



MERYEM ŞEYDA KAYA	DICLE ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.	DOKTORA TEZİ	DİYARBAKIR-2022
-------------------	------------------------------------	--------------	-----------------



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Reseptör Etkileşimli Protein Kinaz-3 İnhibitörü Dabrafenib'in
Doksorubisin Kardiyotoksitesi Sonucu Oluşan Nekroptoza Karşı
Koruyucu Etkilerinin Araştırılması**

Meryem Şeyda KAYA

DOKTORA TEZİ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Meral ERDİNÇ

DIYARBAKIR – 2022



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Reseptör Etkileşimli Protein Kinaz-3 İnhibitörü Dabrafenib'in
Doksorubisin Kardiyotoksitesisi Sonucu Oluşan Nekroptoza Karşı
Koruyucu Etkilerinin Araştırılması**

Meryem Şeyda KAYA
DOKTORA TEZİ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Meral ERDİNÇ

DİYARBAKIR – 2022



DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Farmakoloji Anabilim Dalı** Doktora öğrencisi **Meryem Şeyda KAYA**'nın hazırladığı “**Reseptör Etkileşimli Protein Kinaz-3 İnhibitörü Dabrafenib’in Doksorubisin Kardiyotoksitesi Sonucu Oluşan Nekroptoza Karşı Koruyucu Etkilerinin Araştırılması**” başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman _____

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı _____

Üye _____

Üye _____

Üye _____

Üye _____

Tarih:/....../2022

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/....../.... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

...../...../2022

Prof. Dr. Mahmut BALKAN
Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

10/01/2022

Meryem Şeyda KAYA

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca bilgisini, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Meral ERDİNÇ'e, çalışmama sundukları yardımlarından dolayı Doç. Dr. İlker KELLE'ye, Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Erdoğmuş ÖZGEN'e, Dr. Şeyma DOĞAN'a, Dr. Fatma ÜNSAL OĞUZ'a ve Arş. Gör. Mahir BİNİCİ'ye çok teşekkür ediyorum. Doktora eğitimim boyunca yardımcım ve destekçim olan değerli arkadaşlarım Doç. Dr. Fesih AKTAR'a ve Doç. Dr. Mehmet BOĞA'ya ayrıca çok teşekkür ediyorum. Tez çalışmalarım sırasında kullandığım "Dabrafenib" isimli ilacın temini konusunda yardımcı olan Prof. Dr. Mehmet KÜÇÜKÖNER'e teşekkür ediyorum. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ABD, Tıbbi Genetik ABD, Tıbbi Biyokimya ABD ve DÜSAM personellerine bütün yardımları için çok teşekkür ediyorum.

Hayatımın her alanında sonsuz destekçim olan annem Hatice KAYA'ya, babam Muzaffer KAYA'ya ve kardeşim Yunus Emre KAYA'ya ve cıvıltılarıyla bana hep neşe veren kuşlarım arif, ceku, alış ve mavişe çok teşekkür ediyorum.

Bu tez Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından TIP.20.19 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

BEYAN.....	I
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	III
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	V
RESİMLER LİSTESİ.....	VII
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VIII
TABLolar LİSTESİ.....	IX
1. ÖZET.....	1
1.1. Türkçe Özet.....	1
1.2. Abstract.....	3
2. GİRİŞ ve AMAÇ.....	5
3. GENEL BİLGİLER.....	7
3.1. Doksorubisin.....	7
3.1.1. Genel özellikler.....	7
3.1.2. Biyokimyasal yapısı.....	7
3.1.3. Etki mekanizması.....	8
3.1.4. Metabolizması.....	9
3.1.5. Yan etkileri.....	10
3.2. Doksorubisin Kardiyotoksisite Mekanizmaları.....	10
3.2.1. Oksidatif Stres.....	11
3.2.1.1. Mitokondriyel ROS üretimi.....	11
3.2.1.2. Dox – Fe kompleksi ile ROS Üretimi.....	12
3.2.1.3. NOS üzerinden ROS Üretimi.....	12
3.2.1.4. NADPH Üzerinden ROS Üretimi.....	13
3.2.1.5. Hücre İçi Kalsiyum Düzensizliği Üzerinden ROS Üretimi.....	13
3.2.2. Hücreölüm Yollarının Aktivasyonu.....	14
3.2.2.1.1. Apoptoz.....	14
3.2.2.1.2. Nekroptoz.....	15
3.3. Dabrafenib.....	17
3.4. Necrostatin-1.....	18
4. GEREÇ ve YÖNTEM.....	19
4.1. Kullanılan Cihazlar.....	19
4.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	19
4.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	21
4.4. Kullanılan Deney Hayvanlarının Temini.....	22
4.5. Deney Gruplarının Dizayını.....	22
4.6. Farmakolojik Analizler.....	23
4.7. Biyokimyasal Analizler.....	24
4.8. Histopatolojik Analizler.....	24
4.9. Western Blotting Analizi.....	24
4.9.1. Total protein ekstraksiyonu.....	24
4.9.2. Total protein kuantifikasyonu.....	25
4.9.3. SDS-PAGE jel elektroforezi.....	25
4.9.4. Elektrobloklama işlemi.....	26
4.9.5. Bloklama işlemi.....	27
4.9.6. Antikorların inkübasyonu.....	27

4.9.7. Kemilüminesans görüntüleme.....	27
4.10. İstatistiksel Analizler.....	28
5. BULGULAR.....	29
5.1. Farmakolojik Bulgular.....	29
5.2. Biyokimyasal Bulgular	30
5.3. Histopatolojik Bulgular.....	31
5.4. Western Blotting Bulguları.....	39
6. TARTIŞMA	41
7. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	46
8. KAYNAKLAR	47
9. ÖZGEÇMİŞ	50
10. EKLER.....	51
10.1. Etik Kurul Kararı.....	51
10.2. Tez İntihal Raporu.....	52



KISALTMALAR ve SİMGELER

Dox: Dokсорubisin

Nec-1: Necrostatin 1

Dab: Dabrafenib

LDH: Laktat dehidrojenez

CK: Kreatin Kinaz

H&E: Hemotoksilen&Eozin

CaMKII: Ca²⁺/kalmodulin bağı protein kinaz II

CypD: Siklofilin D

ROS: serbest oksijen radikalleri

NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotid fosfat

NOX: NADPH oksidaz

ETC: Elektron Taşıma Zinciri

NOS: Nitrik Oksid Sentaz

TBA: Tiyobarbütirik asit

TCA: Trikloroasetik asit

APAF-1: Apoptoz proteaz aktifleştirici faktör 1

FADD: Fas ile ilişkili ölüm alanı

FasR: Fas reseptörü

MAPK: Mitogen-activated protein kinaz

MLKL: Karışık soy kinaz bölgesi benzeri protein

NF-κB: Nekroz faktör kappa B

TNF-α: Tümör nekroz faktör-α

TNFR1: TNF-α reseptörü 1

TRAF2: TNF reseptör bağlantılı faktör 2

ERK1/2: Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz 1/2

MKK1/2: Mitojenle aktive olan protein kinaz 1/2

CYLD: Silindromatoz

PYGL: Glikojen fosforilaz

GLUL: Glutamin sentetaz

GLUD1: Glutamat dehidrojenaz 1

I/R: İskemi/reperfüzyon

mPTP: Mitokondriyal transfer poru

RIP1: Reseptör etkileşimli protein kinaz 1

RIP3: Reseptör etkileşimli protein kinaz 3

ALT: Alanin transaminaz

AST: Aspartat transaminaz

AngII: Angiotensin II

i.p.: İntraperitoneal

i.v.: İntravenöz

o.g.: Oral gavaj

KAH: Kalp atım hızı

MDA: Malondialdehit

TBST: Tris-buffered saline with 0.1% Tween[®] 20

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1: Langendorff Sistemi.....	23
Resim 2: İzole Perfüze Kalp.....	23
Resim 3: SDS-PAGE Jel Elektroforez Sistemi.....	26
Resim 4: Elektrobtlama Sistemi.....	27
Resim 5: H&E Boyama ile Kontrol grubu.....	33
Resim 6: H&E Boyama ile Dox.....	34
Resim 7: H&E Boyama ile Dox + Dab grubu.....	35
Resim 8: H&E Boyama ile Dox+Nec grubu.....	36
Resim 9: H&E Boyama ile Dab grubu.....	37
Resim 10: H&E Boyama ile Nec grubu.....	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Doksorubisinin kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2: Doksorubisin ile indüklenen hücresel ölüm yolları.....	14
Şekil 3: Dabrafenibin kimyasal Yapısı.....	17
Şekil 4: Necrostatin-1'in kimyasal yapısı.....	18
Şekil 5: Bütün gruplarda koroner perfüzyon basınç değişimleri.....	29
Şekil 6: Bütün gruplarda kalp hızı değişimleri.....	30
Şekil 7: Bütün gruplarda ölçülen Malondialdehit (MDA) düzeyleri.....	30
Şekil 8: Gruplara göre doku protein ekspresyon düzeyleri.....	39
Şekil 9: Bütün gruplarda çalışılan proteinlere ait western blotting bant görüntüleri...	40

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: Krebs Henseleit Çözeltisinin İçeriği.....	21
Tablo 2: Ayırıcı Jel İçeriği.....	26
Tablo 3: Yoğunlaştırıcı Jel İçeriği.....	26
Tablo 4: Antikorlar ve Seyreltme Oranları.....	28



1. ÖZET

1.1. Türkçe Özet

Başlık: Reseptör Etkileşimli Protein Kinaz-3 İnhibitörü Dabrafenib'in Doksorubisin Kardiyotoksitesisi Sonucu Oluşan Nekroptoza Karşı Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

Öğrenci: Meryem Şeyda KAYA

Danışman: Prof. Dr. Meral ERDİNÇ

Anabilim Dalı: Farmakoloji

Amaç: RIP3 enziminin selektif inhibitörü olan dabrafenibin (Dab) doksorubisin (Dox) kardiyotoksitesisinde gelişen nekroptoza karşı koruyucu etkilerini araştırmak ve nekroptoza karşı koruyucu etkisi kanıtlanmış RIP1 inhibitörü nekrostatin-1 (Nec-1) ile karşılaştırmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 48 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat 6 gruba ayrıldı: 7 gün boyunca intraperitoneal (i.p.) ilaç enjeksiyonları yapıldı. Kontrol grubu (her gün 1 ml serum fizyolojik), Dox grubu (tek doz 10 mg/kg Dox), Dox+Dab grubu (tek doz 10 mg/kg Dox ve her gün 10 mg/kg Dab), Dox+Nec grubu (tek doz 10 mg/kg Dox ve her gün 1,65 mg/kg Nec-1); Dab grubu (her gün 10 mg/kg Dab), Nec grubu (her gün 1,65 mg/kg Nec-1). 7 günün sonunda bütün gruplarda, ratların kalpleri izole edildi ve aorttan kanüle edilerek Langendorf sisteminde Krebs-Henseleit solüsyonu ile perfüze edilerek koroner perfüzyon basınçları MP30 software sistemi ile (Biopac systems) kaydedildi. Ayrıca kalplere takılan elektrotlar yardımı ile kalbin dakikadaki atım sayısı olan kalp atım hızı (KAH) kaydedildi. Kalp dokusunda malondialdehit (MDA) düzeyleri ve western blotting yöntemi ile RIP1, RIP3, CaMKII, CypD proteinlerinin ekspresyon seviyeleri ölçüldü. Formaldehid ile fikse edilen kalp dokuları ise histopatolojik olarak incelendi.

Bulgular: Dox grubunda artan perfüzyon basıncı, kalp hızı, MDA düzeyleri ve nekroptotik proteinlerin ekspresyon seviyeleri dabrafenib uygulanması ile istatistiksel

olarak anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0.05$). Ayrıca belirtilen parametreler üzerinden dabrafenib ve necrostatin-1'in koruyucu etkileri kıyaslandığında, dabrafenibin nekroptoza karşı anlamlı bir şekilde daha koruyucu olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

Sonuç: Dabrafenib'in, doksorubisin ile oluşan kardiyotoksik hasarda gelişen nekroptoza karşı koruyucu etki gösterdiği ve daha önce yapılan çalışmalar ile koruyucu etkisi kanıtlanmış olan necrostatin-1 ile mukayese edildiğinde koruyuculuğunun daha fazla olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Doksorubisin, Kardiyotoksisite, Dabrafenib, Nekroptoz, Necrostatin-1

1.2. Abstract

Title: Investigation of the Protective Effects of Dabrafenib- Receptor Interacting Protein Kinase 3 Inhibitor- Against Necroptosis Induced by Doxorubicin Cardiotoxicity

Student: Meryem Şeyda KAYA

Advisor: Prof. Dr. Meral ERDİNÇ

Department: Pharmacology

Aim: It was aimed to examine the protective effects of dabrafenib- a selective RIP3 inhibitor- against doxorubicin induced cardiotoxicity and to compare it with necrostatin-1, which is a RIP1 inhibitor and has a proven protective effect against necroptosis.

Materials and Methods: 48 Sprague Dawley male rats were divided into 9 groups and intraperitoneally injected for seven days: Control group (saline 1ml every day); Dox group (a single dose of 10 mg/kg Dox); Dox+Dab group (single dose of 10 mg/kg Dox and 10mg/kg Dab daily); Dox+Nec group (a single dose of 10 mg/kg Dox and 1.65 mg/kg Nec-1 daily); Dab group (10 mg/kg /day Dab); Nec group (1.65 mg/kg/day Nec-1). After seven days in all groups, the hearts of the rats were isolated and cannulated from the aorta and perfused with Krebs-Henseleit solution by using Langendorff system. Coronary perfusion pressure was recorded by MP30 (Biopac systems) and heart rates were measured by electrodes attached to the heart. In heart tissues malondialdehyde (MDA) levels were determined and protein expression levels of RIP1, RIP3, CaMKII, CypD were examined by western blotting. Besides that, heart tissues were fixed by formaldehyde and histopathologically examined

Results: In the Dox group, increased perfusion pressure, heart rate, MDA levels and expression levels of necroptotic proteins were significantly decreased by dabrafenib administration ($p<0.05$). In addition, while the protective effects of dabrafenib was compared with necrostatin-1 it was observed that dabrafenib was significantly more effective against necroptosis ($p<0.05$).

Conclusion: It was found that dabrafenib had a protective effect against necroptosis occurred in doxorubicin induced cardiotoxic injury, and it was more effective than necrostatin-1.

Keywords: Doxorubisin, Cardiotoxicity, Dabrafenib, Necroptosis, Necrostatin-1



2. GİRİŞ ve AMAÇ

Doksorubisin (Dox), antrasiklin türevi bir antibiyotik olmakla beraber solid tümörler, lösemi, lenfoma başta olmak üzere birçok kanser çeşidinin tedavisinde 1960'lardan beri kullanılmaktadır (1). Dox'un etki mekanizması, DNA interkalasyonu ve DNA topoizomera 2 enziminin inhibisyonu şeklindedir (2). Kemik iliği supresyonu, mukozit, nefrotoksisite gibi yan etkileri bulunan bu ilacın en önemli doz kısıtlayıcı yan etkisi irreverzibl kardiyotoksisitedir (3). Bu yan etkisinin oluşmasında birçok hücresel sinyal yolağının önemli rolü vardır, ancak artan oksidatif stres ve serbest oksijen radikallerinin (ROS) seviyesi en önemli ve öncelikli sebeplerdendir. Artan oksidatif stres mitokondriyel kalsiyum, ROS seviyesi apoptotik ve nekroptotik hücresel ölüm sinyal yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır (4,5).

Nörodejenerasyon, kanser ve viral enfeksiyon gibi birçok hastalığın moleküler patogeneğinde rol oynayan nekroptozun, kardiyotoksisite mekanizmasında da önemli bir etkisi olduğu görülmüştür. Nekroptotik sinyal yollarının hücresel ölüm reseptörleri ile aktive olmasının ardından Reseptör Etkileşimli Protein Kinaz 1 (RIP1) veya Reseptör Etkileşimli Protein Kinaz 3 (RIP3) enzimlerinin kinaz aktivitesi gerekmektedir (6). Son yıllarda yapılan çalışmalar ile nekroptozun iki ayrı sinyal yolağı ile indüklenbildiği bulunmuştur: RIP1-RIP3- Karışık soy kinaz bölgesi benzeri protein (MLKL) ve RIP3- Ca²⁺/kalmodulin bağlı protein kinaz II (CaMKII)-mitokondriyel transfer poru (mPTP) yolları (7). Birinci yolaktaki RIP1 enzimi devamındaki RIP3 enzimini fosforlayarak kinaz aktivitesini gösterir ve bu enzimin inhibisyonu nekrostatin-1 (Nec-1) molekülü ile sağlanır (8). Bu molekülün koruyucu etkisi birçok dokuda yapılan hem in vivo hem in vitro çalışmalar ile kanıtlanmıştır (6, 7,8). Her iki yolakta da bulunan RIP3 enziminin ise özellikle inflamasyon ve ROS üretimi ile ilişkili olduğu ve kardiyomiyositlerde daha fazla sentezlendiği bildirilmiştir (9, 10). Bu nedenle, kardiyotoksik hasar ile gelişen nekroptoza karşı direnç sağlanabilmesi için RIP3 enzim inhibisyonu oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalarda, bu enzimin selektif inhibisyonunun, dabrafenib (Dab) ile sağlanabildiği kanıtlanmıştır (11). Dabrafenib, hücre proliferasyonunu aktive eden ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz 1/2 (ERK1/2) sinyal kaskadı aktivörlerinden BRAF enzim inhibitörü olarak melonoma tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir (12). Bu

enzimin off target etkilerinden biri olan RIP3 enzim inhibisyonu ile nekroptoza karşı protektif olarak kullanılabileceği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (11, 13).

Bu çalışmada, nekroptotik RIP3 enziminin dabrafenib ile inhibe edilmesi durumunda doksorubisin kardiyotoksitesine karşı olası protektif etkisinin araştırılması ve RIP1 inhibitörü nekrostatin-1'in daha önceki çalışmalar ile kanıtlanmış koruyucu etkisi ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.



3.GENEL BİLGİLER

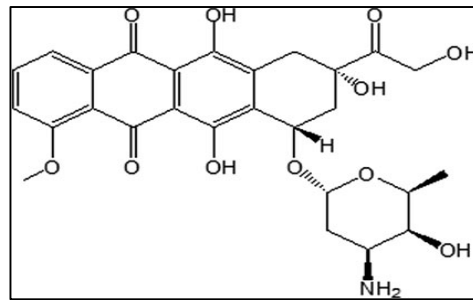
3.1. Doksorubisin

3.1.1.Genel özellikler

Doksorubisin (Dox), geniş spektrumlu antibiyotikler olan antrasiklinler grubunun klinikte en çok kullanılan en etkili üyelerinden birisidir. Günümüzde, tedavide kullanılmakta olan antrasiklin türevi ilaçlar: doksorubisin, idarubisin, daunorubisin ve epirubisindir (14). Dox ilk defa 1950'li yıllarda, Farmitalia isimli bir İtalyan ilaç şirketinin kanser tedavisi arama çalışmaları sırasında keşfedilmiştir. *Streptomyces Peucetius* suşundan izole edilen kırmızı renkli bir antibiyotiğin, deney hayvanlarındaki kanser hücrelerini öldürmede başarılı olduğu kanıtlanmıştır. 1974 yılından beri Dünya Sağlık Örgütü'nün temel ilaçlar listesinde olan Dox, kemoterapinin en önemli ilaçlarından biri haline gelmiştir (15). Kırmızı renginden ötürü hastalar tarafından kırmızı şeytan (red devil) olarak isimlendirilen bu ilaç, başta hodgin lenfomalar olmak üzere, lösemi, multipl myeloma, meme kanseri, yumuşak doku kanseri, akciğer kanseri gibi birçok kanser türüne karşı tüm yaş grubundan hastalarda birinci basamak tedavisi olarak kullanılmaktadır (14, 15).

3.1.2.Biyokimyasal yapısı

Dox, *Streptomyces peucetius* bakterisinin doğal olarak ürettiği daunorubisinin yapısında bulunan tetrasiklik halka üzerindeki 4. ve 14. karbonların hidroksilasyonu ile sentezlenir. Kimyasal yapısına bakıldığında, indirgeyici daunosamine şeker grubu ve tetrasiklik aglikan halka olmak üzere iki ana bileşeni vardır. Ayrıca, komşu halkalar üzerinde elektron alışverişine izin veren kinon ve hidrokinon gruplar bulunmaktadır (Şekil 1) (16).



Şekil 1: Doksorubisinin kimyasal yapısı (16)

Dox, planar yapıdadır ve fizyolojik pH'da pozitif yüklü olarak bulunmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı DNA sarmallarının, DNA ve RNA polimerazların arasına girerek yapısal değişikliklere, sentez ve bölünme fonksiyonlarının bozulmasına sebep olur (17).

3.1.3.Etki mekanizması

Dox, tüm hücreler üzerine yan etkileri seçici olmayan bir biçimde sitotoksik etkilidir. Hücre içine basit difüzyon ile girmekte ve nükleer lokalizasyon sinyalleri ile ATP'ye bağlı şekilde nükleusa geçip DNA'ya etkileşime girer. Hücre üzerindeki etkisini birçok şekilde gösterir (18).

İlk etki mekanizmasının temelini, kanser hücresinin DNA Topoizomeraz 2 enzimi ile yaptığı interkalasyon oluşturur. Topoizomeraz enzim grubu, çift sarmal yapısındaki DNA'nın replikasyon ya da transkripsiyon gibi görev aldığı bütün reaksiyonlarda çift zincir yapısının kırılmasını katalizleyerek DNA'nın konformasyonunu ve topolojisini düzenlerler (19). Memeli hücrelerinde baskın tür olan topoizomeraz 2 enzim ailesinin, alfa ve beta olmak üzere iki izozimi bulunmaktadır. Özellikle kanser hücreleri gibi proliferasyon hızı yüksek hücrelerde topoizomeraz 2 alfa izozimi bulunmaktadır. Hücre döngüsünün G1 ve G2 fazlarındaki DNA replikasyonunda, kromozomların kondensasyonu ve dekontensasyonunda, kardeş kromatidlerin ayrılmasında rol alan bu enzim türü, doksorubisine oldukça duyarlıdır. Doksorubisin, hücre bölünmesi sırasında oluşan DNA-DNA Topoizomeraz 2 kompleksi ile birleşerek, DNA zincirlerinin yeniden birleşmesini engeller ve böylece DNA yapısında geri dönüşümsüz kırıklara sebep olur. Bu etki mekanizması sayesinde, DNA replikasyonunu, RNA transkripsiyonu, DNA tamir mekanizmasını engeller. Özellikle DNA tamir mekanizmasını baskılaması hücresel ölüm yollarının aktivasyonuna sebep olur. Ayrıca son yapılan çalışmalar, doksorubisinin sadece nükleer DNA'nın değil aynı zamanda mitokondriyel DNA'nın da yapısını bozduğunu kanıtlamaktadır (18, 19).

Doksorubisinin kanser hücreleri üzerindeki diğer etki mekanizmaları ise aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Doksorubisin metabolitleri oksijen ile reaksiyona girerek, DNA'ya saldıran süperoksit anyon radikallerini üretebilir (20).
- Serbest oksijen radikallerinin (ROS) üretilmesine sebep olan Nikotinamid Adenin Dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz (NOX) enzimini aktive eder. Ayrıca Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NADH) ile indirgenerek metabolize olduğu semikinin da ROS oluşumunda önemli rol oynar (21).
- Lipid peroksidasyon seviyesini arttırarak hücre içi malondialdehit (MDA) seviyesinin yükselmesine neden olur (22, 23).
- NOX enzim aktivasyonunu sağlayarak, mitokondriyel ROS ve nitrik oksit (NO) üretimini sağlar (20, 23).
- Hücre solunum reaksiyonlarının, fonksiyonel bütünlüğüne zarar verecek reaksiyonların başlangıç moleküllerinden biri olan, mitokondriyel membrandan geçebilen ve mitokondride birikebilen aglikona metabolize olur. Böylece, mitokondriyel membrana serbest elektronlar ve ROS ile zarar vererek, mitokondriyel transfer porunun (mPTP) uyarılmasına, yani apoptotik ve nekroptotik sinyal yollarının indüklenmesine neden olur (4, 6, 20).
- Hücre içi Fe^{+2} iyonlarının salınmasını arttırarak demir metabolizmasının bozulmasına sebep olur. Ayrıca Fe^{+3} ile kompleks oluşturarak, H_2O_2 'den -OH radikallerinin üretimini arttırır (20).
- Hücredeki membranların zarar görmesi ile, hücre içi Ca^{+2} ve diğer iyonların dengeleri bozulmasına sebep olur (20).

Dox, yukarıda bahsedilen mekanizmalar ile oksidatif hasarın artmasına, hücre yaşlanma ve ölüm yollarının aktivasyonuna neden olarak sitotoksik etkisini gösterir (6, 7).

3.1.4. Metabolizması

Kapsüllenmemiş Dox, asidik ortamda stabil olmaması, gastrointestinal sistemden emiliminin az olması ve uygulandığı dokularda hücre ölüm yollarının aktivasyonuna yol açması nedenleriyle sadece intravenöz (i.v.) yolla uygulanır. Vücuda alındıktan sonra karaciğerde hızlı bir şekilde daha az aktif metabolitleri olan doksorubisinol ve daunorubisinole dönüşür. İ.v uygulama sonrası, karaciğer, dalak ve

kalp gibi dokularda plazma konstrasyonundan çok daha fazla birikebilir (5-10 kat). Ayrıca Dox'un, kan beyin bariyerini aşamamasından dolayı beyin omurilik sıvısına geçişi oldukça azdır (18). Hem Dox'un hem de metabolitlerinin itrah edilebilmesi için karaciğerde glukuronidasyon, sülfatlama, demetilasyon gibi bir dizi metabolik reaksiyona dahil olmalıdır. Verilen dozun yarısından fazlası, 7 gün içinde vücuttan safrayla ya da böbrekler yoluyla atılır. Bu sebeple, başlangıç dozunun oldukça küçük bir oranı hedef bölgeye ulaşır ve etkisini gösterir (21, 22).

3.1.5. Yan etkiler

Kemoterapide yaygın klinik kullanıma sahip en etkili antrasiklin ajanlardan biri olmasına rağmen, Dox'un oldukça geniş bir yan etki profili vardır. Tedavide kullanılan diğer sitotoksik ilaçlar gibi alopesi, kemik iliği baskılanması, mukozit, ateş, döküntü, ürtiker, bulantı-kusma, ishal, anoreksi gibi akut toksisitelere sahiptir (23). Bunlarla beraber, Dox'un klinik kullanımda doz kısıtlamasına sebep olan en önemli komplikasyonu kardiyotoksisitedir ve bu yan etkiyi minimumda tutmak için, kümülatif Dox dozunun 550 mg/m²'yi geçmemesi gerekmektedir (24). Çünkü bu dozun üzerine çıkılması durumunda, %50 oranında kardiyomiyopati gelişme ihtimali bulunmaktadır ve bu da hasta için kanserden daha büyük bir tehdit demektir. Bu yan etkilerin şiddeti ilacın kullanım dozuna, sıklığına ve hastanın kullandığı diğer ilaçlara göre değişebilir. Bununla birlikte, düşük dozlarda bile kardiyotoksik yan etkilerin görülme riski bulunmaktadır. Bu kardiyotoksik yan etkiler içinde aritmi, perikardit, miyokardit, kardiyomiyositelerin yapısını değiştirip fonksiyonlarını bozulması, kardiyak hipertrofi, kardiyomiyopati, miyokard enfarktüsü ve konjestif kalp yetmeliği sayılabilir. Bu kardiyotoksik yan etkilerin ortaya çıkma süresi ise tam olarak bilinmemektedir. Kemoterapiden sırasında ya da kısa bir süre sonra görülebileceği gibi, tedavi tamamlandıktan aylar veya yıllar sonra bile ortaya çıkabilir. Bu da kardiyak hasarın moleküler mekanizmasının tam olarak anlaşılmasını ve kardiyoprotektif çözümler üretmeyi zorlaştırmaktadır (25, 26).

3.2. Doksorubisin Kardiyotoksisite Mekanizmaları

Dox tedavisine bağlı olarak gelişen kardiyotoksik hasar mekanizmasının moleküler yolları henüz tam olarak aydınlatılmamıştır ancak bu konuda birçok teori öne sürülmüştür: makromolekül sentezinde inhibisyon, mitokondriyal disfonksiyon,

vazoaktif amin salınımı, serbest radikal üretiminin ve lipid peroksidasyonunun artması, antioksidan enzimlerin seviyesinin azalması, ROS miktarının artması, lizozomal değişiklikler, makrofajlardan sitokin salınmasının artması, hücre elektrolit dengesinin bozulması, hiperkalsemi, apoptoz ve nekroptoz gibi programlanmış hücre ölüm yollarının indüklenmesi (26).

3.2.1. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri, serbest radikal ve lipid peroksidasyon seviyelerinin artması ile antioksidan enzim miktarlarının azalmasından kaynaklanır. Bir ya da daha çok eşleşmemiş tek elektrona sahip atom ve moleküllere serbest radikal denir ve oldukça reaktiftirler (27). Biyolojik sistemler için en tehlikeli olanı ise oksijenden üretilen ve ROS olarak tanımlanan türlerdir. Sağlıklı dokularda, artan oksidatif stresten kaynaklı ROS'lar hızla antioksidan enzimler tarafından dokudan uzaklaştırılarak ROS seviyesinin düşük ve dengede kalması sağlanır. Kardiyak dokular ise glutatyon, katalaz, peroksidaz, süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin zaten düşük seviyelerde bulunmasından ve en çok oksijen tüketen dokulardan biri olmasından dolayı oksidatif strese karşı daha hassastır. Dox kullanımından ötürü zaten hassas olan mekanizma daha da zayıflayarak kardiyotoksik yan etkilerin gelişmesine sebep olur (27, 28).

Dox ile indüklenen oksidatif stresin moleküler patogenezi ile ilgili uzun yıllardır yapılan çalışmalarda birçok farklı mekanizmanın ve enzimin etkisinin olduğu öne sürülmüştür (26).

3.2.1.1. Mitokondriyel ROS üretimi

İnsan vücudundaki en çok çalışan organlardan biri kalptir ve yetişkin bir bireyde günlük neredeyse yüz bin atım yaparak yaklaşık on ton kanı vücuda pompalar. Bu sebeple mitokondri sayısı diğer dokulara oranla daha fazladır ve bu da kardiyak dokuyu mitokondriyel hasarlara karşı daha hassas hale getirir. Bu nedenle Dox ile indüklenen kardiyotoksik hasar en çok mitokondrileri etkilemektedir. Mitokondriyel DNA tarafından sentezlenen ve antijenik tek fosfolipid olan kardiyolipin, mitokondri membranında %20 oranında bulunarak birçok hayati reaksiyonda oldukça önemli roller üstlenir. Bunlardan en önemlisi oksidatif fosforilasyon sırasında elektron taşıma

zincirinin (ETC) fonksiyonlarının düzgün devam etmesini sağlamaktır. Doksorubisin katyonik yapısından dolayı mitokondri membranından kolaylıkla geçer ve iç membranda bulunan kardiyolipin protein ile irreverzibl kompleks oluşturur. Meydana gelen kompleks, ETC fonksiyonunun bozulmasına ve süperoksit radikalleri oluşmasına neden olur. Ayrıca Dox, kalp mitokondrisinde bulunan uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunu azaltır ve glikozun metabolizmasını arttırarak anaerobik solunumun artmasına sebep olur. Bu da kalp yetmezliğine ve kalp kasılmasında abnormalitelere sebep olabilir (29).

3.2.1.2. Dox-Fe kompleksi ile ROS üretimi

Dox pozitif yüklü bir molekül olmasından dolayı demire karşı afinitesi yüksektir ve birleşerek Dox-Fe kompleksini oluşturur. Bu kompleks serbest oksijen ile etkileşime girer ve ROS üretimini arttırır (30). Normal şartlarda, Dox ile şelat oluşturacak kadar serbest demir yoktur ancak Dox aynı zamanda hücre içi demirin taşınmasında görevli olan transferrin proteini üzerine de etki eder. Dox metaboliti olan doksorubisinol, sitoplazmik akonitaz enziminin (demir düzenleyici protein 1) katalitik bölgesindeki Fe-S kümesinden demiri uzaklaştırır ve bu enzimin işlevini bozar. Sonuç olarak serbest demir seviyesinde ve dolayısıyla ROS miktarında artış görülür (24).

3.2.1.3. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) üzerinden ROS üretimi

İnsan vücudunda üç tip NOS vardır: eNOS (endotelial), iNOS (uyarılabilir) ve nNOS (nöronal). Doksorubisin, eNOS redüktaz enzime bağlanarak Dox semikinon radikal formasyonunu indükler ki bu radikal de serbest oksijenin süperoksit radikale indirgenmesini sağlar (31). Kardiyotoksik etkiler gösteren bu reaktif dönüşüm enzimatik tek elektron indirgeme tipi reaksiyon ile gerçekleşir. Dox, NADPH-sitokrom P450 redüktaz ve mitokondriyal NADH dehidrojenaz gibi flavoenzimlerin varlığında tek elektronlu indirgeme reaksiyonunu tamamlar. İlaç eNOS redüktaz enzimine bağlandığında süperoksit serbest radikalleri ve nitrik oksit seviyelerinde bir dengesizlik olur. NO seviyesi düşer ve süperoksit seviyeleri artar, bu da kardiyotoksisiteye yol açar. Ayrıca, eNOS dışında Dox uygulaması, iNOS transkripsiyonunu ve protein ekspresyonunu arttırır ve kalp dokusunda artmış mitokondriyal süperoksit seviyesi ile nitrotirozin oluşumunu indükler. Dox uygulamasından sonra kalp kası hücrelerinin apoptozisine, kalp kontraktilitesinin

azalmasına ve katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitesinin azalmasına neden olur (31, 32).

3.2.1.4. NADPH üzerinden ROS üretimi

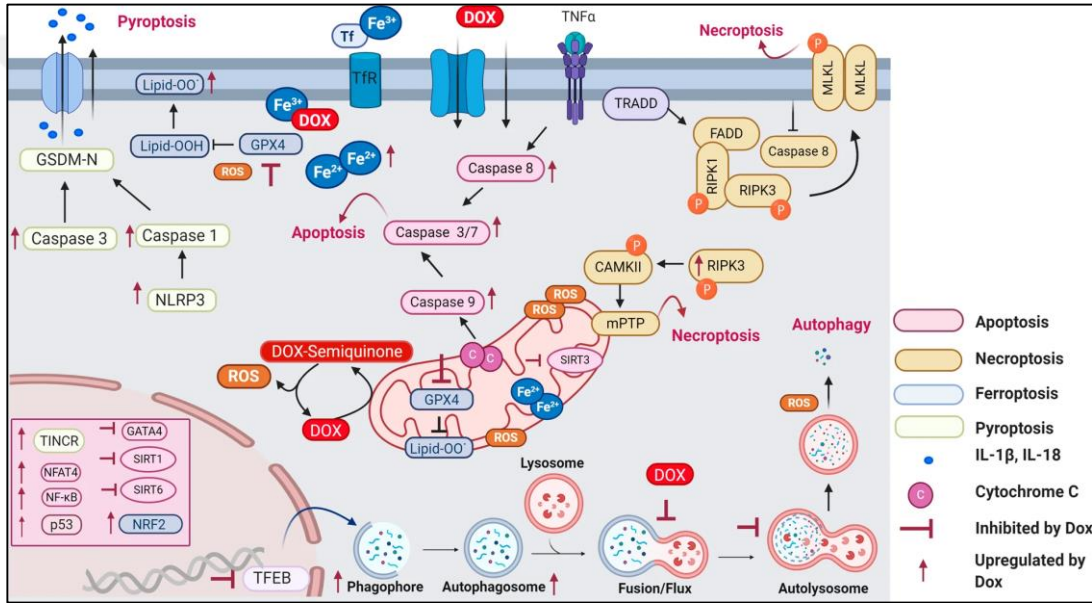
Hücrelerde birçok oksidoredüksiyon reaksiyonunda, dehidrojenaz enzimlerinin koenzimi olarak görev yapan NADPH enzimleri enerji metabolizmasında oldukça önemli görevler üstlenir. NOX enzim ailesi tarafından okside edilirken oksijenden süperoksit radikalinin oluşumu gözlenir. NOX enzimlerinin kardiyak ROS üretiminde oldukça önemli olduğu bildirilmiştir. Yedi adet NOX izozimi vardır ve NOX2 izoziminin, Dox kaynaklı kardiyotoksistide çok önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır. Bu enzim ailesi, NOS yolağı ile benzer şekilde NADPH'dan bir elektronun Dox'a transfer olmasıyla Dox semikinon radikalinin oluşmasına sebep olarak ROS seviyesinin artışına sebep olur (33).

3.2.1.5. Hücre içi kalsiyum düzensizliği üzerinden ROS üretimi

Dox, kalsiyum seviyelerinde düzensizliğe neden olarak hücre içi kalsiyumda artışa, ROS oluşumuna ve kardiyomiyositlerde apoptoza neden olur. Ayrıca, Dox'un toksik metabolitlerinden biri olan doksorubisinol, kalp kontraktilitesinin düzenlenmesinde görevli olan sodyum-kalsiyum iyon kanalını inhibe eder. Bu metabolit kalp kası hücrelerinde tutulduğu için de eliminasyonu Dox'a kıyasla daha zordur (34). Ayrıca, Dox'un neden olduğu kardiyomiyopati, kalsiyum depolama genini, Sarco/endoplazmik retikulum ATPaz'ı (SERCA2a) ve SERCA2a inhibitörü olan fosfolamban peptidini etkiler. Böylece hem sistolik hem de kalbin diyastolik fonksiyonlarını bozar (35). Bunun dışında, hücre içi kalsiyumun artmasıyla, kalsiyum bağımlı proteazlar olan kalpainleri aktive olur. Oksidatif stres sırasında sarkoplazmik retikulumun kalp kaslarında sızıntı meydana gelir ve kalpainleri aktive eden kalsiyum iyonlarının sızmasına neden olur. Kalpainler, apoptotik faktörlerden biri olan kaspaz-12 üzerinden kardiyomiyositlerin apoptozunu indükler. Dox'un neden olduğu kardiyomiyopati, kalpainlerin uyarılması nedeniyle oluşan kalp kası proteinlerinin yıkımıyla da ilişkilidir. Bu protein negatif düzenleyici bir kardiyak gendir ve sarkomer düzenlemesinin kararsızlığına neden olur (36).

3.2.2. Hücresel Ölüm Yolaklarının Aktivasyonu

Dox, oksidatif stres ve ROS seviyelerini arttırarak aynı anda birbirinden farklı hem programlanmış hem de programlanmamış hücresel ölüm yolaklarını indükleyebilir (Şekil 2). Dox ile indüklenen kardiyotoksistide apoptozun rolü kanıtlanmıştır ama sürekli yeni moleküller ve mekanizmalar keşfedilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile, bir diğer programlanmış hücre ölüm yolağı olan nekroptoz ve bu yolağın Dox ile indüklenen kardiyotoksistide mekanizmasında önemli görevleri olduğu görülmüş ve kardiyak hücre ölümlerinde hem apoptoz hem de nekroptoz mekanizmalarının oldukça önemli rolleri olduğu ispatlanmıştır (7, 9).



Şekil 2: Doksorubisin ile indüklenen hücresel ölüm yolakları

3.2.2.1. Apoptoz

Programlanmış hücre ölüm yolaklarının en iyi bilineni olan apoptoz, kaspaz enzimleri ile yönetilmektedir. Apoptozu başlatan iki aktivasyon yolağı vardır: intrinsik yolak ve ekstrinsik yolak. Her iki yolakta da çeşitli kaspaz enzimleri görev almakla birlikte hücrenin apoptoza girmesi için kaspaz 3 enziminin aktivasyonu gereklidir (37). Dox ile indüklenen kardiyotoksistide en çok çalışılan ve en iyi karakterize edilmiş hücre ölüm yolağı apoptozdur. Özetle, Dox tedavisi aşırı oksidatif strese (lipid peroksidatlar, doksorubisinin azaltılmış semikinon parçası, yüklü doksorubisin demir kompleksi, solunum zinciri yetmezliği, peroksinitritler ve diğerleri) ve apoptoz dahil hücre ölüm yollarını tetikleyen mitokondriyal hasara neden olur (38, 39).

Dox ile artan oksidatif stres, apoptozun intrinsik yolağını aktive eder ve mitokondriyal kalsiyumun aşırı yüklenmesi ile mPTP'yi indükler, mitokondriyal membran potansiyel kaybı, mitokondriyal şişme ve sonunda endonükleaz G, sitokrom c, apoptoz indükleyici faktörün (Apaf-1) sitozole salınmasına yol açan mitokondriyal dış membran yırtılması ile sonuçlanır (40). Sitokrom c sitozole geçtikten sonra adaptör protein Apaf-1, deoksi ATP ve kaspaz 9 ile kompleks yaparak apoptozomu oluşturur. Apoptozom oluşumu, kaspaz 9'un bölünmesine ve aktivasyonuna yol açar, bu da kaspaz 3'ü parçalayıp aktive ederek apoptotik hücre ölümüyle sonuçlanır (41). Dox, Bcl2 gen ailesi ile aktive edilen Bax/Bak enzimlerinin aktivasyonunu ve bu enzimlerin sitozolden mitokondrinin dış membranına geçerek mitokondriyal dış membran geçirgenliğini indüklenmesini, önemli proapoptozis faktörü sitokrom c dahil olmak üzere birçok apoptotik proteinin sitoplazmaya difüzyonununun sağlayarak apoptozun intrinsik yolağını aktive eder (42).

Dox, kardiyomiyositlerde ekstrinsik apoptoz yolağını da aktive eder. Fas ve Tümör nekroz faktör- α (TNF- α) gibi ölüm ligandları, reseptörlerine bağlanır ve sitozolik proteinlerin Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) ve TNF- α reseptörü ile ilişkili ölüm alanına (TRADD) bağlanmasını tetikler. FADD ve TRADD kaspaz 8'i aktive ederek, apoptoz ile sonuçlanan kaspaz 3 aktivasyonuna sebep olabilir. Dox., Fas/FasL ve p53'nin upregülasyonuna neden olan aktive olmuş t hücrelerinin nükleer faktörü 4 (NFAT4) ve Nekroz faktör kappa B (NF-KB)'yi aktive ederek ve Fas-aracılı hücre ölümünü indükleyerek apoptozun ekstrinsik yolağını aktive edebilir (38, 43).

Apoptoza giren hücrelerde; mitokondriyal zar permeabilizasyonu, kromatin kalınlaşması, DNA parçalanması ve çekirdeklerde küçülme meydana gelir. Parçalanmış çekirdek artıkları içeren apoptotik cisimcikler, çevre doku ve hücrelere zarar vermeden fagositoza uğrar (38).

3.2.2.2. Nekroptoz

Hücre içi ya da dışındaki homeostatik dengenin ve mikro ortamın bozulması ile başlayan, FAS veya TNF- α reseptörü 1 (TNFR1) gibi reseptörlerin aktivasyonu ile indüklenen programlanmış hücre ölümü çeşididir (44). Önceleri sadece bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı olduğu düşünülen nekroptozun iskemi-reperfüzyon hasarları, Alzheimer, Parkinson, ateroskleroz, miyokardiyal enfarktüs, pankreatit ve

enflamatuar gastrointestinal sistem hastalıklarının moleküler patogenizinde önemli rolü belirlenmiştir. Bu tür programlanmış hücre ölümünün özellikle ROS ve oksidatif stres seviyesinin arttığı, mitokondriyel disfonksiyonların bulunduğu, non apoptotik proteazların indüklendiği ve hücre içi Ca^{++} dengesinin bulunduğu hücrelerde aktive olduğu görülmüştür (45).

Nekroptoz mekanizmasının indüklenmesinin sebepleri arasında $TNF\alpha$, TNF reseptör bağlantılı faktör 2 (TRAF2), tümör baskılayıcı silindromatoz (CYLD) ya da Fas ligandları, patojen kaynaklı DNA/RNA, interferonlar, genotoksik stres gösterilmiştir (46). İndüklenen nekroptoz reseptörleri, RIP1 enzimini fosforlar ve RIP1 enzimi de RIP3 ve MLKL enzimlerini fosforlayarak nekrozomu oluşturur. MLKL enzimi, plazma zarını yırtarak ve organellerin ve inflamator faktörlerin salınmasına izin vererek immün yanıt oluşmasını ve hücre ölümünü indükler. Bu yolağa ek olarak, fosforile ve upregüle edilen RIP3 enziminin CaMKII enzimi ile birleşerek ve onu indükleyerek CypD proteini üzerinden mPTP'nin açılmasını sağlamasıyla da nekroptozu indüklenemediği görülmüştür (7, 9).

Birinci yolda bulunan ve hücre ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile fosforlanan RIP1 enzimi, 671 amino asitten oluşmaktadır. Beyin, kalp, karaciğer, böbrek ve başka birçok dokuda fazlaca sentezlenen ve çoğunlukla hücrelerin sitoplazmasında lokalize olan bir enzimdir (47, 48). Fosforile olan RIP1 enzimi, RIP3 enzimi ve MLKL molekülüne bağlanarak nekrozom olarak adlandırılan bir kompleks oluşturur. Eğer hücrede kaspaz 8 enzimi inhibe olursa, bu nekrozom kompleksi aktive olur ve nekroptozu başlatır (49). Nekroptozun bu yolağında kilit rolü olan RIP1 enziminin inhibisyonu Nec-1 molekülü ile sağlanır (50). Bu inhibisyon ile kardiyak hücre ölümüne karşı direnç geliştirilebildiği deneysel iskemi modellerinde gösterilmiştir (51). Nec-1'in bu koruyucu etkisi sadece kalpte değil birçok dokuda yapılan hem in vivo hem in vitro çalışmalar ile kanıtlanmıştır (6, 7, 52).

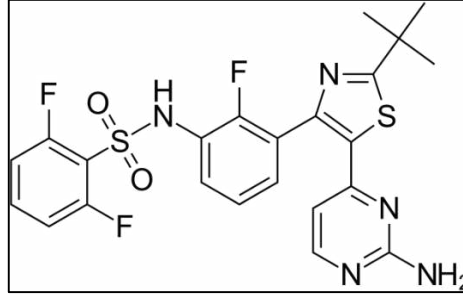
Her iki nekroptoz yolağında da bulunan RIP3 enzimi 518 amino asitten oluşmaktadır ve glikojen fosforilaz (PYGL), glutamin sentetaz (GLUL), glutamat dehidrojenaz 1 (GLUD1) gibi birçok metabolik enzim ile etkileşimde bulunmaktadır ve böylelikle oksidatif fosforilasyon için gerekli olan substratları upregüle etmektedir. Bu nedenle RIP3 enzimi için major ROS kaynaklarından biri olduğu söylenebilir (50).

Ayrıca RIP3 enziminin spesifik olarak kardiyomiyositlerde sentezlendiği ve mitokondride lokalize olduğu; inflamasyon, ROS üretimi ve miyokard enfarktüsünden sonraki remodellemede görev aldığı bildirilmiştir (10). Bu yolaktaki diğer bir önemli enzim olan CaMKII enzimi serin treonin protein kinaz ailesinin bir üyesidir. Bu multifonksiyonel enzimin, I/R hasarı, miyokardiyal enfarktüs, kalp yetmezliği gibi birçok kardiyopatolojik sorunda rolü olduğu tespit edilmiştir (49). RIP3 enziminin CaMKII enzimini hem fosforlayarak direkt olarak hem de artan ROS miktarı ile oksidasyonunu sağlayarak indirekt olarak aktive edebildiği tespit edilmiştir. İndüklenen CaMKII enziminin aktive ettiği sinyal yolları ile CypD proteinin ekspresyonunu arttırdığı ve böylece mPTP'nin açılmasını sağlayarak hücrede nekroptozu başlattığı ispatlanmıştır (6, 7, 9).

3.3. Dabrafenib

Dabrafenib, anti-tümör aktiviteye sahip bir ATP-rekabetçi BRAF enzim inhibitörüdür ve GlaxoSmithKline tarafından "Tafinlar" ve "Rafinlar" ticari isimleri altında satılmaktadır. ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), 29 Mayıs 2013'te Dabrafenib'i BRAF V600E mutasyon pozitif ilerlemiş melanomlu hastalar için tek ajan tedavisi olarak onayladı. Ayrıca Dabrafenib, Ağustos 2013'te Avrupa Birliği'nde kullanım için de onaylandı (53).

Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz 1/2 (ERK1/2) kaskadı, kanser gibi hızlı çoğalan hücrelerde, hücre bölünmesini indükler. ERK1/2 kaskadının aktivasyonu için ARAF, BRAF, RAF1 gibi Raf kinazlar tarafından aktive edilen mitojenle aktive olan protein kinaz 1/2 (MKK1/2) tarafından fosforlanması gerekmektedir. ERK1/2 aktivasyonu için gerekli sinyal yollarındaki mutasyonlar kansere neden olur. Özellikle BRAF enzimini aktive edici mutasyonlar çok yaygındır ve tüm kanserlerin yaklaşık %30'u ile melanomaların yaklaşık %60'ı ile ilişkilidir. Bu nedenle, kanser tedavisi için dabrafenib gibi etkili BRAF inhibitörleri geliştirilmiştir (54) (Şekil 2).



Şekil 3: Dabrafenib'in kimyasal yapısı (54)

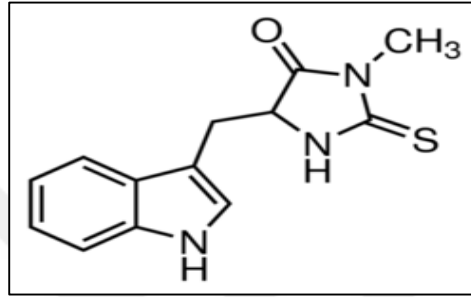
Preklinik veriler, Dabrafenib'in BRAFV600E kinaz enzimi mutasyona uğramış melanom hücrelerinde MAPK sinyal yolağını inhibe ederek ksenograft fare modellerinde proliferasyonun ve regresyonun azalmasını sağladığını göstermiştir. B-Raf V600E mutantını seçici olarak inhibe eden tersinir B-Raf inhibitörü dabrafenib, yakın zamanda klinik deneylerle araştırılmıştır (55). Günde iki kez 150 mg olarak verilen bir faz I/II çalışmasında, Dabrafenib'in melanoma, beyin metastazları ve diğer solid tümörlerin tedavisinde de BRAF'ın aktif bir inhibitörü olduğu sonucuna varılmıştır ve bu denemelerde kontrol edilebilir bir güvenlik profiline sahip olduğu görülmüştür. Faz çalışmaları sırasında, en sık görülen yan etkiler arasında, kutanöz (hiperkeratoz, papillom ve Palmar-plantar eritrodisestezi), ateş, yorgunluk, baş ağrısı ve artralji bulunmaktadır (54, 55).

Bunlara ek olarak, Dabrafenib'in antikanser etkisini Raf1 gibi proapoptotik kinazları inhibe ederek başka bir yolak üzerinden ve off target etkisini de proapoptoz ve nekroptoz yolaklarındaki RIP3 enzimini inhibe ederek gösterebileceği bildirilmiştir (53). Daha önce ifade edildiği gibi RIP3 enzimi kardiyotoksik hasara bağlı gelişen nekroptoz için oldukça önemlidir ve bu enzimin inhibisyonu ile her iki nekroptotik sinyal yolağı da durdurularak kardiyak hasara karşı direnç gelişimi sağlanabilir. Dabrafenib'in, RIP3 enzimini selektif olarak inhibe ettiği, asetaminofen kullanımı sonucu oluşan karaciğer harabiyetine, iskemik beyin hasarına ve hipertansiyon ile gelişen kardiyak hasara karşı protektif etkisinin olduğunu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (11, 13).

3.4. Nekrostatin-1

Aleksey Degretev ve Junying Yuan tarafından 2005 yılında sentezlenen bu Nec-1 bileşiğinin kimyasal yapısı 5-(1H-indol-3-ilmetil)-2-tiohidantoin molekülüdür

(Şekil 3). Yapılan bu ilk çalışmada, insan ve fare hücrelerinde nekrotik hücre ölümünü bloke eden bir bileşik olarak tanımlanan bu molekülün iskemik beyin hasarına karşı koruyucu etkinliğinin olduğu saptamışlardır (8). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise, TNF- α ile uyarılan nekroptozda RIP1 enzimini inhibe ederek nekroptozu engellediği bildirilmiştir (56). Ancak bugüne kadar klinik öncesi aşamada kullanılan bu ilaç daha ileri araştırmalara ihtiyaç duyduğundan klinik çalışmalarda henüz kullanılamamaktadır (57).



Şekil 4: Necrostatin-1'in kimyasal yapısı (8)

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Kullanılan Cihazlar

- Biopac MP30 amplifikatör
- Su sirkülatör cihazı (MAY WBC30-440C)
- Force Displacement Transducer Cihazı (MAY FDT-10A)
- Langendorff sistemi (MAY 0702)
- Hassas terazi (Sartorius BP 121 S)
- pH metre (Mettler Toledo S220-K)
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (VELP ARE Aluminum)
- MagNA Lyser Homojenizatör (Roche)
- NanoDrop™ 2000/2000c Spektrofotometre (Thermo ND-2000/2000c)
- Dikey Elektrophorez Sistemi (Thermo OWL-P8DS-1)
- Güç Kaynağı (Thermo OWL-EC300XL2)
- Hızlı Elektrophotlama Sistemi (Thermo G2 Fast Blotter) (Thermo FP-94060103)
- Yatay çalkalayıcı (Stuart SSM4)
- iBright Western Blotting Görüntüleme Sistemleri (Thermo Fisher (CL 1000)
- Standart Otomatik Pipet Seti (Eppendorf Research® plus)
- Otomatik Doku Takibi Cihazı ile (Thermo, Excelsior AS)
- Mikrotom Cihazı (Leica, RM2245)
- Otomatik Boyama Cihazı (Shardon, Varistain Gemini)
- Işık Mikroskobu (Nikon, Eclipse 50i)

4.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Ketamin HCL (Ketalar 50 mg/ml, 10ml flakon, Pfizer)
- Ksilazin (Rompun %2, Bayer)
- Doksorubisin Hydrochloride (Dox) (Sigma Aldrich)
- Dabrafenib (Dab) (GlaxoSmithKline)
- Nekrostatin-1 (Nec-1) (MedChemExpress)

- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma Aldrich)
- Sodyum Klorür (NaCl) (Sigma Aldrich)
- Sodyum Bikarbonat (NaHCO₃) (Sigma Aldrich)
- Potasyum Klorür (KCl) (Sigma Aldrich)
- Kalsiyum Klorür (CaCl₂) (Sigma Aldrich)
- Magnezyum Klorür (MgCl₂) (Sigma Aldrich)
- Disodyum Fosfat (Na₂HPO₄) (Sigma Aldrich)
- Glikoz (Sigma Aldrich)
- Tiyobarbütirik Asit (TBA) (Sigma Aldrich)
- Trikloroasetik asit (TCA) (Sigma Aldrich)
- T-PER™ Total Protein Ekstraksiyon Reaktifi (Thermo Pierce)
- Halt™ Proteaz ve Fosfotaz İnhibitör Kokteyli (100X) (Thermo Pierce)
- Total Protein Kuantifikasyon Kiti (Thermo Pierce)
- Sample Laemmli Buffer (Sigma Aldrich)
- Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0.8% w/v) (Sigma Aldrich)
- Tetrametiletildiamin (TEMED) (Sigma Aldrich)
- Amonyum Persülfat (APS) (Sigma Aldrich)
- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Sigma Aldrich)
- Tris Hidroklorür (Tris HCl) (Sigma Aldrich)
- Tris Baz (Sigma Aldrich)
- Glisin (Sigma Aldrich)
- Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (10 – 250 kDa) (Thermo Pierce)
- 1 Step Transfer Buffer (1 L) (Thermo Pierce)
- Poliviniliden florür transfer membranı (GVS)
- Filtre Kâğıdı (Thermo Pierce)
- Tris-buffered saline with 0.1% Tween® 20 (TBST) Tablet (Sigma Aldrich)
- ECL Kit (Thermo Pierce)
- MagNA Lyser Green Beads Tüpleri

4.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

1. Krebs Henseleit Solüsyonu: Aşağıdaki tabloda belirtilen kimyasallardan ilk 5'i ayrı bir beherde 700 ml distile su ile çözdürüldü. Daha sonra son ikisi ayrı bir beherde 200 ml distile su ile çözdürüldü. En sonunda, iki çözelti yavaş yavaş karıştırıldı ve çözelti hacmi 1 L'ye tamamlandı.

Tablo 1: Krebs Henseleit Çözeltisinin İçeriği

NaCl	6,9 gr/L
NAHCO ₃	2,1 g/L
KCl	0,35 g/L
Na ₂ HPO ₄	0,12g/L
Glukoz	2 g/L
CaCl ₂	0,28 g/L
MgCl ₂	0,11 g/L

- %5 TCA Çözeltisi:** 5 gr TCA 100 ml distile suda çözüldü.
- %10 TCA Çözeltisi:** 10 gr TCA 100 ml distile suda çözüldü.
- %0,67 TBA Çözeltisi:** 0,67 gr TBA 100 ml distile suda çözüldü.
- %2 Agaroza Çözeltisi:** 2 gr agaroz 100 ml distile su ile karıştırıldı ve mikrodalga fırında yüksek ayarında 2 dk ısıtılarak çözdürüldü ve hiç beklemeden kullanıldı.
- 0,5 M Tris HCl Çözeltisi (pH=6,8):** 3,94 gr Tris HCl distile su ile 50 ml çözdürüldü ve 1,5 M Tris Baz çözeltisi ile pH 6,8'e ayarlandı
- 1,5 M Tris Baz Çözeltisi (pH=8,8):** 11,82 gr Tris Baz distile su ile 50 ml çözdürüldü ve 0,5 M Tris HCl çözeltisi ile pH 8,8'e ayarlandı
- %10 SDS Çözeltisi:** 10 gr SDS 100 ml distile su'da çözüldü
- %10 APS çözeltisi:** 0,1 g APS 1 ml distile su içerisinde çözüldü. Bu çözelti her western blotting deneyine başlamadan önce taze olarak hazırlandı.
- Yürütme tamponu (Running Buffer) (10x):** 30 gr Tris baz ile 144 gr glisin tartılıp 800 ml distile su ile balonjoje içerisinde karıştırıldı. Daha sonra ısıtıcı magnetik karıştırıcı üzerinde tamamen çözdürüldü. En son 10 gr SDS eklenip, çözelti hacmi 1 L'ye tamamlandı.

10. TBST Çözeltisi: Hazır olarak satın alınan TBST tableti 500 ml distile su çözüldü

11. Bloklama Çözeltisi: 5 gr yağsız süt tozu 100 ml TBST çözeltisi ile çözüldü.

4.4. Kullanılan Deney Hayvanlarının Temini

Bu çalışma için gerekli etik kurul izni, Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 31/01/2019 tarih ve 2019/04 nolu kararı ile alınmıştır. Dicle Üniversitesi Sabahattin Payzın Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezinden (DÜSAM) 10-12 haftalık 250-300 gr ağırlığında 48 adet Sprague Dawley cinsi erkek ratlar temin edildi. Hayvanların barınması için standart koşullar (oda sıcaklığı 24-26 °C, %55-60 nem oranı, 12 saat gece 12 saat gündüz ışık döngüsü olan odada) sağlandı. Adlibitum standart pelet yem ve içme suyu da beslenmeleri için kullanıldı. Çalışma süresince ‘Hayvan Haklarının Korunması’ hususundaki esaslara özenle uyuldu.

4.5. Deney Gruplarının Dizayını

Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanılarak yapılan deneysel çalışmalar 6 grupta (n=8) gerçekleştirildi.

1. **Kontrol Grubu:** 1 ml serum fizyolojik solüsyonu i.p. olarak her gün uygulandı ve 7. günün sonunda sakrifiye edildi.
2. **Doksorubisin Grubu:** 1. gün serum fizyolojik ile çözdürülen Dox solüsyonu 10 mg/kg tek doz i.p. olarak uygulandı ve 7. günün sonunda sakrifiye edildi.
3. **Doksorubisin+Dabrafenib Grubu:** 1. gün serum fizyolojik ile çözdürülen Dox solüsyonu 10 mg/kg, tek doz i.p. olarak uygulandı, ilave olarak her gün %80 DMSO ile çözdürülen Dabrafenib 10 mg/kg dozunda i.p olarak uygulandı ve 7. günün sonunda sakrifiye edildi.
4. **Doksorubisin+Necrostatin Grubu:** 1. gün serum fizyolojik ile çözdürülen Dox solüsyonu 10 mg/kg tek doz i.p. olarak uygulandı, ilave olarak her gün %2 DMSO ile çözdürülen Nec-1 1,65 mg/kg dozunda i.p. olarak uygulandı ve 7. günün sonunda sakrifiye edildi.

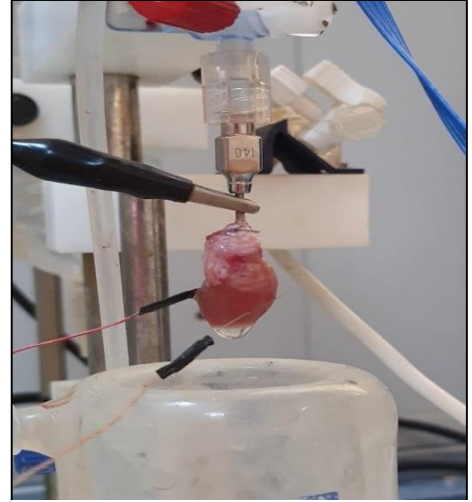
5. **Dabrafenib Grubu:** %80 DMSO ile çözdürülen Dabrafenib 10 mg/kg dozunda i.p. olarak her gün uygulandı ve 7. günün sonunda sakrifiye edildi.
6. **Necrostatin Grubu:** %2 DMSO ile çözdürülen Nec-1, 65 mg/kg dozunda i.p. olarak her gün uygulandı ve 7. günün sonunda sakrifiye edildi.

4.6. Farmakolojik Analizler

İlaç enjeksiyonlarından yedi gün sonra ratlara anestezi amacıyla 100 mg/kg ketamin ve 15 mg/kg ksilazin i.m. yolla verildi ve cerrahi işlemler sırasında oluşabilecek herhangi bir koagülasyonu önlemek amacı ile 500 IU/kg heparin (s.c.) uygulandı. Daha sonra, sağ sternotomi ile toraks açılıp, herhangi bir mekanik hasar oluşturmada asendan aort ve diğer damarlar kesilerek kalp izole edildi. İzole edilen kalp aorttan kanüle edilerek, Langendorff sistemine takıldı (Resim 1, Resim 2) ve peristaltik pompa yardımı ile sabit 37°C sıcaklıkta olan ve %5 CO₂ ve %95 O₂ karışımı ile havalandırılan Krebs solüsyonu ile 11 ml/dakika akış hızında perfüze edildi. Koroner perfüzyon basıncı, infüzyon kanülüne bağlı olan basınç transdüseri ile ölçüldü ve MP30 software sistemi ile (Biopac systems) kaydedildi. Perfüzyon basınçlarındaki değişiklikler gruplar arasında karşılaştırıldı. Bunların yanı sıra kalplere takılan elektrotlar yardımı ile kalbin dakikadaki atım sayısı olan kalp atım hızı (KAH) kaydedildi.



Resim 1: Langendorff Sistemi



Resim 2: İzole Perfüze Kalp

4.7. Biyokimyasal Analizler

Tüm gruplarda izole edilen kalp örneklerinde, doku malondialdehit (MDA) düzeyi ölçüldü. Lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA tayini, tiyobarbütirik asit (TBA) yöntemi ile yapıldı. Sonuçlar dokular için nmol/gr olarak tanımlandı. MDA ölçümü için -80°C’de saklanan kalp doku örnekleri, soğuk TCA (1 gr doku başına 1 ml %10 TCA ve 8 ml %5 TCA) eklenerek homojenize edildi. 13000 rpm’de 20 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatanta eşit hacimde %67 TBA ilave edilerek 100°C’ye kadar 10 dakika ısıtıldı. Absorbsiyon spektrumu 480-600 nm aralığında kaydedildi. MDA ölçümünün standardı olan 1,1,3,3-tetraetoksipropan ile aynı koşullarda çalışıldı. Sonuç MDA konsantrasyonları 532 nm dalga boyunda Jordan ve Scenkman tarafından bildirilen molarite katsayısı ($1,56 \times 10^5$) kullanılarak hesaplandı. (58)

4.8. Histopatolojik Analizler

Doku spesimenleri 48 saat boyunca %10’luk formalinde fikse edildi. Otomatik doku takibi cihazı ile (Thermo, Excelsior AS) standart histolojik doku takibi süreci sonrasında dokular döküm cihazında (Thermo, Histostar) parafine gömülerek bloklama işlemi yapıldı. Bloklardan mikrotom cihazı (Leica, RM2245) ile 4-5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. Kesitler deparafinizasyon işlemi takiben otomatik boyama cihazında (Shardon, Varistain Gemini) Hematoksilen-Eozin (H&E) ile standart metodlara göre boyandı. Histopatolojik değerlendirme için preparatlar ışık mikroskobu ile (Nikon, Eclipse 50i) incelendi.

4.9. Western Blotting Analizi

4.9.1. Total Protein Ekstraksiyonu

Kardiyak doku örnekleri, hayvandan alındıktan sonra distile su ile yıkandı, parafilm sarıldı, işaretlendi ve total protein ekstraksiyonuna kadar -80°C’de muhafaza edildi. Dokuların homojenizasyonu için, öncelikle 1: 100 oranında HALT ve T-PER çözeltilerinden alınarak karıştırıldı. Buz üzerinde, -80°C’de saklanan kardiyak dokulardan 100-125 mg alındı ve MagNA lyzer için üretilmiş boncuklu tüplere konuldu. Dokuların üzerine hazırlanan T-PER ve HALT karışımından 1,5 ml eklendi.

Daha sonra tüpler MagNA Lyzer cihazına yerleştirildi ve 7000 devirde 70 saniye döndürüldü. Çıkarılan numuneler derhal buz üzerine yerleştirildi ve oluşan köpüklerin gitmesi amacıyla 15 dk beklendi. Elde edilen supernant çözeltileri yeni ependroflara aktarıldı ve daha sonrasında ise alikuatlanarak -80°C’de saklandı.

4.9.2. Total Protein Kuantifikasyonu

Bu prosedür için Thermo Pierce 660 nm Assay kiti kullanıldı. Yapılan tüm işlemler kit prosedürüne bağlı olarak gerçekleştirildi. Kit içeriğinde bulunan 7 adet farklı konsantrasyona sahip BSA çözeltileri (125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml, 2000 µg/ml) standart olarak kullanıldı. Hem numunelerden hem de standartlardan 10 µl alınarak yeni ependroflara konuldu. Daha sonra üzerlerine 150 µl reaktif eklendikten sonra oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve NanoDrop™ 2000/2000c Spektrofotometre cihazı ile standartların ve numunelerin absorpsiyonları ölçüldü. Konsantrasyonları bilinen standartların yardımıyla numunelerdeki total protein miktarı hesaplandı.

4.9.3. SDS-PAGE Jel Elektroforezi

Bu prosedür için Thermo marka Owl Duo P8DS-1 cihazı kullanıldı. Hazırlanan %2’lik agaroz jel, herhangi bir sızıntıyı önlemek için kasetlerin tabanına yüklendi ve polimerize olması için 15 dk beklendi. Bu sırada %10’luk ayırıcı jel çözeltisi için tablodaki kimyasallar sırasıyla eklenerek karıştırıldı (Tablo 2). Agaroz jel polimerize olduktan sonra, her kasete 4,13 ml ayırıcı jel karışımı konuldu ve üzerine jellerin hava ile temasını kesmek için distile su eklendi. Jellerin iyice polimerize olması için 30 dakika bekletildi. Bu sırada %5’luk yoğunlaştırıcı jel çözeltisi için tablodaki kimyasallar sırasıyla eklenerek karıştırıldı. Polimerizasyondan sonra jelin üzerine verilen su kurutma kâğıdı ile uzaklaştırıldı. Her kasete 2,03 ml yoğunlaştırıcı jel, ayırıcı jelin üzerine pipetle eklendi. Bu işlemten hemen sonra, 0,8 mm aralıklı on dişli tarak yoğunlaştırıcı jel ile arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek jelin üzerine yerleştirildi. Bu jelin polimerizasyonu için de 30 dakika beklendi. Bu sırada yaklaşık 40-50 µg arasında total protein içeren numuneler oda sıcaklığında çözdürüldü. Her birine 1:1 oranında sample laemlii buffer eklendi. Kaynayan suda 5 dakika bekletildikten sonra 16000 rpm 5 dakika santrifüj edildi ve jele yüklemeye hazır

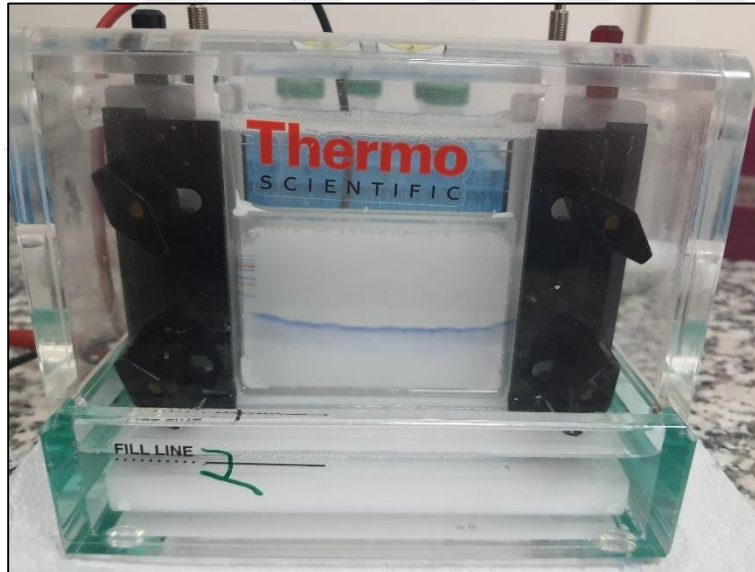
hale getirildi. Tankın iç çemberine uygun miktarda yürütme tamponu eklendi. Taraklar dikkatlice jellerden çıkarıldı ve böylece jeller numune yüklenmesine hazır hale geldi. İki kasete de ilk kuyucuğa 5 µl protein ladder ve geri kalan kuyucuklara da 20 µl hazırlanan numunelerden yüklendi. Tankın dış çemberine de yürütme tamponu eklendi. Elektroforez cihazının kapağı anot ve katot uçlarının doğruluğu kontrol edilerek kapatıldı (Resim 3). Birinci jel için 90 dk sabit 90volt ve ikinci jel için 40 dk sabit 110volt uygulanarak proteinlerin ayrışması işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 2: Ayırıcı Jel İçeriği

Ultrapür su	3,8 ml
Akrilamid:Bisakrilamid	3,4 ml
1,5 M Tris HCl pH=8,8	2,6 ml
%10 SDS	0,1 ml
%10 APS	0,1 ml
TEMED	0,01 ml

Tablo 3: Yoğunlaştırıcı Jel İçeriği

Ultrapür su	2,975 ml
Akrilamid:Bisakrilamid	0,67 ml
0,5 M Tris HCl pH=6,8	1,25 ml
%10 SDS	0,05 ml
%10 APS	0,05 ml
TEMED	0,005 ml

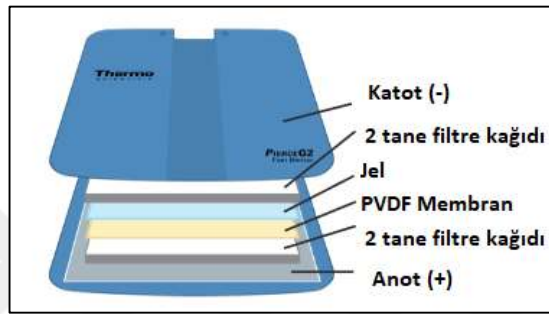


Resim 3: SDS-PAGE Jel Elektroforez Sistemi

4.9.4. ElektrobloTLama işlemi

Bu işlem için Thermo G2 Fastblotter elektrobloTLama sistemi kullanıldı ve her aşama bu cihazın manueline göre gerçekleştirildi. Öncelikle 7x8,5 cm boyutlarındaki 2 adet PVDF membranı metanol ile ıslatıldı. Daha sonra PVDF membranlar ve 8 adet filtre kağıdının üzerine Thermo 1. Step Transfer buffer eklendi ve 5 dakika inkübe

edildi. Bu sırada çalışması biten elektroforez işleminden elde edilen kasetler sistemden dikkatlice çıkartıldı. Kaset camları dikkatlice ayrıldı ve jel membran transfere uygun hale getirildi. Fast blotter sisteminin kasetine, her jel için sırasıyla 2 adet filtre kâğıdı, PVDF membran, jel ve en son 2 filtre kâğıdı üst üste yerleştirildi (Resim 4). Bu işlemlerde hava kabarcığı kalmaması için roller kullanıldı. En sonunda kaset dikkatlice kapatılarak cihaza yerleştirildi ve 7 dakikada proteinlerin jelden membrana transferi sağlandı. Sürenin sonunda akım kesilerek membran çıkarıldı ve PVDF membranlar dikkatlice cam kaplara alındı.



Resim 4: Elektrobloklama Sistemi

4.9.5. Bloklama işlemi

Öncelikle membranlar TBST buffer ile oda sıcaklığında 5 dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Daha sonra 20 ml bloklama çözeltisi ile 1 saat boyunca çalkalayıcının üzerinde oda sıcaklığında inkübe edildi. Bloklama aşamasından sonra TBST tamponu ile 3 kez beşer dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde yıkandı.

4.9.6. Antikorların İnkübasyonu

Literatür taraması ve üretici firmanın önerileri ile uyumlu şekilde seyreltilen birincil antikorlar, her membran için tablo 4'te belirtilen oranlarda 10 ml bloklama çözeltisi ile seyreltildi ve membranların üzerine eklendi. +4⁰ C'de 20 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde birincil antikorların inkübasyonu gerçekleştirildi.

Ertesi gün membranlar TBST çözeltisi ile oda sıcaklığında 3 kez beşer dakika çalkalayıcı üzerinde yıkandıktan sonra, 1:10000 oranında 10 ml bloklama çözeltisi ile seyreltilen sekonder antikor çözeltisi ile oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. Son olarak, tekrar TBST buffer ile oda sıcaklığında 3 kez beşer dakika çalkalayıcı üzerinde yıkandı.

Tablo 4: Antikorlar ve Seyreltme Oranları

Antikor	Seyreltme oranı
Actb (abcam #ab8227)	1:1000
RIP1(abcam #ab106393)	1:1000
RIP3(abcam #ab62344)	1:1000
CaMKII (invitrogen #PA5-22168)	1: 3000
CypD (invitrogen #PA3-022)	1:1000
Sekonder Antikor (abcam #6721)	1:10000

4.9.7. Kemilüminesans görüntüleme

Bu yöntemin temel prensibi, kullanılan görüntüleme kitinde bulunan luminolün, sekonder antikorların ucuna yerleştirilmiş olan Horse Radish Peroxidase enzimi ile kimyasal tepkimeye girmesi ve oluşan 3-aminoftalatın ışımasının 428 nanometre dalga boyunda CCD kamera ile ölçülmesi esasına dayanır. Bu nedenle, bu çalışmada Thermo ECL kit kullanıldı ve yapılan tüm işlemler kit prosedürüne bağlı olarak gerçekleştirildi. Her membran için toplamda 7,5 ml ECL solüsyonu hazırlandı, membranların üzerine eklendi ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Thermo Fisher iBright Western blotting görüntüleme sistemi kullanılarak bant görüntüleri elde edildi. Elde edilen görüntülerdeki protein bant yoğunlukları IMAGE-J (National Institute of Health, Bethesda, ABD) Analysis Software programında analiz edildi. Veriler β -Aktin housekeeping proteinine karşı normalize edildi.

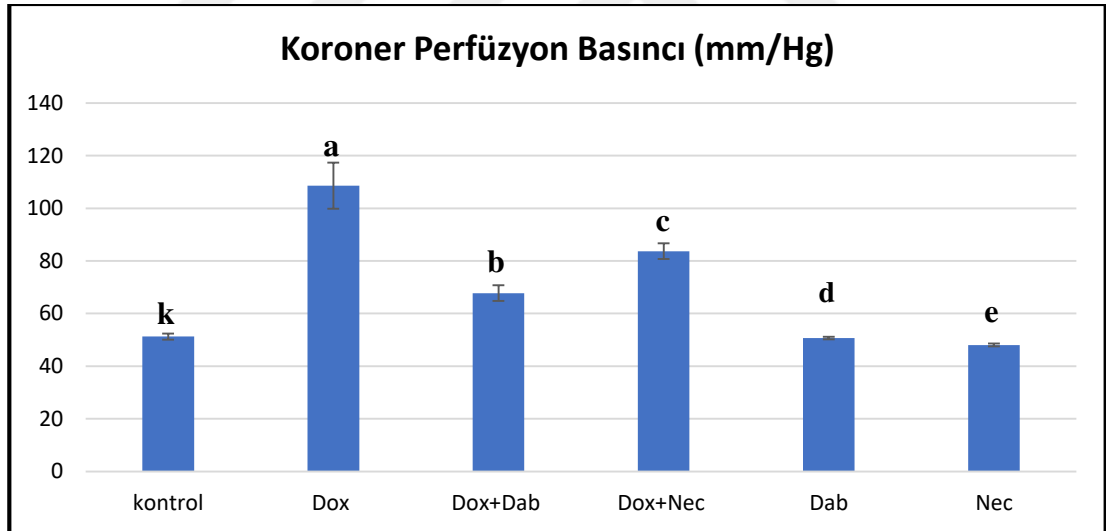
4.10. İstatistiksel Analizler

Elde edilen veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. İstatistiksel analizler SPSS programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası farkı değerlendirmek amacı ile Kruskal Wallis testi uygulandı. İki grup arasındaki fark ise Mann-Whitney U testi kullanılarak hesaplandı. Tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

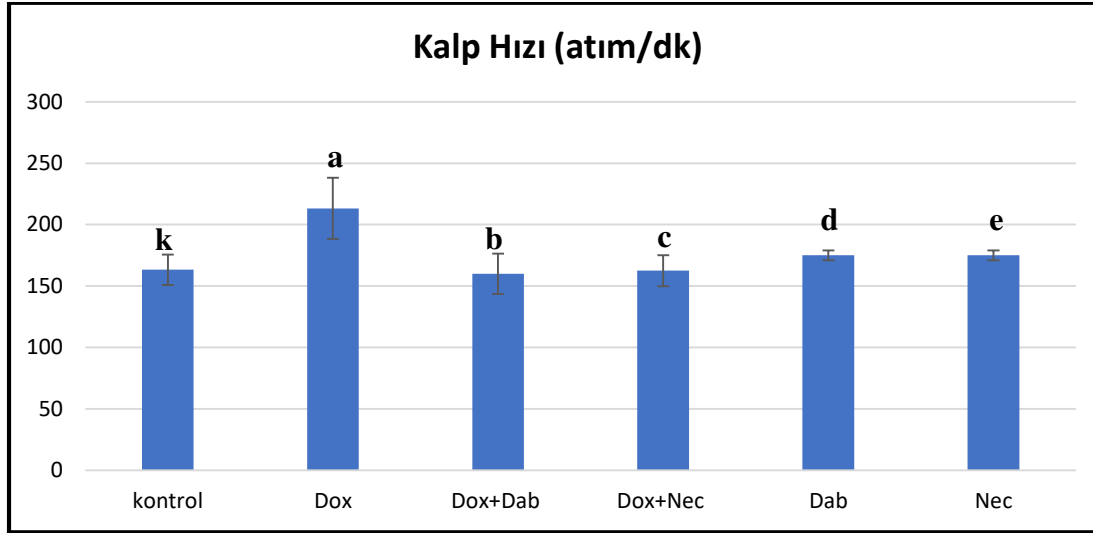
5. BULGULAR

5.1. Farmakolojik Bulgular

Langendorff sistemi ile perfüze edilen kalplerde elde edilen koroner perfüzyon basınç değerleri ve kalp atım hızının gruplara göre değişimi sırasıyla Şekil 4 ve Şekil 5'te gösterilmiştir. Dox grubunda Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu ($p<0,05$), Dox+Dab ve Dox+Nec gruplarında ise Dox grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü ($p<0,05$). Dox grubunda artan perfüzyon basıncı ve kalp atım hızının Dab ve Nec uygulaması ile nasıl değiştiklerine bakıldığında, Dox+Dab grubunda koroner perfüzyon basıncı ve kalp atım hızının Dox+Nec grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha çok azaldığı görülmüştür ($p<0,05$). Tek başına Dab ya da Nec verilen gruplarda ise kontrol grubuna göre her iki parametrede de anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$).



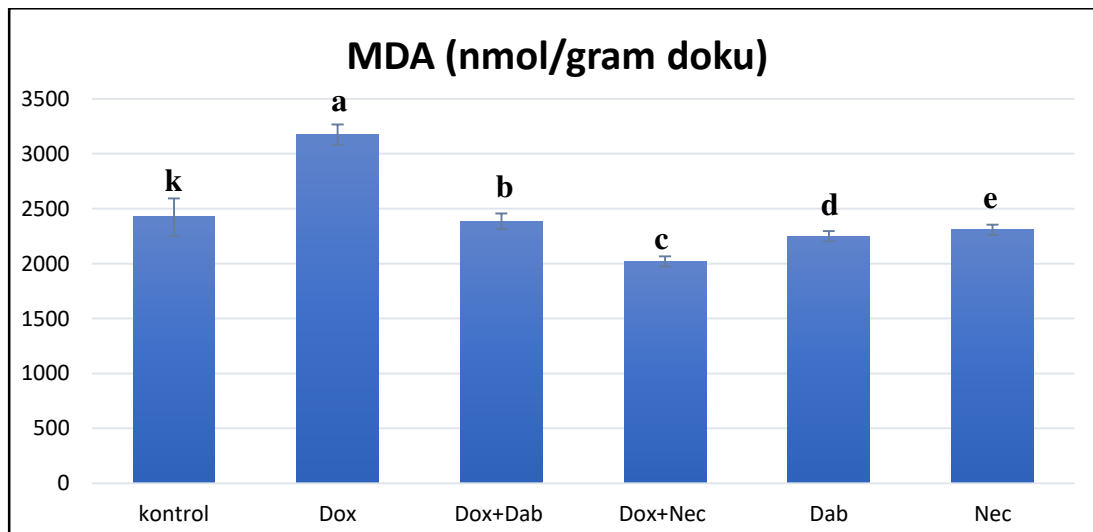
Şekil 5: Bütün gruplarda koroner perfüzyon basınç değişimleri (mm/Hg) (n=8) (k-a $p<0,05$, a-b $p<0,05$, a-c $p<0,05$, b-c $p<0,05$, k-d $p>0,05$, k-e $p>0,05$)



Şekil 6: Bütün gruplarda kalp hızı değişimleri (atım/dk) (n=8) (k-a $p<0,05$, a-b $p<0,05$, a-c $p<0,05$, b-c $p<0,05$, k-d $p>0,05$, k-e $p>0,05$)

5.2. Biyokimyasal Bulgular

Lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA sonuçlarına bakıldığında ise; doku MDA düzeylerinin Dox grubunda Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı ($p<0,05$), Dox+Dab ve Dox+Nec gruplarında ise Dox grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($p<0,05$). Dox grubuna göre Dab ve Nec uygulaması ile azalan bu MDA düzeyleri kıyaslandığında, Dox+Nec grubunda Dox+Dab grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha çok azaldığı görülmüştür ($p<0,05$). Tek başına Dab ya da Nec verilen gruplarda ise kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 6).



Şekil 7: Bütün gruplarda ölçülen doku Malondialdehit(MDA) düzeyleri (nmol/gram doku) (n=8) (k-a $p<0,05$, a-b $p<0,05$, a-c $p<0,05$, b-c $p<0,05$, k-d $p>0,05$, k-e $p>0,05$)

5.3. Histopatolojik Bulgular

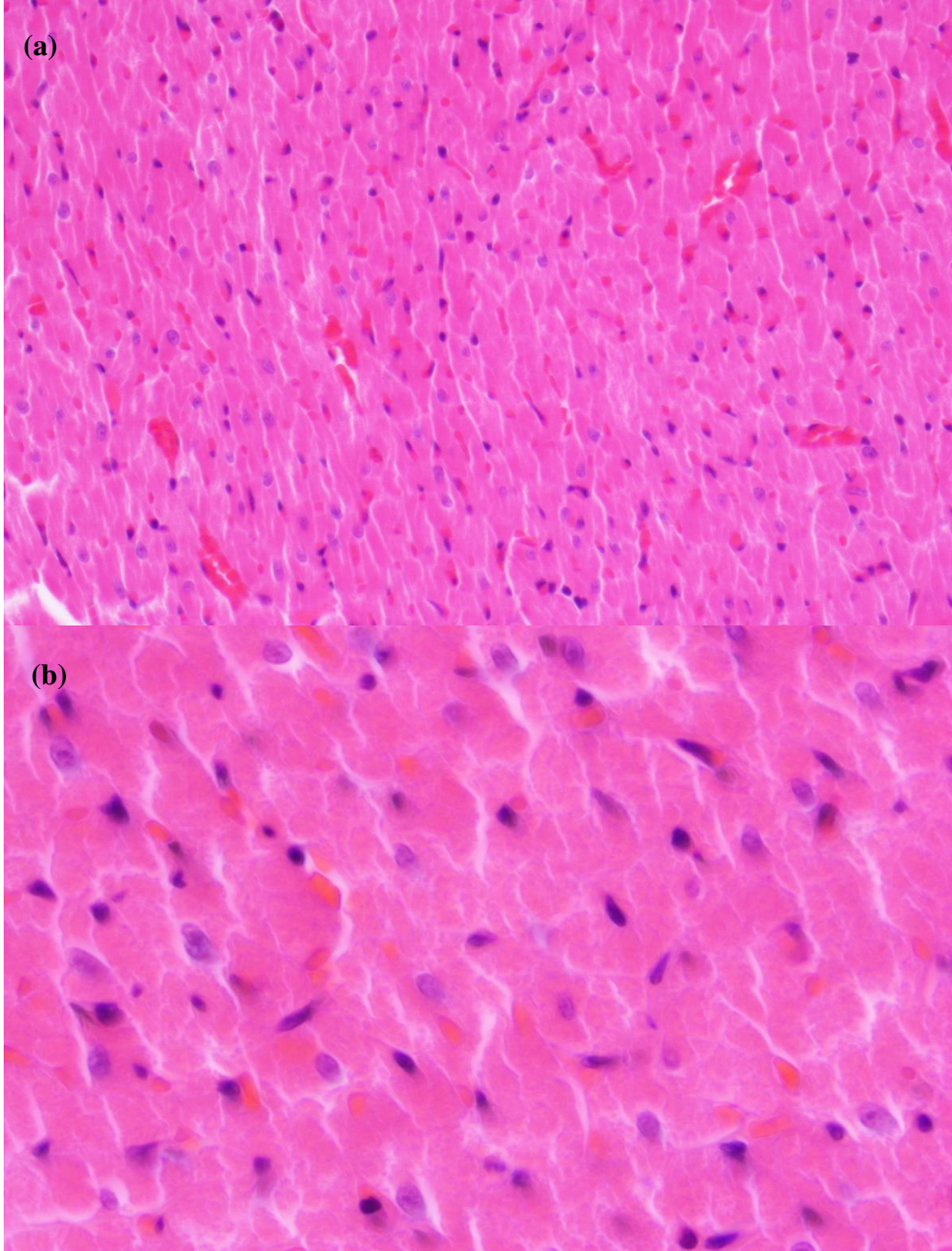
Tüm gruplara ait preparatlar intrasellüler vakuolizasyon, nükleer dejenerasyon, sitoskeletal kardiyomyosit dejenerasyonu, intersellüler ödem, nötrofilik ve lenfoplazmositik infiltrasyon, makrofaj infiltrasyonu, nekroz, apoptozis, fibrozis açısından değerlendirildi.

Dox grubunda kontrol grubuna göre sitoplazmada belirgin volüm artışı ve dağılma eğilimi, sitoskeletal organizasyonda ve striasyonda kayıp, net seçilemeyen sitoplazmik sınırlar ile karakterli belirgin dejenerasyon gösteren kardiyomyositler ile belirgin derecede kardiyomyosit dejenerasyonu gözlemlendi. Heterojen dağılım gösteren veziküler kromatin paterni, irregüler nükleer membran ve belirgin irileşme ile karakterli belirgin dejenerasyon gösteren nükleuslar izlendi (Resim 6).

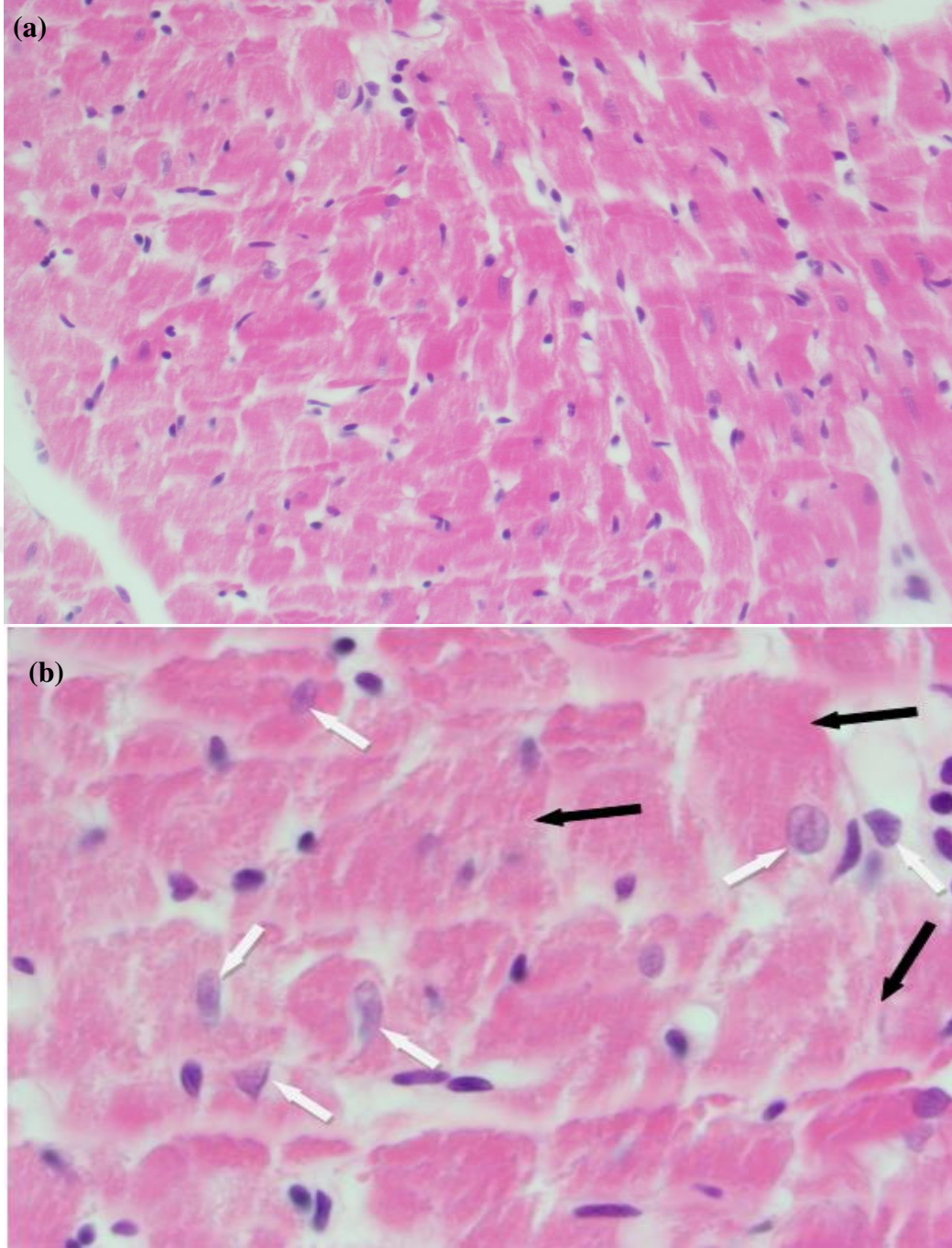
Dox+Dab grubunda ise Dox grubuna göre kardiyomyosit dejenerasyonunun kısmen gerilediği dikkati çekmiş olup, çoğunlukla korunmuş, kısmen seçilemeyen sitoplazmik sınırlar, sitoplazmada hafif volüm artışı, sitoskeletal organizasyonda ve striasyonda kayıp ile karakterli orta derecede dejenerasyon gösteren kardiyomyositler ve hafif irileşme gösteren, aşikâr nükleer membran düzensizliği gözlenmeyen, veziküler kromatin paterni karakterli orta derecede fokal nükleer dejenerasyon izlendi. (Resim 7).

Dox+Nec grubunda büyük oranda korunmuş sitoplazmik sınırlar, sitoskeletal organizasyonda ve striasyonda hafif fokal kayıp ile karakterli, sitoplazmada volüm artışı içermeyen, minimal dejenerasyon gösteren kardiyomyositler ve nükleer membran düzensizliği gözlenmeyen, veziküler kromatin paterni karakterli hafif nükleer dejenerasyon izlenmiş olup, histomorfolojinin normale yakın görünümde olduğu dikkati çekti (Resim 8).

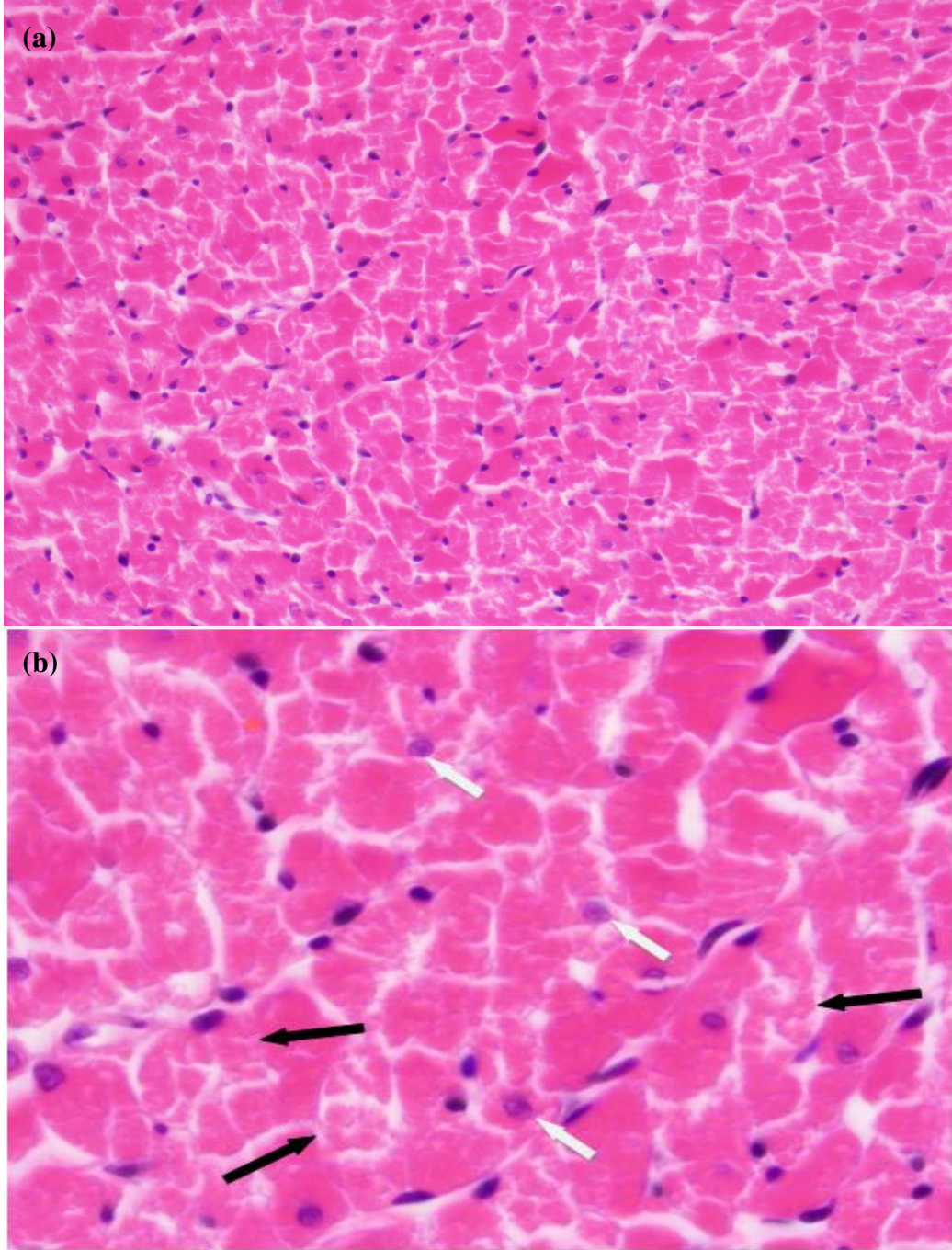
Dab ve Nec gruplarının kontrol grubu ile benzer olağan histomorfoloji sergilediği ve normal kapiller görünüm izlendi (Resim 9, 10).



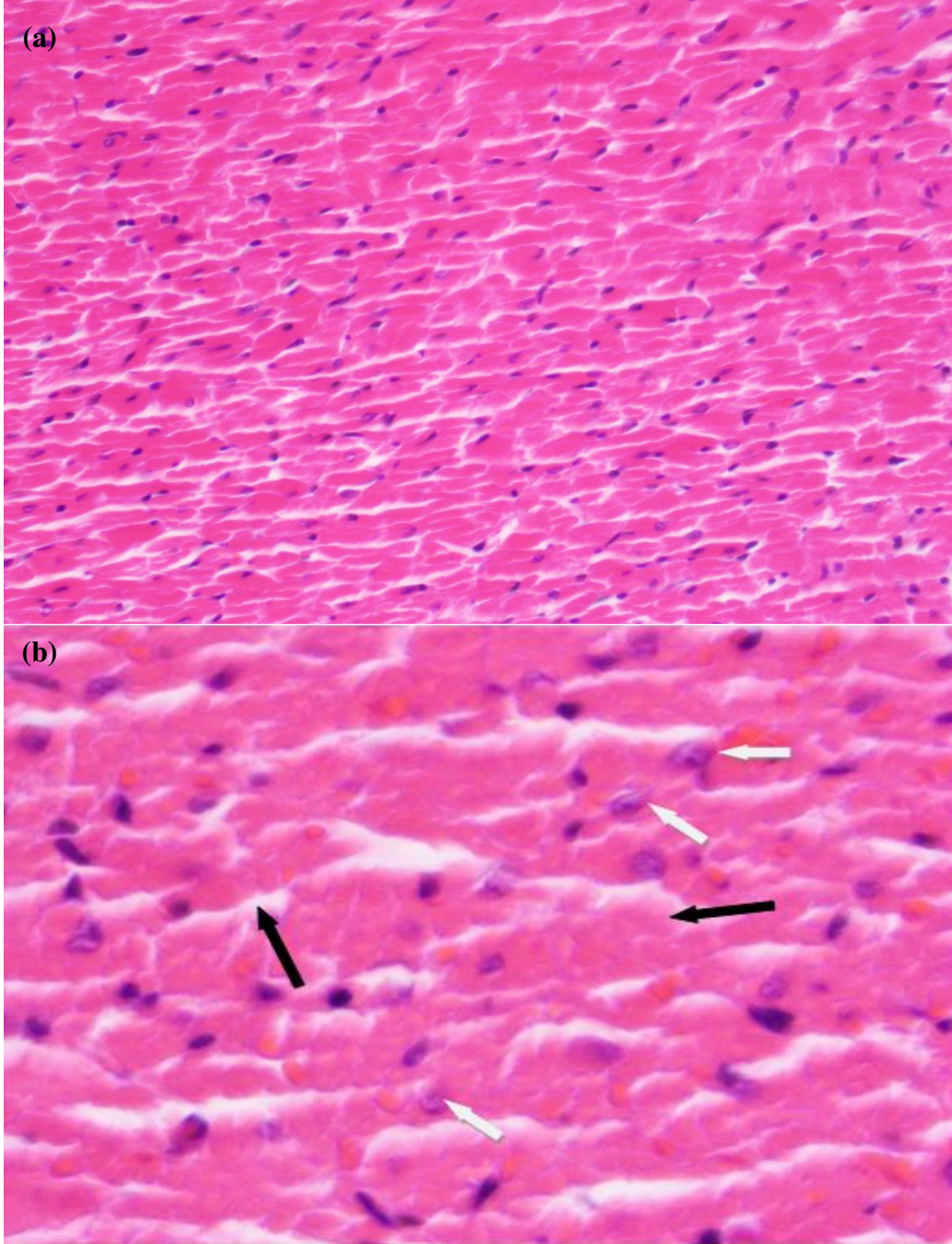
Resim 5: H&E Boyama ile Kontrol Grubu [(a):40X10 ve (b):100x10]: Oval, ökromatik ve santral yerleşimli nukleus ve striasyon gösteren miyokardiyal kas lifleri.



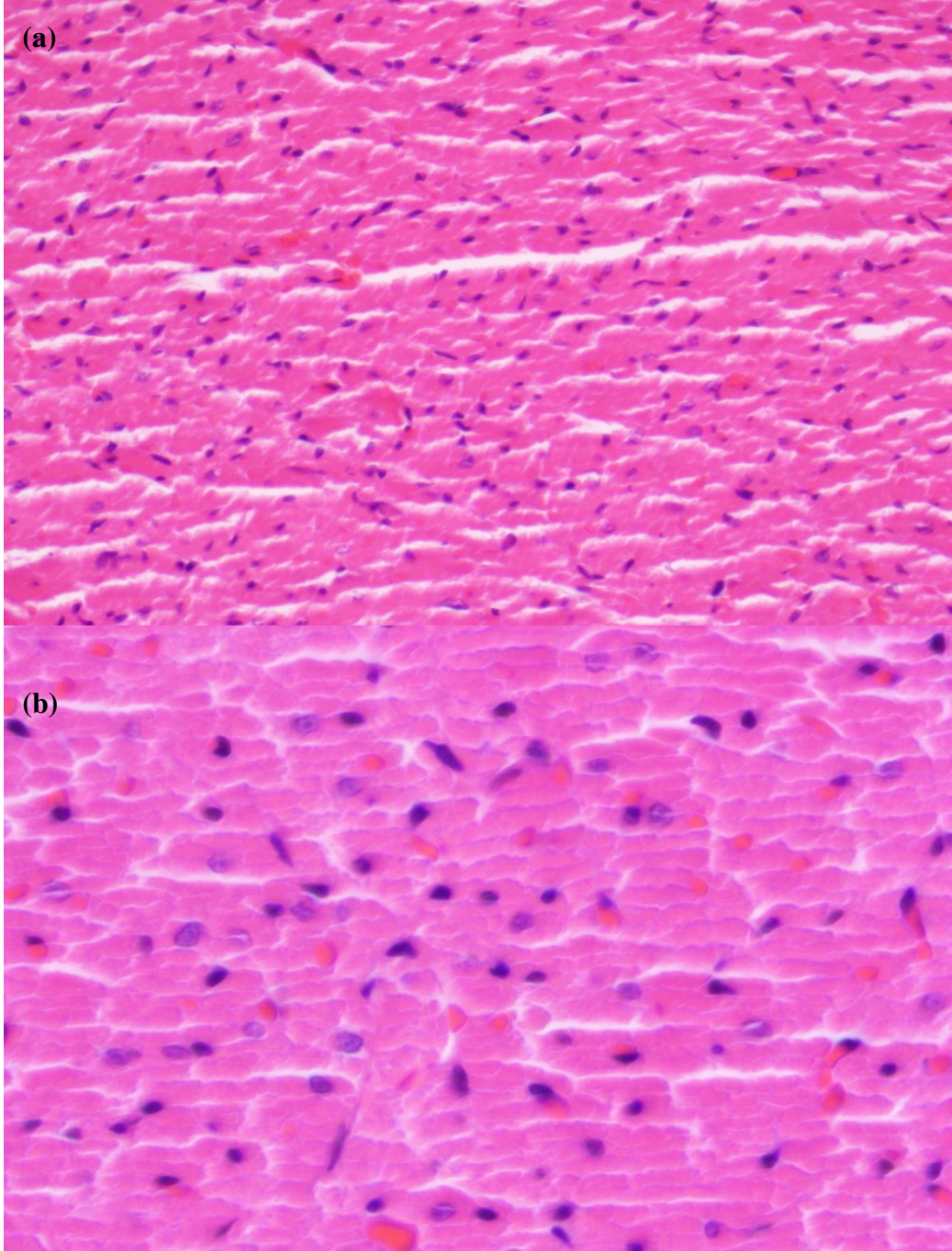
Resim 6: H&E Boyama ile Dox Grubu [(a):40X10 ve (b):100x10]: Sitoplazmada belirgin volüm artışı ve dağılma eğilimi, sitoskeletal organizasyonda ve striasyonda kayıp, net seçilemeyen sitoplazmik sınırlar ile karakterli belirgin dejenerasyon gösteren kardiyomyositler (siyah ok). Heterojen dağılım gösteren veziküler kromatin paterni, irregüler nükleer membran ve belirgin irileşme ile karakterli belirgin dejenerasyon gösteren nükleuslar (beyaz ok).



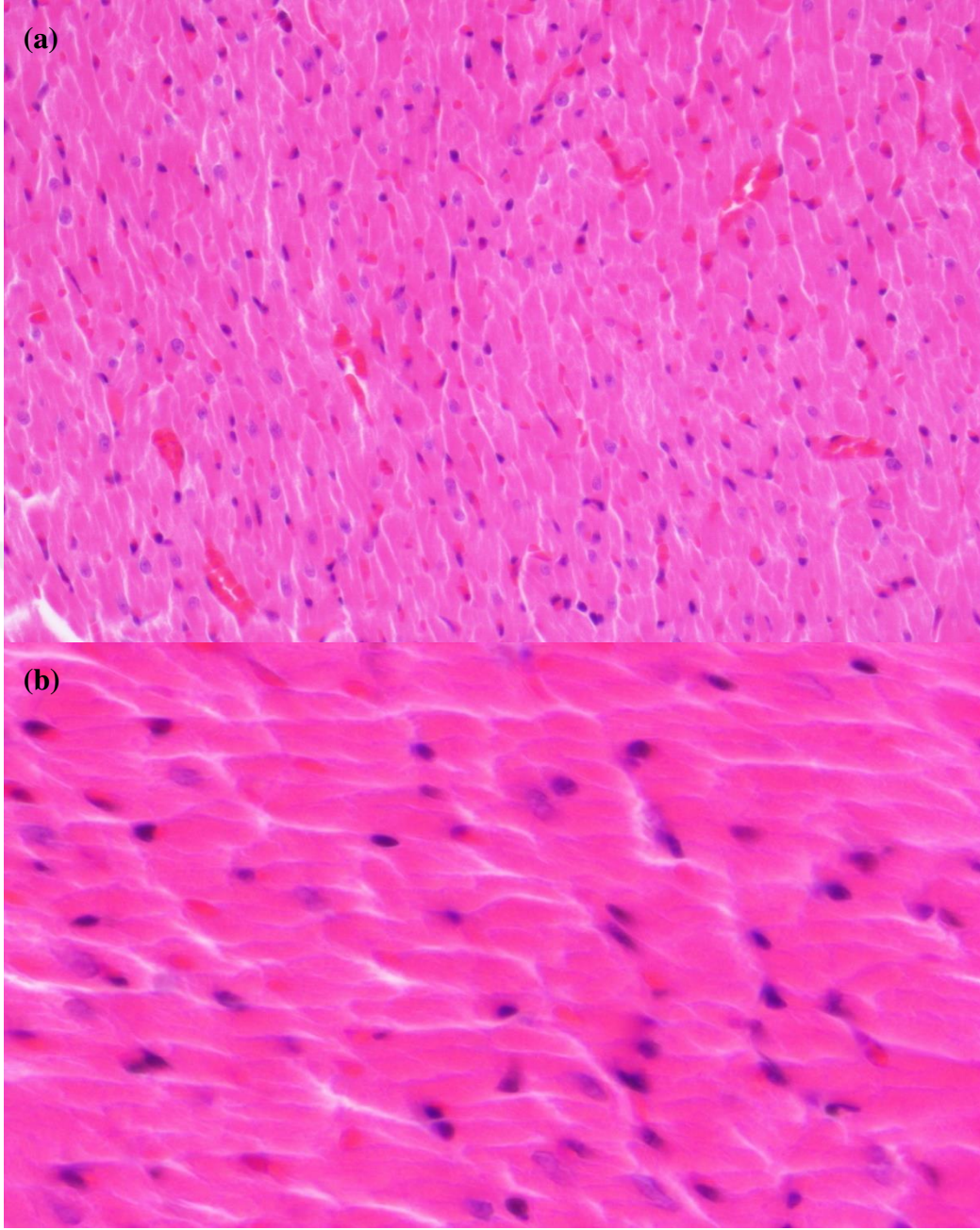
Resim 7: H&E Boyama ile Dox+Dab Grubu [(a):40X10 ve (b):100x10]: Çoğunlukla korunmuş, kısmen seçilemeyen sitoplazmik sınırlar, sitoplazmada hafif volüm artışı, sitoskeletal organizasyonda ve striasyonda kayıp ile karakterli orta derecede dejenerasyon gösteren kardiyomyositler (siyah ok). Hafif irileşme gösteren, aşıkır nükleer membran düzensizliği gözlenmeyen, veziküler kromatin paterni karakterli orta derecede dejenerasyon gösteren nükleuslar (beyaz ok).



Resim 8: H&E Boyama ile Dox+Nec Grubu [(a):40X10 ve (b):100x10]: Büyük oranda korunmuş sitoplazmik sınırlar, sitoskeletal organizasyonda ve striasyonda hafif fokal kayıp ile karakterli, sitoplazmada volüm artışı içermeyen, minimal dejenerasyon gösteren kardiyomyositler (siyah ok). Nükleer membran düzensizliği gözlenmeyen, veziküler kromatin paterni karakterli hafif dejenerasyon gösteren nükleuslar (beyaz ok).



Resim 9: H&E Boyama ile Dab Grubu [(a):40X10 ve (b):100x10]: Kontrol grubu ile benzer olağan histomorfoloji.

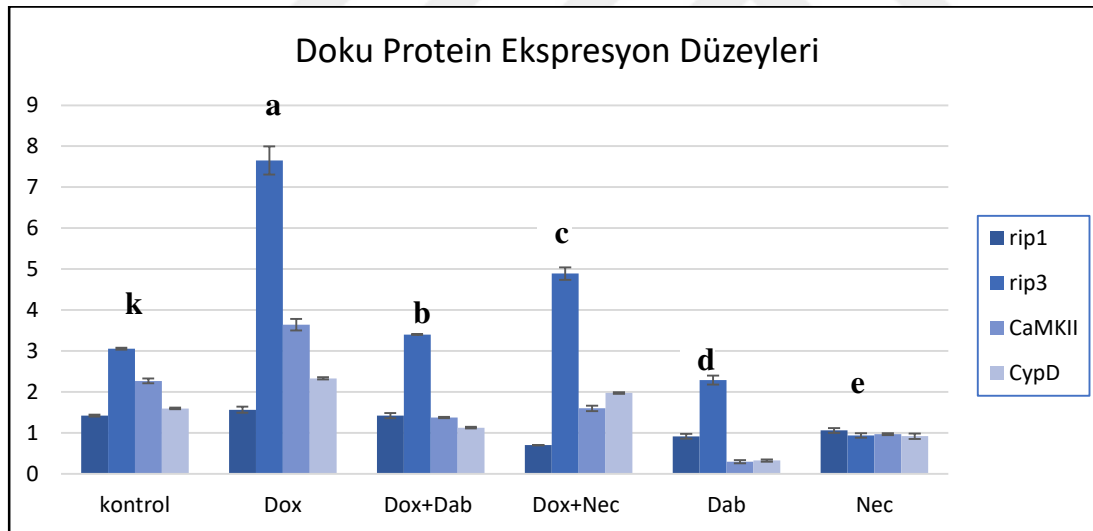


Resim 10: H&E Boyama ile Nec Grubu [(a):40X10 ve (b):100x10]: Santral yerleşimli oval ökromatik nukleus ve normal histolojik yapı.

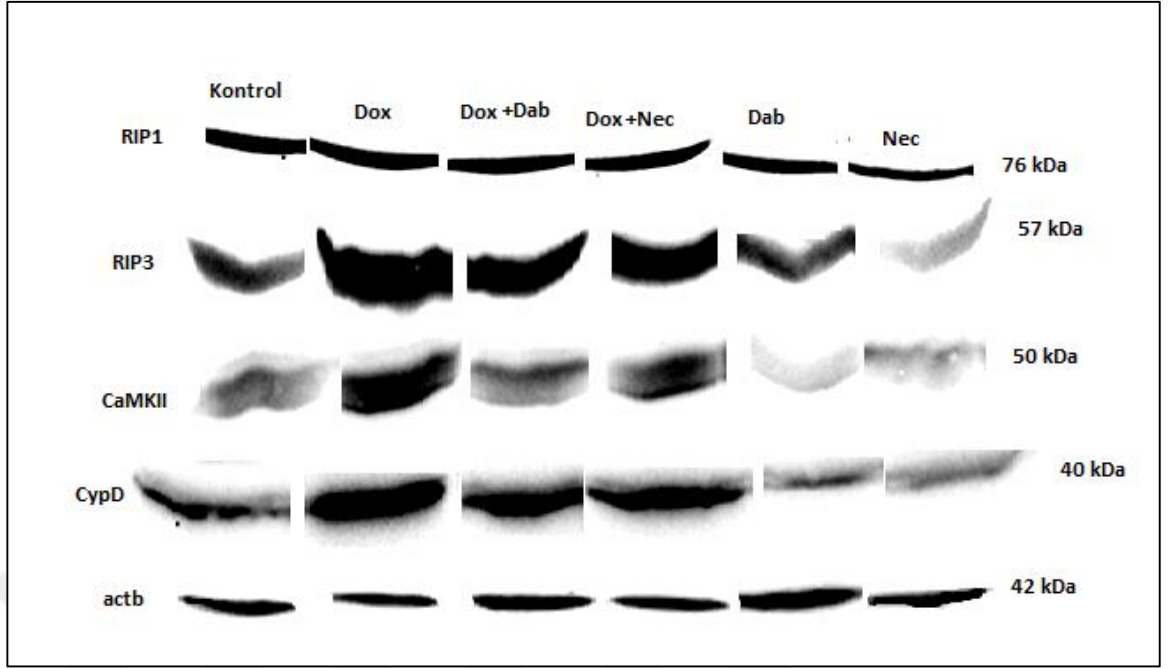
5.4. Western Blot Bulguları

Dox grubunda kontrol grubuna göre RIP1, RIP3, CaMKII ve CypD proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür ($p<0,05$). Dox+Dab ve Dox+Nec gruplarında ise bu proteinlerin ekspresyonunun, Dox grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($p<0,05$) (Şekil 7, 8).

Dox+Dab ve Dox+Nec grupları karşılaştırıldığında ise Dabrafenib uygulanmasının incelenen RIP3, CaMKII ve CypD ekspresyon düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla azalttığı görülmüştür ($p<0,05$). Buna karşılık Necrostatin-1'in RIP1 inhibitörü olmasından dolayı Necrostatin-1 uygulamasının RIP1 ekspresyon düzeylerini, Dox+Nec grubunda beklenildiği üzere anlamlı bir şekilde daha fazla azalttığı görülmüştür ($p<0,05$). Tek başına Dab ya da Nec verilen gruplarda ise kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 7, 8).



Şekil 8: Gruplara göre doku protein ekspresyon düzeyleri (n=8) (k-a $p<0,05$, a-b $p<0,05$, a-c $p<0,05$, b-c $p<0,05$, k-d $p>0,05$, k-e $p>0,05$)



Şekil 9: Bütün gruplarda çalışılan proteinlere ait western blot bant görüntüleri

6. TARTIŞMA

Antrasiklin türevi geniş spektrumlu bir antibiyotik olan doksorubisin, klinikte yaygın bir şekilde farklı kanser türlerine karşı kemoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır (59). Alopesi, ateş, mukozit, bulantı kusma gibi birçok yan etkisi bulunan bu ilacın doz kısıtlayıcı en önemli yan etkisi kardiyotoksisitedir. Dox kullanan hastaların %30-40'ında çok fazla miktarda kardiyomiyosit hücresi kaybı, kardiyomiyopati ve kalp yetmezliği şeklinde bu toksisite tespit edilmiştir (60).

Dox'un kardiyotoksik etkileri ve buna karşı değişik ajanların koruyucu etkilerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu konu ile ilgili literatürde pek çok çalışma bulunmaktadır. Örneğin 2021 yılında Nicol ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, Dox ile oluşturulan kardiyotoksisteye karşı 100 mg/kg dozunda metoprololün koruyucu etkileri araştırılırken (61); 2014 yılındaki başka bir çalışmada Diazoxid'in kardiyoprotektif etkileri araştırılmıştır (62). 2020 yılında Yu ve arkadaşları tarafından yayınlanan oldukça önemli bir çalışmada ise Dexrazoxane'ın kardiyoprotektif etkileri hem apoptoz hem de nekroptoz açısından ele alınmış ve bu çalışmaya benzer şekilde nekroptozu inhibe etmek için Nec-1 kullanılmıştır (63).

Dox uygulanması ile gelişen kardiyotoksik yan etkilerin oluşmasındaki en önemli ve etkili nedenler: artan oksidatif stres ve ROS seviyeleridir. Bunlar, hücredeki birçok mekanizmayı etkileyerek apoptoz ve nekroptoz gibi hücrel ölüm yollarının aktivasyonuna sebep olur (7). Zhang ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınladığı çalışmada, iskemi/reperfüzyon (I/R) ya da Dox ile oluşan kardiyak hasarda, apoptoz inhibitörü zVAD-fmk ile kardiyak hücre ölümlerinin sadece %30'u önlenirken, RIP3 knockout farelerde ise hücre ölümlerinin %50 oranında azaldığı gözlenmiştir ve bu nedenle hem apoptozun hem de nekroptozun kardiyak hasarda oldukça önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir (9). Programlanmış nekroz olarak da ifade edilebilen nekroptozun sinyal yolları, kaspazlardan bağımsız olarak TNFR veya Fas ligand aktivasyonu ile indüklenir, RIP1 ve RIP3 enzimlerinin fosforilasyonu ile ilerler. Yapılan çalışmalarda kardiyovasküler hastalıklarda rolü olduğu görülen nekroptozun RIP1-RIP3-MLKL ve RIP3-CaMKII-mPTP yolları olmak üzere iki ayrı sinyal yolağı üzerinden oluştuğu bildirilmiştir (5,6,7). Birinci yolda RIP1 enziminin fosforilasyonunun çok önemli olduğu ve RIP1'in kinaz aktivitesinin inhibe edilmesiyle oluşacak olan RIP1-RIP3-

MLKL kompleksinin yani bir diğ er ismiyle nekrozom oluşumunun engellenebildiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Aktive olan RIP1 enzimi, RIP3'  ve o da MLKL'yi fosforlayarak nekrozom kompleksini oluşturur. Bu kompleksin oluşumundan sonra hücredeki iyon ve elektrolit dengesinin bozularak nekrotik membran parçalanmasına sebep olduğu bildirilmiştir (7). İkinci yolağın ise özellikle ROS ve oksidatif stres ile indüklenen nekroptozda aktive olduğu gösterilmiştir. MLKL enziminin fosforilasyonunun gerçekleşmediği, CaMKII enziminin RIP3 ile hem doğrudan fosforilasyonu hem de dolaylı olarak oksidasyonu ile aktive olmasının ardından mPTP'nin kilit enzimlerinden CypD'nin ekspresyon seviyesini arttırarak mitokondriyel membran geçirgenliğinin arttırılarak nekrozu başlattığı gösterilmiştir (6, 9).

Oluşan nekroptotik hasarın, nekroptoz mekanizmasındaki enzimlerin inhibisyonu ile azaldığını gösteren ve özellikle RIP1 enzim inhibisyonu ile ilgili yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır. RIP1 enzim inhibitörü olan Necrostatin-1 molekülünün etkileri kalp, beyin ve omurilik, akciğer, karaciğer ve böbrek gibi birçok dokuda hem in vivo hem in vitro olarak incelenmiş ve koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. (10, 57, 64, 65).

Nekroptozun ikinci yolağının aydınlatılması ile RIP3 enziminin her iki yolakta da bulunduğu ve bu nedenle RIP3 enziminin inhibisyonunun, oldukça önemli olduğu g r lm ştir. Luedde ve grubunun 2014 yılında yaptığı çalışmada RIP3 enziminin spesifik olarak kardiyomiyositlerde sentezlendiği ve mitokondride lokalize olduğu; inflamasyon, ROS  retimi ve miyokard enfarktüsünden sonraki remodellemede görev aldığı bildirilmiştir (10). Yapılan bir diğ er çalışmada ise, RIP3 knockout farelerin I/R sonucunda oluşan miyokard enfarktüsü hasarına karşı normal farelere oranla daha dirençli olduğu serum LDH konsantrasyonlarının ölçülmesi ve Evans boyama yöntemleriyle gösterilmiştir (9). Aynı  alışmada, I/R hasarı gibi Dox'un oluşturduğu kardiyotoksisiteye karşı da RIP3 knockout farelerin daha dirençli olduğu bulunmuştur. Ayrıca, RIP3 knockout farelerdeki hem I/R hasarına hem de Dox'un oluşturduğu kardiyotoksik hasara bağlı oluşan ROS üretiminin normal farelere oranla artmadığı gözlenmiş ve ROS artışının RIP3 enziminin indüklenmesi ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (9,10).

Yapılan bu çalışmada literatür ile uyumlu şekilde, Dox grubunda oluşan nekroptoz ile RIP1, RIP3, CaMKII ve CypD proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür (9, 63). Ayrıca çalışmamızda yine literatür ile uyumlu şekilde, Dox uygulaması ile kardiyak fonksiyonlarda bozulma; kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artan koroner perfüzyon basıncı ve kalp atım hızı ile görülmüştür (66). Literatürde hem Dox uygulanması hem de I/R hasarı ile lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeylerinin artışı ile kardiyotoksitesinin olduğu gözlenmiştir (67). Yapılan bu çalışmada da benzer şekilde MDA seviyelerinin, Dox grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı görüldü.

Daha önce yapılan çalışmalarda doksorubisine bağlı olarak miyokardiumda oluşan hücrel lezyonlar, fibrozis, yaygın hemorajiler şeklindeki dejeneratif değişiklikler gözlenmiştir (62, 63, 67). Çalışmamızda yaptığımız histopatolojik incelemede Dox grubunda literatür ile uyumlu şekilde belirgin derecede kardiyomyosit dejenerasyonu ve fokal nükleer dejenerasyon gibi morfolojik bozukluklar gözlendi.

Dabrafenibin RIP3 inhibisyonu üzerinden nekroptozu karşı koruyucu etkili olduğu karaciğer, beyin ve böbrek dokularında in vivo olarak inceleyen sadece birkaç çalışma bulunmaktadır (11, 13, 67, 68, 69). Örneğin Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, RIP3 enziminin melanoma tedavisinde kullanılmakta olan B-Raf inhibitörü dabrafenib ile selektif olarak inhibe edilebildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada, karaciğerde asetaminofen (300 mg/kg i.p.) ile oluşan toksisiteye bağlı gelişen doku hasarına karşı dabrafenibin (100 mg/kg ve 300 mg/kg, oral gavaj (o.g.)) koruyucu etkisi incelenmiş, elde edilen bulgular ile dabrafenibin protektif etkisinin varlığı, hem Alanin transaminaz (ALT) ve Aspartat transaminaz (AST) seviyelerindeki azalma ile biyokimyasal olarak hem de H&E boyama ile histopatolojik olarak tespit edilmiştir (11). 2018 yılında yapılan bir çalışmada ise, dabrafenibin iskemik beyin hasarına karşı koruyucu etkisi incelenmiş ve fototromboz kaynaklı fokal iskemik hasardan bir saat sonra 10 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak uygulan dabrafenibin farelerde infarkt lezyon alanını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı gözlenmiştir (13). Dabrafenib'in kardiyak dokuda ise sadece hipertansiyon ile oluşturulan hasara karşı etkisi incelenmiştir (69). Aslında bu çalışmada dabrafenibin koruyucu etkisinden çok,

kemoterapide kullanılan diğer ERK1/2 inhibitörlerinin bazı hastalarda kardiyotoksik yan etkiler oluşturmamasından dolayı dabrafenibin kardiyak hasar oluşturup oluşturmadığı incelenmiştir. Bu çalışmanın hipotezine göre ERK1/2 sinyal kaskadının sağlıklı kalpte gerekli olmadığı ama kardiyak remodellemesinde rolü olduğu varsayılmıştır. Bu nedenle de stres oluşturmak için hipertansif fare modeli kullanılmış, 0,8 mg/kg/gün Angiotensin II (AngII) kullanılarak oluşturulan hipertansif farelerde, 3 mg/kg/gün Dabrafenib uygulandığında ERK1/2 sinyal yolağının inhibe olduğu ve kardiyak hipertrofinin hem akut (7 gün) hem de kronik (28 gün) uygulamada engellendiği görülmüştür. Bu verilere bağlı olarak dabrafenibin kardiyak dokuda güvenilir bir ajan olduğu sonucuna varılmıştır (69).

2020 yılında kardiyomiyositlerde Dox ile indüklenen nekroptoz mekanizması ile ilgili yapılan bir çalışmada, farelere gün aşırı 10 mg/kg Dox uygulanmış ve koruyucu ajan olarak Dox uygulanmasından 3 saat önce 200 mg/kg/gün dexrazoxane verilmiştir. Dox uygulanmasının kardiyak fonksiyonları düşürdüğü ve RIP1, RIP3 ve MLKL proteinlerinin ekspresyon seviyelerini arttırdığı gözlenmiştir (63). 2020 yılında yapılan bir başka çalışmada ise renal I/R hasarı ile RIP1, RIP3 ve MLKL proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin arttığı görülmüş ve dabrafenib uygulanması ile anlamlı bir şekilde azaldığı bildirilmiştir (70).

Yaptığımız bu çalışmada da literatür ile uyumlu şekilde, Dox grubunda oluşan nekroptoz ile artan RIP1, RIP3, CaMKII ve CypD proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin Dabrafenib ve Nec-1 uygulaması ile anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür. Dabrafenib ve Nec-1 grupları karşılaştırıldığında ise, Dab uygulanması ile RIP3, CaMKII ve CypD ekspresyon seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla azaldığı buna karşılık Nec-1 uygulanması ile RIP1 ekspresyon seviyesinin daha fazla azaldığı gözlenmiştir. Literatür ile uyumlu olarak Nec-1'in RIP1 enzim inhibitörü olması nedeniyle Nec-1 ile RIP1 ekspresyon seviyesindeki azalma dabrafenibe göre daha fazla olmuştur.

Meijes ve arkadaşlarının AngII ile oluşturulan hipertansif kardiyak hasara karşı dabrafenibin kardiyak fonksiyonları iyileştirdiği gösterilen çalışmasına (69) benzer şekilde yaptığımız çalışmada Dox uygulaması ile artan koroner perfüzyon basıncı ve kalp atım hızı Dab+Dox grubunda Dox grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmış olup,

kardiyak fonksiyonlarda iyileşme görülmüştür. Ayrıca Dox+Dab ve Dox+Nec grupları karşılaştırılığında her iki nekroptoz yolağında da etkili olan RIP3 enzim inhibisyonunu sağlayan Dabrafenib uygulamasının kardiyak fonksiyonları Nec-1'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha çok düzelttiği görülmüştür.

Çalışmamızda lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA seviyelerinin, Dox grubunda anlamlı bir şekilde arttığı, Dox+Dab ve Dox+Nec gruplarında ise anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür. Dox+Dab ve Dox+Nec grupları karşılaştırıldığında ise, Nec-1 uygulanmasının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde MDA seviyesini daha çok azalttığı görülmüştür. Nec-1 ile RIP1 ve nekroptoz inhibisyonunun, yapılan birçok çalışmada MDA seviyesini düşürdüğü bildirilmiştir (11, 71). Yapılan bir çalışmada I/R hasarı ile oluşan yüksek MDA seviyelerinin RIP3 delesyonu ile normal seviyelere düşürüldüğü gösterilmiştir (72). Buna göre RIP3 inhibitörü olan dabrafenib uygulamasının MDA düzeyini düşürmesinin literatür ile uyumlu olduğu, ancak Nec-1 uygulamasının lipid peroksidasyonu azaltıcı etkisinin daha fazla olduğu görülmektedir (71, 72).

Çalışmamızda yaptığımız histopatolojik incelemede, literatürde olduğu gibi dabrafenib uygulanmasının Nec-1 grubu ile benzer şekilde dokuda oluşan dejenerasyonu geriletmediği görülmüştür (11, 13, 69). Bu da hem dabrafenibin hem nekrostatin-1'in doksorubisinin oluşturduğu miyokardial hasar üzerinde önemli derecede benzer koruyucu etkileri olduğunu göstermektedir.

7. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu çalışma ile, Dabrafenibin doksorubisin ile oluşan kardiyotoksik hasarda rol oynayan nekroptoza karşı koruyucu olduğu ve bu etkisinin necrostatin-1'e oranla daha fazla olduğu görülmüştür. Halen klinikte BRAF enzim inhibitörü etkisinden dolayı melanoma tedavisi için kullanılan Dabrafenib ile yapılacak ileri çalışmaların, nekroptoza karşı protektif etkisinin daha geniş boyutlarda incelenerek birçok kanser tedavisinde kullanılan doksorubisinin kardiyotoksik yan etkilerinin azaltılmasına ve farklı nedenlerle oluşan nekroptozun önlenmesine yönelik yeni terapötik yaklaşımlar ve tedavide yeni ilaç kombinasyonlarının kullanılmasına olanak sağlayacaktır.

8. KAYNAKLAR

1. Sawicki, K. T., Sala, V., Prever, L., Hirsch, E., Ardehali, H., & Ghigo, A. Preventing and Treating Anthracycline Cardiotoxicity: New Insights. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2021; 61, 309–332.
2. Ewer, M. S., & Ewer, S. M. Cardiotoxicity of anticancer treatments. *Nat Rev Cardiol.* 2015; 12 (9): 547-558.
3. Octavia, Y., Tocchetti, C. G., Gabrielson, K. L., Janssens, S., Crijns, H. J., & Moens, A. L. (2012). Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52(6), 1213–1225.
4. Renu K, VG A, Tirupathi TP, Arunachalam S. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy – An update. *Eur. J. Pharmacol.* 2018; 818, 241–25
5. Singal PK; Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1998; 339, 900–905.
6. Gupta K, Phan N, Wang Q, Liu B. Necroptosis in cardiovascular disease - a new therapeutic target. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2018; 118(3), 26–35.
7. Zhe-Wei S, Li-Sha G, Yue-Chun L. The role of necroptosis in cardiovascular disease. *Front. Pharmacol.* 2018; 9(7), 1–9.
8. Degterev A, Huang Z, Boyce M. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat. Chem. Biol.* 2005; 1(2), 112–119.
9. Zhang T, Zhang Y, Cui, M. CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia- and oxidative stress-induced myocardial necroptosis. *Nat. Med.* 2016; 22(2), 175–182.
10. Luedde M, Lutz M, Carter N, Sosna J, Jacoby C, Vucur M. RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 2014; 103, 206–216
11. Li JX, Feng, JM, Wang Y, Li XH, Chen XX, Su Y. The B-RafV600E inhibitor dabrafenib selectively inhibits RIP3 and alleviates acetaminophen-induced liver injury. *Cell Death Dis.* 2014; 5(6), 1–11
12. Weiss, SA, & Pavlick, AC. Dabrafenib for the treatment of melanoma. *Expert Opin. Orphan Drugs.* 2015; 3(9), 1075–1084.
13. Cruz SA, Qin Z, Stewart AFR, Chen HH. Dabrafenib, an inhibitor of RIP3 kinase-dependent necroptosis, reduces ischemic brain injury. *Neural Regen. Res.* 2018; 13(2), 252–256.
14. Havlin K. An overview of anticancer drug induced cardiac complications. *Cancer Ther Update.* 1992; 12, 2-6.
15. Speth P, Van Hoesel Q, Haanen C. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. *Clin Pharmacokinet.* 1988; 15, 1, 15-31
16. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman&Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th Ed McGraw-Hill Medical Publishing Division. 2005;1355-1360.
17. Pizzo PA, Poplack DG. Principles and Practice of Pediatric Oncology. Fifth edition. Lippincott Williams& Wilkins Philadelphia. 2006; 229-332
18. Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, Phillips DR, Cutts SM. Doxorubicin- DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. *Cancer res.* 2006; 66, 9, 4863-71
19. Chabner BA, Amrein PC, Druker BJ, Michaelson MD, Mitsiades CS, Goss PE. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics. (11th ed.) New York, ABD: McGraw Hill Education/Medical. 2006; 1315–1403
20. Varela-López A, Battino M, Navarro-Hortal MD, Giampieri F, Forbes-Hernández TY, Romero-Márquez JM. An update on the mechanisms related to cell death and toxicity of doxorubicin and the protective role of nutrients. *Food Chem. Toxicol.* 2019; 134 (September), 110834
21. Kwok KK, Vincent EC, Gibson JN. Pharmacology and Therapeutics for Dentistry. (7th ed.). US: Mosby. 2016; 530–562.
22. Gerson SL, Caimi PF, William BM, Creger RJ. Pharmacology and Molecular Mechanisms of Antineoplastic Agents for Hematologic Malignancies. (7th ed.). Elsevier. 2017; 537-615
23. Helvacioğlu S, Charehsaz M, Aydın AA. Review on Doxorubicin Related Genotoxicity and Protective Effects of Phytochemicals. *J Lit Pharm Sci.* 2018; 7, 237–250.
24. Minotti G, Ronchi R, Salvatorelli E, Menna P, Cairo G. Doxorubicin irreversibly inactivates iron regulatory proteins 1 and 2 in cardiomyocytes: evidence for distinct metabolic pathways and implications for iron-mediated cardiotoxicity of antitumor therapy, *Cancer Res.* 2001; 61 (23) 8422–8428.
25. Pugazhendhi A, Edison, TN, Velmurugan BK; Jacob JA, Karuppusamy I. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. *Life Sciences.* 2018; 200, 26–30

26. Rawat PS, Jaiswal A, Khurana A, Bhatti JS, Navik U. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2021; 139, 111708.
27. Horenstein MS, Vander Heide RS. Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity and its prevention, *Mol. Genet. Metab*. 2000; 71 (1–2) 436–444.
28. Simůnek T, St'ěrba M, Popelov'a O, Adamcov'a M, Hrdina R, Gersl V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol. Rep*. 2009; 61 (1), 154–171.
29. Chen Y, Huang T, Shi W, Fang J, Deng H, Cui G. Potential targets for intervention against doxorubicin-induced cardiotoxicity based on genetic studies: a systematic review of the literature, *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2020; 138, 2020, 88–98.
30. Minotti G, Recalcati S, Mordente A, Liberi G, Calafiore AM, Mancuso C, Preziosi P. The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase/iron regulatory protein-1 in cytosolic fractions from human myocardium, *FASEB J*. 1998; 12 (7), 541–552.
31. V'asquez-Vivar P, Martasek N, Hogg BS, Masters KA. Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin, *Biochemistry*. 1997; 36 (38), 11293–11297.
32. Liu B, Li H, Qu H, Sun B. Nitric oxide synthase expressions in ADR-induced cardiomyopathy in rats, *J. Biochem Mol. Biol*. 2006; 39 (6), 759–765
33. Zhao Y, McLaughlin D, Robinson E, Harvey AP, Hookham MB. Nox2 NADPH oxidase promotes pathologic cardiac remodeling associated with Doxorubicin chemotherapy, *Cancer Res*. 2010; 70 (22), 9287–9297
34. Dos Santos DS, Dos Santos Goldenberg, RC. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: From Mechanisms to Development of Efficient Therapy. *Cardiotoxicity*. 2018; 10(5), 22- 41.
35. Jang YM, Kendaiah S, Drew B, Phillips T. Doxorubicin treatment in vivo activates caspase-12 mediated cardiac apoptosis in both male and female rats. *FEBS Lett*. 2004; 577 (3), 483–490.
36. Zhou S, Starkov A, Froberg MK, Leino RL, Wallace KB. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin, *Cancer Res*. 2001; 61 (2), 771–777.
37. Wenningmann N, Knapp M, Ande A, Vaidya T, Ait-Oudhia S. Insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: molecular mechanisms, preventive strategies, and early monitoring. *Mol. Pharmacol*. 2019; 96, 219–232.
38. Shi J, Abdelwahid E, Wei L. Apoptosis in anthracycline cardiomyopathy. *Curr. Pediatr. Rev*. 2011; 7,329–336.
39. Fogli S, Nieri P, Cristina Breschi, M. The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage. *FASEB J*. 2004; 18, 664–675.
40. Wallace KB. Adriamycin-induced interference with cardiac mitochondrial calcium homeostasis. *Cardiovasc. Toxicol*. 2007; 7, 101–107.
41. An J, Li P, Li J, Dietz R, Donath S. ARC is a critical cardiomyocyte survival switch in doxorubicin cardiotoxicity. *J. Mol. Med*. 2009; 87,401–410.
42. L'Ecuyer T. DNA damage is an early event in doxorubicin-induced cardiac myocyte death. *Am.J.Physiol*. 2006; 291, H1273–H1280.
43. Kalivendi SV. Doxorubicin activates nuclear factor of activated T- lymphocytes and Fas ligand transcription: role of mitochondrial reactive oxygen species and calcium. *Biochem. J*. 2005; 389, 527–539.
44. Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *N. Engl.J.Med*. 2014; 370,455–465.
45. Choi ME, Price DR, Ryter SW, Choi AMK. Necroptosis: A crucial pathogenic mediator of human disease. *JCI Insight*. 2019; 4, e128834-37.
46. Szobi A. Analysis of necroptotic proteins in failing human hearts. *J. Transl. Med*. 2017; 15, 86-93.
47. Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda, G, Chen ZJ. Activation of IKK by TNF α requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol. Cell*. 2006; 22 (2), 245–257.
48. Zhou W, Yuan J. Necroptosis in health and diseases. *Semin. Cell Dev. Biol*. 2014; 35, 14–23.
49. Oerlemans MI, Liu J, Arslan F, den Ouden K, van Middelaar BJ, Doevendans, PA. Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion in vivo. *Basic Res. Cardiol*. 2012; 107, 270-75.
50. Christofferson DE, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2010; 22, 263–268.
51. Zhu P, Hu S, Jin Q, Li D, Tian F, Toan S. Ripk3 promotes ER stress-induced necroptosis in cardiac IR injury: A mechanism involving calcium overload/XO/ROS/mPTP pathway. *Redox Biol*. 2010; 16(3), 157–168.

52. Qinli Z, Meiqing L, Xia J, Li X, Weili G, Xiuliang J. Necrostatin-1 inhibits the degeneration of neural cells induced by aluminum exposure. *Restor. Neurol. Neurosci.* 2013; 31(5), 543–555.
53. Weiss SA, & Pavlick AC. Dabrafenib for the treatment of melanoma. *Expert Opin. Orphan Drugs.* 2015. 3(9), 1075–1084.
54. Gibney GT, & Zager JS. Clinical development of dabrafenib in BRAF mutant melanoma and other malignancies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2013; 9(7), 893–899.
55. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: A multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet.* 2012; 380(9839), 358–365.
56. Tonnus W, & Linkermann A. The in vivo evidence for regulated necrosis. *Immunol. Rev.* 2017; 277(1), 128–149.
57. Martens S, Hofmans S, Declercq W, Augustyns K, & Vandenabeele P. Inhibitors Targeting RIPK1/RIPK3: Old and New Drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* 2020; 41(3), 209–224.
58. Pompella A, Maellaro E, Casini AF, Ferrali M, Ciccoli L, Comporti M. Measurement of Lipid Peroxidation In Vivo: A Comparison of Different Procedures. *Lipids.* 1987; 22(3), 206–211.
59. Damiani RM, Moura DJ, Viau CM, Caceres RA, Henriques JAP, Saffi J. Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone. *Arch. Toxicol.* 2016; 90, 2063–2076.
60. Li DL, Hill JA. Cardiomyocyte autophagy and cancer chemotherapy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2014; 71, 54–61.
61. Nicol M, Sadoune M, Polidano E, Launay JM, Samuel JL, Azibani F. Doxorubicin-induced and trastuzumab-induced cardiotoxicity in mice is not prevented by metoprolol. *ESC Heart Failure.* 2021; 8: 928–937.
62. Hole LD, Larsen, TH, Fossan, KO, Limé F, Schjøtt, J. Diazoxide protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in the rat. *BMC Pharmacol. Toxicol.* 2014; 15(1), 13–21.
63. Yu X, Ruan Y, Huang X, Dou L, Lan M, Cui J. Dexrazoxane ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting both apoptosis and necroptosis in cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020; 523(1), 140–146.
64. Qinli Z, Meiqing L, Xia J, Li X, Weili G, Xiuliang J. Necrostatin-1 inhibits the degeneration of neural cells induced by aluminum exposure. *Restor. Neurol. Neurosci.* 2013; 31(5), 543–555.
65. J. Lin, H. Li, M. Yang, J. Ren, Z. Huang, F. Han, J. Huang, J. Ma, D. Zhang, Z. Zhang, J. Wu, et al., A role of RIP3-mediated macrophage necrosis in atherosclerosis development. *Cell Rep.* 2013; 3, 200–210.
66. Hayward R, Hydock DS. Doxorubicin cardiotoxicity in the rat: An in vivo characterization. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2007; 46(4), 20–32.
67. Huang C, Zhang X, Ramil JM, Rikka S, Kim L, Lee Y, Gude NA, Thistlethwaite PA, Sussman MA, Gottlieb RA, Gustafsson AB. Juvenile exposure to anthracyclines impairs cardiac progenitor cell function and vascularization resulting in greater susceptibility to stress-induced myocardial injury in adult mice. *Circulation.* 2010; 121 (5), 675–83.
68. Shi Y, Huang C, Yi H, Cao Q, Zhao Y, Chen J. RIPK3 blockade attenuates kidney fibrosis in a folic acid model of renal injury. *FASEB Journal.* 2020; 34(8), 10286–10298.
69. Meijles DN, Cull JJ, Cooper STE, Markou T, Hardyman MA, Fuller SJ. The anti-cancer drug dabrafenib is not cardiotoxic and inhibits cardiac remodelling and fibrosis in a murine model of hypertension. *Clin. Sci.* 2021; 135(14), 1631–1647.
70. Liu S, Chen Y, Wang S, & Yu Q. Protective effect of dabrafenib on renal ischemia-reperfusion injury in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020; 522(2), 395–401.
71. Jun W, Benjanuwattra J, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Necroptosis in renal ischemia/reperfusion injury: A major mode of cell death? *Arch. Biochem. Biophys.* 2020; 689(May), 108433.
72. Zhu P, Hu S, Jin Q, Li D, Tian F, Toan S. Ripk3 promotes ER stress-induced necroptosis in cardiac IR injury: A mechanism involving calcium overload/XO/ROS/mPTP pathway. *Redox Biol.* 2018; 16(March), 157–168.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Meryem Şeyda	Soyadı	KAYA
Doğum Yeri		Doğum Tarihi	
Uyruğu	T.C.	Tel	
E-posta			

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Dicle Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Farmakoloji ABD	d.e.
Tezli Yüksek Lisans	Dicle Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Farmakoloji ABD (Farmakoloji yüksek lisansı tez dönemi)	2015
Tezli Yüksek Lisans	Trakya Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Farmakoloji ABD (Farmakoloji yüksek lisansı ders dönemi)	2013
Lisans	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü / Fen Fakültesi / Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2012
Lise	Hüseyin Özbuğday Anadolu Lisesi	2007

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Araştırma Görevlisi	Dicle Üniversitesi / Eczacılık Fakültesi / Farmakoloji ABD	9 (2013-)

10. EKLER

10.1. Etik Kurul Kararı

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ
PROF. DR. SABAHATTİN PAYZIN SAĞLIK BİLİMLERİ
ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(DÜHADEK)

ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	KARAR NO	TOPLANTI SAYISI
31/01/2019	4	1

KARAR
Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi / Farmakoloji ABD Prof. Dr. Meral ERDİNÇ'in yürütücüsü olduğu, Arç. Gör. Meryem Şeyda Kaya, Dr. Ecz. Zeynep Erdoğan Özen, Doç. Dr. Hasan Akkoç, Doç. Dr. İlker KELLE'nin yanı sıra araştırmacı olarak yer aldığı, "Reseptör Etkileşimli Kinas-3 İnhibitörü Dabrafenik'in Dokümanlı Kardiyo toksisitesi Sonuç Olarak Nekroptoz Karsinoma Karsinoma (Killerinin Araştırılması)" başlıklı ve 2018/21 prosedür numaralı çalışma.

Deney Hayvanının	Türü	Cinsiyeti	Sayısı	Yaşı
	Sıçan	Erkek	48	Yetişkin, 200-250 gr

İstenen gerekli düzenlemeler ve eksikliklerin yapılmış olduğu görüldü ve araştırmanın oy birliği ile desteklenmesine karar verilmiştir.

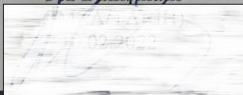
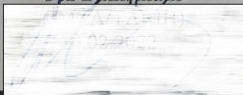
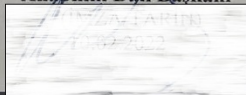
KATILIMCILARIN

UNVANI	AD SOYADI	GÖREVİ	İMZA
Prof. Dr.	Berna YÖKÜŞ	(BAŞKAN) RAPORTÖR	
Doç. Dr.	Selçuk TUNIK	(ÜYE)	
Doç. Dr.	Hasan AKKOÇ	(ÜYE)	
Doç. Dr.	Arç. Gör. MEŞE	(ÜYE)	
Doç. Dr.	Ramazan DR. MİRCEL	(ÜYE)	
Doç. Dr.	Mehmet Erdem AKBALIK	(ÜYE)	
Doç. Dr.	Mehmet Hüseyin ALKAN	(ÜYE)	
Yrd. Doç. Dr.	Feray ALTAN	(ÜYE)	
Yrd. Doç. Dr.	Ulup ALABALIK	(ÜYE)	
Yrd. Doç. Dr.	Erhan UYSAL	(ÜYE)	
Yrd. Doç. Dr.	ERİ VARHAN ORAL	(ÜYE)	
Yrd. Doç. Dr.	Alon KOCHAN	(ÜYE)	
Veteriner Hekim	Eysen ALAK	(ÜYE)	
Avukat	Abdullah VAYUZ	(ÜYE)	
Öğretim	M. Yavuz KAHRAMAN	(ÜYE)	

KYK-FRM/30700

Bölümleri: DÜŞTAM Binası, Zemin Kat, DÜŞTAM Laboratuvarları (Bölümün Fak. Karşısı) 21280 Sık. DÜŞTAM AKR
E-posta: ghaem@duce.edu.tr Sekreterye: 0 412 248 8431 (395) Vet.Hekim: 0 412 2488801-16 hat (4423)

10.2. Tez İntihal Raporu

		DİCLE ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ TEZ İNTİHAL FORMU	
ÖĞRENCİ BİLGİLERİ			
ADI VE SOYADI	Meryem Şeyda KAYA		
ÖĞRENCİ NO	15856302		
EĞİTİM - ÖĞRETİM YILI	2021 - 2022		
YARIYIL	☒ Güz ☐ Bahar		
ANABİLİM DALI	Tıbbi Farmakoloji AB.Dalı		
PROGRAM	☐ Yüksek Lisans ☒ Doktora		
TEZ KONUSU	Reseptör Etkileşimli Protein Kinaz-3 İnhibitörü Dabrafenib'in Doksorubisin Kardiyotoksitesi Sonucu Oluşan Nekroptoza Karşı Koruyucu Etkilerinin Araştırılması		
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ			
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası		
SAYFA SAYISI	70		
BENZERLİK ORANI	% 13		
RAPORLAMA TARİHİ	10.02.2022		
Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 70 sayfalık kısmına ilişkin, 27/01/2022 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %13'tür. Uygulanan filtrelemeler: ☒ Kabul/Onay sayfaları hariç ☒ Kaynakça hariç ☒ Alıntılar hariç/dâhil ☐ Diğer Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim. Gereğini saygılarımla arz ederim.			
Prof. Dr. Meral ERDİNÇ Tez Danışmanı		Öğrencinin Adı Soyadı Meryem Şeyda KAYA (İMZA/TARİH)	
			
Prof. Dr. Meral ERDİNÇ Anabilim Dalı Başkanı			
			

Formdaki bilgiler bilgisayar ortamında doldurulmalıdır. El yazısı ile doldurulan formlar geçersiz sayılmaktadır.

KGK-FRM-340/00

**-Reseptör Etkileşimli Protein Kinaz-3 İnhibitörü Dabrafenib'in
Doksozobisin Kardiyotoksitesisi Sonucu Oluşan Nekroptoza
Karşı Koruyucu Etkilerinin Araştırılması**

ORJİNAL RAPORU

% 13 BENZERLİK ENDEKSİ	% 12 İNTERNET KAYNAKLARI	% 3 YAYINLAR	% 1 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
----------------------------------	------------------------------------	------------------------	--------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisim.dicle.edu.tr İnternet Kaynağı	% 10
2	acikerisim.dicle.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
3	ziraat.dergi.comu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	tr.ovalengineering.com İnternet Kaynağı	<% 1
5	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
6	shefayekhatam.ir İnternet Kaynağı	<% 1
7	Stephan Engibarov, Rummyana Eneva, Ignat Abrashchev. "Neuraminidase (sialidase) from Aeromonas sp. strain 40/02 – isolation and partial purification", Annals of Microbiology, 2014 Yayın	<% 1

8	Yahya Altınkaynak, Birgül Kural, Buket A. Akcan, Akin Bodur et al. "Protective effects of L-theanine against doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats", Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018 Yayın	<% 1
9	Shu Song, Yue Ding, Guo-liang Dai, Yue Zhang, Meng-ting Xu, Jie-ru Shen, Ting-ting Chen, Yun Chen, Guo-liang Meng. "Sirtuin 3 deficiency exacerbates diabetic cardiomyopathy via necroptosis enhancement and NLRP3 activation", Acta Pharmacologica Sinica, 2020 Yayın	<% 1
10	acikerisim.medipol.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
11	app.trdizin.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
12	beslenmevediyetdergisi.org İnternet Kaynağı	<% 1
13	E. MAYHEW. "Free and Liposomal Doxorubicin Treatment of Intraperitoneal Colon 26 Tumor: Therapeutic and Pharmacologic Studies", Selective Cancer Therapeutics, 01/1990 Yayın	<% 1
14	bora.uib.no İnternet Kaynağı	<% 1
15	www.spandidos-publications.com İnternet Kaynağı	<% 1
16	www.teb.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
17	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<% 1
18	Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants, 2014. Yayın	<% 1
19	www.selcukmedj.org İnternet Kaynağı	<% 1

Alıntıları çıkart

Kapat

Eşleşmeleri çıkar

< 3 words

Bibliyografyayı Çıkart Üzerinde