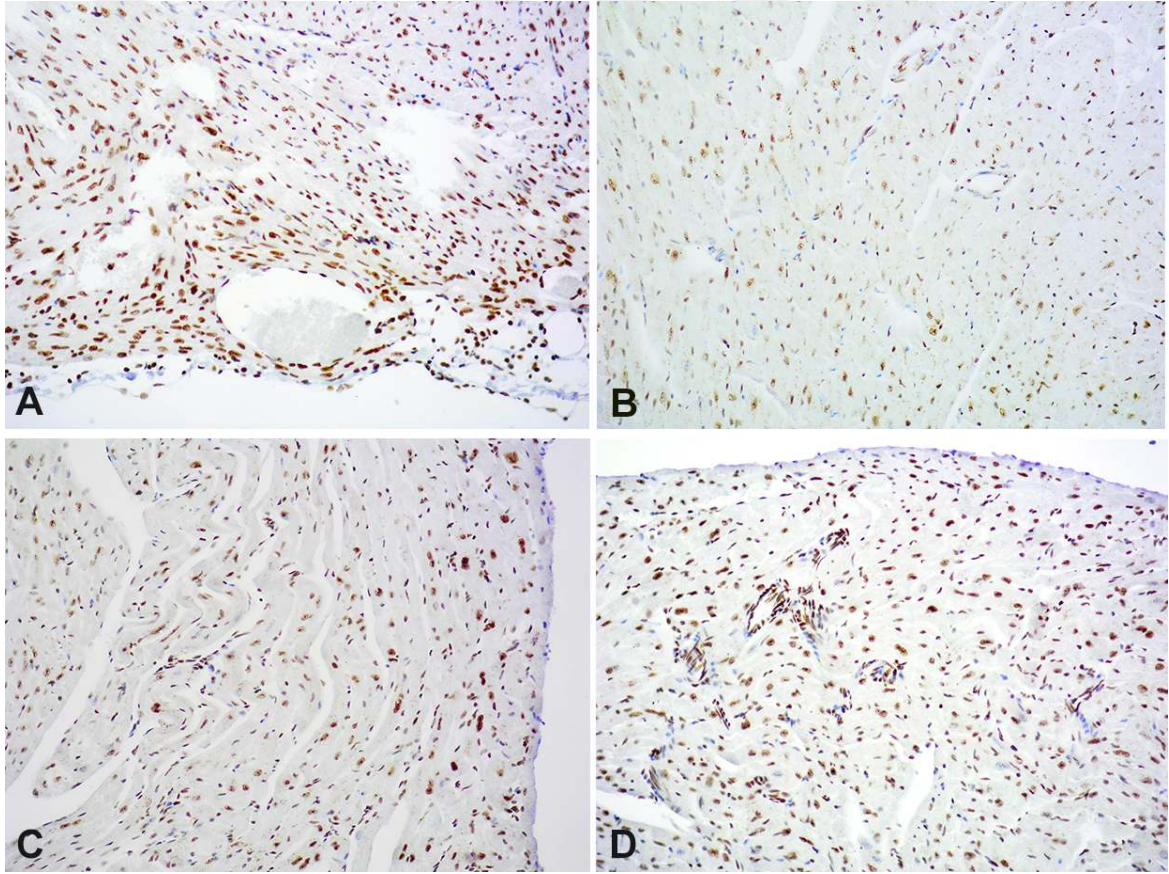
4.4.4. Kalp Dokusunda TopII β İmmunoreaktivitesi

Deney gruplarında TopII β immunoreaktivitesi ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar Şekil 23'te sunuldu. Kalp dokusunda TopII β boyanma skoru Allred skorlama sistemi ile semikantatif olarak değerlendirildiğinde; SİL ve DEKS grubunda TopII β boyanma skorunun kontrol grubuna göre belirgin olarak daha az olduğu belirlendi ($p < 0,001$). SİL ve DEKS grubu arasında TopII β boyanma skoru bakımından istatistiksel olarak bir farklılığın olmadığı belirlendi ($p > 0,05$). DOKS-DEKS ve DOKS-SİL gruplarında TopII β boyanma skoru DOKS grubuna göre belirgin olarak daha az idi ($p < 0,001$) (Resim 5B-C). DOKS-DEKS grubunda TopII β boyanma skorunun DOKS-SİL grubuna göre daha az olduğu, bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0,001$).



*Sütunların üstündeki farklı işaretler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

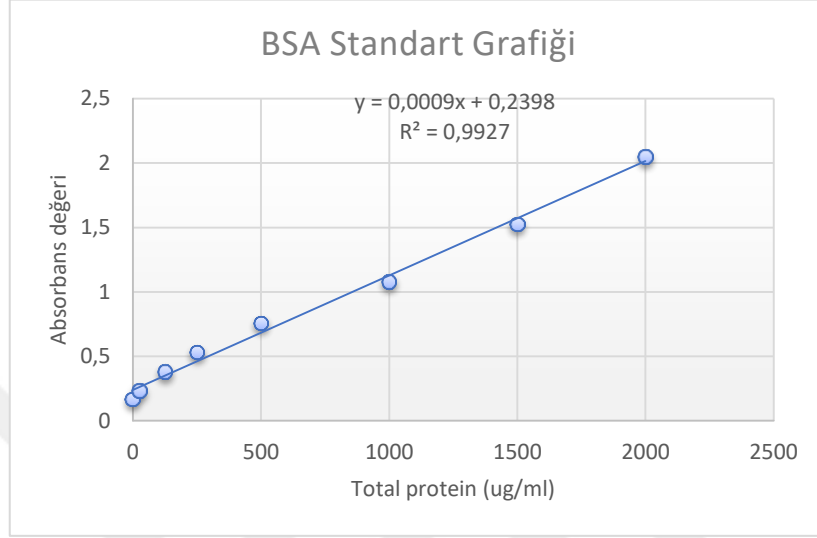
Şekil 23. Deney gruplarında TopII β boyanma skoru ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar



Resim 5. Kalp dokusunda TopII β immunoreaktivitesi, Polimer metot, **A.** Kardiyomiyositlerin tamamına yakınında yoğun γ H₂Ax immunreaktivitesi, DOKS grubu, **B.** Kontrol grubu (D) ile karşılaştırıldığında, TopII β immunopozitif kardiyomiyositlerin hem sayısında hem de boyanma yoğunluğunda azalma, DOKS-DEKS grubu, **C.** DOKS-SİL, **D.** Kontrol grubu, 20x

4.5. İmmunoblotlama Sonuçları

Kalp dokusu örneklerindeki total protein miktarı, protein miktarı bilinen BSA standartlarının absorbans değerleri kullanılarak elde edilen $y=mx+b$ denklemi ile hesaplandı. BSA standartlarının absorbans değerleri ile $y=mx+b$ denklemi Şekil 24'te sunuldu.



Şekil 24. BSA standartlarının absorbans değerleri ve bu değerler ile hesaplanan $y=mx+b$ denklemi

Kalp dokusu örneklerinde TnT, TnI ve $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ ifade düzeyleri ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar Tablo 15'te sunuldu.

Tablo 15. Kalp dokusu örneklerinde TnT, TnI ve $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ ifade düzeyleri ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar

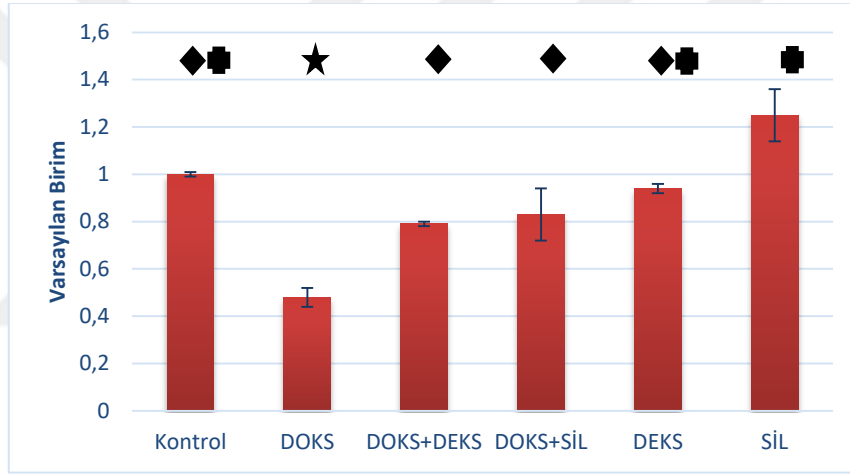
GRUP	Varsayılan birim (Arbitrary unit)		
	TnT	TnI	$\gamma\text{H}_2\text{Ax}$
Kontrol	$0,7 \pm 0,02^b$	$1,00 \pm 0,03^{bc}$	$0,50 \pm 0,01^d$
DOKS	$0,31 \pm 0,01^a$	$0,48 \pm 0,11^a$	$0,97 \pm 0,05^a$
DOKS+DEKS	$0,69 \pm 0,0^b$	$0,79 \pm 0,03^b$	$0,80 \pm 0,02^b$
DOKS+SİL	$0,73 \pm 0,12^{bc}$	$0,83 \pm 0,31^b$	$0,61 \pm 0,03^c$
DEKS	$0,88 \pm 0,05^c$	$0,94 \pm 0,06^{bc}$	$0,61 \pm 0,04^c$
SİL	$1,22 \pm 0,12^d$	$1,25 \pm 0,26^c$	$0,53 \pm 0,04^d$
P	<0.001	<0.001	<0.001

*Aynı sütundaki farklı üst karakterler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

†P: Bu değer, tek yönlü varyans analizinden elde edilen değeri ifade etmektedir.

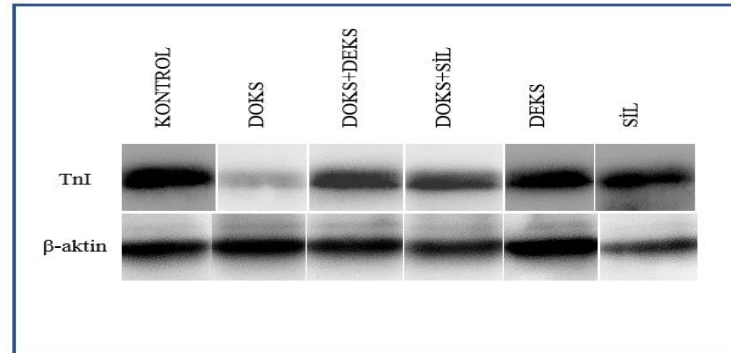
4.5.1. Kalp Dokusu Örneklerinde Troponin I İfade Düzeyi

Deney gruplarında TnI ifade düzeyleri ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar Şekil 25'te sunuldu. Deney grupları TnI ifade düzeyi bakımından karşılaştırıldığında; DOKS grubunda TnI ifade düzeyinin kontrol grubuna kıyasla belirgin olarak azaldığı belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 26). DOKS-SİL ve DOKS-DEKS gruplarında TnI ifade düzeyi DOKS grubuna göre belirgin olarak daha fazla idi ($p<0,05$). DOKS-SİL grubu ile DOKS-DEKS grubu arasında TnI ifade düzeyi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı belirlendi ($p>0,05$). SİL grubunda TnI ifade düzeyi kontrol ve DEKS gruplarına göre oldukça fazla idi, buna karşın bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$). DEKS grubu ile kontrol grubu arasında TnI ifade düzeyi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0,05$).



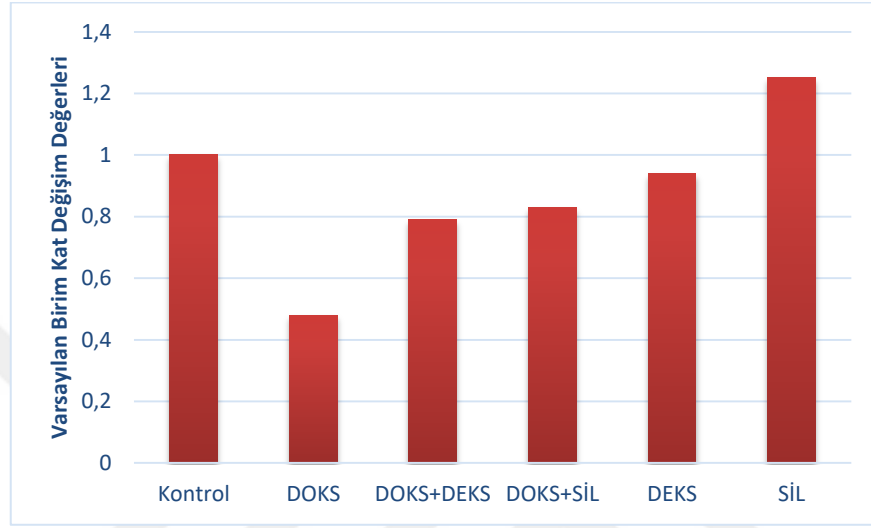
*Sütunların üstündeki farklı işaretler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

Şekil 25. Deney gruplarında TnI ifade düzeyleri ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar



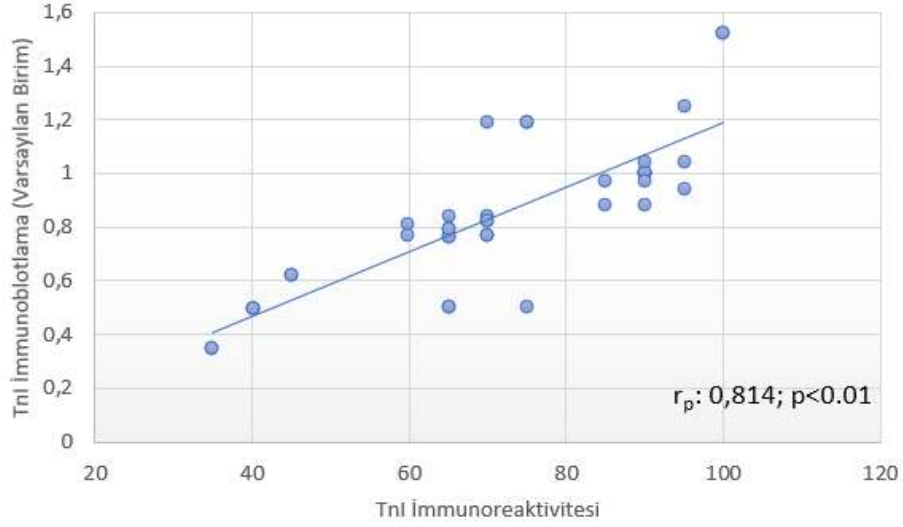
Şekil 26. Kalp dokusu örneklerinde TnI ifade düzeyleri. İmmunoblotlama yöntemi. Endojen kontrol olarak kullanılan β-aktinin tüm gruplarda eşit düzeyde ifade edildiği görülmektedir.

Deney grupları TnI ifade düzeyi bakımından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Şekil 27); DOKS, DOKS-DEKS ve DOKS-SİL gruplarında TnI ifade düzeyinin kontrol grubuna göre sırasıyla 2.08, 1.26 ve 1.2 kat azaldığı saptandı. DEKS grubu ile kontrol grubu arasında TnI ifade düzeyi bakımından farklılık hemen hemen yok denecek kadar azdı. SİL grubunda ise, TnI ifade düzeyinin kontrol grubuna göre 1.25 kat arttığı belirlendi.



Şekil 27. Deney gruplarında TnI ifade düzeylerinin kontrol grubuna göre kat değişim değerleri

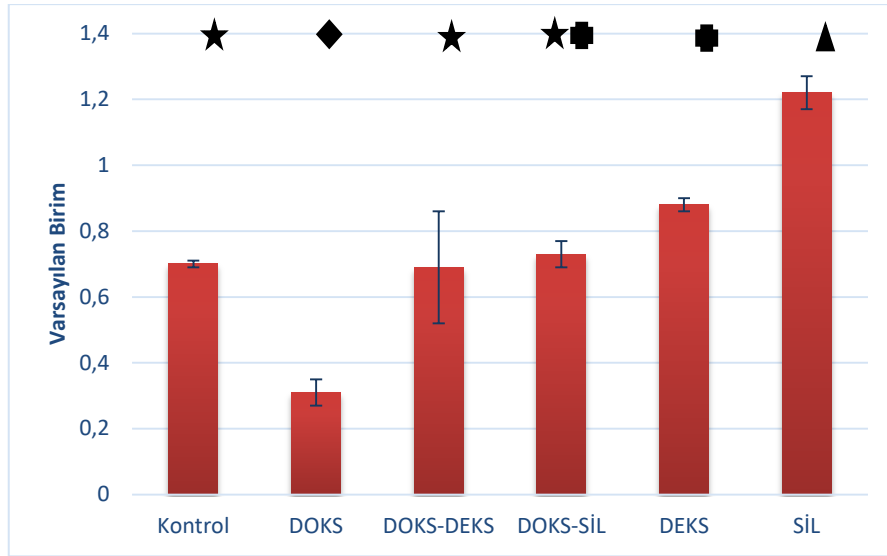
Kalp dokusu örneklerinde TnI ifade düzeyi immunohistokimyasal ve immunoblotlama yöntemleri ile belirlendi. Elde edilen veriler Pearson korelasyon testi ile analiz edildiğinde; immunohistokimyasal olarak elde edilen veriler ile immunoblotlama yöntemi ile elde edilen veriler arasında pozitif korelasyonun bulunduğu (Şekil 28), diğer bir deyişle kalp doku örneklerinde TnI immunoreaktivitesi azaldıkça immunoblotlama yöntemi ile saptanan TnI ifade düzeyinin de doğru orantılı olarak azaldığı ortaya kondu.



Şekil 28. Kalp dokusu örneklerinde TnI immunoreaktivitesi ile TnI immunoblotlama sonuçları arasındaki korelasyon

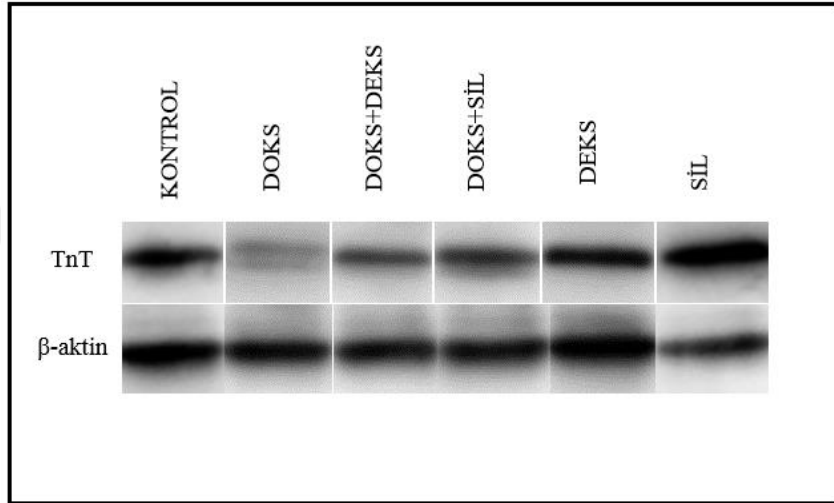
4.5.2. Kalp Dokusu Örneklerinde Troponin T İfade Düzeyi

Deney gruplarında TnT ifade düzeyleri ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar Şekil 29’da sunuldu. Deney grupları TnT ifade düzeyi bakımından karşılaştırıldığında; DOKS grubunda TnT ifade düzeyinin kontrol grubuna kıyasla oldukça azaldığı belirlendi ($p<0,001$) (Şekil 30). DOKS-SİL ve DOKS-DEKS gruplarında TnT ifade düzeyi DOKS grubuna göre belirgin olarak daha fazla idi ($p<0,05$). DOKS-SİL grubu ile DOKS-DEKS grubu arasında TnT ifade düzeyi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı belirlendi ($p>0,05$). SİL ve DEKS gruplarında TnT ifade düzeyi kontrol grubuna göre daha fazla idi ($p<0,01$). SİL grubunda TnT ifade düzeyinin DEKS grubuna göre belirgin olarak daha fazla olduğu saptandı.



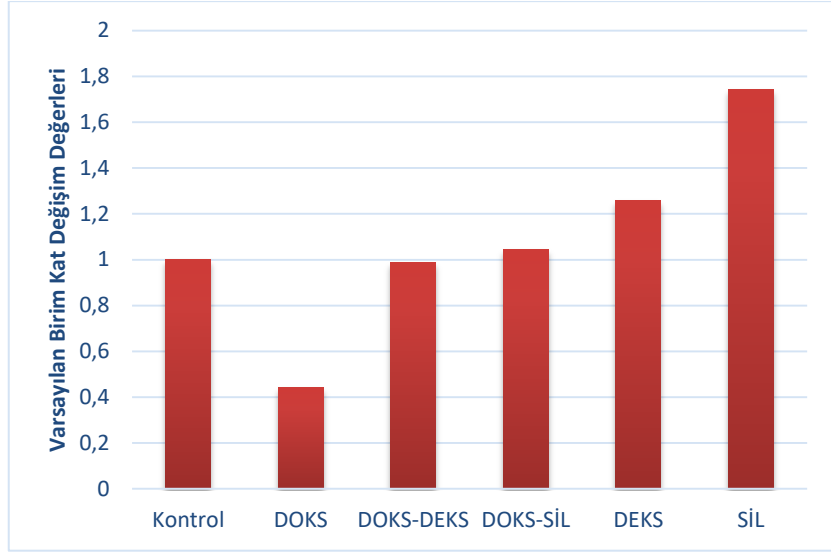
*Sütunların üstündeki farklı işaretler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

Şekil 29. Deney gruplarında TnT ifade düzeyleri ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar



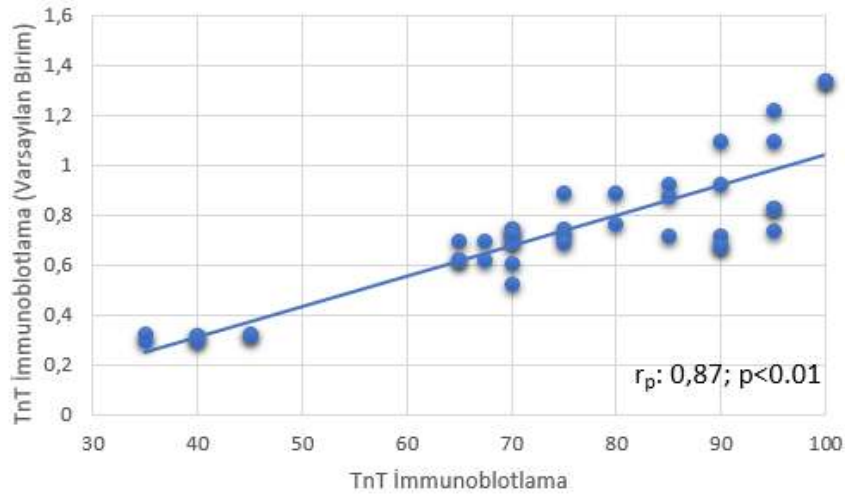
Şekil 30. Kalp doku örneklerinde TnT ifade düzeyleri. İmmunoblotlama yöntemi. Endojen kontrol olarak kullanılan β-aktinin tüm gruplarda eşit düzeyde ifade edildiği görülmektedir.

Kalp dokusu örneklerinde TnT ifade düzeyi immunoblotlama yöntemi ile değerlendirildiğinde (Şekil 31); DOKS grubunda TnT ifade düzeyinin kontrol grubuna göre 2.25 kat azaldığı belirlendi. DEKS ve SİL gruplarında TnT ifade düzeyi kontrol grubuna göre sırasıyla 1.26 ve 1.74 kat daha fazla idi.



Şekil 31. Deney gruplarında TnT ifade düzeylerinin kontrol grubuna göre kat değişim değerleri

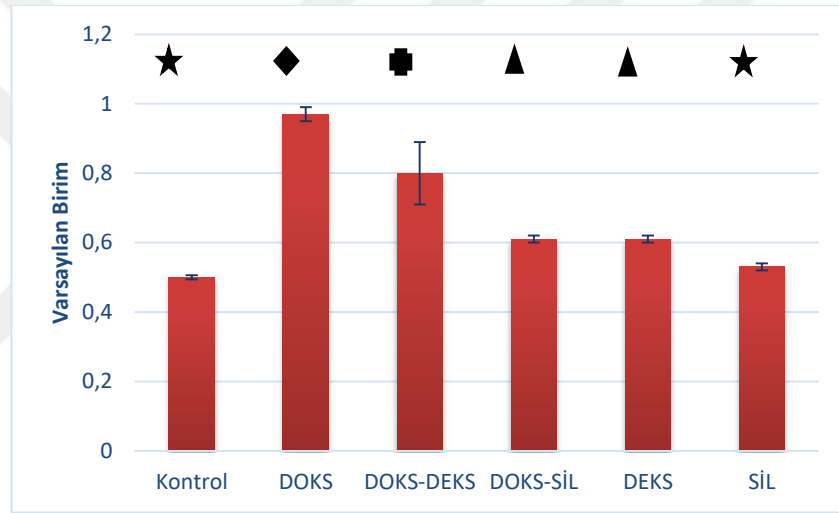
Kalp dokusu örneklerinde TnT ifade düzeyi immunohistokimyasal ve immunoblotlama yöntemleri ile belirlendi. Elde edilen veriler Pearson korelasyon testi ile analiz edildiğinde; immunohistokimyasal olarak elde edilen veriler ile immunoblotlama yöntemi ile elde edilen veriler arasında pozitif korelasyonun bulunduğu (Şekil 32), diğer bir deyişle kalp doku örneklerinde TnT immunoreaktivitesi azaldıkça immunoblotlama yöntemi ile saptanan TnT ifade düzeyinin de doğru orantılı olarak azaldığı ortaya kondu.



Şekil 32. Kalp dokusu örneklerinde TnT immunoreaktivitesi ile TnT immunoblotlama sonuçları arasındaki korelasyon

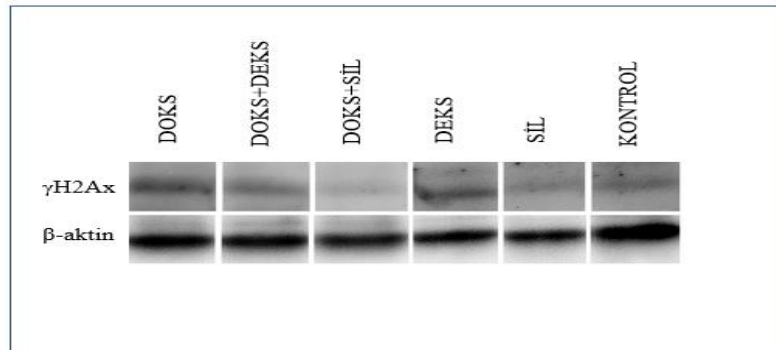
4.5.3. Kalp Dokusu Örneklerinde $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ İfade Düzeyi

Deney gruplarında $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ ifade düzeyleri ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar Şekil 33’de sunuldu. Deney grupları $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ ifade düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında; DOKS grubunda $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ ifade düzeyinin kontrol grubuna kıyasla belirgin olarak daha fazla olduğu belirlendi ($p<0,001$). DOKS-DEKS ve DOKS-SİL gruplarında $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ ifade düzeyinin DOKS grubuna göre belirgin olarak daha az olduğu belirlendi ($p<0,001$). DOKS-SİL grubunda $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ ifade düzeyi DOKS-DEKS grubuna göre belirgin olarak daha az idi ($p<0,001$). DEKS grubunda $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ ifadesi kontrol grubuna göre daha fazla iken ($p<0,05$), SİL grubu ile kontrol grubu arasında $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ ifadesi bakımından bir farklılığın olmadığı belirlendi ($p>0,05$).



*Sütunların üstündeki farklı işaretler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

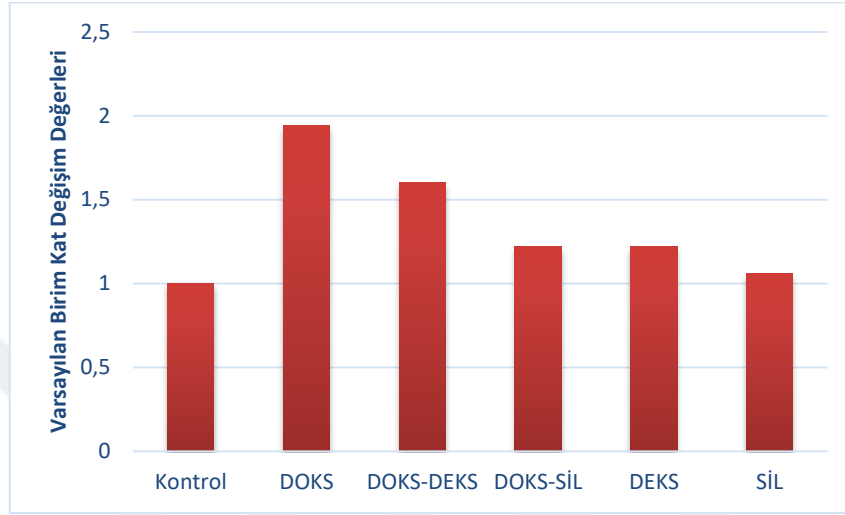
Şekil 33. Deney gruplarında $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ ifade düzeyleri ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar



Şekil 34. Kalp dokusu örneklerinde $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ ifade düzeyleri. İmmunoblotlama yöntemi.

Endojen kontrol olarak kullanılan β -aktinin tüm gruplarda eşit düzeyde ifade edildiği görülmektedir.

Deney gruplarında $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ ifade düzeyinin kontrol grubuna göre kat değişim değerleri Şekil 35’de verildi. DOKS grubunda $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ ifade düzeyinin kontrol grubuna göre 1.94 kat arttığı belirlendi. DOKS-DEKS ve DOKS-SİL gruplarında $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ ifade düzeyinin kontrol grubuna göre sırasıyla 1.6 ve 1.22 kat arttığı ortaya kondu. SİL grubu ile kontrol grubu arasında $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ ifade düzeyi hemen hemen birbirine eşitti.



Şekil 35. Deney gruplarında $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ ifade düzeyinin kontrol grubuna göre kat değişim değerleri

4.6. Kantitatif Eş Zamanlı PCR Sonuçları

Kalp dokusu örneklerinden izole edilen total RNA konsantrasyonları Tablo 16’da sunuldu.

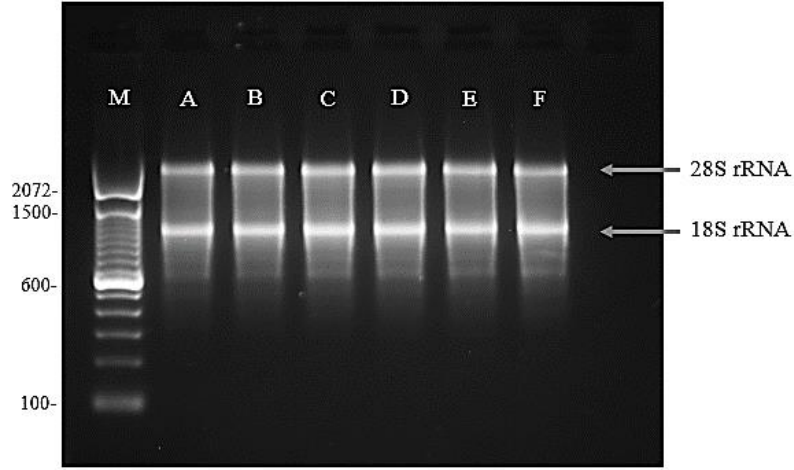
Tablo 16. Kalp doku örneklerinden izole edilen total RNA konsantrasyonları (ng/μl)

Örnek	RNA miktarı (ng/μl)			
	1. ölçüm	2. ölçüm	3. ölçüm	Ortalama
DOKS 1	172	177	178	175.6
DOKS 2	288	293	295	292
DOKS 3	291	294	296	293.6
DOKS 4	189	190	190	189.6
DOKS 5	180	182	181	182
DOKS 6	190	194	198	194

Tablo 16. Kalp doku örneklerinden izole edilen total RNA konsantrasyonları (ng/μl)
(devamı)

DOKS+DEKS 1	474	474	476	474.6
DOKS+DEKS 2	424	426	428	426
DOKS+DEKS 3	423	423	423	423
DOKS+DEKS 4	434	436	438	436
DOKS+DEKS 5	440	444	448	444
DOKS+DEKS 6	440	440	440	440
DOKS+DEKS 7	356	358	360	358
DOKS+DEKS 8	376	378	380	378
DOKS+DEKS 9	350	350	350	350
DOKS+DEKS 10	468	466	464	466
DOKS+SİL 1	458	458	459	458.3
DOKS+SİL 2	312	312	312	312
DOKS+SİL 3	183	184	185	184
DOKS+SİL 4	367	365	364	365.3
DOKS+SİL 5	340	340	340	340
DOKS+SİL 6	264	266	268	266
DOKS+SİL 7	286	286	286	286
DOKS+SİL 8	446	448	450	448
SİL 1	401	400	398	399.6
SİL 2	138	138	137	137.6
SİL 3	273	273	274	273.3
SİL 4	360	360	360	360
SİL 5	468	466	464	464
DEKS 1	486	482	482	483.3
DEKS 2	426	426	426	426
DEKS 3	500	500	500	500
DEKS 4	430	430	430	430
DEKS 5	460	458	456	458
Kontrol 1	158	153	158	156.3
Kontrol 2	223	223	223	223
Kontrol 3	188	188	189	188.3
Kontrol 4	230	230	230	230
Kontrol 5	246	248	250	248

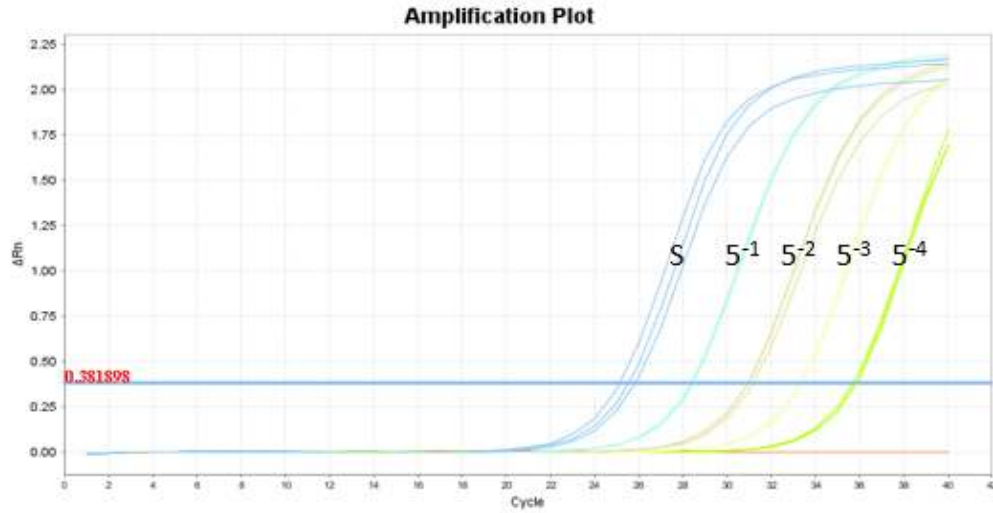
Kalp dokusu örneklerinde izole edilen RNA örnekleri, denatüre agaroz jel elektroforezinde (% 1.5 agaroz-formaldehid jeli) yürütüldüğünde; tüm örneklerde 28S, 18S ve 5S ribozomal RNA (rRNA) bandları görüldü (Şekil 36). Bu da, doku örneklerinin saklanması ve RNA izolasyon işlemleri sırasında RNA ipliğinde kırıkların meydana gelmediğini göstermektedir. Dolayısıyla bu çalışmada kalp dokusundan izole edilen RNA örneklerinin gen kantitasyonu çalışmaları için uygun olduğunu anlamına gelir.



Şekil 36. Kalp dokularından elde edilen total RNA'ların %1.5'lik formaldehid-agaroz jeldeki görüntüsü. **M:** Markır (100 bç), **A:** DOKS grubu, **B:** DOKS-DEKS grubu, **C:** DOKS-SİL grubu, **D:** DEKS grubu, **E:** SİL grubu, **F:** Kontrol grubu

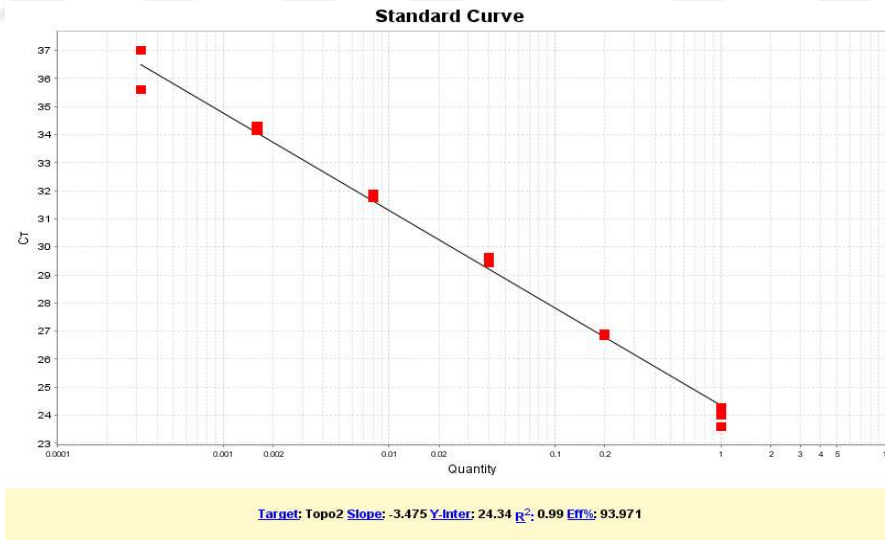
4.6.1. TopII Geninin Amplifikasyon Verimliliği Sonuçları

Deney gruplarından rastgele seçilen bir hayvanın kalp dokusundan sentezlenen cDNA örneğinden hazırlanan seri dilüsyonlar ile yapılan PCR sonucunda elde edilen amplifikasyon eğrileri Şekil 37'de sunuldu.



Şekil 37. Log5 tabanına göre sulandırılmış cDNA sulandırmalarına ait TopII β geni amplifikasyon eğrileri. S: Sulandırılmamış cDNA örneği, 5^{-1} , 5^{-2} , 5^{-3} , 5^{-4} , 5^{-5} : log5 tabanına göre sulandırılmış cDNA örnekleri

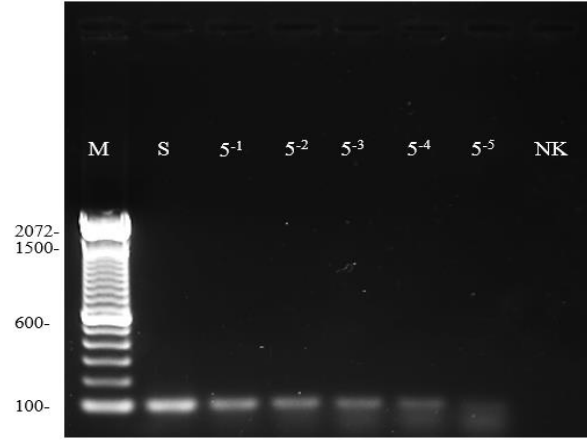
Hazırlanan cDNA dilüsyonları ile yapılan PCR sonucunda bulunan C_T değerleri ile çizilen standart eğri grafiği Şekil 38’de sunuldu. Buna göre, TopII β geninin amplifikasyon verimliliğinde engelleyici bir etki görülmedi.



Şekil 38. cDNA sulandırmalarına ait C_T değerleri ile çizilen standart eğri grafiği

Agaroz jelde yürütülen PCR ürünlerinin jel görüntüleri değerlendirildiğinde; PCR işlemi ile çoğaltılan gen bölgesinin beklenen $b\phi$ uzunluğunda (75 $b\phi$) olduğu görüldü (Şekil 39). Bu da, çoğaltılan gen bölgesinin TopII β enzimini kodlayan gen bölgesine ait olduğunu göstermektedir. Ayrıca, elde edilen band görüntüleri karşılaştırıldığında; en yoğun band

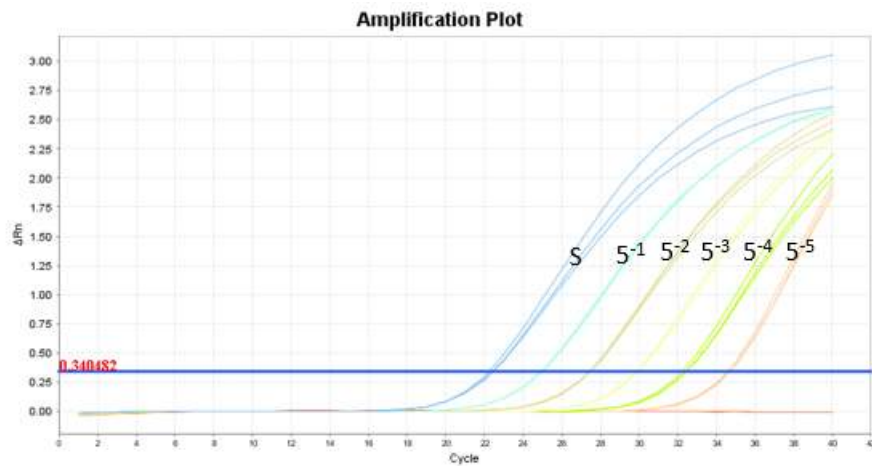
görüntüsünün beklendiği şekilde sulandırılmamış cDNA örneğinde olduğu, cDNA örneğinin sulandırma oranı artıkça band görüntülerinin giderek silikleştiği saptandı.



Şekil 39. cDNA dilüsyonlarının %1'lik agaroz jel elektroforezis görüntüleri. **M:** Marker (100 bp), **S:** Sulandırılmamış cDNA örneği, **5⁻¹, 5⁻², 5⁻³, 5⁻⁴, 5⁻⁵:** log5 tabanına göre sulandırılmış cDNA örnekleri, **NK:** Negatif kontrol.

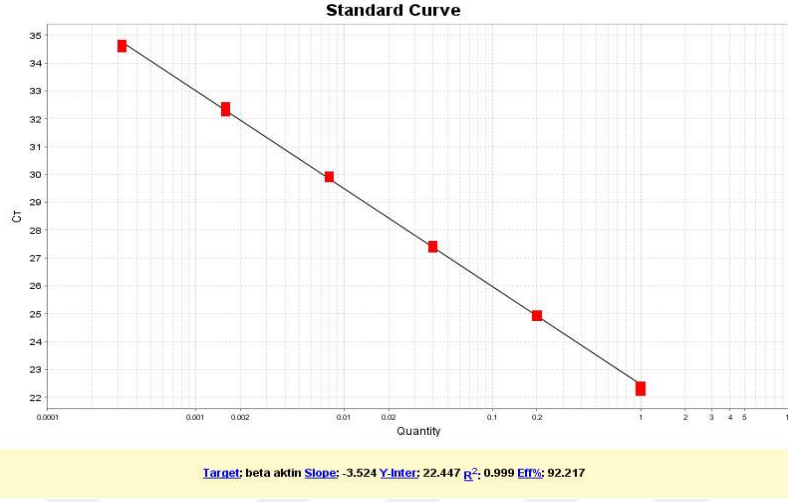
4.6.2. β -aktin Geninin Amplifikasyon Verimliliği Sonuçları

Deney gruplarından rastgele seçilen bir hayvanın kalp dokusundan sentezlenen cDNA örneğinden hazırlanan seri dilüsyonlar ile yapılan PCR sonucunda elde edilen amplifikasyon eğrileri Şekil 40'da sunuldu.



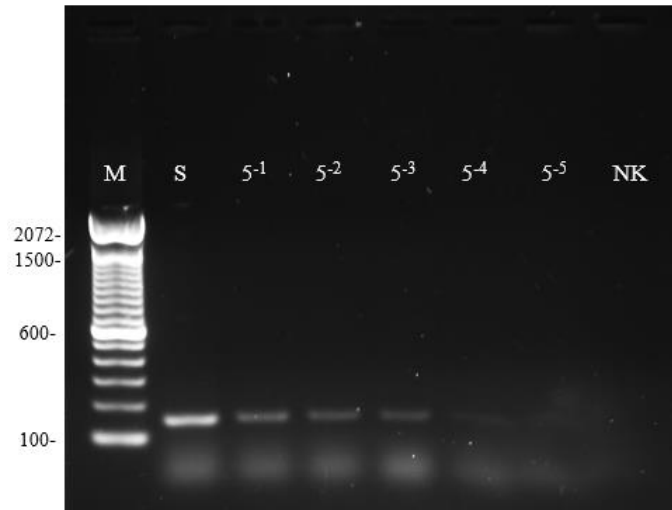
Şekil 40. Log5 tabanına göre sulandırılmış cDNA sulandırmalarına ait β -aktin geni amplifikasyon eğrileri. **S:** Sulandırılmamış cDNA örneği, **5⁻¹, 5⁻², 5⁻³, 5⁻⁴, 5⁻⁵:** log5 tabanına göre sulandırılmış cDNA örnekleri.

Hazırlanan cDNA dilüsyonları ile yapılan PCR sonucunda bulunan C_T değerleri ile çizilen standart eğri grafiği Şekil 41’de sunuldu. Buna göre, β -aktin geninin amplifikasyon verimliliğinde engelleyici bir etki görülmedi.



Şekil 41. cDNA sulandırmalarına ait C_T değerleri ile çizilen standart eğri grafiği

Agaroz jelde yürütülen PCR ürünlerinin jel görüntüleri değerlendirildiğinde; PCR işlemi ile çoğaltılan gen bölgesinin beklenen bç uzunluğunda (143 bç) olduğu görüldü (Şekil 42). Bu da, çoğaltılan gen bölgesinin β -aktin proteinini kodlayan gen bölgesine ait olduğunu göstermektedir. Ayrıca, elde edilen band görüntüleri karşılaştırıldığında; en yoğun band görüntüsünün beklendiği şekilde sulandırılmamış cDNA örneğinde olduğu, cDNA örneğinin sulandırma oranı arttıkça band görüntülerinin giderek silikleştiği saptandı.



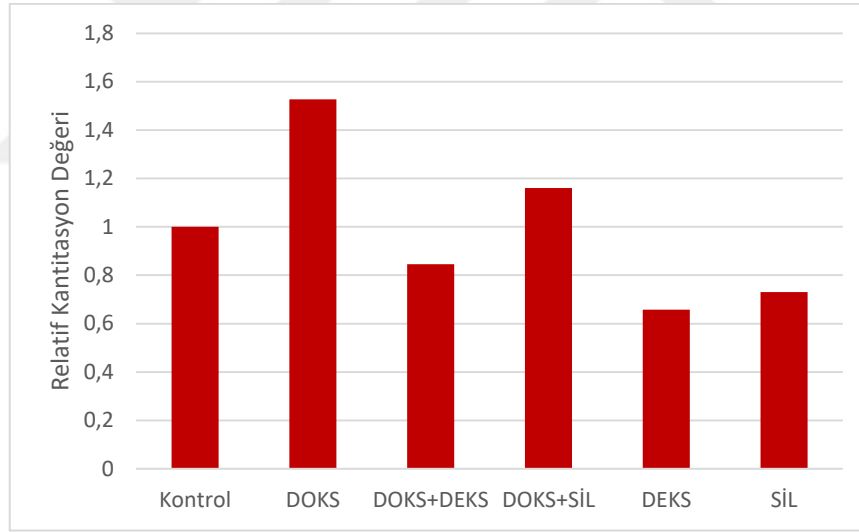
Şekil 42. cDNA dilüsyonlarının %1’lik agaroz jel elektroforezis görüntüleri. **M:** Marker (100 bç), **S:** Sulandırılmamış cDNA örneği, **5⁻¹, 5⁻², 5⁻³, 5⁻⁴, 5⁻⁵:** log5 tabanına göre sulandırılmış cDNA örnekleri, **NK:** Negatif kontrol

4.6.3. Kalp Dokusu Örneklerinde TopII β Enziminin Gen İfade Düzeyi

Deney gruplarında kalp dokusunda TopII β ve β -aktin gen ifade düzeyi analiz sonuçları Tablo 17’de, TopII β gen ifade düzeyinin gruplar arası kat değişim değerleri Şekil 43’te sunuldu.

Tablo 17. Kalp dokusu örneklerinde TopII β enziminin gen ifade düzeyleri

Grup	Ortalama C _T		ΔC_T (deneme)	ΔC_t (kontrol)	$\Delta\Delta C_t$	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	$-1/2^{-\Delta\Delta C_t}$
	TopII β	β -aktin					
Kontrol	26,76	23,14	3,61	3,61	0	1	
DOKS	23,32	20,32	3,00	3,61	-0,61	1,52	
DOKS+DEKS	23,59	19,73	3,85	3,61	0,24	0,84	-1,18
DOKS+SİL	23,34	19,94	3,40	3,61	-0,21	1,16	
DEKS	23,35	19,13	4,22	3,61	0,60	0,65	-1,52
SİL	23,88	19,82	4,06	3,61	0,45	0,73	-1,36



Şekil 43. TopII β gen ifade düzeyinin gruplar arası kat değişim değerleri

Kalp dokusu örneklerinde TopII β gen ifade düzeyi karşılaştırıldığında; DOKS grubunda TopII β ifade düzeyinin kontrol grubuna göre 1.5 kat arttığı belirlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; DOKS-DEKS grubunda TopII β ifade düzeyinin 1.1 kat azaldığı, DOKS-SİL grubunda ise, 1.1 kat arttığı saptandı. SİL ve DEKS gruplarında ise, TopII β ifade düzeyi kontrol grubuna göre sırasıyla 1.3 ve 1.5 kat azaldığı belirlendi.

5. TARTIŞMA

ANT grubunda yer alan DOKS; solid tümörler, lösemi, lenfoma ve meme kanseri gibi pek çok tümöre karşı oldukça etkili olmasına karşın, çok sayıda yan etkisi vardır. Bu yan etkiler arasında en önemlisi kardiyotoksik yan etkilerdir (Minotti ve ark, 2004; van Dalen ve ark, 2008; Octavia ve ark, 2014). DOKS'un kardiyotoksik etkilerinin önlenmesi ya da azaltılmasında iki temel yaklaşım bulunmaktadır: 1. DOKS'un kümülatif dozunu azaltmak, 2. DOKS kardiyotoksitesine karşı kalbi koruyucu ilaçlar kullanmak (van Dalen ve ark, 2008). DOKS'un kardiyotoksik etkilerinin azaltılmasında kullanılan DEKS'in de tıpkı DOKS gibi TopII enziminin katalitik inhibitörü olması nedeniyle (Roca ve ark, 1994; Lyu ve ark, 2007), bu ilaçların birlikte kullanılması durumunda DOKS'un kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin azalabileceği endişesine neden olmuştur (Vejpongsa ve Yeh, 2014). Bu bakımdan, DOKS kardiyotoksitesine karşı kalbi koruyucu etkileri olan ancak TopII enziminin aktivitesi üzerinde etkisi olmayan ya da DEKS'e nazaran daha az etkisi olan yeni ajanlara ihtiyaç duyulduğu açıktır. Deve diken bitkisinin tohumlarından elde edilen SİL'in birtakım kalp hastalıklarına karşı koruyucu etkilerinin olduğu bilinmektedir (Psotová ve ark, 2002; Chlopikova ve ark, 2004; Zhou ve ark, 2006; El-Shitany ve ark, 2008; Cecen ve ark, 2011; El-Awady ve ark, 2011; Anestopoulos ve ark, 2013; Avcı ve ark, 2017). Buna karşın, SİL'in kronik DOKS kardiyotoksitesine karşı kalbi koruyucu etkileri bilinmemektedir. Bu nedenle, bu çalışmada DOKS'un kardiyotoksik etkilerine karşı SİL'in koruyucu etkileri değerlendirildi. DEKS, DOKS'un kardiyotoksik etkilerinin azaltılmasında kullanılan klinik olarak etkinliği kanıtlanmış tek ilaç olduğundan bu ilacın kalbi koruyucu etkileri SİL ile karşılaştırıldı.

Yetişkin Balb/c ırkı farelerde DOKS ile oluşturulan kardiyotoksitede kalp dokusunda karşılaşılan histopatolojik bulgular, insan ve deney hayvanlarında (fare, sıçan, tavşan, köpek) ANT kardiyotoksitesinde tanımlanan histopatolojik bulgular (Mettler ve ark, 1977; Billingham ve ark, 1978; Olson ve Capen, 1978; Herman ve Ferrans, 1998; Lencova-Popelova ve ark, 2014) ile benzer idi. DOKS grubunda kalp dokusunda karşılaşılan en belirgin histopatolojik değişiklikler kardiyomiyositlerde sitoplazmik vakuolizasyon, hiyalin nekrozu ve miyositolizis şeklinde idi. Daha önceki çalışmalarla (Van Vleet ve Ferrans, 1980; Van Vleet ve ark, 1980; Lencova-Popelova ve ark, 2014) uyumlu olarak, miyokardiyumda geniş alanlar halinde rastlanılan bu değişikliklere çoğunlukla sol ventrikulus duvarı ve interventriküler septumda rastlandı. Troponinler

izgili kasların ince iplikçikleri üzerinde düzenli aralıklarla yerleşmiş ve çizgili kaslarda kasılmayı düzenleyen globüler yapıda protein kompleksleridir (Christenson ve ark, 1998; Wu ve ark, 1998). Kardiyak miyositlerde şekillenen hasar sonu bu proteinlerin kan dolaşımına salındığı bilinmektedir (Adamcova ve ark, 2007). Nitekim bu proteinler kardiyotoksik ilaçlarla oluşturulan miyokardiyal hasarın ortaya konulmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Herman ve ark, 1998; 1999; Adamcova ve ark, 1999; Bertinchant ve ark, 2000; Bertinchant ve ark, 2003; Simunek ve ark, 2003; Herman ve ark, 2006; York ve ark, 2007; Cove-Smith ve ark, 2014; Lencova ve ark, 2014). Bu çalışmada, kalp dokusu kesitleri miyokardiyal hasarı gösteren TnT ve TnI birincil antikorları ile boyandığında; DOKS grubunda histopatolojik değişikliklerin görüldüğü kardiyomiyositlerin tamamında hem TnI hem de TnT immunoreaktivitesinin belirgin olarak azaldığı saptandı. Üstelik histopatolojik incelemelerde miyokardiyal lezyonların ortaya konulmadığı alanlarda dahi immunohistokimyasal değerlendirmelerde kardiyomiyositlerdeki TnT ve TnI kayıplarının olması önemliydi. Kardiyomiyositlerdeki patolojik değişikliklerin histopatolojik düzeyde tespit edilemediği çok erken dönemlerinde dahi miyokardiyal hasarın var olduğunun ortaya konulmasında elektron mikroskopik değerlendirmelere bir alternatif olarak kullanılabileceği ngrld. Kalp doku örneklerinde TnT ve TnI ifade düzeyi immunoblotlama yöntemi ile değerlendirildiğinde; DOKS uygulamalarının TnT ve TnI ifade düzeyini kontrol grubuna göre sırasıyla 2,25 ve 2,08 kat azalttığı belirlendi. Bu bakımdan DOKS ile oluşturulan kardiyotoksisitede miyokardiyal hasarın ortaya konmasında immunohistokimyasal boyama yönteminin yanısıra immunoblotlama yönteminin de güvenle kullanılabileceği söylenebilir.

SİL'in akut DOKS kardiyotoksisitesine karşı kalbi koruyucu etkileri bilinmesine rağmen (El-Shitany ve ark, 2008, Cecen ve ark, 2011), kronik DOKS kardiyotoksisitesine karşı koruyucu etkileri bilinmemektedir. SİL'in kronik DOKS kardiyotoksisitesine karşı koruyucu etkileri değerlendirildiğinde; SİL uygulamalarının kalp dokusunda karşılaşılan histopatolojik değişikliklerin hem yaygınlığını hem de şiddetini belirgin olarak azalttığı saptandı. SİL uygulamalarının kardiyomiyositlerdeki TnT ve TnI kayıplarını da belirgin olarak azalttığı ortaya kondu. Bu bakımdan DOKS'un kardiyotoksik etkilerine karşı SİL'in kalbi koruyucu etkilerinin olduğu söylenebilir. *In vitro* alışmalar SİL ve SİL'in yapısındaki bileşenlerin (silibin, dehidrosilibin, silikristin, siliadinin) DOKS'un sitotoksik etkilerine karşı DEKS'e yakın düzeyde koruma sağladığını göstermektedir (Chlopckova ve ark, 2004). Daha nceki *in vitro* alışma bulgularını destekler nitelikte, DEKS ve SİL

uygulamaları arasında kardiyomiyopati skoru açısından istatistiksel olarak farklılığın olmadığı saptandı. TnT ve TnI birincil antikorları ile boyanan kalp dokusu kesitleri değerlendirildiğinde; DEKS ve SİL uygulamaları arasında TnT ve TnI immunoreaktivitesi bakımından da farklılığın olmadığı ortaya kondu. Bu sonuçlar SİL uygulamalarının DOKS'un kronik kardiyotoksik etkilerine karşı DEKS'e yakın düzeyde koruma sağladığını düşündürdü. Troponinlerin miyokardiyal hasarın yanı sıra kardiyomiyositlerin normal metabolizması sırasında da yıkımlandığı, ardından yeniden sentezlendiği bilinmektedir (Marston ve Redwood, 2003). Bu çalışmada, yalnız SİL uygulamalarının kalp dokusu örneklerinde TnT ve TnI ifade düzeyini kontrol grubuna göre sırasıyla 1,74 ve 1,25 kat arttırdığı saptandı. Bu durumun SİL'in kardiyomiyositlerin normal metabolizması sırasında yıkımlanan miyofibriler proteinleri, bu proteinleri yıkımlayan enzimlere karşı korumasından kaynaklanabileceği düşünüldü. SİL'in yapısındaki bileşikler arasında siliadinin'in DOKS'un kardiyak miyositler (H9c2 hücre hattı) üzerindeki sitotoksik etkilerine karşı en iyi düzeyde koruma sağladığı bilinir (Chlopikova ve ark, 2004). DOKS'un kronik kardiyotoksik etkilerine karşı koruyucu etkilerinin olduğu gösterilen SİL'in bu etkilerinden yapısındaki hangi bileşen ya da bileşenlerin sorumlu olduğu bu çalışma kapsamında değerlendirilmedi.

DOKS kardiyotoksitesine karşı kalbi koruyucu etkileri olduğu saptanan SİL'in farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri tam olarak bilinmemektedir. Bu konuda yapılan bilimsel araştırmaların derlendiği bir makalede (Franschini ve ark 2002); bu bileşiğin biyoyararlanımının oldukça az olduğu, absorpsiyonu sonrası karaciğerde konjuge edilerek safra ile atıldığı, barsaklarda bakteriler tarafından hidrolize edilerek yeniden dolaşıma geçtiği bildirilmektedir. İlacın biyoyararlanımı az olmakla birlikte, enterohepatik döngüye girmesinin ilacın etki süresini arttırabileceği söylenebilir. Diğer yandan ilacın konjuge olması ilacın etkin diğer bir deyişle serbest formunun düzeyini azaltmaktadır (Wu ve ark, 2007). SİL'in yapısındaki silibininin serbest ve konjuge formlarının incelenen dokularda (karaciğer, akciğer, mide, pankreas, deri, prostat) 0.5-1 saatte doruk konsantrasyona ulaştığı bilinmektedir (Zhao ve Agarwal, 1999). Bu çalışmada SİL uygulamaları DOKS uygulamalarından 1 saat önce yapıldığında kronik DOKS kardiyotoksitesine karşı kalbi koruyucu etkilerinin olduğu ortaya kondu. Fosfatidilkolinle bağlanmış SİL'in bu molekülle bağlı olmayan formuna göre bağırsaktan 10 kat fazla emildiği bilinmektedir (Morazzoni ve ark, 1993). Bu bakımdan DOKS'un kardiyotoksik etkilerinin azaltılması amacıyla kullanılacak SİL'in serbest formu yerine fosfatilkolinle

bağlanmış formunun kullanılmasının SİL'in emilimini dolayısıyla kalbi koruyucu etkilerini arttırabileceği söylenebilir.

DNA hasarı şekillendiğinde, DNA tamirinde görevli moleküllerin hasarlı DNA bölgesine ulaşabilmesi için kromatin yapısının gevşetilmesi gerekir (Dinant ve ark, 2008; Ohnishi ve ark, 2009). Histon proteinlerinde H₂Ax, DNA hasarı şekillendikten çok kısa bir süre sonra fosforillenir. Fosforillenmiş γ -H₂Ax, DNA tamirinde görevli moleküllerin (53BP1, BRCA1, MDC1 gibi) kırık bölgesine çekilmesinde görev alır (Kobayashi, 2004; Rossetto ve ark, 2010). Dolayısıyla bir hücrede DNA hasarı γ H₂Ax ifadesi değerlendirilerek belirlenebilir (Ohnishi ve ark, 2009). DOKS kardiyak hücrelerde TopII β enziminin DNA molekülüne bağlanması ile oluşan geçici çift zincir kırıklarını kalıcı hale getirdiği bilinmektedir (Zhang ve ark, 2012). Bu çalışma sonucunu destekler nitelikte DOKS uygulamalarının kardiyak hücrelerin tamamına yakınında DNA hasarına neden olduğu saptandı. DEKS ve SİL uygulamalarının DOKS'a bağlı kardiyak hücrelerde şekillenen DNA hasarına karşı koruyucu etkileri değerlendirildiğinde; DEKS ve SİL uygulamalarının DNA hasarını belirgin olarak azalttığı ortaya kondu. DEKS ile karşılaştırıldığında SİL uygulamalarının kardiyak hücreleri DNA hasarına karşı daha fazla koruduğu belirlendi. Bu bakımdan SİL'in DOKS kardiyotoksisitesine karşı kalbi koruyucu etkisinde kardiyak hücrelerdeki DNA hasarını azaltmasının da etkili olduğu söylenebilir.

DEKS'in kalbi koruyucu etkilerini belirlemeye yönelik yapılan ilk çalışmalarda, kardiyak hücrelerde DEKS'in demir iyonlarını şelatlayarak DOKS kardiyotoksisitesine karşı kalbi koruduğu ileri sürülmüştür (Van Vleet ve ark, 1980; Herman ve ark, 1981). Buna karşın, demir şelatlama gücü bakımından DEKS'e nazaran daha güçlü bileşiklerin DOKS kardiyotoksisitesine karşı koruyucu etkilerinin olmaması ya da DEKS'e nazaran daha az koruyucu etkili olmaları nedeniyle DEKS'in DOKS kardiyotoksisitesine karşı kalbi koruyucu etkisinde henüz aydınlatılmamış mekanizmaların olduğu sonucuna götürmüştür (Simunek ve ark, 2005b; Sterba ve ark, 2006). Nitekim Lyu ve ark 2007, DEKS'in kardiyomiyositlerde TopII β enzime bağlanarak DOKS'un bu enzime bağlanmasını önlediğini, bu sayede DOKS'un kardiyak hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini azalttığını ortaya koymuşlardır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, DEKS'in kardiyak hücrelerde proteozomal yolla TopII β enziminin yıkımlanmasına yol açtığı ileri sürülmektedir (Vejpongsa ve Yeh, 2014). Buna karşın, DEKS'in kardiyak hücrelerde TopII β enziminin gen ifadesi üzerine etkileri bilinmemektedir. Bu çalışmada, DEKS'in

kardiyak hücrelerde TopII β enziminin gen ifade düzeyi üzerine etkisi eş zamanlı PCR yöntemi ile değerlendirildiğinde; DEKS uygulamalarının TopII β enziminin gen ifade düzeyini kontrol grubuna göre 1,52 kat azalttığı ortaya kondu. Kalp dokusu kesitleri TopII β birincil antikoru ile boyandığında, DEKS uygulamalarının kardiyak hücrelerde TopII β enzim ifadesini immunohistokimyasal olarak da belirgin şekilde azalttığı ortaya kondu. Bu sonuçlar DEKS'in DOKS kardiyotoksitesine karşı koruyucu etkilerinde daha önce ortaya konan mekanizmaların (Vejpongsa ve Yeh, 2014) yanısıra TopII β enziminin gen ifadesinin azaltılmasının da etkili olabileceğini düşündürdü.

DOKS gibi DEKS'in de TopII enziminin katalitik inhibitörü olması nedeniyle (Roca ve ark, 1994; Lyu ve ark, 2007), bu ilaçların birlikte kullanılması durumunda DOKS'un kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin azalabileceği endişesine neden olmuştur (Vejpongsa ve Yeh, 2014). Bu bakımdan, DOKS kardiyotoksitesine karşı kalbi koruyucu etkileri olan ancak TopII enziminin aktivitesi üzerinde etkisi olmayan ya da DEKS'e nazaran daha az etkisi olan yeni ajanlara ihtiyaç duyulduğu açıktır. Bu çalışmada SİL uygulamalarının DOKS'un kronik kardiyotoksik etkilerinin azaltılmasında DEKS'e yakın düzeyde kalbi koruyucu etkilerinin olduğu ortaya kondu. Akut DOKS kardiyotoksitesine karşı kalbi koruyucu etkileri bilinen SİL'in kardiyak hücrelerde ROS'u temizleyerek ve demir iyonlarını şelatlayarak koruyucu etki gösterdiği ileri sürülmektedir (Chlopikova ve ark 2004; El-Shitany ve ark 2008; Cecen ve ark 2011). Buna karşın, SİL'in DOKS kardiyotoksitesine karşı koruyucu etkilerinde TopII β enziminin rolü bilinmemektedir. Kronik DOKS kardiyotoksitesine karşı koruyucu etkileri olduğu belirlenen SİL'in TopII β enziminin gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi eş zamanlı PCR yöntemi ile değerlendirdiğinde; SİL uygulamalarının TopII β enziminin gen ifade düzeyini kontrol grubuna göre 1,36 kat azalttığı ortaya kondu. Kalp dokusu kesitleri TopII β birincil antikoru ile boyandığında; SİL uygulamalarının kardiyak hücrelerde TopII β enzim ifadesini immunohistokimyasal olarak da belirgin olarak azalttığı ortaya kondu. Bu bakımdan SİL'in DOKS'un kardiyotoksik etkilerine karşı kalbi koruyucu etkisinde daha önce bildirilen mekanizmaların (Chlopikova ve ark 2004; El-Shitany ve ark 2008; Cecen ve ark 2011) yanısıra kardiyak hücrelerde TopII β enzim düzeyini azaltılmasının da etkili olduğu söylenebilir.

DOKS kardiyotoksitesine karşı kalbi koruyucu amaçla kullanılacak ideal bir ilacın TopII β enzimi üzerine etkisinin olmaması istenmektedir (Vejpongsa ve Yeh, 2014). Bu

Çalışmada, kalp dokusu örneklerinde TopIIβ enziminin gen ifade düzeyi eş zamanlı PCR yöntemi değerlendirildiğinde; yalnız DEKS uygulamalarının TopIIβ ifade düzeyini yalnız SİL uygulamalarına göre daha fazla azalttığı, diğer bir deyişle DEKS grubunda TopIIβ ifadesinin SİL grubuna daha az olduğu saptandı. Kalp dokusu kesitleri TopIIβ birincil antikorları ile boyandığında; yalnız DEKS uygulamalarının kardiyak hücrelerde TopIIβ enzim ifadesini yalnız SİL uygulamalarına göre immunohistokimyasal olarak da daha fazla azalttığı saptandı. Bu sonuçlar, kronik DOKS kardiyotoksisitesine karşı DEKS’e yakın düzeyde koruma sağladığı ortaya konan SİL’in DOKS’un antikanser etkinliğinde bir azalmaya neden olmaksızın DOKS’un kardiyotoksik etkilerinin azaltılmasında kullanılabileceğini düşündürdü.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada DOKS kardiyotoksitesine karşı SİL'in koruyucu etkinliği DEKS ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Bu kapsamda elde edilen sonuçlara göre;

1. Yetişkin Balb/c ırkı farelerde DOKS ile oluşturulan kronik kardiyotoksisite modelinde kalp dokusunda karşılaşılan histopatolojik bulgular ile diğer deney hayvanlarında (fare, sıçan, tavşan, köpek) ANT grubu ilaçlar ile oluşturulan kardiyotoksisite de kalp dokusunda tanımlanan histopatolojik bulguların oldukça benzer olduğu ortaya kondu.

2. HE ile boyanan kalp kesitlerinde histopatolojik olarak belirgin değişikliklerin görülmediği alanlarda, miyokardiyal hasarı gösteren Tn kayıpları görülmekteydi. Bu bakımdan miyokardiyal hasarın ortaya konulmasında özellikle miyokardiyal hasarın erken dönemlerinde diğer bir deyişle HE boyanan kesitlerde henüz belirgin değişiklikler şekillenmemişken dahi kalp kesitleri Tn birincil antikoru ile boyanarak hasarın ortaya konabileceği saptandı.

3. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; SİL uygulamalarının kalp dokusu örneklerinde TnI ve TnT ifade düzeyini oldukça arttırdığı belirlendi. Bu durumun SİL'in kardiyomiyositlerin normal metabolizması sırasında yıkılan miyofibriller proteinleri, bu proteinleri yıkımlayan enzimlere karşı korumasından ileri gelebileceğini düşündürdü.

4. SİL uygulamalarının DOKS'un kardiyotoksik etkilerine karşı DEKS'e yakın düzeyde kalbi koruyucu etki gösterdiği ortaya kondu.

5. SİL uygulamalarının kalp dokusu örneklerinde TopII β enziminin ifade düzeyini belirgin olarak azalttığı ortaya kondu. Bu bakımdan SİL'in DOKS'un kardiyotoksik etkilerine karşı kalbi koruyucu etkisinde daha önce bildirilen mekanizmaların yanısıra kardiyak hücrelerde TopII β enzim düzeyini azaltmasının da etkili olduğu söylenebilir.

6. DEKS'in kardiyak hücrelerde proteozomal sistemi aktive ederek TopII β enziminin yıkılmasına yol açtığı, diğer bir deyişle DEKS uygulamalarının kardiyak kardiyak TopII enziminin yıkılmasına yol açarak bu enzimin ifadesini azalttığı ileri sürülmektedir. Bu çalışmada DEKS uygulamalarının kalp doku örneklerinde TopII enziminin gen ifadesini azalttığı saptandı. Bu bakımdan DEKS'in kardiyak hücrelerde

proteozomal sistemi aktive etmesinin yanı sıra TopII enziminin gen ifadesini azaltarak da DOKS kardiyotoksisitesine karşı koruyucu etki gösterdiği ortaya kondu.

7. SİL ile karşılaştırıldığında; DEKS uygulamalarının kalp dokusu örneklerinde TopII β ifadesini daha fazla azalttığı, diğer bir deyişle DEKS grubunda TopII β ifadesinin daha az olduğu ortaya kondu. Bu durum SİL'in DOKS'un antikanser etkinliğinde bir azalmaya neden olmaksızın DOKS'un kardiyotoksik etkilerinin azaltılmasında kullanılabileceğini düşündürdü.



KAYNAKLAR

- Adamcová M, Gersl V, Hrdina R, Melka M, Mazurová Y, Vávrová J, Palicka V, Kokstein Z.** Cardiac troponin T as a marker of myocardial damage caused by antineoplastic drugs in rabbits. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 1999, 125, 268-274.
- Adamcová M, Simůnek T, Kaiserová H, Popelová O, Sterba M, Potáková A, Vávrová J, Maláková J, Gersl V.** In vitro and in vivo examination of cardiac troponins as biochemical markers of drug-induced cardiotoxicity. *Toxicology* 2007, 237, 218-28.
- Adams JE, Schectman KB, Landt Y, Ladenson JH, Jaffe AS.** Comparable detection of acute myocardial infarction by creatine kinase MB isoenzyme and cardiac troponin I. *Clinical Chemistry*, 1994, 40, 1291-1295.
- Alamolhodaie NS, Shirani K, Karimi G.** Arsenic cardiotoxicity: An overview. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2015, 40, 1005-1014.
- Allen A.** The cardiotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Seminars in Oncology* 1992, 19(5), 529-42.
- Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP.** Myocardial infarction redefined- a consensus of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 2000, 36, 959-969.
- Anestopoulos I, Kavo A, Tentes I, Kortsaris A, Panayiotidis M, Lazou A, Pappa A.** Silibinin protects H9c2 cardiac cells from oxidative stress and inhibits phenylephrine-induced hypertrophy: potential mechanisms. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2013, 24, 586-594.
- Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C.** Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, A New Antitumor Antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnology and Bioengineering* 1969, 11(6), 1101-10.
- Ausio J, Abbott DW.** The many tales of a tail: carboxyterminal tail heterogeneity specializes histone H2A variants for defined chromatin function. *Biochemistry* 2002, 41, 5945-5949.
- Austin CA, Marsh KL.** Eukaryotic DNA topoisomerase II β . *BioEssays* 1998, 20(3), 215–226.

Avci H, Epikmen ET, Ipek E, Tunca R, Birincioglu SS, Aksit H, Sekkin S, Akkoç AN, Boyacioglu M. Protective effects of silymarin and curcumin on cyclophosphamide-induced cardiotoxicity *Experimental and Toxicologic Pathology* 2017.

Baguley BC, Ferguson LR. Mutagenic properties of topoisomerase-targeted drugs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1998, 1400, 213-222.

Bayrak S. Kalp kası; Bir Pompa Olarak Kalp ve Kalp Kapaklarının İşlevi. In: Yeğen BÇ, Alican İ, Solakoğlu Z (eds), Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2013, s101-110.

Bertazzoli C, Bellini O, Magrini U, Tosana MG. Quantitative experimental evaluation of Adriamycin cardiotoxicity in the mouse. *Cancer Treatment Reports* 1979, 63,1877-1883.

Bertinchant JP, Polge A, Juan JM, Oliva-Lauraire MC, Giuliani I, Marty-Double C, Burdy JY, Fabbro-Peray P, Laprade M, Bali JP, Granier C, de la Coussaye JE, Dauzat M. Evaluation of cardiac troponin I and T levels as markers of myocardial damage in doxorubicin-induced cardiomyopathy rats, and their relationship with echocardiographic and histological findings. *Clinica Chimica Acta* 2003, 329(1-2), 39-51.

Bertinchant JP, Robert E, Polge A, Marty-Double C, Fabbro-Peray P, Poirey S, Aya G, Juan JM, Ledermann B, de la Coussaye JE, Dauzat M. Comparison of the diagnostic value of cardiac troponin I and T determinations for detecting early myocardial damage and the relationship with histological findings after isoprenaline-induced cardiac injury in rats. *Clinica Chimica Acta* 2000, 298, 13-28.

Bhavsar PK, Brand NJ, Yacoub MH, Barton PJ. Isolation and characterization of the human cardiac troponin I gene (TNNT3). *Genomics* 1996, 35, 11-23.

Biancaniello T, Meyer RA, Wong KY, Sager C, Kaplan S. Doxorubicin cardiotoxicity in children. *The Journal of Pediatrics* 1980, 97, 45-50.

Billingham ME, Mason JW, Bristow MR, Daniels JR. Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treatment Reports* 1978, 62(6), 865-872.

Blanco JG, Leisenring WM, Gonzalez-Covarrubias VM, Kawashima TI, Davies SM, Relling MV, Robison LL, Sklar CA, Stovall M, Bhatia S. Genetic polymorphisms in the carbonyl reductase 3 gene CBR3 and the NAD(P)H: quinone oxidoreductase1 gene NQO1 in patients who developed anthracycline-related congestive heart failure after childhood cancer. *Cancer* 2008, 112(12), 2789–2795.

Blanpain C, Mohrin M, Sotiropoulou PA, Passequé E. DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell Stem Cell* 2011, 8(1), 16-29.

- Boigk G, Stroedter L, Herbst H, Waldschmidt J, Riecken EO, Schuppan D.** Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. *Hepatology* 1997, 26, 643-649.
- Broader H, Gottlieb RA, Lepor NE.** Chemotherapy and cardiotoxicity. *Reviews in Cardiovascular Medicine* 2008, 9(2), 75-83.
- Burden DA, Osheroff N.** Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1998, 1400 (1-3), 139-154.
- Capranico G, Tinelli S, Austin CA, Fisher ML, Zunino F.** Different patterns of gene expression of topoisomerase II isoforms in differentiated tissues during murine development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1992, 1132(1), 43-48.
- Cecen E, Dost T, Culhaci N, Karul A, Ergur B, Birincioglu M.** Protective effects of silymarin against doxorubicin-induced toxicity. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2011, 12, 2697-2704.
- Champoux JJ.** DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual Review of Biochemistry* 2001, 70, 369-413.
- Chlopčíková S, Psotová J, Miketová P, Simánek V.** Chemoprotective Effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part I. Silymarin and its flavonolignans. *Phytotherapy Research* 2004, 18, 107-110.
- Christenson RH, Apple FS, Morgan DL, Alonsozana GL, Mascotti K, Olson M, McCormack RT, Wians FH, Keffer JH, Duh SH.** Cardiac troponin I measurement with the Access immunoassay system: analytical and clinical performance characteristics. *Clinical Chemistry* 1998, 44, 52-60.
- Cooper TA, Ordahl CP.** A single troponin T gene is governed by two different regulatory programs in cardiac and skeletal muscle development. *Science* 1984, 226, 979-982.
- Cove-Smith L, Woodhouse N, Hargreaves A, Kirk J, Smith S, Price SA, Galvin M, Betts CJ, Brocklehurst S, Backen A, Radford J, Linton K, Roberts RA, Schmitt M, Dive C, Tugwood JD, Hockings PD, Mellor HR.** An integrated characterization of serological, pathological, and functional events in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicological Sciences* 2014, 140(1), 3-15.
- Di Marco A, Gaetani M, Scarpinato B.** Adriamycin (NSC-123,127): A New Antibiotic with Antitumor Activity. *Cancer Chemotherapy Reports* 1969, 53(1), 33-37.

Dinant C, Houtsmuller AB, Vermeulen W. Chromatin structure and DNA damage repair. *Epigenetics Chromatin* 2008, 1(1), 9.

Doroshov JH. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Research* 1983, 43, 460-472.

Drake FH, Hofmann GA, Bartus HF, Mattern MR, Crooke ST, Mirabelli CK. Biochemical and pharmacological properties of p170 and p180 forms of topoisomerase II. *Biochemistry* 1989, 28(20), 8154-8160.

Drake FH, Zimmerman JP, McCabe FL, Bartus HF, Per SR, Sullivan DM, Ross WE, Mattern MR, Johnson RK, Crooke ST. Purification of topoisomerase II from amsacrine-resistant P388 leukemia cells. Evidence for two forms of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 1987, 262(34), 16739-47.

Dunnick JK, Nyska A, Bishop JB, Bucher JR, Chhabra RS, Foster PM, Herbert RA, Hooth MJ, King-Herbert AP, Kissling GE, Malarkey DE, Roycroft JH, Sanders JM, Singh BP, Smith CS, Travlos GS, Walker NJ, Witt KL, Hébert CD, Heath JE, Mann JF, Hamlin MH 2nd, Allison N, Kolenda-Roberts HM, Peckham JC, Wolfe GW, Seung HS, Brecher S, Iyer S, Tharakan VS, Newbigging S, Dixon D, Elmore SA, Flake GP, Blackshear PE, Hobbie K, Nold JB, Crockett PW, Betz LJ, McGowan KP, Gunnels SR, Hall BF, Harper LM, Powers JI, Serbus DC. Toxicology and carcinogenesis studies of milk thistle extract (CAS No. 84604-20-6) in F344/N rats and B6C3F1 mice (Feed Studies). *National Toxicology Program Technical Report Series* 2011, 565, 1-177.

Dupré A, Boyer-Chatenet L, Gautier J. Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nature Structural and Molecular Biology* 2006, 13(5), 451-457.

El-Awady el-SE, Moustafa YM, Abo-Elmatty DM, Radwan A. Cisplatin-induced cardiotoxicity: Mechanisms and cardioprotective strategies. *European Journal of Pharmacology* 2011, 650, 335-341.

El-Shitany NA, El-Haggag S, El-desoky K. Silymarin prevents adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology* 2008, 46(7), 2422-2428.

Farah CS, Miyamoto CA, Ramos CH, da Silva AC, Quaggio RB, Fujimori K, Smillie LB, Reinach FC. Structural and regulatory functions of the NH₂- and COOH-terminal regions of skeletal muscle troponin I. *Journal of Biological Chemistry* 1994, 269, 5230-5240.

Farza H, Townsend PJ, Carrier L, Barton PJ, Mesnard L, Bährend E, Forissier JF, Fiszman M, Yacoub MH, Schwartz K. Genomic organisation, alternative splicing and polymorphisms of the human cardiac troponin T gene. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1998, 30, 1247-1253.

Felix CA. Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1998, 1400, 233-255.

Filatov VL, Katrukha AG, Bulargina TV, Gusev NB. Troponin: structure, properties, and mechanism of functioning. *Biochemistry* 1999, 64, 969-985.

Foster ER, Downs JA. Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *FEBS Journal* 2005, 272, 3231-3240.

Fortune JM, Osheroff N. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 2000, 64, 221-253.

Fraschini F, Demartini G, Esporti D. Pharmacology of silymarin. *Clinical Drug Investigation* 2002, 22, 51-65.

Gammella E, Maccarinelli F, Buratti P, Recalcatti S, Cairo G. The role of iron in anthracycline cardiotoxicity. *Frontiers in Pharmacology* 2014, 5, 25.

Gao H, Huang KC, Yamasaki EF, Chan KK, Chohan L, Snapka RM. XK469, a selective topoisomerase II poison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, 96(21), 12168–73.

Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology* 1999, 57(7), 727–741.

Godoy LY, Fukushige J, Igarashi H, Matsuzaki A, Ueda K. Anthracycline-induced cardiotoxicity in children with malignancies. *Acta Paediatrica Japonica* 1997, 39, 188–93.

Gomes AV, Guzman G, Zhao J, Potter JD. Cardiac troponin T isoforms affect the Ca²⁺ sensitivity and inhibition of force development. Insights into the role of troponin T isoforms in the heart. *Journal of Biological Chemistry* 2002, 277, 35341-35349.

Gomes AV, Venkatraman G, Davis JP, Tikunova SB, Engel P, Solaro RJ, Potter JD. Cardiac troponin T isoforms affect the Ca²⁺ sensitivity of force development in the presence of slow skeletal troponin I: insights into the role of troponin T isoforms in the fetal heart. *Journal of Biological Chemistry* 2004, 279, 49579-87.

- Guano F, Pourquier P, Tinelli S, Binaschi M, Bigioni M, Animati F, Manzini S, Zunino F, Kohlhagen G, Pommier Y, and Capranico G.** Topoisomerase poisoning activity of novel disaccharide anthracyclines. *Molecular Pharmacology* 1999, 56, 77–84.
- Gunes G, Atalan CM, Erdogan HM.** Use of cardiac troponin kits for the qualitative determination of myocardial cell damage due to traumatic reticuloperitonitis in cattle. *The Veterinary Record* 2008, 162, 514-517.
- Gunes V, Erdogan HM, Citil M, Ozcan K.** Assay of cardiac troponins in the diagnosis of myocardial degeneration due to foot-and-mouth disease in a calf. *The Veterinary Record* 2005, 156, 714-715.
- Güçlü F.** Troponin T Gen Mutasyonlarının Türk Populasyonundaki Dilate Kardiyomyopati Hastalarda Taranması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2006, 76.
- Hallstrom TA.** p53 and DNA damage checkpoint responses in the human prostate, PhD Thesis, University of Helsinki, Haartman Institute, Molecular and Cancer Biology Program, Finland 2007, 100.
- Hasinoff BB, Hellmann K, Herman EH, Ferrans VJ.** Chemical, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines. *Current Medicinal Chemistry* 1998, 5, 1–28.
- Hasinoff BB, Herman EH.** Dexrazoxane: how it works in cardiac and tumor cells. Is it a prodrug or is it a drug? *Cardiovascular Toxicology* 2007, 7(2), 140–144.
- Helt CE, Cliby WA, Keng PC, Bambara RA, O'Reilly MA.** Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage. *Journal of Biological Chemistry* 2005, 280(2), 1186-1192.
- Herman EH, Ferrans VJ.** Preclinical animal models of cardiac protection from anthracycline-induced cardiotoxicity. *Seminars in Oncology* 1998, 25, 15-21.
- Herman EH, Ferrans VJ, Jordan W, Ardalan B.** Reduction of chronic daunorubicin cardiotoxicity by ICRF-187 in rabbits. *Research Communications in Chemical Pathology & Pharmacology* 1981, 31, 85-97.
- Herman EH, Ferrans VJ, Myers CE, Van Vleet JF.** Comparison of the effectiveness of (+/-)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl) propane (ICRF-187) and N-acetylcysteine in preventing chronic doxorubicin cardiotoxicity in beagles. *Cancer Research* 1985, 45(1), 276-81.

Herman EH, Ferrans VJ, Young RS, Hamlin RL. Effect of pretreatment with ICRF-187 on the total cumulative dose of doxorubicin tolerated by beagle dogs. *Cancer Research* 1988, 48, 6918–6925.

Herman EH, Mhatre RM, Lee IP, Waravdekar VS. Prevention of the cardiotoxic effects of adriamycin and daunomycin in the isolated dog heart. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1972, 140(1), 234-9.

Herman EH, Zhang J, Ferrans VJ. Comparison of the protective effects of desferrioxamine and ICRF-187 against doxorubicin-induced toxicity in spontaneously hypertensive rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1994, 35, 93-100.

Herman E, Zhang J, Knapton A, Lipshultz SE, Rifai N, Sistare F. Serum cardiac troponin T as a biomarker for acute myocardial injury induced by low doses of isoproterenol in rats. *Cardiovascular Toxicology* 2006, 6, 211-22.

Herman EH, Zhang J, Lipshultz SE, Rifai N, Chadwick D, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ. Correlation between serum levels of cardiac troponin-T and the severity of the chronic cardiomyopathy induced by doxorubicin. *Journal of Clinical Oncology* 1999, 17, 2237-43.

Hershko C, Link G, Tzahor M, Kaltwasser JP, Athias P, Grynberg A, Pinson A. Anthracycline toxicity is potentiated by iron and inhibited by deferoxamine: studies in rat heart cells in culture. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1993, 122(3), 245-51.

Hershma DL, McBride RB, Eisenberg A, Tsai WY, Grann VR, Jacobson JS. Doxorubicin, cardiac risk factors, and cardiac toxicity in elderly patients with diffuse B-cell Non-Hodgkins lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 2008, 26, 3159-3165.

Holden JA. DNA topoisomerases as anticancer drug targets: from the laboratory to the clinic. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents* 2001, 1(1), 1-25.

Hsiang YH, Wu HY, Liu LF. Proliferation dependent regulation of DNA topoisomerase II in cultured human cells. *Cancer Research* 1988, 48(11), 3230-3235

Huang X, Halicka HD, Traganos F, Tanaka T, Kurose A, Darzynkiewicz Z. Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell Proliferation* 2005, 38(4), 223-243.

Imondi AR, Della Torre P, Mazue G, Sullivan TM, Robbins TL, Hagerman LM, Podesta A, Pinciroli G. Dose-response relationship of dexrazoxane for prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice, rats, and dogs. *Cancer Research* 1996, 56(18), 4200-4.

- Jaffe AS, Landt Y, Parvin CA, Abendschein DR, Geltman EM, Ladenson JH.** Comparative sensitivity of cardiac troponin I and lactate dehydrogenase isoenzymes for diagnosing acute myocardial infarction. *Clinical Chemistry* 1996, 42, 1770-1776.
- Jackson SP.** Detecting, signalling and repairing DNA double-strand breaks. *Biochemical Society Transactions* 2001, 29(6), 655–661.
- Jackson SP.** Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 2002, 23(5), 687–696.
- Jin JP, Huang QQ, Yeh HI, Lin JJ.** Complete nucleotide sequence and structural organization of rat cardiac troponin T gene. A single gene generates embryonic and adult isoforms via developmentally regulated alternative splicing. *Journal of Molecular Biology* 1992, 227(4), 1269–1276.
- Jin JP, Yang FW, Yu ZB, Ruse CI, Bond M, Chen A.** The highly conserved COOH terminus of troponin I forms a Ca^{2+} -modulated allosteric domain in the troponin complex. *Biochemistry* 2001, 40, 2623-2631.
- Jin JP, Zhang Z, Bautista JA.** Isoform diversity, regulation, and functional adaptation of troponin and calponin. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 2008, 18, 93-124.
- Kaneko JK.** Clinical Biochemistry of Domestic Animals (5th ed), Academic Press, San Diego, 1997, 413.
- Karimi G, Hassanzadeh M, Mehri S.** Protective effects of Silymarin against free radical-induced erythrocyte lysis. *Journal of Complementary and Integrative Medicine* 2006, 3, 8.
- Kaufmann SH.** Cell death induced by topoisomerase targeted drugs: more questions than answers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1998, 1400, 195-211.
- Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, Joenje H.** Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics* 1990, 47, 219-231.
- Kobayashi J, Antoccia A, Tauchi H, Matsuura S, Komatsu K.** NBS1 and its functional role in the DNA damage response. *DNA Repair* 2004, 3(8-9), 885-861.
- Kroll DJ, Shaw HS, Oberlies NH.** Milk thistle nomenclature: why it matters in cancer research and pharmacokinetic studies. *Integrative Cancer Therapies* 2007, 6(2), 110-9.
- Kurien BT, Scofield RH.** Western Blotting: An Introduction. In: Western Blotting Methods and Protocols, Kurien BT, Scofield RH (eds), Humana Press, New York, 2015, s 17-30.

- Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A.** Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 2003, 99(2), 167-81.
- Leavis PC, Gergely J.** Thin filament proteins and thin filament-linked regulation of vertebrate muscle contraction. *Critical Reviews in Biochemistry* 1984, 16, 235-305.
- Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb JA.** A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer* 1973, 32, 302-314.
- Lenčová-Popelová O, Jirkovský E, Mazurová Y, Lenčo J, Adamcová M, Šimůnek T, Geršl V, Štěrba M.** Molecular remodeling of left and right ventricular myocardium in chronic anthracycline cardiotoxicity and post-treatment follow up. *PLoS One* 2014, 9(5).
- Li B, Carey M, Workman JL.** The role of chromatin during transcription. *Cell* 2007, 128(4), 707-19.
- Link G, Tirosh R, Pinson A, Hershko C.** Role of iron in the potentiation of anthracycline cardiotoxicity: identification of heart cell mitochondria as a major site of iron–anthracycline interaction. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1996, 127(3), 272-278.
- Lipshultz SE, Lipsitz SR, Mone SM, Goorin AM, Sallan SE, Sanders SP, Orav EJ, Gelber RD, Colan SD.** Female sex and drug dose as risk factors for late cardiotoxic effects of doxorubicin therapy for childhood cancer. *New England Journal of Medicine* 1995, 332(26), 1738-43.
- Lowndes NF, Toh GW.** DNA repair: the importance of phosphorylating histone H2AX. *Current Biology* 2005, 15, 99-102.
- Lyu YL, Kerrigan JE, Lin CP, Azarova AM, Tsai YC, Ban Y, Liu LF.** Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Research* 2007, 67, 8839–8846.
- Manna P, Sinha M, Sil PC.** Arsenic induced oxidative myocardial injury: Protective role of arjunolic acid. *Archives of Toxicology* 2008, 82, 137-149.
- Marston SB, Redwood CS.** Modulation of thin filament activation by breakdown or isoform switching of thin filament proteins: Physiological and pathological implications. *Circulation Research* 2003, 93, 1170-1178.
- Martin E, Thougard AV, Grauslund M, Jensen PB, Bjorkling F, Hasinoff BB, Tjørnelund J, Sehested M, Jensen LH.** Evaluation of the topoisomerase II-inactive bisdioxopiperazine ICRF-161 as a protectant against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Toxicology* 2009, 255(1-2), 72–9.

- McAuliffe JJ, Gao LZ, Solaro RJ.** Changes in myofibrillar activation and troponin C Ca²⁺ binding associated with troponin T isoform switching in developing rabbit heart. *Circulation Research* 1990, 66, 1204-1216.
- Menna P, Salvatorelli E, Minotti G.** Anthracycline degradation in cardiomyocytes: a journey to oxidative survival. *Chemical Research in Toxicology* 2010, 23(1), 6-10.
- Mesnard-Rouiller L, Mercadier J-J, Butler-Brown G, Heimbürger M, Logeat D, Allen PD, Samson F.** Troponin T mRNA and protein isoforms in the human left ventricle: pattern of expression in failing and control hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1997, 29, 3043-3055.
- Mettler FP, Young DM, Ward JM.** Adriamycin-induced cardiotoxicity (cardiomyopathy and congestive heart failure) in rats. *Cancer Research* 1977, 37, 2705-13.
- Migrino RQ, Aggarwal D, Konorev E, Brahmbhatt T, Bright M, Kalyanaraman B.** Early detection of doxorubicin cardiomyopathy using two-dimensional strain echocardiography. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2008, 34, 208-214.
- Minotti G, Cairo G, Monti E.** Role of iron in anthracycline cardiotoxicity: new tunes for an old song? *FASEB Journal* 1999, 13, 199-212.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L.** Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews* 2004, 56(2), 185–229.
- Minotti G, Recalcati S, Mordente A, Liberi G, Calafiore AM, Mancuso C, Preziosi P, Cairo G.** The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase/iron regulatory protein-1 in cytosolic fractions from human myocardium. *FASEB Journal* 1998, 12(7), 541–52.
- Moon K, Guallar E, Navas-Acien A.** Arsenic Exposure and Cardiovascular Disease: An Updated Systematic Review. *Current Atherosclerosis Reports* 2012, 14, 542-555.
- Morawietz G, Ruehl-Fehlert C, Kittel B, Bube A, Keane K, Halm S, Heuser S, Heuser A, Hellmann J.** Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 3. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2004, 55, 433-449.
- Morazzoni P, Montalbetti A, Malandrino S, Pifferi G.** Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 1993, 18, 289-297.
- Motawi TM, Sadik NA, Refaat A.** Cytoprotective effects of DLalpha-lipoic acid or squalene on cyclophosphamide-induced oxidative injury: an experimental study on rat

myocardium, testicles and urinary bladder. *Food and Chemical Toxicology* 2010, 48, 2326–36.

Muthumani M, Prabu SM. Silibinin potentially attenuates arsenic-induced oxidative stress mediated cardiotoxicity and dyslipidemia in rats. *Cardiovascular Toxicology* 2014, 14, 83-97.

Nabavi SM, Nabavi SF, Moghaddam AH, Setzer WN, Mirzaei M. Effect of silymarin on sodium fluoride-induced toxicity and oxidative stress in rat cardiac tissues. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2012, 84, 1121-1126.

Nassar R, Malouf NN, Kelly MB, Oakeley AE, Anderson PA. Force-pCa relation and troponin T isoforms of rabbit myocardium. *Circulation Research* 1991, 69, 1470-1475.

Nazemian F, Karimi G, Moatamedi M, Charkazi S, Shamsara J, Mohammadpour AH. Effect of silymarin administration on TNF- α serum concentration in peritoneal dialysis patients. *Phytotherapy Research* 2010, 24, 1654-1657.

Ning Y, Shen Q, Herrick K, Mikkelsen R, Anscer M, Houlihan R, Lapane K. Cause of death in cancer survivors (abstr). *Cancer Res* 2012, 72, LB–339.

O'Brien PJ. Review: Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. *Toxicology* 2008, 245, 206-218.

Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2012, 52, 1213–1225.

Ohnishi T, Mori E, Takahashi A. DNA double-strand breaks: their production, recognition, and repair in eukaryotes. *Mutation Research* 2009, 669, 8-12.

Olson HM, Capen CC. Chronic cardiotoxicity of doxorubicin (adriamycin) in the rat: morphologic and biochemical investigations. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1978, 44(3), 605-16.

Panjrath GS, Patel V, Valdiviezo CI, Narula N, Narula J, Jain D. Potentiation of doxorubicin cardiotoxicity by iron loading in a rodent model. *Journal of the American College of Cardiology* 2007, 49, 2457–2464.

Parmacek MS, Solaro RJ. Biology of the troponin complex in cardiac myocytes. *Progress in Cardiovascular Diseases* 2004, 47, 159-76.

Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, Sledge GW, Kaufman PA, Hudis CA, Martino S, Gralow JR, Dakhil SR, Ingle JN, Winer EP, Gelmon KA, Gersh BJ, Jaffe AS, Rodeheffer RJ. Cardiac safety analysis of doxorubicin and cyclophosphamide followed

by paclitaxel with or without trastuzumab in the North Central Cancer Treatment Group N9831 adjuvant breast cancer trial. *Journal of Clinical Oncology* 2008, 26(8), 1231-8.

Perry SV. Troponin I: inhibitor or facilitator. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1999, 190, 9-32.

Pınar L. Sinir ve Kas Fizyolojisi Temel Bilgiler, Efil Yayınevi, Ankara 2010, 238.

Pilch DR, Sedelnikova OA, Redon C, Celeste A, Nussenzweig A, Bonner WM. Characteristics of γ -H2AX foci at DNA double-strand break sites. *Biochemistry and Cell Biology* 2003, 81, 123-129.

Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature Reviews Cancer* 2006, 6(10), 789–802.

Popelová O, Sterba M, Simůnek T, Mazurová Y, Guncová I, Hroch M, Adamcová M, Gersl V. Deferiprone does not protect against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2008, 326, 259-269.

Popelová O, Sterba M, Hasková P, Simůnek T, Hroch M, Guncová I, Nachtigal P, Adamcová M, Gersl V, Mazurová Y. Dexrazoxane-afforded protection against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo: effective rescue of cardiomyocytes from apoptotic cell death. *British Journal of Cancer* 2009, 101(5), 792-802.

Psotová J, Chlopčíková S, Grambal F, Simánek V, Ulrichová J. Influence of silymarin and its flavonolignans on doxorubicin-iron induced lipid peroxidation in rat heart microsomes and mitochondria in comparison with quercetin. *Phytotherapy Research* 2002, 16, 63-67.

Qureshi A, Pervez S. Allred scoring for ER reporting and it's impact in clearly distinguishing ER negative from ER positive breast cancers. *Journal of Pakistan Medical Association* 2010, 60(5), 350-3.

Ramakrishnan G, Lo Muzio L, Elinos-Báez CM, Jagan S, Augustine TA, Kamaraj S, Anandakumar P, Devaki T. Silymarin inhibited proliferation and induced apoptosis in hepatic cancer cells. *Cell Proliferation* 2009, 42, 229-240.

Rao PR, Viswanath RK. Cardioprotective activity of silymarin in ischemia-reperfusion-induced myocardial infarction in albino rats. *Experimental & Clinical Cardiology* 2007, 12, 179-187.

Roca J, Ishida R, Berger JM, Andoh T, Wang JC. Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 1994, 91(5), 1781-1785.

Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry* 1998, 273(10), 5858-5868.

Rossetto D, Truman AW, Kron SJ, Côté J. Epigenetic modifications in double-strand break DNA damage signaling and repair. *Clinical Cancer Research* 2010, 16(18), 4543-52.

Saandeep K, Vikram A, Tripathi DN, Ramarao P, Jena G. Influence of hyperglycaemia on chemical-induced toxicity: study with cyclophosphamide in rat. *Basic & Clinical Pharmacology Toxicology* 2009, 105, 236-42.

Sander M, Hsieh T. Double strand DNA cleavage by type II DNA topoisomerase from *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Biological Chemistry* 1983, 258, 8421-8428.

Sawyer DB, Peng X, Chen B, Pentassuglia L, Lim CC. Mechanisms of anthracycline cardiac injury: can we identify strategies for cardioprotection? *Progress in Cardiovascular Diseases* 2010, 53, 105-113.

Sayed-Ahmed MM, Aldelemy ML, Al-Shabanah OA, Hafez MM, Al-Hosaini KA, Al-Harbi NO, Al-Sharary SD, Al-Harbi MM. Inhibition of gene expression of carnitine palmitoyltransferase I and heart fatty acid binding protein in cyclophosphamide and ifosfamide-induced acute cardiotoxic rat models. *Cardiovascular Toxicology* 2014, 14, 232-42.

Schoeffler AJ, Berger JM. Topoisomerases: DNA harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Quarterly Reviews of Biophysics* 2008, 41(1), 41–101.

Schmidt BH, Burgin AB, Dewese JE, Osheroff N, Berger JM. A novel and unified two metal mechanism for DNA cleavage by type II and IA topoisomerases. *Nature* 2010, 465(7298), 641–4.

Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols* 2008, 3(6), 1101-8.

Sheng JJ, Jin JP. Gene regulation, alternative splicing, and posttranslational modification of troponin subunits in cardiac development and adaptation: a focused review. *Frontiers in Physiology* 2014, 5, 165.

Sigel R, Desantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedewa S, Lin C, Leach C, Cannady RS, Cho H, Scoppa S, Hachey M, Kirch R, Jemal A, Ward E. Cancer treatment and survivorship statistics. *CA Cancer Journal for Clinicians* 2012, 62(4), 220-41.

Simůnek T, Klimtová I, Adamcová M, Gersl V, Hrdina R, Sterba M, Kaplanová J, Mazurová Y. Cardiac troponin T as an indicator of reduced left ventricular contractility in

experimental anthracycline-induced cardiomyopathy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2003, 52, 431-434.

Simůnek T, Klimtová I, Kaplanová J, Sterba M, Mazurová Y, Adamcová M, Hrdina R, Gersl V, Ponka P. Study of daunorubicin cardiotoxicity prevention with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone in rabbits. *Pharmacological Research* 2005b, 51, 223-231.

Simunek T, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R, Gersl V. Anthracycline induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological Reports* 2009, 61, 154-71.

Sinha M, Manna P, Sil PC. Terminalia arjuna protects mouse hearts against sodium fluoride-induced oxidative stress. *Journal of Medicinal Food* 2008, 11, 733-740.

Smider V, Chu G. The end-joining reaction in V(D)J recombination. *Seminars in Immunology* 1997, 9(3), 189-197

Sonoda E, Hohegger H, Saberi A, Taniguchi Y, Takeda S. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair* 2006, 5(9-10), 1021-1029.

Srivastava N, Gochhait S, de Boer P, Bamezai RN. Role of H2AX in DNA damage response and human cancers. *Mutation Research* 2009, 681(2-3), 180-188.

Sterba M, Popelová O, Simůnek T, Mazurová Y, Potácová A, Adamcová M, Guncová I, Kaiserová H, Palicka V, Ponka P, Gersl V. Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: a study of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). *Toxicology* 2007, 235, 150-166.

Sterba M, Popelová O, Simunek T, Mazurová Y, Potácová A, Adamcová M, Kaiserová H, Ponka P, Gersl V. Cardioprotective effects of a novel iron chelator, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone, in the rabbit model of daunorubicin-induced cardiotoxicity. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2006, 319, 1336-1347.

Stěrba M, Popelová O, Vávrová A, Jirkovský E, Kovaříková P, Geršl V, Simůnek T. Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxidants & Redox Signaling* 2013, 18, 899-929.

Sun Y, Jiang X, Chen S, Fernandes N, Price BD. A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, 102(37), 13182-187.

- Taghiabadi E, Imenshahidi M, Abnous K, Mosafa F, Sankian M, Memar B, Karimi G.** Protective Effect of Silymarin against acrolein-induced cardiotoxicity in mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012.
- Tan C, Tasaka H, Yu KP, Murphy ML, Karnofsky DA.** Daunomycin, An Antitumor Antibiotic, In the Treatment of Neoplastic Disease. Clinical Evaluation with Special Reference to Childhood Leukemia. *Cancer* 1967, 20(3), 333-353.
- Tanker N, Koyuncu M, Çoşkun M.** Farmasotik Botanik, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 2007, 434.
- Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, Zuppinger C, Wallimann T, Schlattner U.** New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: the critical role of cellular energetics. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2006, 41, 389-405.
- Tunca R, Erdogan HM, Sozmen M, Citil M, Devrim AK, Erginsoy S, Uzu E.** Evaluation of cardiac troponin I and inducible nitric oxide synthase expressions in lambs with White muscle disease. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2009, 33:53-59.
- Tunca R, Sozmen M, Erdogan HM, Citil M, Uzu E, Ozen H, Gokce E.** Determination of cardiac troponin I in the blood and heart of calves with foot and mouth disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2008, 20, 598-605.
- van Dalen EC, Caron HN, Dickinson HO, Kremer LC.** Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. *Cochrane Database Systematic Reviews* 2008, 16(2):CD003917.
- Van Vleet JF, Ferrans VJ.** Clinical and pathologic features of chronic adriamycin toxicosis in rabbits. *American Journal of Veterinary Research* 1980, 41, 1462-1469.
- Van Vleet JF, Ferrans VJ, Weirich WE.** Cardiac disease induced by chronic adriamycin administration in dogs and an evaluation of vitamin E and selenium as cardioprotectants. *The American Journal of Pathology* 1980, 99, 13-42.
- Vejpongsa P, Yeh ET.** Topoisomerase 2 β : a promising molecular target for primary prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2014, 95(1), 45-52.
- Vejpongsa P, Yeh ET.** Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. *Journal of the American College of Cardiology* 2014, 64(9), 938-45.
- Vos SM, Tretter EM, Schmidt BH, Berger JM.** All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2011, 12(12), 827-41.

- Wallace KB.** Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacology & Toxicology* 2003, 93, 105-115.
- Wang JC.** DNA topoisomerases. *Annual Review of Biochemistry* 1996, 65, 635–692.
- Wang JC, Liu LF.** DNA Replication: Topological Aspects and the Roles of DNA Topoisomerases. In: Cozzarelli NR, Wang JC (eds), *DNA Topology and its Biological Effects*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1990, s321-340.
- Weiss RB.** The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Seminars in Oncology* 1992, 19:670–686.
- Wellington K, Jarvis B.** Silymarin: A review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs* 2001, 15, 465-489.
- Wilstermann AM, Osheroff N.** Stabilization of Eukaryotic Topoisomerase II-DNA Cleavage Complexes. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2003, 3(3), 321-38.
- Woessner RD, Mattern MR, Mirabelli CK, Johnson RK, Drake FH.** Proliferation- and cell cycle-dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells. *Cell Growth & Differentiation* 1991, 2(4), 209–214.
- Wouters KA, Kremer LC, Miller TL, Herman EH, Lipshultz SE.** Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies. *British Journal of Haematology* 2005, 131, 561–578.
- Wu AHB, Feng JV, Moore R, Apple FS, Mopherson PH, Buechler KF, Bodor G.** Characterization of cardiac troponin subunit release into serum after acute myocardial infarction and comparison of assays for troponin T and I. *Clinical Chemistry* 1998, 44, 1198-1208.
- Wu JW, Lin LC, Hung SC, Chi CW, Tsai TH.** Analysis of silibinin in rat plasma and bile for hepatobiliary excretion and oral bioavailability application. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007, 45, 635-641.
- Xu X, Persson HL, Richardson DR.** Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron. *Molecular Pharmacology* 2005, 68(2), 261-71.
- Yamauchi H, Aminaka Y, Yoshida K, Sun G, Pi J, Waalkes MP.** Evaluation of DNA damage in patients with arsenic poisoning: Urinary 8-hydroxydeoxyguanine. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2004, 198, 291-296.
- York M, Scudamore C, Brady S, Chen C, Wilson S, Curtis M, Evans G, Griffiths W, Whayman M, Williams T, Turton J.** Characterization of troponin responses in

isoproterenol-induced cardiac injury in the Hanover Wistar rat. *Toxicologic Pathology* 2007, 35, 606-17.

Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, Yeh ET. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature Medicine* 2012, 18, 1639-1642.

Zhao J, Agarwal R. Tissue distribution of silibinin, the major active constituent of silymarin, in mice and its association with enhancement of phase II enzymes: Implications in cancer chemoprevention. *Carcinogenesis* 1999, 20, 2101-2108.

Zhou B, Wu LJ, Li LH, Tashiro S, Onodera S, Uchiumi F, Ikejima T. Silibinin protects against isoproterenol-induced rat cardiac myocyte injury through mitochondrial pathway after up-regulation of SIRT1. *Journal of Pharmacological Sciences* 2006a, 102, 387-395.

Zhou B, Wu LJ, Tashiro S, Onodera S, Uchiumi F, Ikejima T. Silibinin Protects Rat Cardiac Myocyte from Isoproterenol-Induced DNA Damage Independent on Regulation of Cell Cycle. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2006b, 29, 1900-1905.

Zechiedrich EL, Christiansen K, Andersen AH, Westergaard O, Osheroff N. Double-stranded DNA cleavage/religation reaction of eukaryotic topoisomerase II: evidence for a nicked DNA intermediate. *Biochemistry* 1989, 28 (15), 6229-6236.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : İpek Emrah
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Mustafakemalpaşa 16.01.1989
Telefon : 05439534305
E-mail : ipek.emrah@windowslive.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Patoloji (Veteriner)	2012-
Lisans	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2011

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2011 yılı dönem beşincisi
Çukurova bölgesinde Batı Nil virüs (BNV) enfeksiyonun etiyolojik ve serolojik olarak araştırılması ve vektör özelliklerinin belirlenmesi başlıklı TÜBİTAK Projesi'nde (SBAG-110-S-404) Bursiyer, 2012

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2012 -	Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı	Araş. Gör.

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

Tunca R, Devrim AK, Sözmen M, Dağ S, Güngör O, Ipek E. The effects of gemfibrozil and ovariectomy on the peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) in mice with experimentally induced obesity. *Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University* 2013, 19, 783-792.

Toplu N, Tan MT, Pasa S, Epikmen ET, Ipek E. The Detection of Viral Antigen Localization with Immunohistochemical Methods in Goats Naturally Infected with Caprine Arthritis Encephalitis Virus *Animal Health, Production and Hygiene* 2014.

Erdogan G, Yaygingül R, Ucar EH, Sen ZB, Peker C, Gultekin M, Ipek E, Pasa S. A giant non-functioning granulosa cell tumor in a dog. *Animal Health, Production and Hygiene* 2015, 4(1), 408-410.

Oğuzoğlu TÇ, Toplu N, Koç BT, Doğan F, Epikmen ET, Ipek E, Akkoç AN. First molecular detection and characterization of Akabane virus in small ruminants in Turkey. *Archives of Virology* 2015, 160(10), 2623-7.

Demir Ş, Ünübol M, Aypak SÜ, Ipek E, Aktaş S, Ekren GS, Yılmaz M, Tunca R, Güney E. Histopathologic Evaluation of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Hypothyroidism-Induced Rats. *International Journal of Endocrinology* 2016, 5083746.

Avcı H, Epikmen ET, Ipek E, Tunca R, Birincioglu SS, Aksit H, Sekkin S, Akkoc AN, Boyacioglu M. Protective effects of silymarin and curcumin on cyclophosphamide-induced cardiotoxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2017, 69(5), 317-327.

Naseer Z, Ahmad E, Epikmen ET, Ucan U, Boyacioglu M, Ipek E, Aksoy M. Quercetin supplemented diet improves follicular development, oocyte quality, and reduces ovarian apoptosis in rabbits during summer heat stress. *Theriogenology* 2017, 96(1), 136-141.

2. PROJELER

1. Çukurova bölgesinde Batı Nil virüs (BNV) enfeksiyonun etiyolojik ve serolojik olarak araştırılması ve vektör özelliklerinin belirlenmesi, TÜBİTAK Projesi, SBAG-110-S-404, **Bursiyer**, 2012.

2. Köpeklerde miyokardiyal hasarın belirlenmesinde kardiyak troponinlerin etkinliğinin araştırılması, Adnan Menderes Üniversitesi BAP, VTF-12003, **Yardımcı Araştırmacı**, 2012-devam ediyor

3. Doksorubisin Kardiyotoksitesinin Önlenmesinde Dekssazoksan ve Silimarin Etkinliğinin Karşılaştırılmalı Olarak Araştırılması, Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP), **Yardımcı Araştırmacı**, 2014-devam ediyor.

4. Mevcut nekropsi salonunun Avrupa Veteriner Eğitim Kurumları standartlarına uygun olarak yeniden yapılandırılması, Adnan Menderes Üniversitesi BAP, **Yardımcı Araştırmacı**, 2014-2015.

5. Hipotiroidizm oluşturulmuş ratlarda alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı gelişiminin ve epikardiyal yağ dokusunun değerlendirilmesi, Adnan Menderes Üniversitesi BAP, TPF-15011, **Yardımcı Araştırmacı**, 2015
6. Gökkuşluğu Alabalıklarında İnfeksiyöz Pankreatik Nekroz'un Patogenezi Üzerine Deneysel Bir Araştırma: Apoptosis ve Tip 1 İnterferonların İnate (Doğal) Bağışıklıktaki Rolü, TAGEM Projesi, HSGYAD/13/A11/P03/34, **Yardımcı Araştırmacı**, 2015-2016
7. Tiroid Nodülü ve Adrenal Adenom Oluşumunda Metabolik Sendromun Rolünün Rat Modelinde Değerlendirilmesi, Adnan Menderes Üniversitesi BAP, TPF-16017, **Yardımcı Araştırmacı**, 2016-devam ediyor
8. Tavşanlarda korneanın subakut alkali yanıklarında amniyotik membran transplantasyonu, topikal su bazlı propolis ekstraktı, kortikosteroid ve antibiyotiklerin farklı kombinasyonlarda kullanımının etkinliğinin karşılaştırılması, Adnan Menderes Üniversitesi BAP, VTF-15056, **Yardımcı Araştırmacı**, 2015-devam ediyor
9. İnfeksiyöz Pankreatik Nekroz (IPN)'un Tanısı için "In Situ Hibridizasyon" moleküler kitinin geliştirilmesi, TAGEM Projesi, 15/AR-GE/50, **Yardımcı Araştırmacı**, 2015-2017
10. İndometazinle İndüklenmiş Gastrik Ülserde Androgropolide'in Farklı Dozlarda Koruyucu Etkinliğinin Araştırılması, TPF-17002, **Yardımcı Araştırmacı**, 2017-devam ediyor
11. Parasetamol intoksikasyonuna bağlı karaciğer hasarını önlemede arbutin'in rolü, TPF-17004, **Yardımcı Araştırmacı**, 2017-devam ediyor

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler

Ozkul A, Ergunay K, Karaoglu MT, Tezcan S, Kasap OZ, Turan M, Faraji A, Gunay F, Ipek E, Gargari S. West Nile Virus Circulation in Cukurova Region, Turkey. *IX. International Congress of Veterinary Virology*, 4-7 Eylül 2012, Madrid (Sözlü Bildiri)

Avci H, Epikmen ET, Ipek E, Tunca R, Birincioglu SS, Aksit H, Sekkin S, Akkoc AN, Boyacioglu M. Protective effects of silymarin and curcumin on cyclophosphamide-induced cardiotoxicity. *I. Uluslararası Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Kongresi*, 09-12 Mayıs 2017, Konya (Sözlü Bildiri)

Birincioglu SS, Avci H, Ipek E, Berke E. Histopathologic and ultrastructural findings of *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporidia: Bivalvulida) in European seabass (*Dicentrarchus*

labrax L.) in Turkey. *18th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish*, 4-8 September 2017, Belfast, UK (Sözlü Bildiri)

Birincioglu SS, Aypak S, Avcı H, Birincioglu B, İpek E, Akkoc AN. Pathological and Parasitological Investigations in an Adult Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). *18th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish*, 4-8 September 2017, Belfast, UK (Poster bildiri)

B) Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler

İpek E, Tunca R. Silimarinin Topoizomerez II β Gen İfadesi Üzerine Etkisinin Doksorubisin İle Oluşturulan Kronik Kardiyotoksisteki Koruyucu Etkinliği, *VIII. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi*, 1-3 Eylül 2016, Samsun (Sözlü Bildiri)

Toplu N, Oğuzoglu TÇ, Akkoç AN, Epikmen ET, İpek E, Koç B. Ege Bölgesinde Bir Sığır İşletmesinde Akabane Enfeksiyonu, *VIII. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi*, 1-3 Eylül 2016, Samsun (Sözlü Bildiri)

Birincioglu SS, Avcı H, İpek E, Epikmen ET, Avsever ML, Akkoç AN, Berke E. Erişkin Levreklerde (*Dicentrarchus Labrax L.*) Kronik Fotobakteriozis Enfeksiyonunda Patolojik ve İmmunhistokimyasal İncemeler, *VIII. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi*, 1-3 Eylül 2016, Samsun (Sözlü Bildiri)

Birincioglu SS, İpek E, Akkoç AN, Avcı H. İki Aylık Holsteinırkı Bir Buzağıda Fallot Tetralojisi, *VIII. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi*, 1-3 Eylül 2016, Samsun (Poster Bildiri)

Toplu N, Ozan E, Oğuzoglu TÇ, Albayrak H, Epikmen ET, Akça Y, İpek E, Akkoç AN. Gökkuşığı Alabalıklarında Deneysel İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis Hastalığında Apoptozis ve Tip 1 İnterferonların Doğal Bağışıklıktaki Rolü, *VIII. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi*, 1-3 Eylül 2016, Samsun (Poster Bildiri)

Toplu N, Epikmen ET, İpek E, Akkoç AN. Arşiv Parafin Bloklardan Köpek Viseral Leishmaniasisin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Leishmania İmfantum'un Genomik DNA'sının Belirlenmesi, *VIII. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi*, 1-3 Eylül 2016, Samsun (Poster Bildiri)

Aypak SÜ, Ünübol M, Aktaş S, İpek E, Ekren G, Tunca R, Güney E. Spirinolakton Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Gelişimini Önler mi? (Deneysel Çalışma). *18. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi*, 12-16 Ekim 2016, (Sözlü Bildiri)