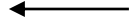


Adınızı soyadınızı giriniz

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



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



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(DOKTORA TEZİ)

**TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRÜ REGORAFENİB'İN
KARDİYOTOKSİSİTESİNİN MOLEKÜLER
TEKNİKLERLE İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

TUĞÇE BORAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. BÜKET ALPERTUNGA**

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli danışman hocam Prof. Dr. Buket Alpertunga'ya sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen İ.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı kıymetli hocalarım Prof. Dr. Gül Özhan'a, Prof. Dr. Sibel Özden'e, Doç. Dr. Eren Özçağlı'ya; tez çalışmalarım süresince yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Ayşe Tarbın Jannuzzi'ye ve Dr. Ayşenur Günaydın'a; değerli çalışma arkadaşlarım Dr. Öğr. Ü. Ezgi Öztaş'a, Arş. Gör. Dr. Mehtap Kara'ya, Kim. Fatih Sarı'ya ve anabilim dalı sekreterimiz Bengül Çalık'a,

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

Elektron mikroskopisi çalışmaları için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne ve sonuçların yorumlanmasında yardımlarını esirgemeyen hocam Prof. Dr. İlknur Dağ'a,

Sonsuz sevgileriyle her daim yanımda olan, evlatları olmaktan mutluluk duyduğum canım annem Ayla Boran'a, canım babam Yalçın Boran'a; canım kardeşim Mahmutcan Boran'a, canım ablam Günce Yozgat'a ve değerli eşi Onurcan Yozgat'a

Her zaman yanımda olan değerli dostlarım Gamze Çamlık'a, Zehra Kızıllıkanat'a ve Gönül Arslan'a; kıymetli arkadaşlarım Ecem Fatma Karaman'a, Mine Çağlayan'a, Merve Arıcı'ya ve Mahmoud Abudayyak'a çok teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmam sırasında TÜBİTAK-BİDEB "2211-C/Öncelikli Alanlara Yönelik Doktora Burs Programı" 2017/1 kapsamında bursiyer olarak desteklenmiş olduğumdan dolayı TÜBİTAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-25176

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xii
ÖZET	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Protein Kinazlar	3
2.2. Tirozin Kinaz İnhibitörleri	8
2.3. Regorafenib.....	10
2.4. Tirozin Kinaz İnhibitörleri ve Kardiyotoksisite.....	12
2.5. Regorafenib ve Kardiyotoksisite.....	16
2.6. Mitokondri ve Kalp.....	17
2.6.1. Mitokondriyal Füzyon.....	18
2.6.2. Mitokondriyal Fisyon.....	18
2.6.3. Mitokondriyal Oksidatif Fosforilasyon.....	19
2.7. Mitokondriyal DNA (mtDNA)	21
2.8. Apoptoz.....	22
2.9. Isı Şok Proteini 70 (HSP70) ve Kardiyotoksisite	23
2.10. Glukoz ile Regüle Edilen Protein 94 (GRP94) ve Kardiyotoksisite.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Gereç	26
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kitler.....	28
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Aletler.....	28
3.2. Yöntem.....	29

3.2.1. H9c2 Kardiyomiyoblastik Hücre Hattının Stoklanması ve Stoklanan Hücrelerin Açılması	29
3.2.2. Regorafenib Stok Çözeltilerinin Hazırlanması	30
3.2.2.1. 100 mM Regorafenib Stok Çözeltisinin Hazırlanması	30
3.2.2.2. 10 mM Regorafenib Stok Çözeltisinin Hazırlanması	30
3.2.3. Hücrelere İlaç Maruziyetlerinin Uygulanması.....	30
3.2.4. Tripan Mavisi Sitotoksosite Testi	30
3.2.5. Laktat Dehidrojenaz (LDH) Sitotoksosite Testi	31
3.2.6. MTT Hücre Proliferasyonu Testi	32
3.2.7. Hücre İçi ATP Miktarı	33
3.2.8. Mitokondri Membran Potansiyeli	35
3.2.9. RNA Düzeyinde Gen İfadesi Analizi.....	35
3.2.9.1. Total RNA İzolasyonu	35
3.2.9.2. Hücre Lizatlarından Elde Edilen RNA'ların Miktarlarının ve Safılıklarının Ölçülmesi	36
3.2.9.3. cDNA Sentezi.....	37
3.2.9.4. Gen Ekspresyonunun Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Belirlenmesi	38
3.2.9.5. Gerçek Zamanlı PZR.....	38
3.2.10. Protein Ekspresyon Analizi.....	40
3.2.10.1. Protein İzolasyonu.....	40
3.2.10.2. Hücre Lizatlarından İzole Edilen Proteinlerin Miktarının Ölçülmesi.....	41
3.2.10.3. Belirlenen Proteinleri Western Blot Yöntemi ile Analizi	41
3.2.11. Mitokondriyal DNA İçeriğinin Tayini	44
3.2.11.1. DNA İzolasyonu.....	44
3.2.11.2. Hücre Lizatlarından İzole Edilen DNA'ların Safılık ve Miktar Tayini	46
3.2.11.3. Gerçek Zamanlı PZR Yöntemiyle Mitokondriyal DNA İçeriğinin Tayini	46
3.2.12. Mitokondrilerin Elektron Mikroskopunda Görüntülenmesi	46
3.2.13. İstatistiksel Analiz.....	47
4. BULGULAR.....	48
4.1. Sitotoksosite Test Sonuçları.....	48
4.1.1. Tripan Mavisi Sitotoksosite Testi	48
4.1.2. LDH Sitotoksosite Testi.....	48

4.2. MTT Hücre Proliferasyonu Testi	49
4.3. Hücre İçi ATP Miktarı	50
4.4. Mitokondri Membran Potansiyeli	51
4.5. Gen Ekspresyonu Sonuçları	52
4.6. Protein Ekspresyon Sonuçları	54
4.7. mtDNA İçeriği	64
4.8. Elektron Mikroskobu Sonuçları	65
5. TARTIŞMA	67
KAYNAKLAR	80
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	100
ÖZGEÇMİŞ	101

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: FDA tarafından kanser tedavisinde kullanımı onaylanan tirozin kinaz inhibitörü ilaçlar ve kardiyovasküler yan etkileri (Lamore ve ark., 2019).	15
Tablo 3-1: Gen Ekspresyonu çalışmalarında kullanılan primer çiftleri	39
Tablo 3-2: Gerçek zamanlı PZR için uygulanan protokol	39
Tablo 3-3: Mitokondriyal DNA içeriğinin saptanmasında kullanılan primer dizileri	46



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Tirozin kinaz enzimlerinin fonksiyonu	3
Şekil 2-2: Protein tirozin kinazların sınıflandırılması (Madhusudan ve Ganesan, 2004). 4	
Şekil 2-3: Reseptör tirozin kinazların yapısı (Hedger ve ark., 2015)	5
Şekil 2-4: Reseptör tirozin kinazları aktivasyonu (Cooper ve Hausmann, 2016)	6
Şekil 2-5: Regorafenib'in etki mekanizması (Goel, 2018)	11
Şekil 2-6: Mitokondrilerin yapısı.....	17
Şekil 2-7: Mitokondri dinamikleri a) füzyon ve b) fisyon (Chiong ve ark., 2014)	19
Şekil 2-8: Mitokondriyal elektron transport zinciri (Mastroeni ve ark., 2017)	20
Şekil 2-9: mtDNA içeriğinin mitokondriyal hastalıklarda önemi (Dominic ve ark., 2014)	22
Şekil 3-1: Laktat dehidrojenaz (LDH) enzim aktivitesinin ölçülmesi	31
Şekil 3-2: Luminesans oluşumu.....	33
Şekil 4-1: 48 ve 72 saat, 0-20 μ M Regorafenib maruziyeti sonucunda hücre canlılığında meydana gelen değişimler	48
Şekil 4-2: 48 ve 72 saat, 0-20 μ M Regorafenib maruziyeti sonucunda hücre canlılığında meydana gelen değişimler	49
Şekil 4-3: 48 ve 72 saat 0-20 μ M Regorafenib maruziyeti sonucunda hücre proliferasyonunda meydana gelen değişimler	49
Şekil 4-4: Standart ATP ölçü eğrisi	50
Şekil 4-5: 48 ve 72 saat 0-20 μ M Regorafenib maruziyeti sonucunda hücre içi ATP miktarında meydana gelen değişimler	51
Şekil 4-6: 48 ve 72 saat, 0-20 μ M Regorafenib maruziyeti sonucunda mitokondri membrane potansiyelinde meydana gelen değişimler	52
Şekil 4-7: 48 ve 72 saat, 0-20 μ M Regorafenib maruziyeti sonucunda mitokondri dinamiğinde rol alan genlerde meydana gelen değişimler.....	53
Şekil 4-8: 48 ve 72 saat, 0-20 μ M Regorafenib maruziyeti sonucunda SOD2 gen ekspresyonunda meydana gelen değişimler.....	54
Şekil 4-9: Protein standart ölçü eğrisi.....	54
Şekil 4-10: 48 saat, 0-20 μ M Regorafenib maruziyeti sonucunda mitokondriyal komplekslerin protein ekspresyonunda meydana gelen değişimler	56

Şekil 4-11: 72 saat, 0-20 μ M Regorafenib maruziyeti sonucunda mitokondriyal komplekslerin protein ekspresyonunda meydana gelen değişimler	58
Şekil 4-12: 0-20 μ M Regorafenib a) 48 saatlik ve b)72 saatlik maruziyeti sonrasında UCP2 protein ekspresyonunda meydana gelen değişimler.....	59
Şekil 4-13: 0-20 μ M Regorafenib a) 48 saatlik ve b)72 saatlik maruziyeti sonrasında LONP1 protein ekspresyonunda meydana gelen değişimler	60
Şekil 4-14: 0-20 μ M Regorafenib a) 48 saatlik ve b)72 saatlik maruziyeti sonrasında HSP70 protein ekspresyonunda meydana gelen değişimler	61
Şekil 4-15: Şekil 4-15: 0-20 μ M Regorafenib a) 48 saatlik ve b)72 saatlik maruziyeti sonrasında GRP94 protein ekspresyonunda meydana gelen değişimler	62
Şekil 4-16: 0-20 μ M Regorafenib a) 48 saatlik ve b)72 saatlik maruziyeti sonrasında Sitokrom c protein ekspresyonunda meydana gelen değişimler	63
Şekil 4-17: 0-20 μ M Regorafenib a) 48 saatlik ve b)72 saatlik maruziyeti sonrasında prokaspaz 3 protein ekspresyonunda meydana gelen değişimler	64
Şekil 4-18: 48 ve 72 saat, 0-20 μ M Regorafenib maruziyeti sonucunda mtDNA içeriğinde meydana gelen değişimler	65
Şekil 4-19: 72 saat, Kontrol, 10 ve 20 μ M Regorafenib maruziyeti sonucunda mitokondrilerde meydana gelen değişimler.....	66
Şekil 5-1: H9c2 hücrelerinde 48 ve 72 saatlik maruziyet sonucu meydana gelen değişiklikler	79

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ADP:	Adenozin difosfat
APS:	Amonyum persülfat
ATP:	Adenozin trifosfat
BCA:	Bikinkoninik Asit
DMSO:	dimetil sulfoksit
DNA:	Deoksiribo nükleik asit
DRP1:	dynamine ilişkili protein 1
EGFR:	epidermal büyüme faktörü
ETZ:	Elektron transport zinciri
F:	Forward (İleri)
FADH ₂ :	Flavin adenin dinükleotit
FDA:	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi, (U.S. Food and Drug Administration)
FGFR:	fibroblast büyüme faktörü reseptörü
FIS1:	fisyon protein 1
GRP94:	glukoz ile regüle edilen protein 94
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit
HSP70:	Isı şok protein 70
JC-1:	tetraetilbenzimidazolkarbosiyanid iyodür
kDa:	Kilo Dalton
LDH:	Laktat dehidrojenaz
LONP1:	Lon proteaz 1
MFN1/2:	Mitofusin 1/2
MMP:	Mitokondri membrane potansiyeli
mtDNA:	Mitokondriyal DNA
MTT:	MTT: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NADH:	Nikotinamid adenin dinükleotit
NO:	nitrik oksit
OPA1:	optik atrofi 1
OXPHOS:	Oksidatif fosforilasyon
PDGFR:	platelet kaynaklı büyüme faktörü beta reseptörü
PZR:	polimeraz zincir reaksiyonu
R:	Reverse (Geri)

RNA: ribo nükleik asit

ROS: reaktif oksijen türleri

rRNA: ribosomal RNA

SD: Standart sapma

SDS-PAGE: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi

SOD2: süperoksid dismutaz 2

TEMED: N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine

tRNA: taşıyıcı RNA

UCP2: Eşleşme bozucu protein 2 (Uncoupling protein 2)

VEGF: vaskular endoteliyal büyüme faktörü

VEGFR: vaskular endoteliyal büyüme faktörü reseptörü

ÖZET

Boran, T. (2021). Tirozin Kinaz İnhibitörü Regorafenib'in Kardiyotoksitesinin Moleküler Tekniklerle İn Vitro Değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Regorafenib, kanser oluşumundan sorumlu pek çok kinazı inhibe eden tirozin kinaz inhibitörü bir ilaçtır. Kolorektal kanser, gastrointestinal stromal tümör ve hepatoselüler karsinom tedavisinde kullanılmaktadır. Regorafenib'in hayatı tehdit edici boyutlara ulaşabilen hipertansiyon ve iskemiye neden olduğu raporlanmıştır ve bu etkilerin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

Çalışmamızda H9c2 kardiyomyoblastik hücre hattı kullanılarak Regorafenib ile indüklenen kardiyotoksik etkilerin moleküler mekanizmaların aydınlatılması amaçlanmıştır. Kalp hücreleri fonksiyonlarını gerçekleştirebilmek için yüksek miktarda ATP'ye ihtiyaç duymaktadırlar. Bu nedenle, çalışmada Regorafenib'in kardiyomyoblast hücrelerinde toksik etkileri 48 ve 72 saatlik 5, 10 ve 20 μ M Regorafenib maruziyeti sonrasında, mitokondriyal ve hücresel stres ile ilişkili yollar üzerine odaklanılarak araştırılmıştır.

Hücre içi ATP miktarında her iki maruziyet süresinde tüm deney gruplarında azalma, membran potansiyelinde ise 72 saatlik 20 μ M maruziyet grubunda bozulma saptanmıştır. Mitokondriyal dinamik genlerinin ekspresyonunda her iki maruziyet süresinde yüksek dozlarda artma görülmüştür. Mitokondriyal kompleks I ve V'in ekspresyonu 72 saatlik maruziyeti takiben 20 μ M dozda azalmıştır. Mitokondriyal proteinlerden sitokrom c, UCP2 ve LONP1 ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Stres proteinlerinden HSP70 protein ekspresyonunda 72 saatlik 10 ve 20 μ M'da artma saptanırken, GRP94 seviyesi belirgin bir değişiklik göstermemiştir. 72 saatlik maruziyeti takiben mtDNA içeriğinde azalma tespit edilmiştir. Ayrıca her iki maruziyet süresinde 20 μ M'da prokaspaz 3 seviyesi azalmıştır.

Bu çalışma, Regorafenib tarafından indüklenen kardiyotoksitenin mitokondriyal hasar ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Ancak bu teoremin *in vivo* ve klinik çalışmalarla desteklenmeye ihtiyacı vardır.

Anahtar Kelimeler: Antikanser ilaçlar, Tirozin kinaz inhibitörleri, Regorafenib, mitokondriyal toksisite, kardiyotoksisite,

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-25176

ABSTRACT

Boran, T. (2021). In Vitro Evaluation of Cardiotoxicity of Tyrosine Kinase Inhibitor Regorafenib with Molecular Techniques. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Toxicology. Doctoral Thesis. İstanbul.

Regorafenib is a tyrosine kinase inhibitor drug that inhibits many kinases responsible for cancer. It is used in the treatment of colorectal cancer, gastrointestinal stromal tumor and hepatocellular carcinoma. Regorafenib has been reported to cause life-threatening hypertension and ischemia, and its molecular mechanism is not fully known.

In the study, it was aimed to elucidate the molecular mechanisms of regorafenib-induced cardiotoxicity using H9c2 cardiomyoblastic cell line. Cardiac cells highly need ATP for their functioning. Therefore, regorafenib-induced toxic effects on cardiomyoblasts were investigated by focusing pathways that are related to mitochondrial and cellular stress after 48- and 72-hours exposure of 5, 10 and 20 μ M regorafenib.

A decrease in intracellular ATP level in all groups in both exposure times and disruption of membrane potential at 20 μ M after 72-hours exposure were detected. An increase in expressions of mitochondrial dynamic genes at high doses in both end-points was seen. Mitochondrial complex I and V expressions reduced at 20 μ M following 72-hours exposure. No significant change was detected in the expressions of mitochondrial proteins cytochrome c, UCP2 and LONP1 levels. While an increase in HSP70 protein expression was detected at 10 and 20 μ M after 72-hours exposure, GRP94 level did not show significant change. A decrease in mtDNA content was detected following 72-hours exposure. In addition, procaspase 3 protein level decreased at 20 μ M in both exposures.

This study shows that the regorafenib-induced cardiotoxicity can be linked with mitochondrial damage. However, this theory needs to be supported by *in vivo* and clinical studies.

Key Words: Anticancer drugs, Tyrosine kinase inhibitors, Regorafenib, Mitochondrial toxicity, cardiotoxicity,

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TDK-2017-25176

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tirozin kinazlar hücre fonksiyonunun sürdürülmesinde oldukça önemli rollere sahip enzimlerdir. ATP’de bulunan terminal fosfatı proteinlerin genellikle tirozin, serin/treonin residülerine aktarılmasını sağlamaktadır (Zhang ve ark. 2009). Tirozin kinazlar reseptör ve non-reseptör olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Madhusudan ve Ganesan 2004). Bunlar sinyal iletim kaskadının başlamasında ve ilerlemesinde hayati derecede önemlidir. Mutasyon, kromozomların yapısal olarak yeniden düzenlenmesi, otokrin uyarılar gibi durumlar tirozin kinaz enzimlerinin sürekli aktivasyonuna neden olmaktadır. Tirozin kinazların sürekli aktivasyonu kanser gelişimine zemin hazırlamaktadır (Kolibaba ve Druker, 1997; Du ve Lovly, 2018).

Kanserde her kanserin spesifik genetiğine uygun olarak hedeflendirilmiş ilaçların kullanımı artmaktadır. Yeni nesil antikanser ilaçlar olarak da isimlendirilen tirozin kinaz inhibitörlerinin kanser tedavisinde kullanılmaya başlanması ile kanser tedavisinde büyük başarı sağlanmıştır (Paul ve Mukopadhyay 2004; Chen ve ark., 2008; Chen ve Force 2010). Başlangıçta bu ilaçların yan etkilerinin konvansiyonel antikanser tedavilerine oranla daha az olduğu düşünülmüş, ancak giderek artan kullanımlarında çok sayıda advers etkileri görülmüştür. Bu advers etkiler hayatı tehdit edebilecek boyutlara ulaşabildiği gibi tedavinin sonlandırılmasına veya yarıda kesilmesine yol açabilmektedir. Kardiyotoksisite advers etkilerin en önemlilerindendir. Ancak tirozin kinaz inhibitörlerinin neden olduğu kardiyotoksik etkilerin mekanizması ile ilişkili çeşitli yollar öne sürülmesine rağmen moleküler mekanizması net olarak bilinmemektedir (Cheng ve Force, 2010; Mellor ve ark., 2011; Shah ve ark., 2013b).

Regorafenib, kolorektal kanser, gastrointestinal stromal tümörler ve hepatoselüler kanserlerde kullanımı Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA) tarafından onaylanan, kanser oluşumunda önemli rollere sahip VEGFR, PDGFR, FGFR gibi pek çok kinazı inhibe eden tirozin kinaz inhibitörü bir ilaçtır (Wilhelm ve ark., 2011). Ayrıca konvansiyonel kemoterapide ilaçlara karşı direnç oluşumuna neden olan ilaç taşıyıcı proteinleri inhibe ettiği bu nedenle de konvansiyonel kemoterapi ile kombinasyon halinde kullanılabilceği de gündeme gelmiştir (Wang ve ark., 2017; Chen ve ark., 2019). Regorafenib’in hayatı tehdit edici boyutlara ulaşabilen

hipertansiyon, kardiyak iskemi ve enfarktüse de neden olduğu raporlanmıştır (FDA, 2012b; FDA, 2013; FDA, 2017a).

Regorafenib'in kardiyotoksitesinin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir, eldeki veriler klinikte ilacın kullanılmasına bağlı oluşan advers etkilerden elde edilen bilgilerle sınırlıdır. İlacın kardiyotoksitesinin moleküler mekanizmasının belirlenmesi ile Regorafenib'in neden olduğu kardiyotoksiteyi önlemek amacıyla yeni yaklaşımların denenerek ilacın kardiyotoksite profilinin azaltılıp fayda görüldüğü halde tedavinin sonlandırılmasının önüne geçilebileceği düşünülmektedir. Regorafenib'in kardiyotoksitesinin moleküler yollarının aydınlatılmasına yönelik *in vitro* bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızın literatüre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

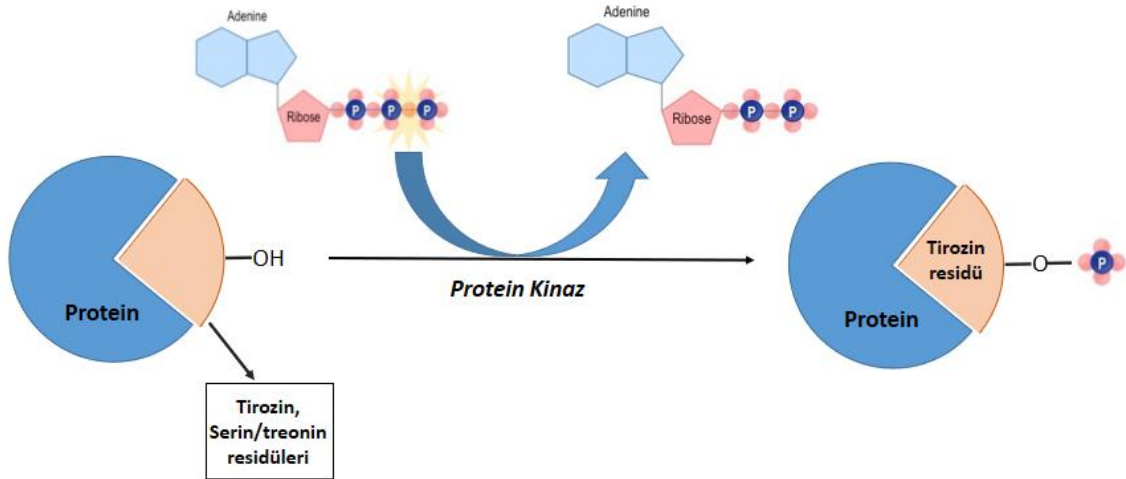
Mitokondriler hücrelerde enerji üretiminden sorumlu organellerdir. Kardiyomiyositler fonksiyonlarını gerçekleştirebilmek için ATP'ye ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle mitokondrilerde meydana gelebilecek hasarlar hücrede ölümcül sonuçlara yol açabilmektedir. Kalpte mitokondri hasarı sonucu fonksiyonun bozulması bazı kardiyovasküler hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir (Marín-García ve Goldenthal, 2002). Bu nedenle çalışmamızda özellikle mitokondriyal yollar üzerinde durulacak ayrıca stres proteinleri ve apoptoz araştırılacaktır.

Tez çalışmasında amaç; tirozin kinaz inhibitörü olan Regorafenib'in neden olduğu kardiyotoksitenin altında yatan mekanizmaları kardiyomiyoblastik hücre modeli kullanarak aydınlatmaya çalışmaktır. Bu amaçla; Regorafenib maruziyeti sonrası H9c2 hücrelerinde hücre canlılığındaki ve hücre proliferasyonundaki etkiler; mitokondriyal membran potansiyeli, mitokondri dinamiğinde rol oynayan genlerin ekspresyonları, bazı mitokondriyal proteinlerin ekspresyonları, hücre içi ATP miktarında meydana gelecek değişiklikler, stres proteinlerden ısı şok proteini (HSP) 70 ve glukoz ile regüle edilen protein 94 (GRP94) ekspresyonları; apoptoz ile ilişkili olarak da prokaspaz 3 seviyesi incelenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Protein Kinazlar

Protein kinazlar, hücre fonksiyonu için önemli enzimlerdir. Bu enzimler apoptozda, hücre siklusu ilerlemesinde, sitoskeletonun yeniden düzenlenmesinde, farklılaşmada, gelişmede, immün cevap oluşmasında, sinir sistemi fonksiyonunda rol alırlar ve transkripsiyonu düzenleyen sinyal transdüksiyonuna katılırlar. Kinazların disregülasyonu kanser, diyabet, otoimmün hastalıklar, kardiyovasküler, inflamatuvar ve sinir sistemi hastalıklarına neden olmaktadır. Protein kinazların pek çok hastalığın etiyolojisinde yer alması bu enzimleri önemli ilaç hedefleri haline getirmektedir (Roskoski 2016). Bu enzimler, Şekil 2-1’de gösterildiği gibi ATP’de bulunan terminal fosfatın genellikle tirozin veya serin/treonin aminoasitinin hidroksil grubuna transferini katalizlerler (Zhang vd., 2009).

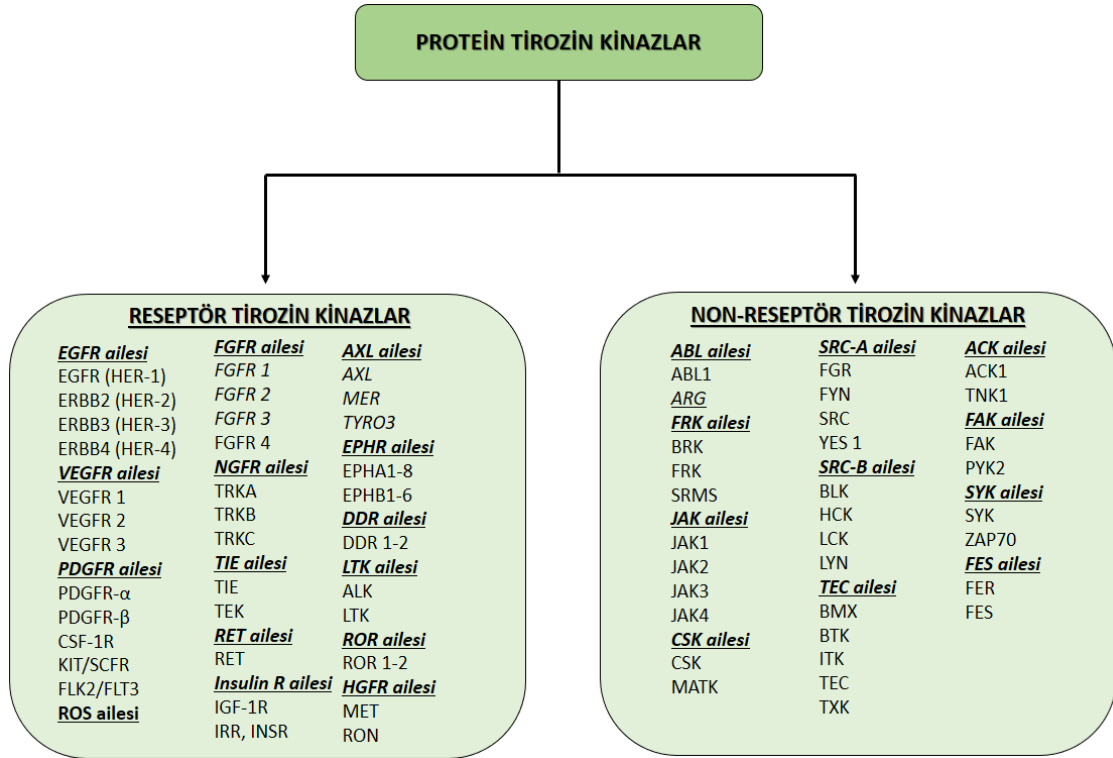


Şekil 2-1: Tirozin kinaz enzimlerinin fonksiyonu

Tirozin residülerinin fosforilasyonu enzimatik aktiviteyi modüle eder, sinyal iletiminde aşağıda yer alan sinyalizasyon proteinleri için bağlanma bölgesi oluşturur (Hubbard ve Till, 2000). Protein fosforilasyonu, enzimlik aktivitenin artmasına veya azalmasına, transkripsiyon, translasyon gibi diğer biyolojik aktivitelerin değişmesine neden olabilmektedir. Bir proteinde bulunan bazı fosforilasyon bölgeleri stimülatör bazıları inhibitör özellik gösterebilir (Roskoski 2015).

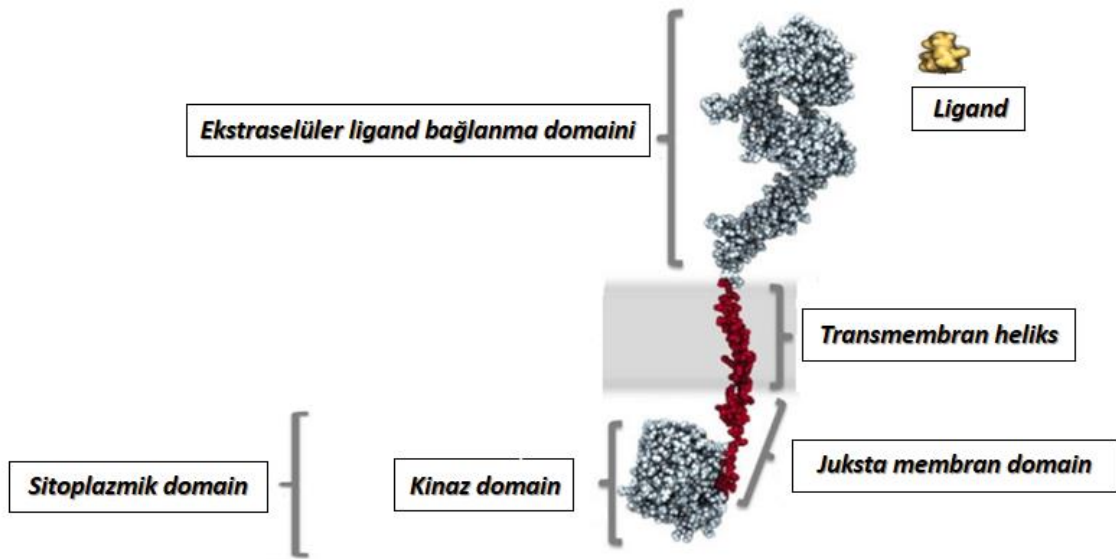
Tirozin kinaz enzimleri, transmembran reseptör tirozin kinazlar ve sitoplazmik non-reseptör tirozin kinazlar olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır (Şekil 2-2) (Robinson

ve ark., 2000). İnsulin reseptör ailesi dışında, tüm reseptör tirozin kinazlar, ekstraselüler ligand bağlanma bölgesi, ligand bağlanma bölgesi ve sitoplazmik domaini birbirine bağlayan transmembran hidrofobik heliks ve sitoplazmik domainden oluşmaktadır (Şekil 2-3). Sitoplazmik domainde korunmuş tirozin kinaz çekirdeği ve diğer düzenleyici diziler bulunmaktadır (Schlessinger, 2000; Madhusudan ve Ganesan 2004).



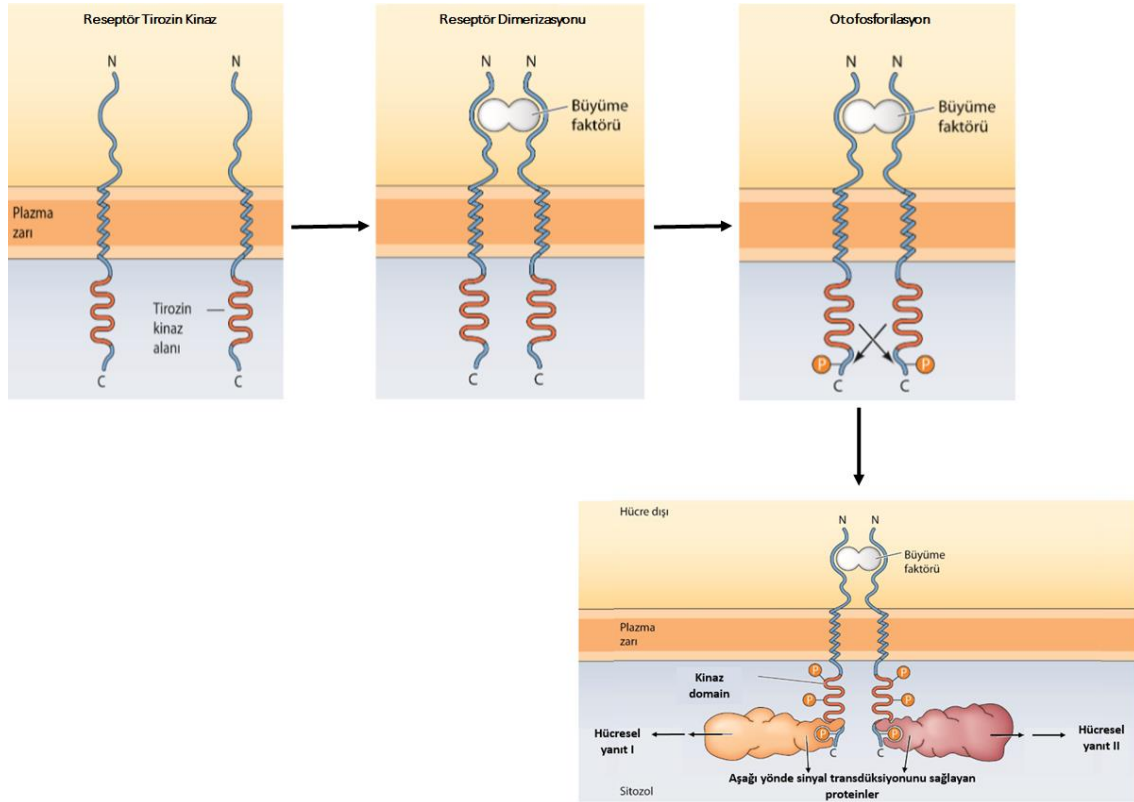
Şekil 2-2: Protein tirozin kinazların sınıflandırılması (Madhusudan ve Ganesan, 2004)

EGFR: Endotelial büyüme faktörü reseptörü, VEGFR: Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü, PDGFR: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü, FGFR: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü, NGFR: Sinir büyüme faktörü reseptörü, AXL: AXL reseptör tirozin kinaz, EPHR: Efrin reseptör tirozin kinaz, TIE:, RET: Transfeksiyon sırasında yeniden düzenleyici, DDR: Diskoidin etki alanı içeren reseptör, LTK: Lökosit reseptör tirozin kinaz, ROR: Yetim reseptör benzeri reseptör tirozin kinaz, HGFR: Hepatosit büyüme faktörü reseptörü, ABL:, FRK: Fyn-ilişkili kinaz, TEC: Tirozin protein kinaz TEC, SRC: Proto-onkogen tirozin kinaz SRC, FES: Felin sarkoma, FAK: fokal adezyon kinaz, ACK: Asetat kinaz, SYK: Dalak tirozin kinazı JAK: Janus kinaz,



Şekil 2-3: Reseptör tirozin kinazların yapısı (Hedger ve ark., 2015)

Reseptör tirozin kinazlar ile ligand etkileşimi reseptörlerin dimerizasyonuna/oligomerizasyonuna neden olmakta, bu da hücre içindeki katalitik domainlerin otofosforilasyonunu sağlamaktadır. Otofosforillenmiş tirozin residüleri hücresel yanıtların modüle edilmesini sağlayan sinyal iletim kaskadındaki çeşitli proteinlerin davetinde ve tanınmasında görev almaktadır. Bu durum, proteinlerin aktif konformasyonuna ve daha sonra da hücre içindeki sinyal transduksiyon kaskadının aktivasyonuna neden olmaktadır (Şekil 2-4) (Heldin, 1995; Madhusudan ve Ganesan, 2004; Paul ve Mukopadhyay 2004). Daha önceden normal şartlarda tüm reseptör tirozin kinazların hücre membranında monomer olarak bulunduğu ve reseptör dimerizasyonu/oligomerizasyonu için reseptöre ligand bağlanması gerektiği düşünülmüştür, ancak günümüzde aktive edici ligand yokluğunda da reseptör tirozin kinazların oligomer oluşturdıkları ve sinyalizasyon kaskadına etki ettiği bilinmektedir. Örneğin epidermal büyüme faktörünün (epidermal growth factor-EGF) oligomer halindeki reseptörüne bağlanarak sinyal kaskadını aktive ettiği gösterilmiştir (Lemmon ve Schlessinger, 2010). Sonuç olarak, gelen uyarının tirozin residülerinin ve sinyalizasyon için gerekli aşağı akış proteinlerinin otofosforilasyonu ile sitoplazmaya aktarımı sağlanmış olur.



Şekil 2-4: Reseptör tirozin kinazları aktivasyonu (Cooper ve Hausmann, 2016)

Reseptöre bağlanacak liganda göre dimerizasyon/oligomerizasyon oluşma stratejisi değişiklik göstermektedir. Bir ligand iki reseptöre bağlanabilir ve 1:2 ligand reseptör kompleksi oluşturabilir. Buna örnek olarak büyüme hormonu ve büyüme hormon reseptörü etkileşimi verilebilir. Diğer bir durum da; iki ligand eş zamanlı olarak 2 reseptöre bağlanabilir ve 2:2 ligand reseptör kompleksi oluşturur. Vasküler-endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) vasküler-endotelyal büyüme faktörü reseptörüne (VEGFR) bağlanması örnek olarak verilebilir. Ayrıca bazı ligandlar kompleks oluşumunu sağlayacak kadar stabil değildir ve stabilize edilmesi için yardımcı moleküllere ihtiyaç duyarlar. Fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast Growth Factor-FGF) Fibroblast büyüme faktörü reseptörünü (Fibroblast Growth Factor Receptor-FGFR) aktive edemez ve heparin sülfat ile stabilize edilir (Paul ve Mukhopadhyay, 2004).

Non-reseptör tirozin kinazlar çoğunlukla sitozolde veya hücre membranının sitoplazmaya bakan kısmında bulunan proteinlerdir. Hücre içinde çoğunlukla intrinsik tirozin kinaz aktivitesine sahip olmayan reseptörlerin alt ünitesi gibi davranarak reseptör aracılı transmembran sinyalizasyonunda görev yapar, hücre dışı sinyallerinin hücre büyümesi, aktivasyonu, farklılaşması sinyalizasyon yollarındaki diğer proteinlere

aktarımını sağlarlar. Kinaz aktivitesine sahip bölge dışında fosfotirozin kalıntısı içeren özgün kısımlara bağlanabilen farklı bölgeler de içermektedir (Neet ve Hunter, 1996; Kolibaba ve Druker, 1997; Madhusudan ve Ganesan, 2004; Gocek ve ark., 2014). Bu bağlanma bölgeleri, tirozin kinazlar tarafından aktive edilen sinyalizasyon yollarındaki protein-protein etkileşiminde rol oynayan bölgelerdir ve sinyalizasyonun gerçekleşmesinde büyük öneme sahiptir (Schlessinger, 1994). Non-reseptör tirozin kinazların aktivasyonu, ilişkili olduğu reseptöre ligand bağlanması ile olabileceği gibi hücresel adhezyon, kalsiyumun hücre içine girmesi gibi bazı hücresel olaylarda da olabilmektedir (Taniguchi, 1995).

Hem reseptör hem de non-reseptör tirozin kinazların aktivasyonu, otofosforilasyon, sitoplazmik substratların fosforilasyonu ve spesifik olarak fosforile tirozin içeren bölgelere bağlanan proteinlerin çağrılmasından oluşan bir fosforilasyon kaskadı başlatmaktadır. Bu durum diğer proteinlerin aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Aynı zamanda, regüle edici fonksiyonları bulunan ikincil mesajcı moleküllerin üretimi de sağlanmaktadır. Oluşan sinyaller nükleusa iletilebilir ve çeşitli genlerin ekspresyonunun indüklenmesine sebep olabilir. Benzer şekilde tirozin kinazların deaktivasyonu ile inhibe edici sinyaller de oluşabilmektedir (Kolibaba ve Druker, 1997).

Bilindiği üzere kanser oluşumu, hücre proliferasyonu ve hayatta kalımını etkileyen genlerdeki hasarın birikiminden kaynaklanan çok basamaklı bir süreçtir (Bertram, 2000) ve tirozin kinazlar ile kanser arasında ilişki olduğu saptanmıştır. Tirozin kinazlar neoplastik oluşumun başlamasının ve bu neoplastik oluşumun ilerlemesinin pek çok basamağında etkili olabilmektedirler. Ayrıca doğrudan neoplastik bir oluşum başlatmadan kanser hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde proliferasyonu, tümör progresyonu ve metastazda da etkili olabileceği bilinmektedir (Kolibaba ve Druker, 1997). Fizyolojik durumda tirozin kinazların fosforilasyonu, tirozin kinazların antagonize edici etkileri ve tirozin fosfataz enzimleri ile kontrol altındadır (Hunter, 1995). Çeşitli mekanizmalar, tirozin kinazların sürekli aktivasyonuna neden olabilmekte ve neoplastik oluşuma katkı yapabilmektedir (Paul ve Mukhopadhyay, 2004). Tirozin kinazlar, kansere dönüşümde rol oynayan onkojen proteinlerin ana kısmını temsil etmektedirler. Onkojenik reseptör tirozin kinazların ligand bağlanmasından bağımsız olarak sürekli aktivasyonu, mutasyon, genomik amplifikasyon, kromozomlardaki

yapısal yeniden düzenlenme ve/veya otokrin aktivasyon sonucu oluşmaktadır. Ekstraselüler, transmembran ve sitoplazmik domainde meydana gelen çeşitli mutasyon veya delesyonlar, ATP bağlanma bölgesinde ve katalitik kinaz bölgesinde meydana gelen değişiklikler tirozin kinazların sürekli aktivasyonuna neden olur. Ayrıca genetik amplifikasyon sonucu reseptör tirozin kinazların aşırı eksprese edilmesi ve bazı kanser türleri arasında ilişki olduğu saptanmıştır. Buna örnek olarak; tiroid, glioblastoma ve akciğer kanserlerinde EGFR'nin aşırı eksprese edilmesi gösterilebilir. Kromozomların yapısal yeniden düzenlenmesi, yeni tirozin kinaz füzyon onko-proteinlerinin oluşmasına neden olmaktadır. Bu duruma en bilinen örnek kronik myeloid lösemi hastalarında karakteristik olarak bulunan BCR-ABL füzyon proteini. BCR-ABL füzyon proteini 9 numaralı kromozomda bulunan ABL1 tirozin kinazını kodlayan gen ile 22 numaralı kromozomda bulunan BCR geninin birleşmesi sonucu oluşur. Benzer şekilde non-reseptör tirozin kinazlarda oluşan mutasyonlar da bu tirozin kinazların sürekli aktivasyonuna neden olabilmektedir (Kolibaba ve Druker, 1997; Du ve Lovly, 2018). Otokrin ve parakrin uyarılar, özellikle reseptör tirozin kinazların sürekli aktivasyonuna neden olan diğer bir mekanizmadır. Bu durum ligand varlığında reseptör tirozin kinazın anormal/aşırı ekspresyonu veya reseptöre ait ligandın aşırı ekspresyonundan kaynaklanabilir (Paul ve Mukhopadhyay, 2004). Benzer şekilde serin/treonin kinazların disregülasyonunun bazı kanserlere neden olabileceği ve bazı kanser türlerinde belli serin/treonin kinazların ekspresyonun arttığı saptanmıştır. Böylece kanser tedavisinde bu enzimlerin de hedef olabileceği gündeme gelmiştir (Capra vd., 2006).

2.2. Tirozin Kinaz İnhibitörleri

Kanser oluşumu ile tirozin kinazların anormal aktivasyonu arasında ilişkinin ortaya çıkması kanserin spesifik genetiğine uygun hedeflendirilmiş tedavilerin geliştirilmesinde ana basamak olmuştur (Paul ve Mukopadhyay 2004). Günümüzde, her kanserin spesifik genetiğine uygun olarak hedeflendirilmiş antikanser ilaçların kullanımı artmaktadır. Bu hedefli yaklaşım esas olarak kanserde aşırı eksprese edilen ve/veya mutasyona uğrayan tirozin kinaz aktivitelerinin inhibisyonu ile sağlanmaktadır. Bu şekilde tedavi yaklaşımı kronik myeloid lösemide, meme kanserinde, renal hücre karsinomunda, gastrointestinal stromal tümörlerde ve kolon karsinomunda başarıyı artırmaktadır (Chen ve ark., 2008). Hedeflendirilmiş tedavide ağırlıklı olarak tirozin

kinazları hedef alan tedaviler geliştirilmekle beraber, serin/treonin kinazları da hedef alan tedaviler geliştirilmeye başlanmıştır (Cheng ve Force 2010).

Konvansiyonel kemoterapide tümör hücrelerinin yanında hızlı bölünme özelliğine sahip sağlıklı hücreler de etkilenmekte ve bu durum ciddi yan etkilere sebep olmaktadır. Tirozin kinaz inhibitörleri tümör büyüme ve progresyonunda etkili olan molekülleri etkilemektedir, dolayısıyla tirozin kinaz inhibitörlerinin hedeflerinin daha çok tümör hücrelerine spesifik olduğu bu nedenle de terapötik indekslerinin geniş ve yan etkilerinin daha az olduğu düşünülmektedir. Ayrıca sitotoksik kemoterapötik ajanlar veya radyoterapi ile kombinasyon halinde kullanıldığında antikanser etkinliklerinin arttığı gösterilmiştir. Bu nedenle kanserde hedeflendirilmiş tedavilerin kullanılması oldukça umut vaad eden bir terapi yöntemidir (Arora ve Scholar, 2005).

Klinikte tirozin kinaz inhibisyonunun nasıl sonuçlar doğuracağını tahmin etmek kolay değildir. Tümörlerde eksprese edilen tirozin kinaz genlerinde ikincil mutasyonların oluşmasının tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavide ilaca karşı direnç gelişimine neden olduğu saptanmıştır (Baselga, 2006).

İmatinib 2001 yılında pHiLadelfiya kromozom pozitif olan yetişkin kronik myeloid lösemi hastalarında kullanımı onaylanmış ilk tirozin kinaz inhibitörüdür. kronik myeloid lösemi hastalarının %95'inde pHiLadelfiya kromozomu bulunmaktadır. PHiladelfiya kromozomu 9. kromozomdan bir parçanın kopup 22. kromozomdan kopan parça ile karşılıklı yer değiştirmesi t(9;22) sonucu oluşmaktadır. İlk kez 1960 yılında kronik myeloid lösemi hastalarında tanımlanmıştır. Translokasyon 9. kromozomda bulunan ABL1 (proto-onkogen tirozin protein kinaz geni) ile 22. kromozomda bulunan BCR (breakpoint cluster region) arasında gerçekleşir ve 22. kromozomda BCR-ABL1 füzyon geni oluşumuna yol açar. BCR-ABL1 füzyon hibrid geni sürekli tirozin kinaz aktivitesine sahip BCR-ABL1 proteinini kodlar. Sürekli tirozin kinaz aktivasyonu hücre ölümünde, proliferasyonunda görevli sinyalizasyon yollarının bozulmasına neden olur (Kang ve ark., 2016). Kronik myeloid löseminin patogenezinde BCR-ABL1'in sürekli tirozin kinaz aktivitesine neden olduğunun bilinmesi ile sürekli aktivasyon görülen bu kinaz aktivitesinin hedefli olarak durdurulmasının tedavide kullanılabilecek bir strateji olduğu düşünülmüştür. İmatinib BCR-ABL1 aşırı ekspresyonu görülen hücrelerde büyümeyi selektif bir şekilde inhibe etmektedir. İmatinib keşfi ile kronik

myeloid lösemi hastalığının tedavisinde büyük başarı sağlanmış ve kronik myeloid lösemi tedavisinde ilk seçenek olarak kullanılmaya başlanmıştır (Ohno, 2006).

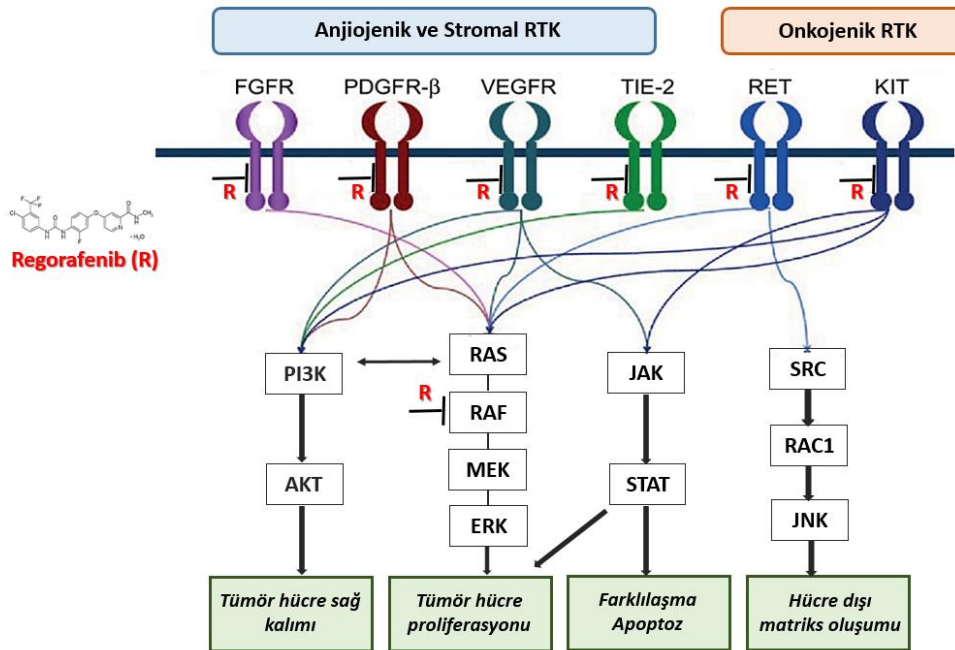
Gastrointestinal stromal tümörler, KIT ve PDGFR-A'nın sürekli aktivasyonuna neden olan mutasyonlar ile karakterizedir (Lopes ve Bacchi, 2010). İmatinib mesilat, ABL1'nin yanı sıra; kök hücre faktörü reseptörü (c-KIT) ve platelet türevli büyüme faktörü reseptörlerini (PDGFR) de spesifik olarak inhibe etmektedir. İmatinib'in 2002 yılında KIT mutasyonu olan gastrointestinal stromal tümörlerde kullanımı onaylanmıştır. İmatinib gastrointestinal stromal tümörlerde kullanımı onaylanan ilk hedefli antikanser tedavidir ve İmatinib'in keşfi, hedefli antikanser ajanların geliştirilmesinde devrim yaratmıştır (Savage ve Antman, 2002; Lopes ve Bacchi, 2010). İmatinib'in günümüzde hala yeni tanı almış, yetişkin ve çocuklarda kronik fazdaki pHiLadelfiya kromozomu pozitif kronik myeloid lösemi hastalarının tedavisinde, yetişkinlerde PDGFR ile ilişkilendirilmiş diğer miyeloproliferatif hastalıklarda, yetişkinlerde diğer bazı lösemi türlerinde kullanımı devam etmektedir. Bunların yanı sıra; c-KIT mutasyonu olan, cerrahi olarak çıkarılması mümkün olmayan ve metastatik gastrointestinal stromal tümörlerin tedavisinde ayrıca c-KIT pozitif gastrointestinal stromal tümör rezeksiyonu yapılmış yetişkinlerde adjuvan tedavi olarak kullanılabilecek, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA) tarafından onaylı bir tedavi seçeneğidir (FDA, 2012a).

2.3. Regorafenib

Regorafenib, çok sayıda membran bağımlı ve hücre içi kinaz enzimlerini etkileyerek antikanser aktivite gösteren tirozin kinaz inhibitörü bir ilaçtır. Oral olarak 28 günlük tedavi döngüsünün ilk 21 günü süresince günde bir kez 160 mg uygulanmaktadır. Regorafenib, ilk olarak 2012 yılında FDA tarafından daha önceden floropirimidin, oksaliplatin, irinotekan bazlı kemoterapi, anti vasküler endotelial büyüme faktörü (vascular endothelial growth hormone-VEGF) tedavisi görmüş; KRAS mutasyonu olmayan kişilerde “anti epidermal büyüme faktörü reseptörü (epidermal growth factor-EGFR) tedavisi uygulanmış metastatik kolorektal kanser hastalığının tedavisinde onaylanmıştır (FDA, 2012b). 2013 yılında FDA tarafından, daha önceden İmatinib mesilat ve Sunitinib maleat tedavisi görmüş, lokal olarak ilerlemiş, cerrahi olarak çıkartılamayan veya metastatik gastrointestinal stromal tümörlerin tedavisinde kullanımı onaylanmıştır (FDA, 2013). 2017 yılında ise daha önceden sorafenib tedavisi

almış, hepatosellüler karsinoma hastalarında ikinci seçenek tedavi olarak kullanımı onay almıştır, bu ilaç 10 yıldan beri karaciğer kanseri tedavisinde FDA onayı almış ilk ilaçtır (FDA,2017a; FDA, 2017b). Ayrıca Regorafenib Türkiye’de de Stivarga® adıyla 2015 yılında ruhsat almıştır. Türkiye’de ek izlemeye tabi ilaçlar listesinde bulunmaktadır, meydana gelen yan etkilerin raporlanması gerekmektedir (T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, 2015).

Regorefenib, Şekil 2-5’te gösterildiği gibi anjiojenik ve stromal vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü 1,2,3 (VEGFR1/2/3), platelet kaynaklı büyüme faktörü beta reseptörü (PDGFR β), fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1 (FGFR 1), TIE reseptör tirozin kinazları, onkojenik Mast/kök hücre büyüme faktörü reseptörü KIT, proto-onkogen tirozin kinaz reseptörü RET’i ve intraselüler sinyalizasyonda yer alan proto-onkogen serin-treonin kinase RAF’ı inhibe etmektedir (Wilhelm ve ark., 2011).



Şekil 2-5: Regorafenib’in etki mekanizması (Goel, 2018)

Regorafenib’in, çoklu ilaç direncinde önemli role sahip meme kanseri rezistans proteinin (BCRP) ve ABCB1 ilaç taşıyıcı proteinlerin aktivitesini ihibe ettiği gösterilmiştir. Bundan dolayı konvansiyonel kemoterapi ajanları ile kombinasyon halinde kullanılarak ilaç direncinin üstesinden gelinebileceği düşünülmektedir (Wang ve ark., 2017; Chen ve ark., 2019).

Regorafenib'in diğer kanser türlerinde de monoterapi veya kombinasyon halinde kullanılabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. *In vitro* ortamda Regorafenib'in multiple myelom kanser hücre hatlarında hücre büyümesini inhibe ettiği, apoptozu indüklediği, tümör büyümesini yavaşlatığı, osteoklastojenezi inhibe ettiği; insan multiple myelom fare xenograft modelinde tümör oluşumunu belirgin şekilde geciktirdiği gösterilmiştir (Breitkreutz ve ark., 2018). Ayrıca mesane kanser hücre hattında ve aynı hücre hattı xenograft fare modelinde tümör büyümesini inhibe ettiği, mesane kanserinde tümör progresyonu ile ilişkili olan proteinlerin ekspresyonunda azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Ek olarak mesane kanser hücre hattında Regorafenib'in intrinsik ve ekstrinsik apoptozu indüklediği de saptanmıştır (Chiang ve ark., 2019). Regorafenib'in, *in vivo* ve *in vitro* olarak agresif beyin tümörlerinden glioblastoma multiforme tümörlerinde otofajiyi indükleyip, otofagozom-lizozom füzyonunu inhibe ederek glioblastoma hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği (Jiang ve ark., 2019), *in vitro* ortamda akciğer skuamöz hücre karsinomunda hücre siklusunu bozarak etkili olabileceği gösterilmiştir (Hu ve ark., 2018). Ayrıca Regorafenib'in over kanseri, tirod kanseri, melanoma ve sarkoma gibi solid kanser türlerinde de kullanılabileceğine dair klinik çalışmalar halen devam etmektedir (<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=Regorafenib&cntry=&state=&city=&dist=>).

2.4. Tirozin Kinaz İnhibitörleri ve Kardiyotoksisite

Tirozin kinaz inhibitörleri, hastalarda genellikle iyi tolere edilmektedir. Ancak klinikte kalp, karaciğer, böbrek, akciğer, gastrointestinal sistem gibi organ ve sistemlerde beklenmeyen ciddi advers etkiler ortaya çıkardığına dair bilgiler literatürde mevcuttur (Shah ve ark., 2013a; Shah ve ark., 2013c; Hartmann ve ark., 2009; Orphanos ve ark., 2009). Tirozin kinaz inhibitörlerinin toksik etkilerini 'hedef etkiler' ve 'hedef dışı etkiler' olarak sınıflandırmak mümkündür. Hedef etkiler, kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve hayatta kalmasını regüle eden tirozin kinaz sinyal yolağının diğer doku ve organlarda da hayati öneme sahip olmasından dolayı ortaya çıkar. Yani bu istenmeyen etkilerin bir kısmı tirozin kinazların bu bölgelerde de fonksiyonel etkilerinin bulunmasından kaynaklanmaktadır. Hedef dışı etkiler ise tirozin kinaz inhibitörü olan ilacın istenmeyen tirozin kinazı inhibe etmesinden kaynaklanmaktadır. Bu durum ilacın yeterince seçici olmamasından kaynaklanabileceği gibi bilinçli olarak tümöröenez ve

tümör anjiyogenezi regüle eden kinazları içeren geniş bir hedef spektrumuna sahip olmasından da kaynaklanabilir. Piyasada bulunan tirozin kinaz inhibitörlerinin sipsifikliğı ve hedeflediğı protein kinazlar farklılık gösterebilmekte ve buna bağılı olarak advers etkilerinde de farklılıklar görülebilmektedir. İlaçtan ilaca fark göstermekle birlikte çoğı tirozin kinaz inhibitörü ile sıklıkla görülen advers etkiler; deri toksisitesi, anemi, nötropeni, trombositopeni gibi hemotolojik etkiler, diyare, mide bulantısı, kusma, ödem, hipotiroidizmdir (Shah ve ark., 2013a; Chen ve ark., 2008; Hartmann ve ark., 2009).

Tirozin kinaz inhibitörlerinin geliştirilmesi ile kanser tedavisinde büyük başarı sağlanmasına rağmen ilaçların güvenliğı ile ilgili bazı endişeler vardır ve bunların en önemlilerinden birisi kardiyovasküler sistem üzerindeki toksik etkileridir. Kardiyovasküler toksik etkiler tirozin kinaz inhibitörü kullanan hastalarda tedavi dozunun yeniden ayarlanmasını gerektiren veya bu ilaçların kullanımına son verilmesine neden olabilen oldukça ciddi advers etkilerdir (Shah ve ark., 2013b). Ayrıca hangi hastaların yüksek risk grubunda bulunduğunu belirleyen bir metod bulunmadığı için hastaların kardiyovasküler toksik etkiler açısından yakından takip edilmesi gerekmektedir (Abdel-Rahman ve Fouad, 2014). Kardiyovasküler toksisite, kinaz inhibitörü ilaçların hem hedef toksisitesi hem de hedef dışı toksisitesi nedeni ile gelişebilmektedir (Cheng ve Force, 2010). Bugüne kadar pek çok tirozin kinaz inhibitörü ilacın kardiyovasküler toksisitesinin olduğu raporlanmıştır (Shah ve ark., 2013b; Shah ve Morganroth, 2015). Kardiyovasküler toksik etkiler; hipertansiyon, pulmoner hipertansiyon, kanama, venöz trombozis, pulmoner emboli, arteriyal tromboz, QT intervalinde değişiklikler, sol ventrikül disfonksiyonu olarak sıralanabilir. QT intervalinde değişiklikler genellikle intervalin uzaması şeklindedir ve ölümlere neden olmadığı düşünülmektedir. Sol ventrikül disfonksiyonu ve tedavi edilemeyen hipertansiyon yüksek oranda ölüme neden olmaktadır. Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunun azalması ile görülen kardiyomiyoiti, kalp yetmezliğine de neden olabilmektedir. Bu ilaçların kardiyotoksitesinin moleküler mekanizmaları hala net olarak anlaşılamamıştır (Shah ve ark., 2013b; Mellor ve ark., 2011). Kardiyotoksik advers etkiler ve bu advers etkilerin mekanizmaları ilaca bağılı olarak değişkenlik gösterebilmekte ve ilaca özgü olabilmektedir. Hedef dışı kinazların etkilenmesi sonucu kardiyomiyosit mitokondrilerinde oluşan hasarın, kardiyotoksitesinin altında yatan mekanizmalarından biri olabileceğı düşünülmektedir (Chaar ve ark., 2018).

Tirozin kinaz inhibitörlerinin neden olduğu hipertansiyonun nedeni net olarak bilinmemekle birlikte VEGFR inhibisyonundan kaynaklandığı ileri sürülmektedir. VEGF endotel hücrelerine özgü bir büyüme faktörüdür ve endotel hücrelerinin proliferasyonuna, migrasyonuna, hayatta kalmasına, farklılaşmasına aracılık etmektedir. Anjiogenez daha önce var olan damarlardan yeni kan damarlarının üretilmesidir ve VEGF'in anjiyogenezde önemli olduğu bilinmektedir. Bu durum normal hücrelerin gelişmesi için gerekli iken bazı tümör türlerinin metastazını ve proliferasyonunu kolaylaştırır. Bu nedenle VEGFR kanser tedavisinde hedeflenen önemli bir tirozin kinaz reseptörüdür. Tirozin kinaz inhibitörlerinin neden olduğu hipertansiyonun patofizyolojisi ile ilgili çeşitli hipotezler öne sürülmektedir. Bu hipotezlerden ilki, Tirozin kinaz inhibitörlerinin VEGF sinyalizasyonunu bozmasından dolayı NO (nitrik oksit) üretimi ve homeostazını etkilemesi sonucu vazokonstriksiyon, periferel vasküler direncin artması ve hipertansiyonun ortaya çıkmasıdır. İkinci hipotez ise; VEGF sinyalizasyon inhibisyonunun damarlardan hipertansiyona neden olan diğer vazoaaktif maddelerin salınmasına neden olabileceğidir. Diğer bir hipoteze göre de bu sinyalizasyon yolağı inhibisyonu sonucu damar yoğunluğunun azalması hipertansiyona neden olmaktadır (de Jesus-Gonzalez ve ark., 2012; Brinda ve ark, 2016; Stutfeld ve Ballmer-Hofer, 2009; Erol, 2007). Bu hipotezler halen tartışmalıdır ve doğrulanmaya ihtiyaçları vardır. Ayrıca her ilacın hipertansiyon oluşturma mekanizması da farklılık gösterebilmektedir (de Jesus-Gonzales ve ark., 2012). Hipertansiyonun tedavi edilmemesi ölümcül sonuçlar doğurabilmektedir (Shah vd., 2013b). Ayrıca VEGFR inhibitörlerinin konjestif kalp yetmezliğini de arttırdığı düşünülmektedir (Qi ve ark., 2014). Bununla birlikte tirozin kinaz inhibitörleri ile indüklenen hipertansiyonun ilacın etkililiğini gösteren bir belirteç olabileceğine yönelik görüşler de bulunmaktadır (Budolfson ve ark., 2019). Tablo 2-1'de FDA tarafından kanser tedavisinde onaylanan tirozin kinaz inhibitörü ilaçlar ve bu ilaçların neden olduğu kardiyovasküler toksik etkiler özetlenmiştir.

Tablo 2-1: FDA tarafından kanser tedavisinde kullanımı onaylanan tirozin kinaz inhibitörü ilaçlar ve kardiyovasküler yan etkileri (Lamore ve ark., 2019).

İlaç adı	FDA tarafından onaylanma tarihi	Kardiyovasküler yan etkileri
<i>İmatinib</i>	2001	Ciddi konjestif kalp yetmezliği, sol ventrikül disfonksiyonu
<i>Erlotinib</i>	2004	Miyokardial enfarktüs/iskemi
<i>Sorafenib</i>	2005	Hipertansiyon, QT uzaması
<i>Dasatinib</i>	2006	QT uzaması, konjestif kalp yetmezliği, sol ventrikül disfonksiyonu, miyokardial enfarktüs
<i>Sunitinib</i>	2006	Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunda ciddi azalma, QT uzaması, torsade de pointes, hipertansiyon
<i>Lapatinib</i>	2007	Sol ventrikül ejeksiyonda azalma, QT uzaması
<i>Nilotinib</i>	2007	QT uzaması ve ani ölümler
<i>Pazopanib</i>	2009	QT uzaması, torsade de pointes, hipertansiyon
<i>Crizotinib</i>	2011	QT uzaması, bradikardi
<i>Vandetanib</i>	2011	QT uzaması, torsade de pointes ve ani ölümler, kalp yetmezliği, hipertansiyon
<i>Vemurafenib</i>	2011	QT uzaması
<i>Axitinib</i>	2012	Hipertansiyon, arterial ve venöz tromboz
<i>Cabozantinib</i>	2012	Trombolitik olaylar, hipertansiyon ve hipertansif kriz
<i>Ponatinib</i>	2012	Arteriyal oklüzyon, venöz tromboembolizm, kalp yetmezliği, hipertansiyon, kardiyak aritmi
<i>Regorafenib</i>	2012	Hipertansiyon, kardiyak iskemi ve enfarktüs
<i>Dabrafenib</i>	2013	Venöztromboembolizm, kardiyomiyopati
<i>Ibrutinib</i>	2013	Kardiyak aritmi, hipertansiyon
<i>Trametinib</i>	2013	Venöztromboembolizm, kardiyomiyopati
<i>Ceritinib</i>	2014	QT uzaması, bradikardi

<i>Alectinib</i>	2015	Bardikardi
<i>Cobimetinib</i>	2015	Kardiyomiyopati
<i>Lenvatinib</i>	2015	Hipertansiyon, kardiyak disfonksiyon, arteriyel tromboembolik olaylar, QT uzaması
<i>Osimertinib</i>	2015	Kardiyomiyopati, QT uzaması
<i>Acalabrutinib</i>	2017	Atrial fibrilasyon, çarpıntı
<i>Brigatinib</i>	2017	Hipertansiyon, bradikardi
<i>Binimetinib</i>	2018	Kardiyomiyopati, venöz tromboembolizm
<i>Encorafenib</i>	2018	QT uzaması,
<i>Gilteritinib</i>	2018	QT uzaması
<i>Lorlatinib</i>	2018	Atrioventriküler blok
<i>Entractinib</i>	2019	Konjestif kalp yetmezliği, QT uzaması

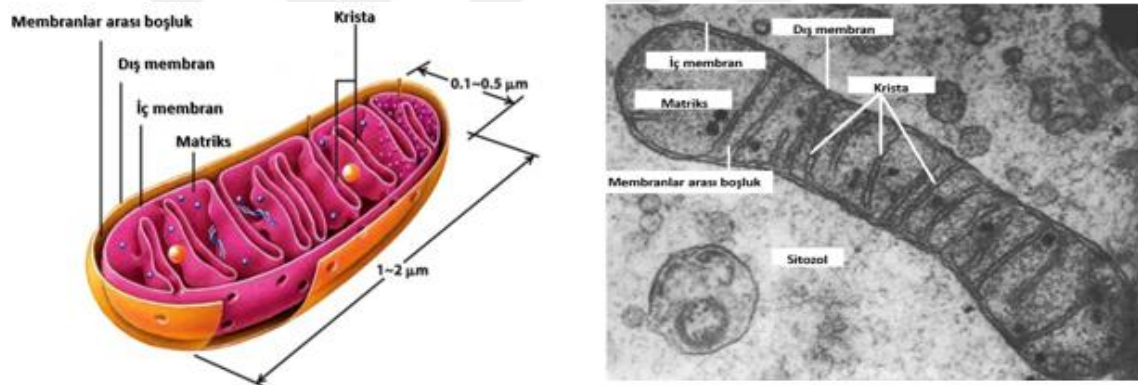
2.5. Regorafenib ve Kardiyotoksisite

Regorafenib'in en sık görülen kardiyotoksik etkisi hipertansiyondur. Yapılan çalışmalar, Regorafenib'in hayatı tehdit edici boyutlara ulaşan ve hatta ölüme neden olabilecek hipertansiyon oluşturduğunu göstermiştir (FDA 2017a; FDA 2013; De Wit ve ark., 2014; FDA 2012b). Bunun dışında klinik çalışmalarda Regorafenib'in kardiyak iskemi/infarktüse de neden olduğu raporlanmıştır (FDA 2017a; FDA 2013; Eisen ve ark., 2012; FDA 2012b). Ayrıca Regorafenib'in bazı hastalarda kardiyovasküler hastalıkların belirtisi olabileceği düşünülen dispneye neden olabileceği belirtilmiştir (Groarke ve ark., 2014). Son zamanlarda Regorafenib kullanan hastalarda miyokardial hasar (Hsiao ve ark., 2016) ve hipertansif kriz (Yılmaz ve ark., 2014) geliştiğine dair olgu raporları bulunmaktadır.

Regorafenib'in yüksek dereceli hipertansiyon ve kanamalara neden olma riski yüksektir. Bu nedenle Regorafenib'in kardiyovasküler advers etkiler oluşturabileceğine dair hastalarda ve klinisyenlerde farkındalık yaratılması gerektiği düşünülmektedir (Chen ve Wang, 2018). Regorafenib'in kardiyotoksitesinin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir, eldeki veriler klinikte ilacın kullanılmasına bağlı oluşan advers etkilerden elde edilen bilgilerle sınırlıdır.

2.6. Mitokondri ve Kalp

Mitokondriler ökaryotik hücrelerde bulunan enerji üretim merkezleridir. Mitokondrilerin endositoz ile α -proteobakterilerden köken aldığı düşünülmektedir. Bunun en belirgin kanıtının bakteriyel ve mitokondriyal solunum zinciri kompleks homolojilerinin birbirine yakın olması olarak gösterilmektedir (Kühlbrandt, 2015). Mitokondriler çift katlı zarla çevrilidir. Dış mitokondriyal membran voltaj bağımlı anyon kanalları (VDAC) olarak da bilinen porlar içermektedir. Bu porlar aminoasit, iyon gibi küçük hidrofilik moleküllerin geçişine izin verir. İç mitokondriyal membran ise geçirgen değildir. Krista denilen çok sayıda katlanmalar yapmıştır ve mitokondriyal matriksi çevreler (Şekil 2-6). Mitokondriler, hücrenin ihtiyacı doğrultusunda bölünebilir, birleşebilir ve hareket edebilirler (Ylikallio ve Suomalainen, 2012).



Şekil 2-6: Mitokondrilerin yapısı

Kardiyomiyositler kasılma ve gevşeme fonksiyonunu gerçekleştirebilmek için ATP'ye yüksek derecede gereksinim duymaktadır. ATP'ye duyulan ihtiyacın karşılanması için kardiyomiyosit hücreleri çok miktarda mitokondri içermektedir. Memelilerde toplam kardiyomiyosit hacminin %22-37 kadarını mitokondriler oluşturmaktadır (Barth ve ark., 1992; Lehman ve ark., 2002). Mitokondri yapısında ve fonksiyonunda meydana gelen bozulmaların çeşitli kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Marín-García ve Goldenthal, 2002). Mitokondriler oldukça dinamik organellerdir, ihtiyaç duyulan ATP miktarına bağlı olarak sayılarını artırabilmekte veya azalabilmektedir. Bu durum fisyon ve füzyon denilen prosesler ile gerçekleşmektedir (Li ve ark., 2012). Ayrıca mitokondriyal füzyon ve fizyon, mitokondriyal proteinlerin, lipidlerin ve genom değişimi yoluyla hasarlı mitokondrilerin

ortadan kaldırılması için kalite kontrol mekanizmalarından biridir (Chen ve ark., 2011; Anand ve ark., 2013).

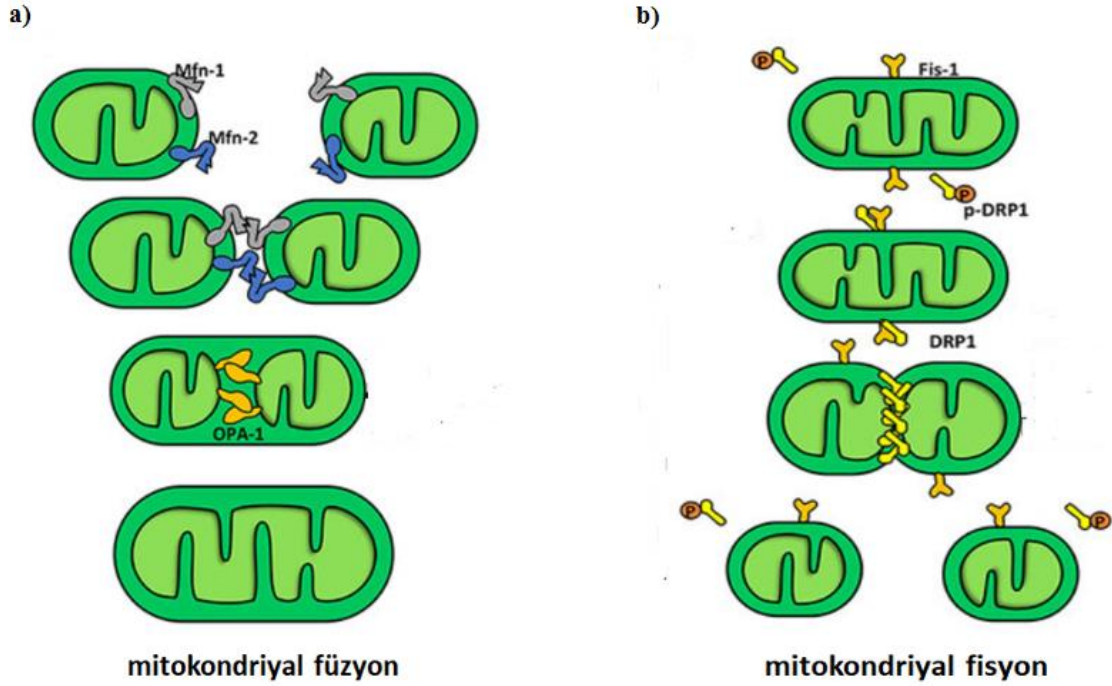
2.6.1. Mitokondriyal Füzyon

Mitokondriyal füzyon, mitokondrilerin içeriklerini karıştırıp birleşmesidir. Bu durum hasarlı mitokondrilerin ortadan kaldırılmasının yanı sıra mitokondriyal genomun kalıtımı ve sürdürülebilirliği için de önem teşkil etmektedir (Westermann, 2002). Mitokondriyal füzyon, farklı füzyon proteinlerin rol aldığı dış mitokondriyal membran füzyonu ve iç mitokondriyal membran füzyonu olmak üzere iki basamakta gerçekleşmektedir. Dış zar füzyonu, dış mitokondriyal membranda bulunan integral proteinler mitofusin 1 (MFN1) ve mitofusin 2 (MFN2) tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu proteinlerin sitoplazmaya bakan tarafları homotipik (MFN1-MFN1/MFN2-MFN2) veya heterotipik (MFN1-MFN2) kompleksler oluşturacak şekilde fiziksel bağlantılar oluşturarak dış zar füzyonunu gerçekleştirirler (Chen ve ark., 2003; Koshiba ve ark., 2004). İç mitokondriyal membran füzyonuna GTPaz aktivitesine sahip optik atrofi 1 (OPA1) proteini aracılık etmektedir (Şekil 2-7a) (Cao ve ark., 2019). Ayrıca kardiyak mitokondrilerde spesifik olarak bulunan bir fosfolipid olan cardiolipin ve OPA1 etkileşiminin iç zar füzyonu için önemli olduğu da belirtilmiştir (Ban ve ark., 2017). Dış zar füzyonu için iç zar boyunca bir proton gradienti gereklidir. İç zar füzyonu için ise iç zar elektrik potansiyeli gerekmektedir (Meeusen ve ark., 2006). Mitokondri membran potansiyelinin bozulmasının iç zar füzyonunu olumsuz etkilediği gösterilmiştir (Legros ve ark., 2002; Ishihara ve ark., 2003).

2.6.2. Mitokondriyal Fisyon

Mitokondriyal fisyon hasarlı mitokondrilerin mitofaji denilen prosesle ortadan kaldırılmasına aracılık etmektedir (Kim ve ark., 2007). Bunun yanı sıra hücre bölünmesinde mitokondrilerin bölünmesi için de gerekli bir süreçtir (Ong ve ark., 2015). Mitokondri fisyonuna dynamin ilişkili protein (DRP1) aracılık etmektedir. DRP1 çoğunlukla sitozolde bulunmaktadır ve mitokondriyal fisyonu gerçekleştirmek üzere mitokondriyal dış zara gelir. Burada kendisi doğrudan membrana bağlanamadığı için dış zarda bulunan fisyon proteini 1 (FIS1) adaptör proteinin yardımı ile DRP 1 ile etkileşir ve mitokondriyal fisyon bölgelerinde halka kompleksi oluşur. Bu halka yapısı GTP'nin hidrolizini takiben sıkışır ve bölünme gerçekleşir (Şekil 2-7b). Günümüzde, FIS1 dışında başka proteinlerin de DRP1'in dış mitokondriyal zara çağrılmasında ve

bölünmeyi sağlayan halka yapısının oluşmasında rolü olduğu düşünülmektedir (Palmer ve ark., 2011; Otera ve ark., 2013).



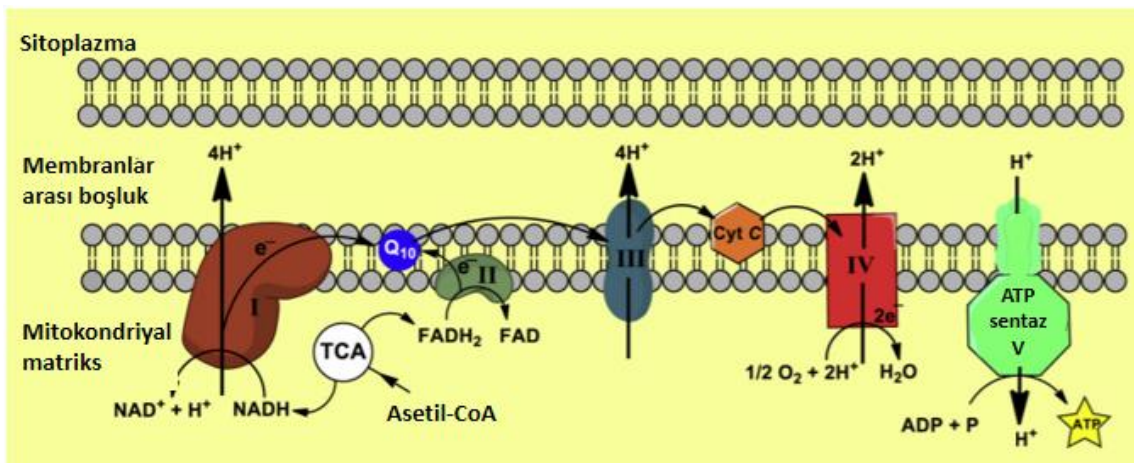
Şekil 2-7: Mitokondri dinamikleri a) füzyon ve b) fisyon (Chiong ve ark., 2014)

2.6.3. Mitokondriyal Oksidatif Fosforilasyon

Normal, sağlıklı bir kalpte enerji üretimi için gerekli olan en etkin substrat yağ asitlerinin mitokondriyal β -oksidasyonudur. Bunun yanı sıra glukoz oksidasyonu, glikoliz, laktat ve ketonlar da miyokardiyal ATP üretimine katkı sağlamaktadır (Taegtmeyer, 1994). Çeşitli biyokimyasal yollardan elde edilen NADH ve FADH₂ tarafından sağlanan elektronlar, mitokondriyal iç zara gömülü olarak bulunan elektron transport zinciri (ETZ) boyunca elektron donörden elektron akseptöre doğru akar, diğer bir deyişle elektronlar daha az pozitif redüksiyon potansiyeline sahip elektron taşıyıcısından daha pozitif redüksiyon potansiyeline sahip elektron taşıyıcısına taşınmaktadır. NADH kompleks I için elektron sağlarken, FADH₂ kompleks II için elektron sağlamaktadır. Elektron transport zinciri 5 adet multimerik protein kompleksinden oluşmaktadır. Bu kompleksler; NADH dehidrojenaz-ubikinin oksidoredüktaz (kompleks I), süksinat dehidrojenaz, ubikinin oksidoredüktaz (kompleks II), ubikinin-sitokrom c oksidoredüktaz (kompleks III), sitokrom c oksidaz (kompleks IV), F₁-F₀ ATP sentaz (kompleks V) olarak sıralanmaktadır. Ayrıca elektron transport zincirinde, koenzim Q10 ve sitokrom c olmak üzere kompleksler

arası elektron taşınmasından sorumlu 2 adet elektron taşıyıcısı da bulunmaktadır (Kühlbrandt, 2015), (Şekil 2-8).

Mitokondride ATP sentezinin gerçekleşebilmesi için koordine olarak çalışan 2 süreç gerekmektedir. İlk olarak; elektronların kompleksler boyunca taşınması iç mitokondriyal zar boyunca bir proton gradientinin oluşmasını sağlamaktadır. Kompleks I ve II'deki elektronlar KoenzimQ₁₀ yardımıyla Kompleks III'e taşınır, Kompleks III'teki elektronlar sitokrom c yardımıyla Kompleks IV'e taşınmaktadır. Kompleks IV'ün O₂ bağlama potansiyeli vardır ve O₂ kompleksler boyunca aktarılan elektronları alarak H₂O'ya indirgenir. Elektronlar kompleksler boyunca taşınırken kompleks I, III ve IV'den mitokondriyal matrikste bulunan protonlar membranlar arası boşluğa pompalanır ve iç membran boyunca proton gradienti oluşturulur. Matriks negatif, membranlar arası boşluk pozitif olduğu için voltaj farkı, proton konsantrasyonundaki fark nedeniyle iki kısım arasında pH gradienti meydana getirmektedir. Bu iki durum mitokondri membran potansiyelinin oluşmasını sağlamaktadır. Proton hareket ettirici kuvvet de denilen enerjinin oluşması büyük ölçüde proton gradientinden sağlanmaktadır. ATP sentezi için membranlar arası boşlukta bulunan protonların matrikse tekrar dönmeleri gerekmektedir ve protonların matrikse geri dönmesi ve ATP sentezi eş zamanlı olarak gerçekleşmektedir (Şekil 2-8). ATP sentaz'ın bir altbirimi olan F₀, protonların matrikse dönüşü için proton kanalı oluşturur. ATP sentazın diğer birimi F₁ ise ADP ve Pi (inorganik fosfat) kullanarak ATP sentezini gerçekleştirir (Elston ve ark., 1998; Wang ve Oster, 1998; DiMauro ve Schon, 2003; Murphy ve ark., 2016).



Şekil 2-8: Mitokondriyal elektron transport zinciri (Mastroeni ve ark., 2017)

Daha önce de bahsedildiği gibi, iç mitokondriyal membran boyunca oluşturulan proton gradienti ATP üretimi için hayati derecede öneme sahiptir. Proton gradientinin bozulması ATP sentezinin de bozulmasına yol açmaktadır. Eşleşme bozucu proteinler (UCP), mitokondriyal matrikse protonların yeniden girişine izin verir, ancak bu durum ATP üretimi yerine sıcaklık üretimi ile sonuçlanır ve sonuç olarak ATP üretimi için gerekli olan proton gradientinin düşmesine neden olur (Murray ve ark., 2004). En iyi karakterize edilmiş UCP'lerden birisi UCP1'dir, kahverengi yağ hücrelerinde bulunmaktadır ve termojenezde önemli role sahiptir. UCP ailesine ait olan UCP2 and UCP3 proteinleri pek çok dokuda eksprese edilmektedir ve çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarda rol oynadıkları düşünülmektedir (Esteves ve Brand, 2005). Bu proteinlerin termojenezde UCP1 kadar etkili olmadığı düşünülmektedir (Matthias ve ark., 2000). Bunun yanı sıra UCP proteinlerinin, yağ asidi oksidasyonunun düzenlemesinde, ROS oluşumunda, hücre proliferasyonunda ve metabolik proselerde rolü olduğu gösterilmiştir. Kalp dokusunda UCP2 ve UCP3 eksprese edilmektedir. Kardiyomiyositlerde UCP2'nin apoptozu ve oksidatif stresi azaltarak kalpte koruyucu etkisinin bulunduğu gösterilmiştir (Teshima ve ark., 2003; Wang ve ark., 2018).

Lon proteaz 1 (LONP1) nükleer DNA tarafından kodlanan, mitokondride bulunan ATP bağımlı bir proteazdır. Mitokondrideki hasarlı veya yanlış katlanmış proteinlerin selektif olarak yıkımını sağlayarak mitokondri homeostazının sürdürülmesini sağlar. Ayrıca mtDNA replikasyonunun regülasyonunda, mitokondri morfolojisinin sürdürülmesinde ve mitokondri dinamiğinde de etkili olduğu düşünülmektedir. (Pinti ve ark., 2016). LONP1, oksidatif stres, hipoksi ve mitokondride katlanmamış protein yanıtı gibi hücrede stres oluşumuna yol açan durumlarda aktive olarak hücrenin oluşan stres ile başa çıkmasına yardımcı olmaktadır (Kao ve ark., 2015).

2.7. Mitokondriyal DNA (mtDNA)

Mitokondriler daha düşük organizmalarda bulunan DNA'ların analogu olan, dairesel kendi DNA'sına sahiptirler ve maternal kalıtım göstermektedirler. İnsanlarda 16 569 baz çiftinden oluşan mtDNA, 37 gen içermektedir ve bu genler ETZ komplekslerinde bulunan 13 adet protein alt ünitesini kodlamaktadır. Ayrıca protein sentezi için gerekli olan 22 tRNA, 2 tane de rRNA'ya sahiptir (Ott ve ark., 2016; Brown ve ark., 2017). Mitokondriler, ETZ'ye yakın bulunmaları, gelişmiş onarım

mekanizmalarının ve histonlarının bulunmamasından dolayı nükleer genoma göre hasara daha açıktır, dolayısıyla mtDNA'da meydana gelebilecek bir mutasyon hızlı şekilde birikir ve patolojik sonuçlara neden olabilir (Ebner ve ark., 2011).

mtDNA tarafından kodlanan genlerin ekspresyonu mtDNA kopya sayısı ile regüle edilmektedir. Örneğin, mitokondriyal hastalıklarda, mtDNA'da büyük bir mutasyon yükü olsa bile mtDNA replikasyonunun artırılması ile hastalarda hastalık belirtisi ortaya çıkmayabilir. mtDNA'daki büyük bir mutasyon yüküne mtDNA kopya sayısı azalması eşlik ederse hastalık fenotipinde ortaya çıkmaktadır (Dominic ve ark., 2014) (Şekil 2-9). mtDNA hasarı, ETZ'nin protein subunitelerini kodlayan genlerin ekspresyonunun azalması veya artmasına neden olabilir. Bu durum da oksidatif fosforilasyonun bozulmasına yol açabilmektedir. Elektron taşıma sisteminde elektronların düzgün bir şekilde taşınmaması mitokondride ROS oluşumunu artırır ve mtDNA hasarına yol açar (Tian ve ark., 2016). mtDNA kopya sayısı mitokondriyal biyogenezin ve mtDNA miktarının bir göstergesidir. Düşük mtDNA kopya sayısı kardiyomyopati, kanser gibi pek çok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Yoon ve ark., 2016).



Şekil 2-9: mtDNA içeriğinin mitokondriyal hastalıklarda önemi (Dominic ve ark., 2014)

mtDNA: mitokondriyal DNA

2.8. Apoptoz

Apoptoz, programlı hücre ölümünün bir çeşididir, hücre proliferasyonunun kontrol edilmesinde ve homeostazının sağlanmasında pek çok organizma için hayati önem taşır. Ayrıca başta kanser ve nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere birçok hastalığın oluşumunda rolü olduğu bilinmektedir (Saikumar ve ark., 1999). Apoptoz prenatal dönemde kalp gelişimi için gerekli olmasına rağmen çeşitli kardiyovasküler hastalıklar ile de ilişkilendirilmiştir. Bilindiği gibi kalpte ana olarak kasılma fonksiyonuna sahip hücreler kardiyomiyosit hücreleridir ve kalp ağırlığının yaklaşık %85'ini oluşturmaktadır. Apoptoz, kardiyomiyosit kaybına yol açarak hayatı tehdit edebilecek

düzeyde kardiyak disfonksiyona neden olabilmektedir (Xia ve ark., 2016). Normal koşullarda sağlıklı bir kalpte apoptoz sık olarak görülmez (Chiong ve ark. 2011). Kalpte apoptozun indüklenmesi, kardiyomiyosit hücrelerinin ölümüne dolayısıyla kardiyak hasara yol açmaktadır (Moudgil ve Yeh, 2016).

Kanser tedavisinde kullanılan bir çok ilacın çeşitli mekanizmalar üzerinden apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Örneğin tirozin kinaz inhibitörlerinden Sunutinib'in kalp hücrelerinde apoptozu indükleyerek kardiyotoksisiteye yol açtığına ilişkin bulgular vardır. (Force ve Krause, 2007). Yine geniş spektrumlu antikanser ajanlardan Antrasiklerin de apoptoza sebep olarak kardiyomiyosit kaybı sonucu kardiyotoksik etkilere neden olduğu belirtilmiştir (Mondal ve ark., 2019).

Memelilerde, ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere iki ana apoptoz yolağı bulunmaktadır (Goldar ve ark., 2015). Ekstrinsik yolakta plazma membranında bulunan hücre ölüm reseptörleri ve kaspaz 8'in katalitik aktivasyonu önemli rol oynar. Ligandın hücre ölüm reseptörlerine bağlanmasından sonra sitoplazmada bulunan adaptör proteinler ve prokaspaz 8 devreye girer ve ölüm indükleyici sinyal kompleksi oluşur, prokaspaz 8 otokatalitik aktivasyonla aktif kaspaz 8'e dönüşür. Kaspaz 8'in aktive olması kaspaz 3'ün aktivasyonuna yol açar ve hücre ölümü gerçekleşir (Elmore, 2007). İntrinsik yolakta ise mitokondri önemli rol oynamaktadır. ROS, DNA hasarı, katlanmamış protein yanıtı gibi durumlar çeşitli pro-apoptotik proteinler aracılığı ile mitokondriyal permeabilizasyonun artmasına neden olur. Mitokondriyal permeabilizasyonun artması, mitokondriyal geçirgenlik geçiş kanalının oluşumu ve sitokrom c gibi proapoptotik proteinlerin mitokondriden sitozole salımına neden olur. Sitokrom c, sitozolde apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 ile birleşerek apoptozom kompleksini oluşturur. Apoptozomda prokaspaz 9 aktive hale getirilir, aktive kaspaz 9 bağlı apoptozom kaspaz 3'ü aktive hale getirir (Hotchkiss ve ark., 2009; Bernardi, 2013; D'Arcy, 2019). Kaspaz 3'ün aktive hale gelmesi hücrenin yaşaması için gerekli olan substratlarını parçalar ve hücrenin apoptotik ölümü gerçekleşir (Xia ve ark., 2016).

2.9. Isı Şok Proteini 70 (HSP70) ve Kardiyotoksisite

Isı şok proteini 70 (HSP70), yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanması ve birleştirilmesi, yanlış katlanmış proteinlerin yeniden katlanması, düzenleyici protein aktivitesinin kontrolü gibi hücrenin fonksiyonlarını sağlıklı bir şekilde gerçekleştirebilmesi için gerekli olan proseslerde görevlidir (Leu ve ark., 2009). Bu

görevlere ek olarak, hücre homeostazını, proliferasyonunu, farklılaşmasını ve ölümünü kontrol eden sinyal yollarında görevli proteinler ile de etkileşim halindedir. Bu etkileşim hücrede uygun olmayan bir olay olduğunda, bu sinyal yollarındaki proteinleri inaktif halde tutarak hücreler için koruyucu olarak görev yapar (Mayer ve Bukau, 2005).

HSP70 seviyesi stres olmayan koşullarda normal hücrelerde oldukça düşüktür. Protein konformasyonu ve stabilitesinin bozulmasına neden olan durumlarda HSP70 seviyesinin hızla arttığı görülmektedir. Ağır metaller, oksidatif stres, viral enfeksiyonlar, sıcaklık yükselmesi gibi durumlar HSP70'in indüklenmesine neden olmaktadır. HSP70'in strese karşı hatalı katlanmış proteinlerin yeniden katlanmasına, protein agregasyonun önlenmesine yardımcı olarak hücrede ölümcül sonuçlara yol açabilecek durumlarla başa çıkmak için indüklendiği düşünülmektedir. Mitokondriyal membran bütünlüğü ve kaspaz aktivasyonu gibi proseslerde etkili olan proteinlerin doğrudan etkileşimde olduğu HSP70'in apoptozda önemli bir regülatör olduğu da düşünülmektedir (Leu ve ark., 2009). Proteinlerin doğru katlanmasında, yanlış katlanan proteinlerin tekrar katlanmasında görevli HSP70'in normal koşullarda düşük düzeyde eksprese olurken stres anında ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (Afolayan ve ark., 2014).

Klinikte HSP70 seviyeleri ve bazı kardiyovasküler hastalıklar arasında ilişki bulunmuştur. Sınırdaki hipertansiyonu bulunan hastalarda serum HSP70 seviyelerinin arttığı, ayrıca serum HSP70 seviyesinin artması ile koroner arter hastalıklarının düşük oranda görülmesi arasında bir ilişki olabileceği saptanmıştır (Zhu ve ark., 2003; Pockley ve Henderson, 2018). Ek olarak; dolaşımda bulunan HSP70 seviyeleri ile hipertansiyon tanısı alan hastalarda ateroskleroz riskinin tahmin edilebileceği ileri sürülmüştür (Pockley ve ark., 2003).

2.10. Glukoz ile Regüle Edilen Protein 94 (GRP94) ve Kardiyotoksisite

Glukoz ile Regüle Edilen Protein 94 (GRP94), sitozolik HSP90 ailesinin homolog formudur, endoplazmik retikulumda bulunmaktadır (De Maio ve Vazquez, 2013). GRP94 moleküler şaperon gibi davranarak proteinlerin katlanmasında, hatalı katlanan proteinlerin endoplazmik retikulum aracılı yıkımının hedeflenmesinde ve dolayısıyla homeostazın sağlanmasında görev almaktadır (Zhu ve Lee, 2015). Endoplazmik retikulumda hatalı proteinlerin yeniden katlanmasına yardımcı olmaktadır.

Endoplazmik stres durumunda GRP94'ün ekspresyonunun artmasının, endoplazmik retikulum stresini ortadan kaldırarak kardiyomiyosit hücreleri için koruyucu etki yaptığı gösterilmiştir (Vitadello ve ark., 2003; Minamino ve ark., 2010). Ayrıca iskemi/reperfüzyon hasarının da etkilerini azaltabileceği düşünülmüştür (Martindale ve ark., 2006). Diğer yandan doğal kaynaklı maddelerin GRP94 ekspresyonunu düşürerek, endoplazmik retikulum stresini ortadan kaldırdığı ve kalpte koruyucu etki oluşturduğu söylenmektedir (Choy ve ark., 2018).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması İ.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Hücre Kültür Laboratuvarı ve Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi. Mitokondri membran potansiyeli tayini için Marmara Üniversitesi Genetik ve Metabolik Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden hizmet alımı yapıldı. Elektron mikroskobu çalışmaları Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden hizmet alımı ile gerçekleştirildi.

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Akrilamid	Affymetrix
Amfoterisin	Multicell-Wisent
Amonyum persülfat	Affymetrix
Asetik asit	Merck
Blotlama kağıdı	Biorad
Developer solüsyonu	Impact
Dimetil sülfoksit (DMSO)	BioShop
DMEM:F12 besiyeri	Gibco
Etanol	Merck
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	Multicell-Wisent
Fetal bovin serum (FBS)	Gibco
Fixer solüsyonu	Konix
Glisin	BioShop
GRP94 primer antikoru	Santa Cruz, sc-32249
Hidroklorik asit (HCl)	Merck
HRP konjugatı anti-mouse sekonder antikor	Santa Cruz, sc-2005
HRP konjugatı anti-rabbit sekonder antikor	Santa Cruz, sc-2004
HRP konjuge β -aktin primer antikoru	Santa Cruz, sc-47778
HSP70 primer antikoru	Santa Cruz, sc-32239
İzopropil alkol	Merck

JC-1 boya	Thermo Scientific
LDH sitotoksosite kiti	Roche Life Sciences
LONP1 primer antikoru	Cell Signaling, 28020S
Metanol	TekKim
N,N' metilen bisakrilamid	Affymetrix
Nitroselüloz transfer membranı (0,22 µm)	Chem-Cruz sc-3718
Nupage LDS örnek yükleme tamponu (4X)	İnvitrogen, NP0008
Nupage redükleme ajanı (10X)	İnvitrogen, NP0009
Oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) primer antikor kokteyli	Abcam, ab110413
PBS (10x)	Multicell-Wisent
Penisilin/Streptomisin	Gibco
Polivinilidın florür (PVDF) membran (0,22 µM)	Thermo Scientific, 88520
Ponceau S	Chem-Cruz
Prokaspaz 3 primer antikoru	Santa Cruz, sc-98785
Primer çiftleri	Sentromer DNA Teknolojileri
Protein markeri	Thermo Scientific, 26619
Regorafenib	Chem Cruz, sc-477163
RIPA lizis buffer sistem	Chem Cruz, sc-24948A
Sitokrom c primer antikoru	Santa Cruz, sc-13156
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Chem-Cruz
Sodyum klorür (NaCl)	Multicell-Wisent
Syber green	Thermo Scientific
Tetrametiletildiamin (TEMED)	Affymetrix
Tripan mavisi	Gibco
Tripsin	Multicell-Wisent
Tris baz	Multicell-Wisent
Triton X-100	Merck
Tween 20	Chem-Cruz
UCP2 primer antikoru	Cell Signaling, 89326S
X-ray filmi	Fuji film

Yağsız süt tozu

BioShop

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kitler

ATP kontent ölçüm kiti	Invitrogen 1892095
BCA protein assay kiti	Intron Biotechnology- 21410548
DNA izolasyon kiti	Intron Biotechnology
First Strand cDNA sentez kiti	Roche, 04896866001
High Pure RNA izolasyon kiti	Roche, 11828665001
Kemilüminesans substrat kit	Thermo Scientific- 34577
LDH sitotoksosite kiti	Roche, 04 744 934 001

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Aletler

8 kanallı otomatik dispenser pipet (0,5-10 µL)	Ependorf
8 kanallı otomatik dispenser pipet (30-300 µL)	Ependorf
-80 °C Dondurucu	Daihan -Scientific Wisecry
Akım sitometrisi	Becton Dickinson, FACSCalibur
Ayarlanabilir Otomatik Pipetler (1-2,5 µL; 1-10 µL 10-100 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)	Ependorf
Blok ısıtıcı	Stuart
CO ₂ 'li inkübatör	Thermo Scientific Heracell
Çalkalayıcı	Stuart-SSMI
Dikey elektroforez sistemi ve ıslak blotlama sistemi	Bio-Rad, Mini PROTEAN 1658030
Faz-kontrast invert mikroskop	Olympus CKX4
Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR) döngü cihazı	Stepone plus
Güç Kaynağı	Bio-Rad, PowerPac
Hassas terazi	Precisa XB 220A

Laminar kabin	Tezsan
Mikroplaka okuyuculu multimod	Perkin Elmer, EnSpire
Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre	Biotek Epoch
Mini orbital çalkalayıcı	Biosan
No Frost Buzdolabı	Arçelik
No Frost Buzdolabı	Arçelik
Otoklav	Hirayama HV-50L
Otomotik pipetör	Ependorf
pH metre	Hanna HI 1131 B
Soğutmalı mikro santrifüj	Hettich Micro 200 R
Soğutmalı santrifüj	Hettich micro Universal 32R
Spin santrifüj	Labnet C1301B
Termal döngü cihazı	Axygen Therm-1000
Ultra saf su cihazı	Milipore Gradient
Ultrasonikatör	Elma (Transsonic T460/H)
Vorteks	NC 28405-Ika
X-ray fil görüntülem kaseti	Fuji film
No Frost Buzdolabı	Arçelik
-80 °C Dondurucu	Daihan -Scientific Wisecry

3.2. Yöntem

3.2.1. H9c2 Kardiyomiyoblastik Hücre Hattının Stoklanması ve Stoklanan Hücrelerin Açılması

H9c2 hücreleri hücre kültürü kaplarında büyütüldükten sonra ara pasaj numaraları ile stoklandı. Bunun için hücreler tripsin yardımıyla kaldırılıp 15 ml'lik falkonda toplandı ve 1500 rpm'de santrifüj edildi. Üst faz atıldı, hücre pelleti üzerine yaklaşık 1×10^6 /mL olacak şekilde %5 DMSO içeren besiyeri ilave edildi, pipetleme yapılarak karıştırıldı ve kriyo viallere aktarıldı, sıvı azot tankına kaldırılarak saklandı.

Dondurulmuş hücreler açılmadan önce hücre büyütmede kullanılacak besiyeri 37 °C'de ısıtıldı. Sıvı azot tankından alınan hücreler çözöldükten sonra kriyo viallerden 15 mL'lik falkona aktarıldı ve hücre süspansiyonu üzerine yavaş yavaş taze besiyeri ilave edildi. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Hücre pelleti üzerine taze besiyeri ilave edilip, pipetleme yapılarak hücreler süspande edildi ve steril hücre kültürü kaplarına ekildi.

3.2.2. Regorafenib Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

3.2.2.1. 100 mM Regorafenib Stok Çözeltilisinin Hazırlanması

24 mg Regorafenib 497,079 μ L DMSO'da çözündürüldü, 100 μ L'lik porsiyonlanarak -20 °C'de saklandı.

3.2.2.2. 10 mM Regorafenib Stok Çözeltilisinin Hazırlanması

100 mM Regorafenib stok çözeltisinden 10 μ L alındı üzerine 90 μ L DMSO ilave edildi, -20 °C'de saklandı.

3.2.3. Hücrelere İlaç Maruziyetlerinin Uygulanması

Uygun sayıda ekilen hücreler flaska/kuyucuklara tutunduktan sonra, üzerlerine 10 mM Regorafenib stok çözeltisinden son konsantrasyon 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M olacak şekilde Regorafenib eklendi. Maruziyetler sırasında kuyucuklardaki DMSO konsantrasyonunun %1'i aşmamasına dikkat edildi. Kontrol grubuna, maruziyet grupları ile aynı oranda DMSO içermesi için %1 DMSO uygulandı. Maruziyet sürelerinin sonunda hücreler deneyin amacına uygun olarak toplandı ve deneyler gerçekleştirildi.

3.2.4. Tripan Mavisi Sitotoksikite Testi

Deneyin Esası

Tripn mavisi, mavi renkte hidrofilik bir azo boyasıdır. Membran bütünlüğü bozulmamış, canlı hücreler tripn mavisi boyasını hücre içine almazken, membran bütünlüğü bozulmuş, ölü hücrelerde bozulmuş hücre membranından boyanın hücre içerisine girmesi esasına dayanır. Işık mikroskobu ile incelendiğinde; canlı hücrelerin sadece membranları mavi renkli gözlenirken, ölü hücreler tamamıyla mavi renge boyanmış halde gözlenirler (Strober, 1997).

Deneyin Yapılışı

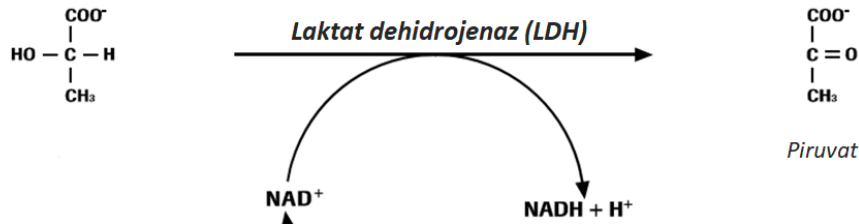
Hücreler, 24 kuyucuklu plakaya 5×10^4 konsantrasyonda olacak şekilde ekildi ve yapışması için inkübasyona bırakıldı. Hücrelere 500 μ L besiyeri içerisinde kuyucuklardaki son konsantrasyon 20 μ M, 10 μ M ve 5 μ M olacak şekilde Regorafenib maruziyeti yapıldı. 48 saat ve 72 saat maruziyet süreleri sonunda besiyeri uzaklaştırıldı, her kuyucuk 1X PBS ile yıkandı, hücreler tripsin ile kaldırılarak toplandı ve 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üst faz atıldı, hücreler 1 mL 1X PBS'te süspande edildi. Ardından hücre sayımı ışık mikroskobunda, Thoma lamı (hemositometre) adı verilen 1

mm² alana ve 0,1 mm derinliğe sahip 4×16 küçük kareden oluşan özel sayım lamaları kullanılarak gerçekleştirildi. 4x16 küçük kareye düşen ölü ve canlı hücreler sayıldı. Sayılan 4 alanın ortalaması alındı ve % canlılık hesaplandı.

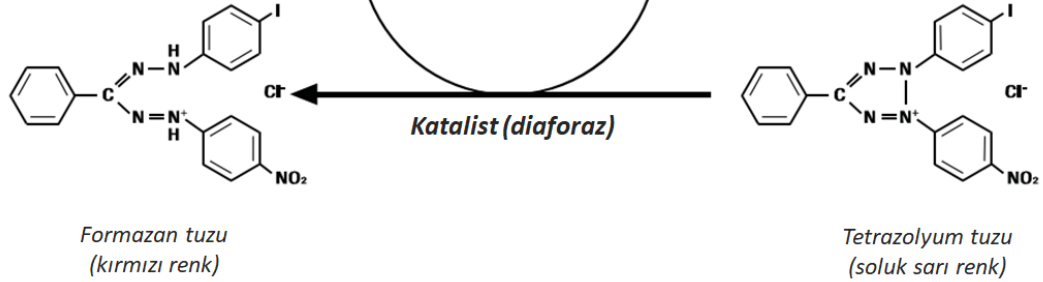
3.2.5. Laktat Dehidrojenaz (LDH) Sitotoksisite Testi

LDH enzimi, fizyolojik koşullarda sitozelde bulunan bir enzimdir. Bu enzim membran hasarı olan hücrelerden dışarı salınmaktadır (Wang ve ark., 2012). Hücre canlılığı süpernatantta LDH aktivitesinin ölçülmesi ile kolorimeterik olarak 2 basamaklı reaksiyon sonucunda değerlendirilmektedir. İlk basamakta laktat LDH enzimi ile piruvate dönüştürülür, bu esnada NAD⁺ NADH/H⁺'ya redüklenir. İkinci aşamada katalist (diaforaz) NADH/H⁺'den H/H⁺'yı INT (2-[4-iodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-feniltetrazolyum klorür) tetrazolyum tuzuna (soluk sarı renk) transfer eder ve formazan tuzuna (kırmızı renk) redükler (Şekil 3-1).

1. basamak



2. basamak



Şekil 3-1: Laktat dehidrojenaz (LDH) enzim aktivitesinin ölçülmesi

Kit İçeriği

Katalist: Diaforaz/NAD⁺ karışımı (Liyofilize toz)

Boya solüsyonu: Iodotetrazolyum klorür (INT) ve sodyum laktat

Durdurma solüsyonu: 1 N HCl

Lizis solüsyonu: Triton X-100

Deneyde Kullanılan Kimyasallar

Katalistin hazırlanması: 1 mL bidistile suda çözüldü, -20 °C’de saklandı.

Reaksiyon karışımının hazırlanması: 100 test için 250 µL katalist solüsyonu 11,25 mL boya solüsyonu ile karıştırıldı. Kullanılacak miktar yapılacak test sayısına göre ve kullanmadan hemen önce hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

Hücreler, 96’lık mikropalakaya $7,5 \times 10^3$ konsantrasyonda olacak şekilde ekildi ve yapışması için inkübasyona bırakıldı. İlaç maruziyetleri Bölüm 3.2.3’te anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. 48 ve 72 saat maruziyet yapıldı Maruziyet süresi sonunda pozitif kontrol olarak kullanılacak kuyucuklara 5 µL lizis tamponu ilave edildi, karıştırıldı ve 5 dk 37 °C’de inkübe edildi. Yüzeyden kalkmış olan hücrelerin çöktürülmesi amacıyla 96 kuyucuklu plaka 250 g’de 5 dk santrifüj edildi. Ardından 100 µL süpernatant temiz 96’lık plakaya alındı, süpernatant üzerine 100 µL taze hazırlanan reaksiyon karışımı ilave edildi. 25 dk karanlıkta, oda sıcaklığında inkübe edildi, ardından tüm kuyucuklara durdurma solüsyonu ilave edildi ve absorbands 490 nm dalga boyunda mikropalaka okuyuculu spektrofotometre ile ölçüldü. Hücre canlılığı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

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

3.2.6. MTT Hücre Proliferasyonu Testi

Deneyin Esası

MTT testinin esası; canlı ve mitokondriyal fonksiyonu bozulmamış hücrelerin MTT bileşiğindeki tetrazolyum halkasını mitokondriyal süksinat dehidrojenaz enzimi ile suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüştürülmesi ve bu kristallerin uygun çözücüler ile çözülmesi sonucu oluşan renk şiddetinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile hücre canlılığının belirlenmesidir (Mosmann, 1983).

Deneyde Kullanılan Kimyasallar

Negatif Kontrol Çözeltilisi: DMSO

Pozitif Kontrol Çözeltilisi: 100 µL Triton X-100 üzerine 900 µL 1X PBS ekledi ve -20 °C’de saklandı.

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

Deneyin Yapılışı

Hücreler, 96'lık mikropalakaya $7,5 \times 10^3$ konsantrasyonda olacak şekilde ekildi ve yapışması için inkübasyona bırakıldı. İlaç maruziyetleri Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. 48 ve 72 saat maruziyet süresi sonrasında besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Kuyucuklara 100 μ L taze besiyeri dağıtıldı ve üzerine 20 μ L MTT çözeltisi eklendi. MTT çözeltisinin homojen bir şekilde dağılması için mikropalaka 2 dk 150 rpm ile çalkalandı ve 3 saat süreyle %5 CO₂ içeren 37 °C'deki inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda MTT içeren besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Kuyucuklara formazan kristallerinin çözünmesi için 100 μ L DMSO eklendi, mikropalaka 150 rpm ile 10 dk çalkalandı. Oluşan renk şiddeti (OD) 590 nm dalga boyunda mikropalaka okuyuculu spektrofotometre ile ölçüldü.

İlaçların hücre proliferasyonuna etkisi kontrole kıyasla aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

% Hücre proliferasyonu: (negatif kontrol OD₅₉₀ $\times$ 100)/örnek OD₅₉₀

3.2.7. Hücre İçi ATP Miktarı

Deneyin Esası

Lusiferinin ATP varlığında, Lusiferaz enzimi yardımıyla, Mg²⁺ katalizörlüğünde luminesans meydana gelmesi esasına dayanır (Şekil 3-2) (Fan ve Wood, 2007).



Şekil 3-2: Luminesans oluşumu

Lusiferaz ve bu enzimin substratı olan lusiferin, hücrelerde bulunan ATP aracılığıyla luminesans oluşumunu sağlar (Fan ve Wood, 2007; Riss ve Moravec, 2006). 61 kDa ağırlığındaki lusiferaz enzimi, öncelikle lusiferin ile ATP'yi birbirine bağlayarak lusiferil-AMP ara ürününü meydana getirir. Bu ürün ise magnezyum iyonları varlığında, oksijen ile reaksiyona girerek oksitlenir ve eksite enerji düzeyindeki bir bileşik olan oksilusiferine dönüşür. Oksilusiferin, kararlı enerji düzeyine dönerken fazla enerjisini foton olarak yayar ve sarı-yeşil renkte ışık oluşturarak 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir.

Kit İçeriği

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

Komponent B: Ateş böceği rekombinant lusiferaz (25 mM Tris asetat’taki 5 mg/ml çözeltisi (PH:7,8), 0.2 M amonyum sülfat, %15 (h/h) gliserol ve %30 (h/h) etilen glikol)

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

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

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

Kullanılan Kimyasallar

Lizis Tamponu: 200 mM Tris (PH:7,5), 2 M NaCl, 20 mM EDTA, %0,2 Triton-X-100, %1 DTT

Kimyasal maddeler tartılıp, 7 mL suda çözöldü, çözelti 10 mL’ye tamamlandı. Çözelti 2’şer mL’lik porsiyonlanarak -20 °C’de saklandı.

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

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

Pozitif Kontrol: 200 µM H₂O₂ çözeltisi

Deneyin Yapılışı

Hücreler, 24 kuyucuklu plakaya 5x10⁴ konsantrasyonda olacak şekilde ekildi ve yapışması için inkübasyona bırakıldı. Hücrelere 800 µL besiyeri içerisinde kuyucuklardaki son konsantrasyon 20 µM, 10 µM ve 5 µM olacak şekilde Regorafenib maruziyeti yapıldı. 48 saat ve 72 saat maruziyet süreleri sonunda besiyeri uzaklaştırıldı, her kuyucuk 1X PBS ile yıkandı. Ardından 30 µL/kuyucuk lizis tamponu eklendi ve 5 dk boyunca çalkalanarak oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu süre sonunda örnekler için her kuyucuktan 8 µl, standartlar için her konsantrasyondan 8 µl alınıp floresan ölçüme uygun platelere konuldu ve üzerine taze hazırlanmış 92 µl standard reaksiyon çözeltisi eklenip karıştırıldı. Ardından 560 nm emisyonunda ölçöldü. ATP standartlarından standart eğri çizildi, standart eğri denkleminde her bir örnekteki ATP miktarı hesaplandı. Kontrolün ATP içeriğı %100 kabul edilip, diğör örneklerdeki %ATP içeriğı hesaplandı.

3.2.8. Mitokondri Membran Potansiyeli

Deneyde Kullanılan Kimyasallar

0,2 mM JC-1 (tetraetilbenzimidazolkarbosiyanid iyodür) stok boya çözeltisi

Deneyin Esası

JC-1 mitokondri depolarizasyonunun belirlenmesinde kullanılan, mitokondride biriken katyonik bir boyadır. Normal fizyolojik şartlarda, JC-1 boyası mitokondrilerde mitokondri membran potansiyeli bağımlı birikerek, agregatlar oluşturur ve kırmızı floresan özellik gösterir. Mitokondri membran potansiyelinin bozulması durumunda JC-1 boyası mitokondride birikip agregat oluşturamaz, monomer halde kalır ve yeşil floresan özellik gösterir (Cossarizza ve Salvioli, 2000)

Deneyin Yapılışı

Hücreler 25 cm²'lik flasklara her flaskta $2,5 \times 10^5$ konsantrasyonda olacak şekilde ekildi. Hücrelere 5 mL besiyeri içerisinde flask içerisindeki son konsantrasyon 20 μ M, 10 μ M ve 5 μ M olacak şekilde Regorafenib maruziyeti yapıldı. 48 saat ve 72 saat maruziyet süreleri sonunda, hücreler tripsin ile kaldırılarak toplandı ve 5 dk 1500 rpm'de santrifüj edildi. Ardından hücre pelleti üzerine 1X PBS eklendi ve hücreler süspande edilip FACS tüplerine alındı ve 5 dk 1500 rpm'de santrifüj edildi. Ardından hücrelere son hacimde 2 μ M konsantrasyonda boya olacak şekilde JC-1 stok çözeltisi eklendi. 37 °C'de CO₂'li ortamda 15 dk karanlıkta bekletildikten sonra tekrar 500 μ l 1X PBS ile sulandırılarak akış sitometrisinde FL1 (yeşil floresan-eksitasyon 488 nm, emisyon 530 nm) ve FL2 (kırmızı floresan-eksitasyon 488 nm, emisyon 585 nm) panelinde ölçüldü. Elde edilen sonuçlar FlowJo v10 programı ile analiz edildi. Sonuçlar, analiz sonucu elde edilen dot-plot grafiğinde kırmızı ve yeşil floresans yüzdesi olarak gösterildi.

3.2.9. RNA Düzeyinde Gen İfadesi Analizi

3.2.9.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu ticari olarak satışta bulunan High Pure RNA Isolation Kit kullanılarak üretici firmanın belirlediği protokole uygun olarak gerçekleştirildi.

Kit İçeriği

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

DNaz I (Rekombinant, Liyofilize): 10 KU liyofilize DNaz I

550 µL elüsyon tamponunda çözöldü, porsiyonlanarak -20°C’de saklandı.

DNaz İnkübasyon Tamponu: 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (PH:7,0)

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

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

Elüsyon Tamponu: PZR kalite su

Filtreli ve Toplama tüpü

DNaz I hariç tüm kit içeriği oda ısısında saklandı.

Deneyin Yapılışı

1x10⁶ hücre 75 cm²’lik hücre kültürü flasklarına ekildi, yapışması için inkübe edildi ve 3.2.3.’te belirtildiği şekilde 48 ve 72 saat süreyle hücrelere ilaç maruziyeti yapıldı. Maruziyet sürelerinin sonunda hücreler tripsin ile kaldırıldı ve 15 mL’lik falkon tüplerine aktarılıp 1500 rpm’ de 5 dk santrifüj edildi. Ardından hücre pelleti üzerine 200 µL içinde 1X10⁶ hücre olacak şekilde soğuk 1X PBS eklendi, pipetleme yapılarak hücreler süspande hale getirildi.

200 µL hücre süspansiyonu üzerine 400 µL lizis tamponu eklendi, karıştırıldı. Karışım, kit içerisinde bulunan toplama tüpü ve filtreli tüp birleştirildikten sonra filtreli tüpe aktarıldı ve 8000 g’de 15 saniye (sn) santrifüj edildi, toplama tüpündeki elüat atıldı. Steril bir ependorfta 90 µL DNaz I inkübasyon tamponu ve 10 µL DNaz karıştırılıp filtreli tüpteki kartuşların yüzeyine denk gelecek şekilde konuldu, oda ısısında 15 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra filtreli tüpe 500 µL yıkama tamponu I eklendi ve 8000 g’de 15 sn santrifüj edilip toplama tüpündeki elüat atıldı. Ardından kartuşun üzerine 500 µL yıkama tamponu II eklendi, 8000 g’de 15 sn santrifüj edildi ve toplama tüpündeki sıvı atıldı. Daha sonra filtreli tüpteki kartuşa 200 µL yıkama tamponu II eklenip 13000 g’de 2 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü içerisinde toplanan sıvı atılıp filtreli tüp steril 1,5 mL’lik temiz ependorf ile birleştirildi. Filtreli tüpteki kartuşun üzerine 50 µL elüsyon tamponu eklendi ve 8000 g’de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen elüat deneylerde miktarı ölçöldükten sonra cDNA sentezinde kullanıldı, kalan kısım -80 °C’de saklandı.

3.2.9.2. Hücre Lizatlarından Elde Edilen RNA’ların Miktarlarının ve Safılıklarının Ölçölmesi

RNA saflık ve miktarlarını belirlemek için izole edilen RNA’lar Take-3 plate kullanılarak mikropłaka okuyuculu spektrofotometrede 260 ve 280 nm’de ölçöldü. 260

nm’de elde edilen ölçümler RNA miktarının belirlenmesinde kullanıldı. İzole edilen RNA’ların saflığı ise A_{260}/A_{280} oranına göre değerlendirildi, bu değer 1,8-2 arasında olan RNA’lar saf olarak değerlendirildi. Ardından cDNA sentezine başlandı.

3.2.9.3. cDNA Sentezi

cDNA sentezi, ticari olarak satışta bulunan Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit ile totalde 1000 ng olacak şekilde, üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Kit İçeriği

Transkriptör Revers Transkriptaz: 200 mM potasyum fosfat, 2 mM ditiyotritol, %0,2 Triton X-100, %50 gliserol (pH 7,2)

Transkriptör Revers Transkriptaz Reaksiyon Tamponu (5X): 250 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 40 mM MgCl₂ (pH 8,5)

RNaz İnhibitörü: 20 mM Hepes-KOH, 50 mM KCl, 8 mM ditiyotritol, %50 gliserol (pH 7,6)

Deoksinükleotid Karışımı: 10 mM, dATP, dGTP, dCTP, dTTP

Anchored-oligo (dT)18 Primer

Random Hekzamer Primer

Kontrol RNA

Kontrol Primer, İnsan Porfobilinojen Deaminaz (PBGD) Karışımı: PBGD için 5 µM ileri (F) ve geri (R) primer

PZR Kalite Su

Deneyin Yapılışı

Miktarı belirlenen RNA örnekleri su ile seyreltilerek 1000 ng’a eşitlendi. Buz üzerinde steril, nükleaz içermeyen PZR tüpüne 1000 ng total RNA örneği, 1 µL Anchored oligo, 2 µL Random hekzamer primer eklendi, son hacim PZR kalite su kullanılarak 13 µL’ye tamamlandı, dikkatlice karıştırıldı ve spin yapıldı. Örnekler termal döngü cihazında primer karışımını denatüre etmek için 65 °C’de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası örnekler buza alınıp üzerine 4 µL transkriptör revers transkriptaz reaksiyon tamponu 0,5 µL RNaz inhibitörü, 2 µL deoksinükleotid karışımı, 0,5 µL transkriptör revers transkriptaz eklendi, dikkatlice karıştırıldı, spin yapıldı ve cDNA sentezi için termal döngü cihazında 55 °C’de 30 dk inkübe edildi. Süre sonunda revers transkriptaz enziminin inaktive edilmesi için örnekler 85 °C’de 5 dk inkübe

edildi, ardından örnekler buz üzerine alınıp reaksiyon durduruldu. Sentezlenen cDNA'lar -20 °C' de saklandı.

3.2.9.4. Gen Ekspresyonunun Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Belirlenmesi

48 saat ve 72 saat süre ile 5 µM, 10 µM, 20 µM Regorafenib'e maruz kalan kardiyomyoblastik hücrelerdeki belirlenen genlerin ekspresyonunun belirlenmesi için primer sentezi yapıldı, ardından ticari olarak satışta bulunan 2X PowerUp Syber Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak, üretici firmanın kullanma talimatı doğrultusunda çalışıldı.

Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Çalışmalarında Kullanılacak Primerlerin Seçilmesi

Çalışılacak gene özgü primerler, Rattus norvegicus data bankası kullanılarak NCBI-Primer Blast veya Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) programları ile gerçekleştirildi. Primerlerin *in siliko* ortamda ilgilenilen mRNA'ya spesifik olarak çoğalıp çoğalmadığı Santa Cruz Kaliforniya Üniversitesi'nin (UCSC) *in siliko* PZR arayüzü (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) kullanılarak kontrol edildi. Hedef mRNA'ya özgü çoğalan primelerin saç tokası ya da dimer yapıp yapmadığı Northwestern Üniversitesi'nin online OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) ve Sequence Manipulation Suite (SMS) (https://www.genscript.com/sms2/pcr_primer_stats.html) programı ile belirlendi. Gerçek zamanlı PZR çalışmaları için saç tokası ya da dimer yapmayan primer çiftleri seçildi.

3.2.9.5. Gerçek Zamanlı PZR

Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR deneyi ticari olarak satışta 2X PowerUp Syber Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak üretici firmanın kullanma talimatına uygun olarak gerçekleştirildi.

Deneyin Esası

Gerçek zamanlı PZR yöntemi, floresan işaretli prob veya boyalar kullanılarak, PCR ürününün çoğalmasını eş zamanlı görünür hale getiren bir yöntemdir (Bustin, 2000).

Kit içeriği

2X PowerUp Syber Green Master Mix

Gene Özgü F ve R primerler: Gen ekspresyonu çalışmalarında çalışmalarında kullanılan primer çiftleri Tablo 3-1’de verilmiştir.

RNaz İçermeyen Su

Tablo 3-1: Gen Ekspresyonu çalışmalarında kullanılan primer çiftleri

Gen Adı	5'- 3'primer dizisi	Erime Derecesi (°C)
MFN1	F:AGAATTTTCCTTGGGCTCCAT	59,9
	R:AGAAAGGAGGTGGACGGTTT	60,0
MFN2	F:GTGACTGGACTCCCCAGAAA	60,1
	R:ATCACAATGCCAGACACCAA	60,0
DRP1	F:GTAGGTGATCAGCCCAAGGA	60,1
	R:CATCTGGATCTACCTCTCTGGAA	59,7
FIS1	F:AAATGATGCTACGCAGGCTT	59,9
	R:CCTGGACCATGACCAAGTTT	59,8
OPA 1	F:GCATCTGGTTTCCCGAAGTA	60,1
	R:GAGCCTTGCAGCTAACCTTG	60,2
SOD2	F:CCTGACTATCTGAAAGCCATTTGG	63,2
	R: CACAGTGCTGCAATGCTCTACAC	63,2
β -aktin	F:ATGGTGGGTATGGGTCAGAA	60,0
	R:CTTTTCACGGTTGGCCTTAG	59,7

Deneyin Yapılışı

Her bir örnek için 5 μ L 2X PowerUp Syber Green Master Mix, 500 nM forward ve reverse primer ve su olacak şekilde örnek sayısına uygun olarak hazırlandı, çalışılacak cihaza uygun olarak satın alınan 96 kuyucuklu mikropalakaya 8 μ L/kuyucuk olacak şekilde dağıtıldı. Ardından her bir kuyucukta 10 ng cDNA olacak şekilde hazırlanan örneklerden 2 μ L/kuyucuk ilave edildi, karıştırıldı ve spin yapıldı. Ardından cDNA’lar Tablo 3.2’de belirtilen programa uygun olarak, 40 döngü Stepone Plus Cihazı kullanılarak çoğaltıldı.

Tablo 3-2: Gerçek zamanlı PZR için uygulanan protokol

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
UDG (urasil DNA glikozilaz) aktivasyonu	50 °C	2 dk	—

Dual-Lock DNA polimeraz	95 °C	2 dk	—
Denatürasyon	95 °C	15 sn	40
Primerlerin bağlanması ve zincirin uzaması	60 °C	1 dk	40

Gen ifadesindeki değişimler cihaz tarafından belirlenen Ct (cycle treshold) değeri kullanılarak hesaplandı. Her bir örnek için, hedef genin Ct değeri referans gen olarak kullanılan β -aktin'in Ct değerine normalize edilerek ΔCT değerleri hesaplandı. Hedef genlerin maruziyet grubu ΔCT değerleri aynı genlerin deney kontrol grubunun ΔCT değerinden çıkarılarak $\Delta\Delta CT$ değeri ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri hesaplandı (Livak ve Schmittgen, 2001). Maruziyet gruplarının gen ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre normalize edilerek relatif gen ekspresyon seviyeleri hesaplandı.

3.2.10. Protein Ekspresyon Analizi

3.2.10.1. Protein İzolasyonu

Hücreden proteinlerin izolasyonu RIPA lizis tampon kiti kullanılarak üretici firmanın vermiş olduğu kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

Kit İçeriği

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

Viya 2: 200 mM Fenilmetilsülfonil florür (PMSF), DMSO'da çözündürülmüş

Viya 3: Proteaz inhibitör kokteyli, DMSO'da çözündürülmüş

Viya 4: 100 mM Sodyum ortovanadat, suda çözündürülmüş

Her 1 ml 1x lizis tamponu için 10 μ L PMSF, 15 μ L proteaz inhibitör kokteyli ve 10 μ L sodyum orthovandanat eklenip karıştırıldı.

Deneyin Yapılışı

Hücreler 75 cm²'lik hücre kültürü flasklarına 1×10^6 konsantrasyonda olacak şekilde ekildi. Hücreler yüzeye tutunduktan sonra hücrelere flasklardaki son konsantrasyon 5, 10 ve 20 μ M olacak şekilde ilaç maruziyeti uygulandı. 48 ve 72 saatlik maruziyet sürelerinin sonunda hücreler tripsin ile kaldırılıp toplandı, 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp, hücre pelleti üzerine yıkama yapmak amacıyla 1X PBS ilave edilip pipetleme yapılarak hücreler süspansiyonunda edildi ve hücre süspansiyonu 1,5 mL'lik ependorfa alındı ardından 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.

Üst faz uzaklaştırılıp hazırlanan RIPA lizis tamponu eklendi ve pipetleme yapılarak karıştırıldı ardından 15 dk buz üstünde bekletildi. 15 dk sonra -80 °C’de 3 kez dondurulup çözüldü ve DNA ve RNA’nın uzaklaştırılması için 3 kere 30 sn ultrasonik banyoda tutuldu ve 14000 g’de 15 dk santrifül edildi. Üst faz temiz ependorflara porsiyonlandı ve -80 °C’de saklandı.

3.2.10.2. Hücre Lizatlarından İzole Edilen Proteinlerin Miktarının Ölçülmesi

Hücre lizatlarından izole edilen proteinlerin miktarlarının ölçülmesi için BCA Protein Tayin Kit’i üretici firmanın protokolü doğrultusunda kullanıldı.

Deneyin Esası

Yöntem, Cu^{2+} iyonlarının alkali ortamda proteinler tarafından Cu^{1+} e indirgenmesi ve Cu^{1+} iyonlarının bişinkoninik asit (BCA) ile oluşturduğu kompleksin renk şiddetinin 562 nm’de spektrofotometrik olarak tayini esasına dayanmaktadır. Oluşan renk protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Smith ve ark., 1985).

Kit İçeriği

BCA Reaktif A

BCA Reaktif B

2 mg/mL Bovin Serum Albumin

Standartların hazırlanması için kit içerisinde bulunan 2 mg/mL Bovin Serum Albumin bidistile su ile seyreltilerek üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlanarak kullanıldı. Reaktif A ve Reaktif B 50:1 oranında iyice karıştırılarak çalışma çözeltisi hazırlandı. Standartlar ve örneklerden 10 μL alınarak 96 kuyucuklu mikropalakaya konuldu, standart ve örneklerin bulunduğu kuyucuklara 200 μL çalışma çözeltisi ilave edilip pipetleme yapılarak karıştırıldı, mikropalaka 37 °C’de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra oluşan renk 562 nm’de mikropalaka okuyuculu spektrofotometre ile ölçüldü ardından standart eğri denkleminde izole edilen protein miktarları hesaplandı.

3.2.10.3. Belirlenen Proteinleri Western Blot Yöntemi ile Analizi

Deneyin Esası

Elektroforez ile jelde ayrımı yapılan proteinlerin çeşitli yöntemler ile membrana transferi ve ilgili proteine özgü işaretlenmiş antikorlar kullanılarak protein

ekspresyonunun yarı kantitatif olarak belirlenmesi esasına dayanır (Mahmoud ve Yang, 2012).

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi İçin Kullanılan

Kimyasallar

Akrilamid Jeller İçin Kullanılan Kimyasallar

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8): 18,2 g Triz baz 90 mL bi-distile su ile çözüldü. Çözeltinin pH'ı %37'lik HCl ile 8,8'e ayarlandı. bi-distile su ile 100 mL'ye tamamlandı ve +4 °C'de saklandı.

1 M Tris-HCl (pH 6,8): 12,1 g Triz baz 90 mL bi-distile su ile çözüldü. Çözeltinin pH'ı %37'lik HCl ile 6,8'e ayarlandı. bi-distile su ile 100 mL'ye tamamlandı ve +4 °C'de saklandı.

%10 SDS: 1 g SDS bi-distile su ile çözülerek 10 mL'ye tamamlandı.

%10 APS: 0,11 g APS 1 mL bi-distile su ile her deney öncesi taze olarak çözüldü.

%30'luk Akrilamid-Bis akrilamid çözeltisi

TEMED

Deneylerde Kullanılan Jellerin Hazırlanması

Yürütme Jeli (%12)

Bi-distile su ----- 3,3 mL

1,5 M Tris-HCl (PH: 8,8) -----2,5 mL

Akrilamid-bisakrilamid çözeltisi (%30) ----- 4 mL

%10 SDS ----- 100 µL

%10 APS ----- 100 µL

TEMED ----- 8 µL

Ayrırma Jeli (%5)

Bi-distile su ----- 2,7 mL

1 M Tris-HCl (PH: 6,8) ----- 500 µL

Akrilamid-bisakrilamid çözeltisi (%30) ----- 670 µL

%10 SDS ----- 40 µL

%10 APS ----- 40 µL

TEMED ----- 8 µL

İlk olarak 1,5 mm'lik SDS-PAGE jel camlarının alt kısmına yaklaşık 6 cm yüksekliğe kadar yürütme jeli döküldü. Jel polimerize olduktan sonra ayırma jeli döküldü ve 10/15 kuyucuklu taraklar takıldı.

Yürütme Tamponu:

6,06 g (50 mM) Tris baz, 28,52 g glisin (380 mM) ve 5 g SDS (% 0,5) 900 mL bi-distile suda çözüldü. Çözeltinin pH'ı 8,5-8,7'ye %37'lik HCl ile ayarlandı ve 1 L'ye bi-distile ile tamamlandı.

SDS-PAGE Protein Markeri

Western Blot Deneyi İçin Kullanılan Kimyasallar

Transfer Tamponu: 3,03 g Tris baz (25mM), 14,26 g (190 mM), glisin 800 mL bi-distile suda çözüldü. Üzerine 200 mL metanol eklenip +4 °C'de saklandı.

Nitroselüloz Membran: Kullanmadan önce transfer tamponunda 5 dk inkübe edildi.

PVDF Membran: Kullanmadan önce metanol içinde 10 dk bekletilerek membranın aktifleşmesi sağlandı.

TBS (Tris Tamponu): 12,1 g Tris baz (100 mM), 8,76 g NaCl (150 mM), 900 mL bi-distile su ile çözüldü. Çözeltinin pH'ı 7,5'e %37'lik HCl ile ayarlandı ve 1 L'ye bi-distile su ile tamamlandı.

TBST (%0,1 Tween-20 içeren TBS): 1 L TBS'in üzerine 1 mL Tween-20 eklenerek kullanıldı.

%5 Yağsız Süt Tozu Çözeltisi: 5 g Yağsız süt tozu 100 mL TBST ile çözüldü.

Primer Antikorlar: LONP1, HSP70, UCP2, OXPHOS, sitokrom c ve kaspaz 3 primer antikorlarından ayrı ayrı 5'er µL alınıp 5 mL %5 yağsız süt tozu çözeltisi ile karıştırıldı (1:1000).

Sekonder Antikorlar: Anti-rabbit ve Anti-mouse HRP konjuge sekonder antikorlarından ayrı ayrı 0,5 µL alınıp 5 mL %5 yağsız süt tozu çözeltisi ile karıştırıldı (1:10000).

Ponceau S Boyası: 0,1 g Ponceau S 500 µL asetik asit içinde çözüldü ve 50 mL'ye bi-distile su ile tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

Örneklerin hazırlanması için ticari olarak satışta bulunan 4X örnek tamponu (invitrogen) ve 10X redükleme ajanı (invitrogen) 1X olacak şekilde seyreltilerek kullanıldı. Protein miktarları belirli olan örneklerden 40 µg protein, 1X örnek tamponu, 1X redükleme ajanı ve son hacim 35 µL olacak şekilde bidistile su karıştırıldı. OXPHOS primer antikor kokteyli ile analiz edilecek örnekler 50 °C'de 5 dk, diğer antikorlar ile analiz edilecek örnekler 95 °C'de 5 dk denatüre edildi. Örnekler

soğuduktan sonra jele yüklendi ayrıca proteinlerin takip edilmesi amacıyla jeldeki 1 kuyucuğa 5 µL protein belirteci yüklendi. Jeller yürütme tamponu içinde sabit voltta sırasıyla 120 voltta 10 dk, 100 voltta örnekler aşağı inene kadar soğukta yürütüldü. Böylece proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrımı sağlandı.

Jellerdeki proteinlerin membrana aktarılması için ıslak transfer sistemi kullanıldı. Nitroselüloz/PVDF membrana aktarım +4 °C’de 75 sabit voltta 3 saat süresince gerçekleştirildi. Proteinlerin nitroselüloz membrana düzgün bir şekilde aktarılıp aktarılmadığını kontrol etmek için membran Ponceau S boya çözeltisine konuldu, ardından membranın boyadan temizlenmesi için membran TBST ile 2 kez 5 dk çalkalanarak yıkandı. Membranın bloklama işlemi oda sıcaklığında 1 saat %5 yağsız süt tozu çözeltisi çalkalanarak gerçekleştirildi. Bloklamadan ardından membran 3 kez 5 dk TBST ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından membran ilgilenen proteinlere özgü primer antikorlar ile 1 gece +4 °C’de çalkalanarak inkübe edildi. Ertesi gün membran 3 kez 5 dk TBST ile çalkalanarak yıkandı. Yıkamadan sonra membran primer antikorun üretildiği canlıya özgü olan, HRP konjuge sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında 2 saat boyunca çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrası membranlar 3 kez 5 dk TBST ile yıkandı. Protein bantlarını görüntülemek için kemilüminesans görüntüleme kiti kullanıldı. Solüsyonlar 1:1 oranında karıştırıldı, membran hazırlanan karışımla 2 dk inkübe edildi. Daha sonra membranlar, X-ray filmleri ile birlikte görüntüleme yapmak için kasete yerleştirildi ve belli süre beklendi, ardından X-ray filmleri protein bantlarının görünür hale gelmesi için developer ve fiksatif çözeltisi ile banyo edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Image J programı kullanılarak analiz edildi, yükleme kontrolü olarak β-aktin kullanıldı. Her bir protein bandının kalınlığı, kendi β-aktin bandının kalınlığına oranlandı, elde edilen sonuçlar kontrol grubuna normalize edildi.

3.2.11. Mitokondriyal DNA İçeriğinin Tayini

3.2.11.1. DNA İzolasyonu

Hücre lizatlarından DNA izolasyonu ticari olarak satışta bulunan G-spin Total DNA Extraction Kit kullanılarak üretici firmanın sağladığı kullanma talimatına uygun olarak gerçekleştirildi.

Kit İçeriği:

CL Tamponu

BL Tamponu

WA Tamponu

WB Tamponu: Kullanmadan önce 40 mL absölü etanol ilave edildi.

CE Tamponu

Döndürme Kolonu

Toplama Tüpü

Tüm malzemeler oda ısında saklandı.

Liyofilize RNaz A: 300 µL bidistile suda çözöldü, porsiyonlanarak -20 °C’de saklandı.

Liyofilize Proteinaz K: 1,1 mL bidistile suda çözöldü, porsiyonlanarak -20 °C’de saklandı.

Deneyin Yapılışı:

1x10⁶ hücre 75 cm²’lik hücre költürü flasklarına ekildi, yapışması için inkübe edildi ve 3.2.3’te belirtildiği şekilde 48 ve 72 saat süreyle hücrelere ilaç maruziyeti yapıldı. Maruziyet sürelerinin sonunda hücreler tripsin ile kaldırılıp toplandı ve 1300 rpm’ de 5 dk santrifüj edildi. Ardından hücre pelleti üzerine 1X PBS ilave edildi, 1300 rpm’ de 1 dk santrifüj edilip süpernatantın büyük bir kısmı uzaklaştırıldı. Hücre pelleti ve dipte kalan süpernatant iyice karıştırıldı ve vortekslendi ardından üzerine 200 µL CL tamponu, 20 µL proteineaz K ve 5 µLRNase eklendi ve iyice karıştırılıp vortekslendi. Hücrelerin parçalanması için hücre lizatı 15 dk 56 °C’de inkübe edildi. Bu süre sonunda karışımın üzerine 200 µL BL tamponu eklendi ve iyice karıştırıldı, karışım 70 °C’de 5 dk inkübe edildi. Bu aşamadan sonra DNA’nın kırılmaması için vorteksleme işlemi yapılmadı. Ardından 200 µL absölü etanol ilave edilip pipetaj yapılarak iyice karıştırıldı ve kapaktaki damlacıkların aşağı inmesi için kısa süre santrifüj yapıldı. Spin Column ve toplama tüpü birleştirildi Hazırlanan karışım kolona dikkatli şekilde konuldu ve 13000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi, filtrat atıldı. Kolona 700 µL WA tamponu eklenip 1300 rpm rpm’de 1 dk santrifüj edildi, filtrat atıldı. Ardından kolona 700 µL WB tamponu eklendi, 1300 rpm rpm’de 1 dk santrifüj edildi, filtrat atıldı. Membranın kuruması amacıyla 1 dk daha santrifüj edildikten sonra toplama kabı ve filtrat atıldı. Kolon steril 1,5 mL’lik yeni ependorf ile birleştirildi ve membrana bağlanan DNA’nın elüe edilebilmesi için direkt membrana denk gelecek şekilde CE tamponu ilave edilip oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi, 1300 rpm rpm’de 1 dk santrifüj edildi ve filtrat -20 °C’de saklandı.

3.2.11.2. Hücre Lizatlarından İzole Edilen DNA'ların Safılık ve Miktar Tayini

İzole edilen DNA'ların safılık ve miktar tayini Take-3 plate kullanılarak mikropłaka okuyucu spektrofotometre kullanılarak 260 ve 280 nm'de ölçüldü. 260 nm'de elde edilen ölçümler DNA miktarının belirlenmesinde kullanıldı. İzole edilen DNA'ların saflığı ise A_{260}/A_{280} oranına göre değerlendirildi, bu değer 1,8-2 arasında olan DNA'lar saf olarak değerlendirildi.

3.2.11.3. Gerçek Zamanlı PZR Yöntemiyle Mitokondriyal DNA İçeriğinin Tayini

mtDNA içeriği mtDNA'ya (NADH dehidrojenaz) ve nükleer DNA'ya (Beta aktin) özgü primer çiftleri kullanılarak Bölüm 3.2.9.4'te belirtildiği gibi gerçek zamanlı PZR yöntemi ile gerçekleştirildi. Kullanılan primerler Bölüm 3.11'de anlatıldığı gibi sentezlendi. mtDNA'ya ve nükleer DNA'ya özgü primer çiftleri Tablo 3-3'te gösterilmiştir. mtDNA içeriği aşağıda belirtilen formül kullanılarak hesaplandı (Quiros ve ark., 2017).

$$\Delta CT = Ct(\text{nükleer DNA geni}) - Ct(\text{mtDNA geni})$$

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

Tablo 3-3: Mitokondriyal DNA içeriğinin saptanmasında kullanılan primer dizileri

Gen Adı	5'- 3'primer dizisi	Erime Derecesi (°C)
NADH dehidrojenaz (complex I)	F: CCTGACTATCTGAAAGCCATTTGG	63,2
	R: CACAGTGCTGCAATGCTCTACAC	63,2
β-aktin	F: ATGGTGGGTATGGGTCAGAA	60,0
	R: CTTTTCACGGTTGGCCTTAG	59,7

3.2.12. Mitokondrilerin Elektron Mikroskopunda Görüntülenmesi

72 saat 5 ve 10 µM konsantrasyonda Regorafenib'e maruz bırakılan ve kontrol grubundaki hücreler tripsin ile kaldırıldı, 1200 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Ardından pellet üzerine PBS (1X) ilave edilerek 2 kez hücreler yıkandı. Ardından pellet üzerine 0.1M PBS içerisinde % 2.5 glutaraldehit (2ml) ilave edildi ve hücreler 1 gece boyunca +4°C'de fiksasyona bırakıldı. Fiksasyon sonrası hücreler 2 kez PBS tamponu ile yıkandı. Pellet üzerine ikinci fiksasyon işlemi için 2 mL %1'lik ozmiyum tetraoksit ilave edildi ve +4°C'de 1 saat fikse edildi. Fiksasyon sonrası hücrelere PBS ile 2 kez yıkama yapıldı. Ardından %5'lik eriyik agar hücrelere eklendi, karıştırıldı. Homojen

hale getirilmiş olan karışımdan lam üzerine küçük damlalar halinde damlatılıldı ve donması beklendi. Lam üzerindeki agar hücre karışımı donduktan sonra bisturi ucu yardımı ile ufak parçalara ayrıldı ve kahverengi şişelere alındı. Şişe içerisindeki hücrelere uranil asetat ilave edildi ve 15 dk. +4°C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası agar içindeki hücreler sırasıyla; +4°C’de %30 etil alkol 10 dk, +4°C’de %50 etil alkol 10 dk, +4°C’de %70 etil alkol 10 dk, +4°C’de %90 etil alkol 10 dk ve +4°C’de %90 etil alkol 10 dk olacak şekilde alkol serilerinden geçirildi. Ardından +4°C’de saf propilen oksit içerisinde bekletildi. Bu sürenin sonunda saf propilen oksit uzaklaştırıldı, üzerine 1:1 oranında propilen oksit-Epon karışımı ilave edildi, 10 dk +4°C’de inkübe edildi. Ardından saf epon karışımı ilave edilip 48 saat süreyle +4°C’de bekletildi. Daha sonra 60 °C’de 48 saat süreyle polimerizasyona bırakıldı.

Örneklerden bakır gridler üzerine ultramikrotom (Leica Ultracut R) ile 60 nm’lik kesitler alındı. Bu kesitler asetat-kurşun sitrat ile boyanarak mitokondriyal değişiklikler gözlemlenmek üzere geçirimli elektron mikroskopunda (Hitachi HT7800) görüntülendi.

3.2.13. İstatistiksel Analiz

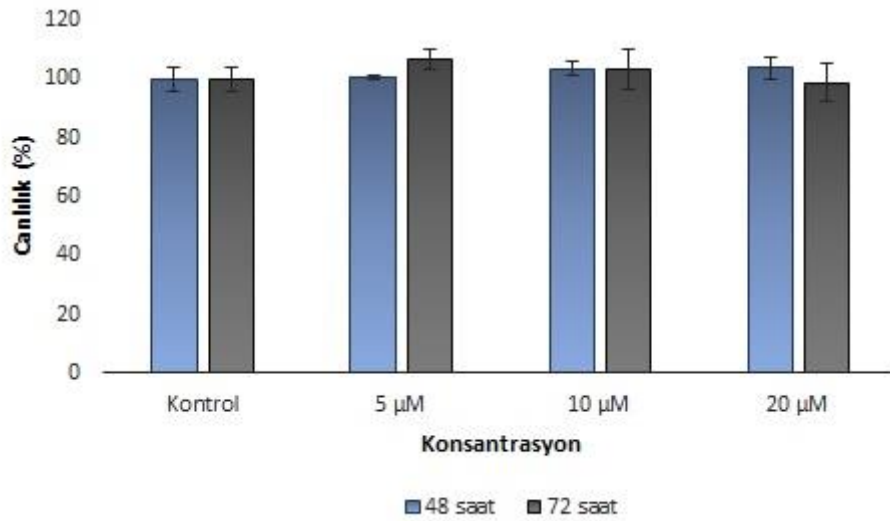
Çalışmadan elde edilen tüm veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma ($\pm$ SD) olarak gösterildi. Verilerin istatistiksel analizi SPSS 21.0 programı kullanılarak yapıldı. Gruplar kendi kontrol grupları ile karşılaştırıldı. Gruplar arası farklılıkların karşılaştırılması için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ardından post hoc Tukey HSD testi uygulandı, $^{\#}p < 0,001$ ve $^{*}p < 0,05$ olan sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi. 48 saat ve 72 saatlik maruziyet grupları arasındaki istatistiksel farklılıklar SPSS 21.0 programı kullanılarak eşleştirilmiş gruplar T testi ile belirlendi. $^{**}p < 0,05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Sitotoksosite Test Sonuçları

4.1.1. Tripan Mavisi Sitotoksosite Testi

Şekil 4-1’de görüldüğü gibi, membran bütünlüğünü değerlendiren tripan mavisi testi sonucuna göre hem 48 hem de 72 saatlik Regorafenib maruziyeti çalışılan dozlarda hücre canlılığında anlamlı bir değişime neden olmadı. ($p>0,05$).

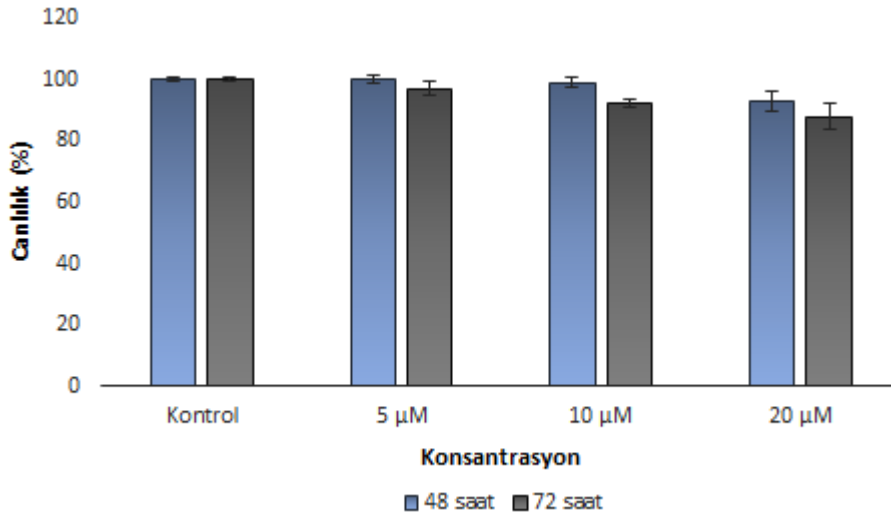


Şekil 4-1: 48 ve 72 saat, 0-20 µM Regorafenib maruziyeti sonucunda hücre canlılığında meydana gelen değişimler

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

4.1.2. LDH Sitotoksosite Testi

LDH sitotoksosite testi sonucunda da tripan mavisi testine benzer şekilde 48 ve 72 saat Regorafenib maruziyetinin hücre canlılığında belirgin bir değişime neden olmadığı ($p>0,05$) görüldü (Şekil 4-2).

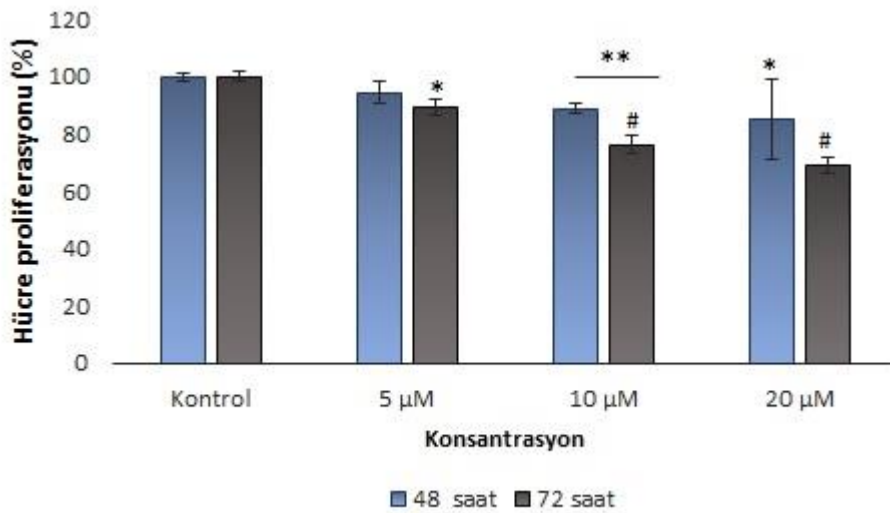


Şekil 4-2: 48 ve 72 saat, 0-20 µM Regorafenib maruziyeti sonucunda hücre canlılığında meydana gelen değişimler

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

4.2. MTT Hücre Proliferasyonu Testi

48 saat ve 72 saat 5, 10 ve 20 µM Regorafenib maruziyeti sonucu hücre proliferasyonunda meydana gelen değişimler Şekil 4-3'te gösterildi. 48 saat 5 ve 10 µM Regorafenib hücre proliferasyonunda belirgin bir değişiklik meydana getirmezken, 48 saat 20 µM Regorafenib hücre proliferasyonunda %15 azalmaya neden oldu ($p=0,04$). 72 saatlik maruziyet sonucunda hücre proliferasyonunda doza bağlı bir azalma görüldü ($p<0,06$). En yüksek dozda ise hücre proliferasyonu yaklaşık %32 inhibe oldu.

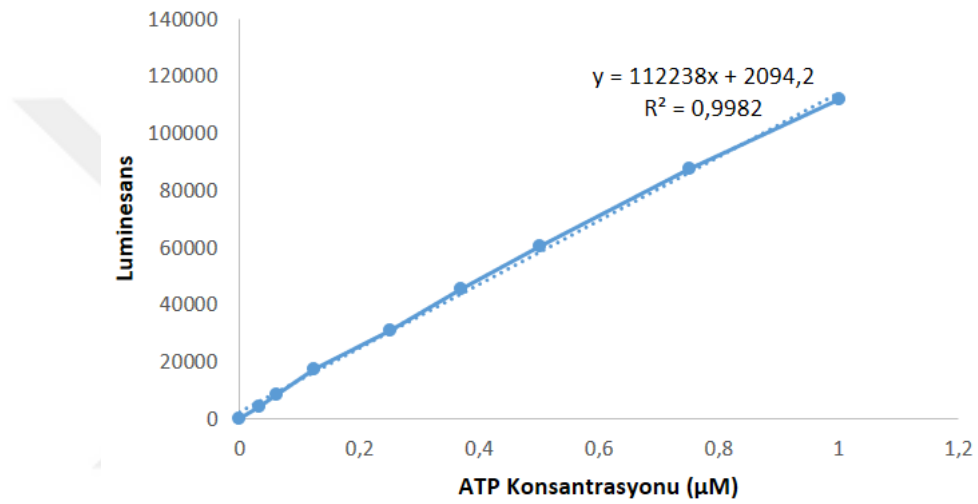


Şekil 4-3: 48 ve 72 saat 0-20 µM Regorafenib maruziyeti sonucunda hücre proliferasyonunda meydana gelen değişimler

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. $*p<0,05$ ve $^{\#}p<0,05$ kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir (ANOVA, Post-Hoc Tukey testi). $**p<0,05$ 48 saat ve 72 saat grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir (Eşleştirilmiş gruplar T testi).

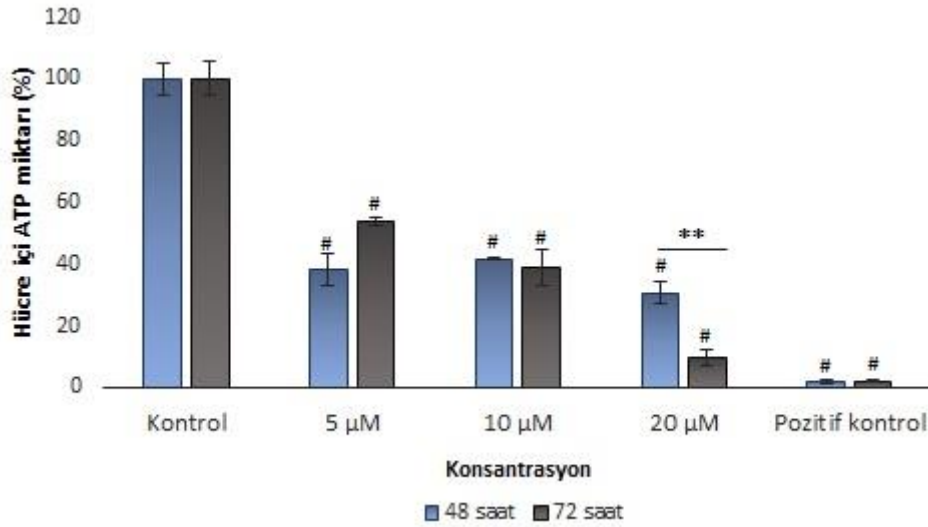
4.3. Hücre İçi ATP Miktarı

3.2.7 ye göre hazırlanan ATP standart-kalibrasyon eğri denkleminde örneklerin ATP içeriği hesaplandı. Elde edilen standart kalibrasyon eğrisi Şekil 4-4'te gösterildi. Kontrol grubunun ATP içeriği 100 kabul edilerek örneklerin % ATP içeriği hesaplandı ve sonuçlar %ATP $\pm$ standard sapma şeklinde belirtildi.



Şekil 4-4: Standart ATP ölçü eğrisi

Bu test sonucuna göre; hem 48 hem 72 saat maruziyette tüm doz gruplarında hücre içi ATP miktarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalma görüldü. 48 ve 72 saatlik maruziyet sonucunda ATP miktarındaki azalmanın en fazla en yüksek doz olan 20 µM'da gerçekleştiği gözlemlendi (Şekil 4-5). 72 saat maruziyet süresi sonunda 20 µM ilaç maruziyetinin ATP miktarını neredeyse pozitif kontrol seviyesine kadar düşürdüğü saptandı ($p=0,002$).

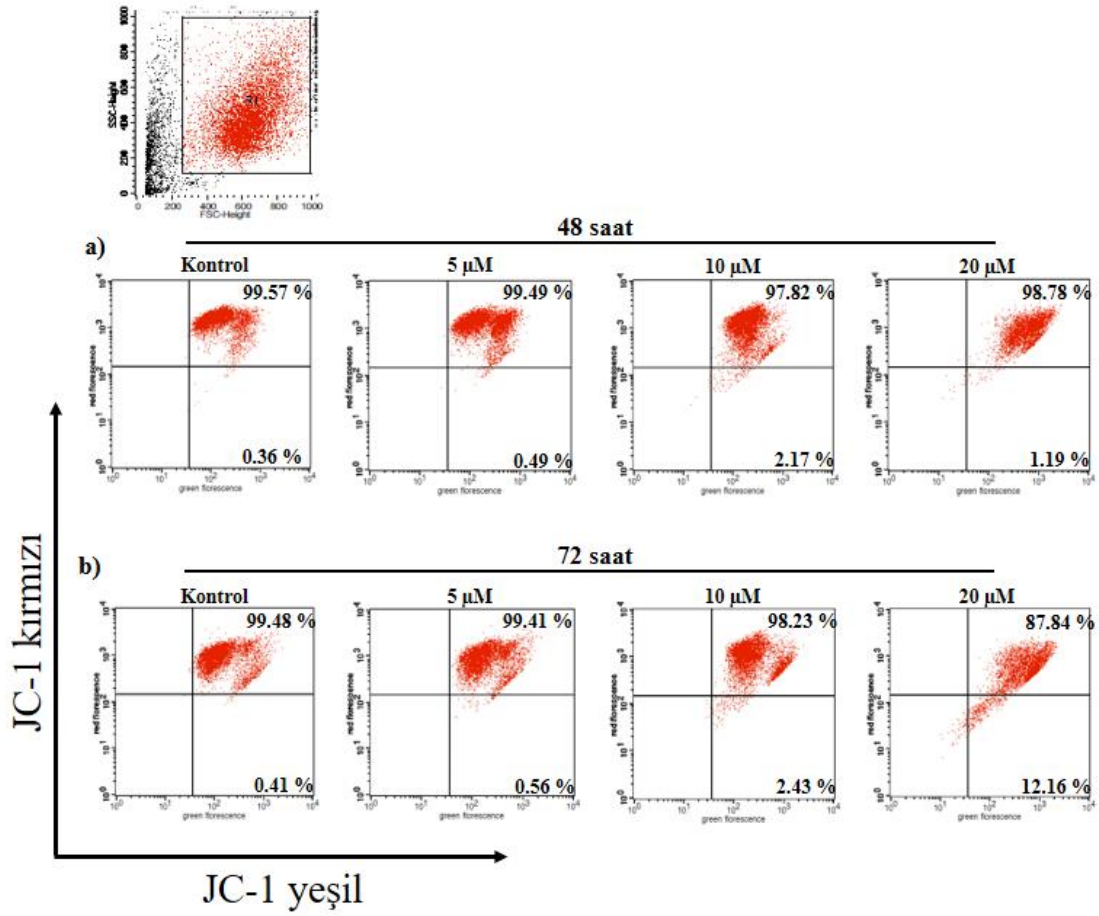


Şekil 4-5: 48 ve 72 saat 0-20 µM Regorafenib maruziyeti sonucunda hücre içi ATP miktarında meydana gelen değişimler

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. * $p < 0,05$ ve # $p < 0,001$ kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir (ANOVA, Post-Hoc Tukey testi). ** $p < 0,05$ 48 saat ve 72 saat grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir (Eşleştirilmiş gruplar T testi).

4.4. Mitokondri Membran Potansiyeli

Mitokondri membran potansiyeli tayini JC-1 boyası kullanılarak flowsitometrik olarak tayin edildi. Mitokondri membran potansiyeli normal olan hücreler kırmızı floresan gösterirken, membran potansiyeli bozulmuş hücreler yeşil floresan gösterdi. Sonuçlar kırmızı ve yeşil floresan gösteren hücrelerin yüzdesi (%) olarak verildi. Şekil 4-6'da gösterildiği gibi 72 saatlik en yüksek doz grubunda mitokondri membran potansiyelinin kontrol grubuna kıyasla belirgin şekilde bozulduğu gözlemlendi. ($p < 0,05$).

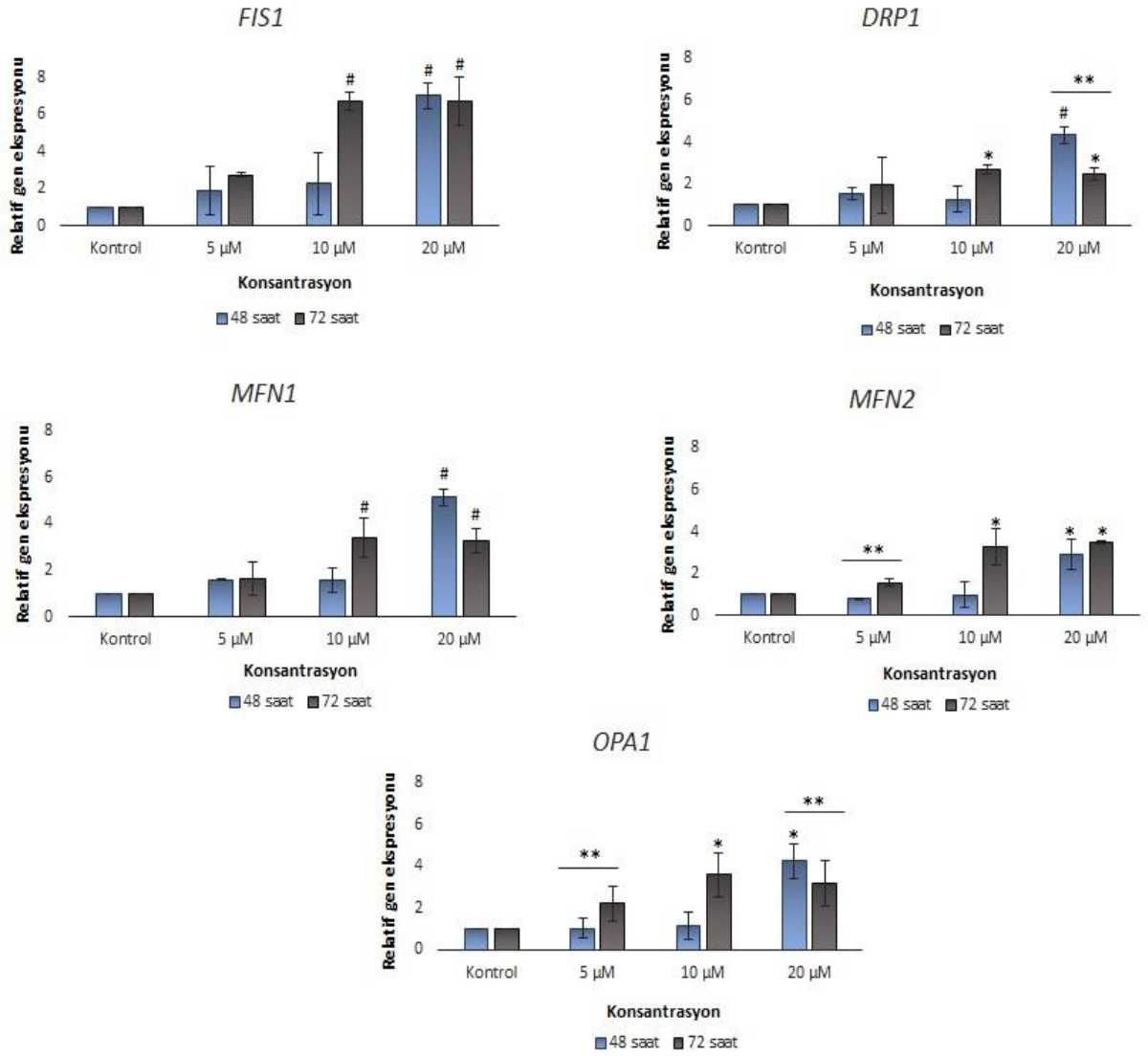


Şekil 4-6: 48 ve 72 saat, 0-20 µM Regorafenib maruziyeti sonucunda mitokondri membrane potansiyelinde meydana gelen değişimler

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

4.5. Gen Ekspresyonu Sonuçları

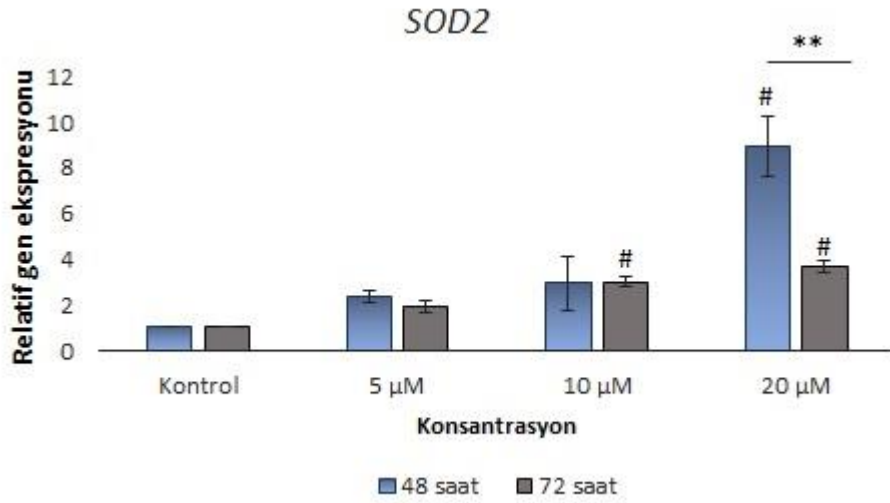
Mitokondri dinamiğinde rol oynayan genlerin ekspresyonu gerçek zamanlı PZR yöntemi ile belirlendi. Şekil 4-7’de gösterildiği gibi 48 saatlik maruziyet sonucunda 20 µM Regorafenib maruziyetinin hem füzyon hem de fisyon genlerinin ekspresyonunu artırdığı saptandı ($p<0,05$). 72 saatlik, 10 ve 20 µM maruziyet sonucunda, FIS1, DRP1, MFN1 ve MFN2 genlerinde anlamlı artış saptandı ($p<0,05$). Yine Şekil 4-7’de gösterildiği gibi 10 µM Regorafenib’in 72 saatlik maruziyeti sonucunda OPA1 gen ekspresyonunun anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi ($p=0,026$). OPA1 geninin 72 saat 5 µM doz grubunda, aynı dozda 48 saatlik maruziyet grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla artış gösterdiği saptandı. 72 saat 20 µM maruziyet grubunda DRP1 ve OPA1 genlerinin ekspresyonunda 48 saatlik maruziyet grubuna göre belirgin şekilde düşüş gözlemlendi ($p<0,05$).



Şekil 4-7: 48 ve 72 saat, 0-20 µM Regorafenib maruziyeti sonucunda mitokondri dinamiğinde rol alan genlerde meydana gelen değişimler

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. * $p < 0,05$ ve # $p < 0,001$ kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir (ANOVA, Post-Hoc Tukey testi); ** $p < 0,05$ 48 saat ve 72 saat grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir (Eşleştirilmiş gruplar T testi). MFN1: Mitofusin 1, MFN2: Mitofusin 2, OPA1: Optik atrofi 1, FIS1: Fiyon protein 1, DRP1: Dynamin ilişkili protein 1.

Şekil 4-8’de gösterildiği gibi, 48 saat, 20 µM Regorafenib maruziyeti sonucunda SOD2 ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 9 kat artış saptandı ($p = 0,0001$). 72 saatlik maruziyet sonucunda ise 5, 10 ve 20 µM konsantrasyonlarda, doza bağlı olarak SOD2 gen ekspresyonunun arttığı tespit edildi. 72 saatlik 20 µM doz grubunda, kontrol grubuna kıyasla SOD2 gen ekspresyonunun 3 kat arttığı görüldü ($p < 0,001$).

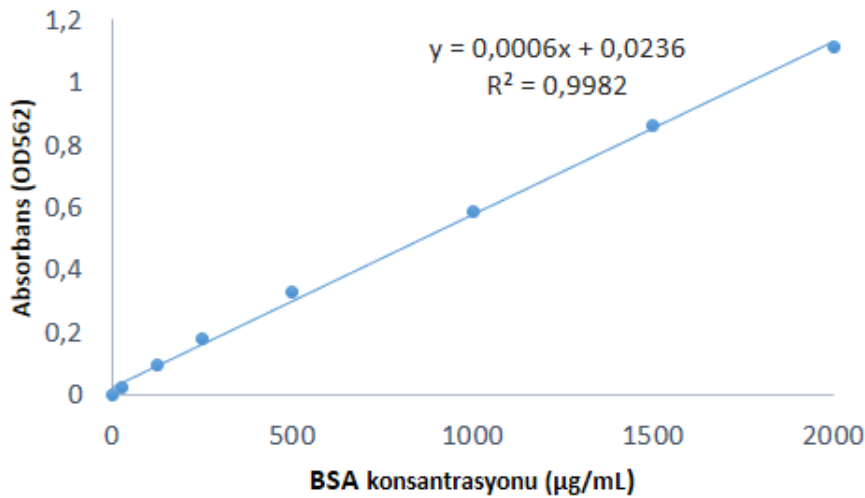


Şekil 4-8: 48 ve 72 saat, 0-20 µM Regorafenib maruziyeti sonucunda SOD2 gen ekspresyonunda meydana gelen değişimler

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. $^{\#}p<0,001$ kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir (ANOVA, Post-Hoc Tukey testi). $^{**}p<0,05$ 48 saat ve 72 saat grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir (Eşleştirilmiş gruplar T testi). SOD2: süperoksit dismutaz 2.

4.6. Protein Ekspresyon Sonuçları

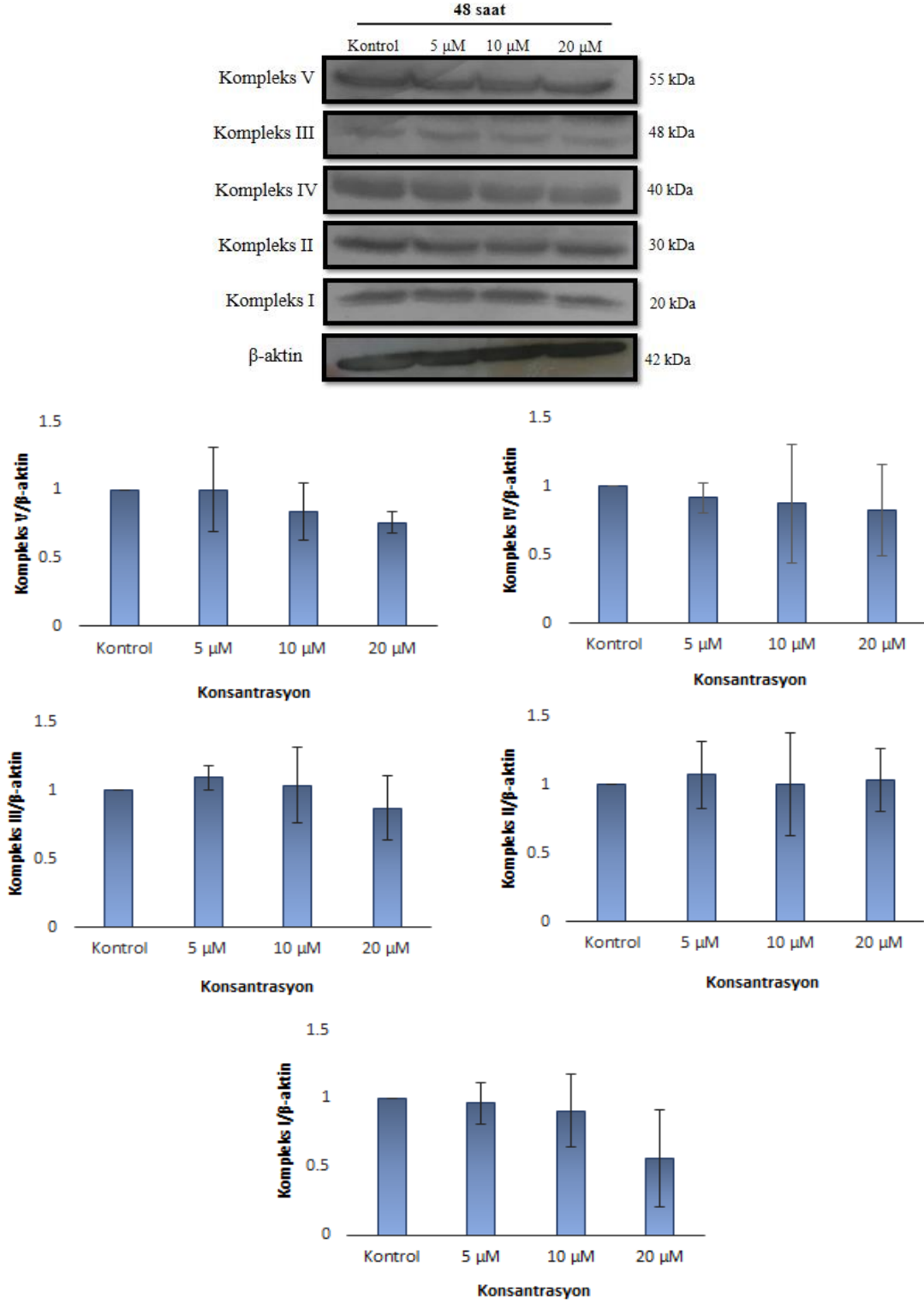
Protein ekspresyonunun western blot yöntemi ile tayini için ilk olarak kit içerisinde hazır olarak bulunan standart BSA çözeltisi kullanılarak kalibrasyon eğrisi hazırlandı (Şekil 4-9). Elde edilen eğri denkleminde örnek gruplarının içerdiği protein konsantrasyonları hesaplandı.



Şekil 4-9: Protein standart ölçü eğrisi

Şekil 4-10'da gösterildiği gibi, 48 saatlik Regorafenib maruziyeti sonucunda, 20 µM doz grubunda mitokondriyal kompleks V, IV, III ve I protein ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan azalma saptandı ($p>0,05$). Kompleks II ekspresyonunda ise belirgin bir değişiklik gözlenmedi.



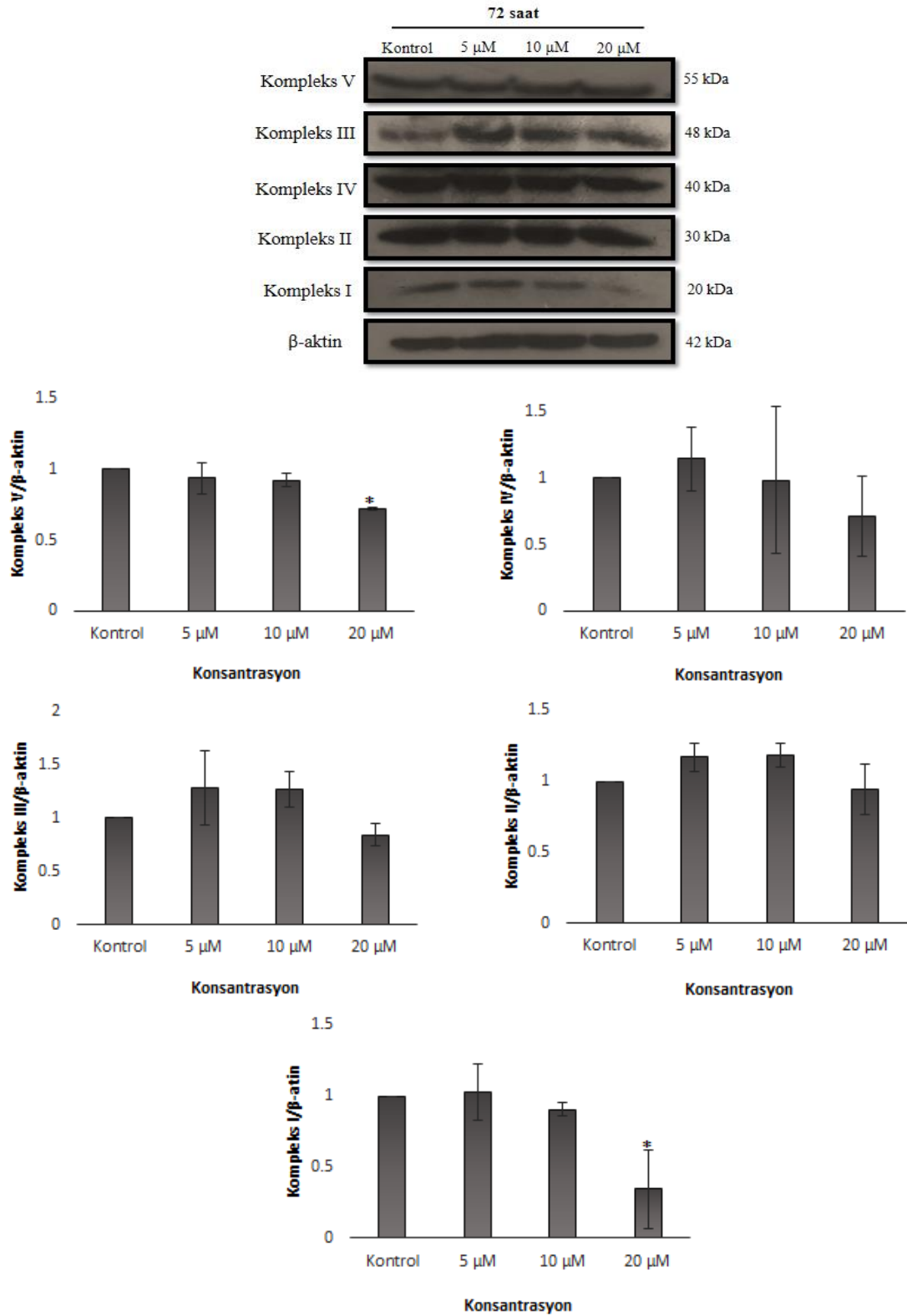


Şekil 4-10: 48 saat, 0-20 μ M Regorafenib maruziyeti sonucunda mitokondriyal komplekslerin protein ekspresyonunda meydana gelen değişimler

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

72 saatlik maruziyet sonucunda 20 μ M Regorafenib dozunun Kompleks I ve Kompleks V ekspresyonununda anlamlı şekilde azalmaya neden olduğu tespit edildi ($p<0,006$). Aynı dozda Kompleks II, III ve IV ekspresyonunda da azalma tespit edilmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlılık bulunamadı (Şekil 4-11).

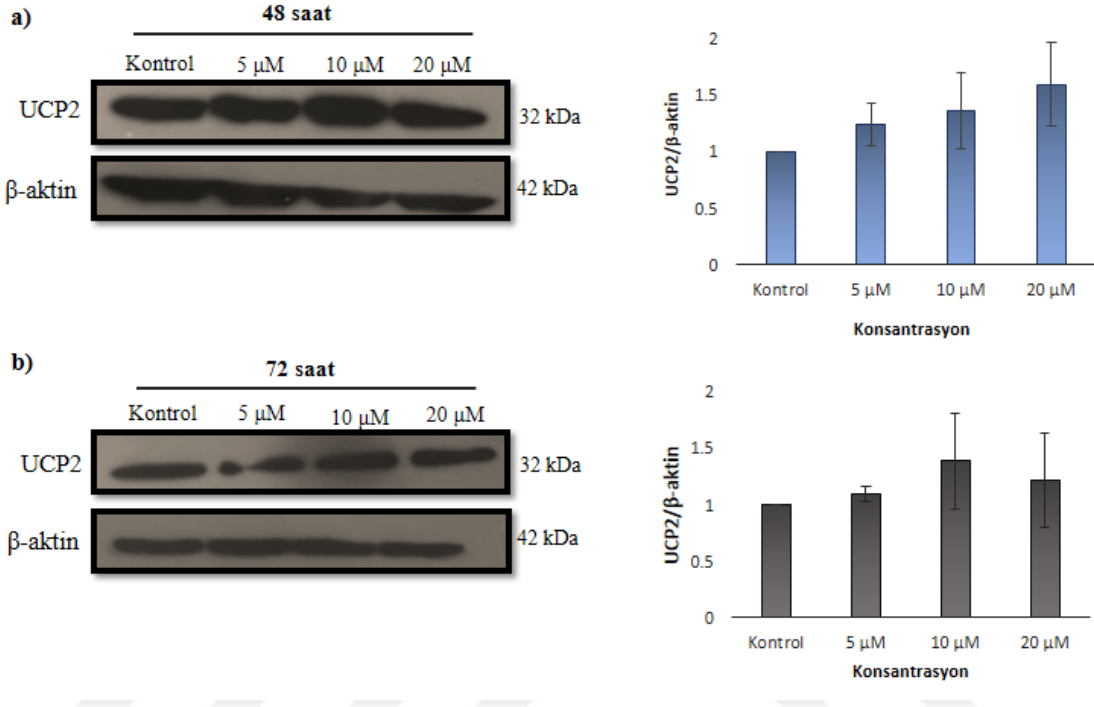




Şekil 4-11: 72 saat, 0-20 μ M Regorafenib maruziyeti sonucunda mitokondriyal komplekslerin protein ekspresyonunda meydana gelen değişimler

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. * $p < 0,05$ kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir. (ANOVA, Post-Hoc Tukey testi).

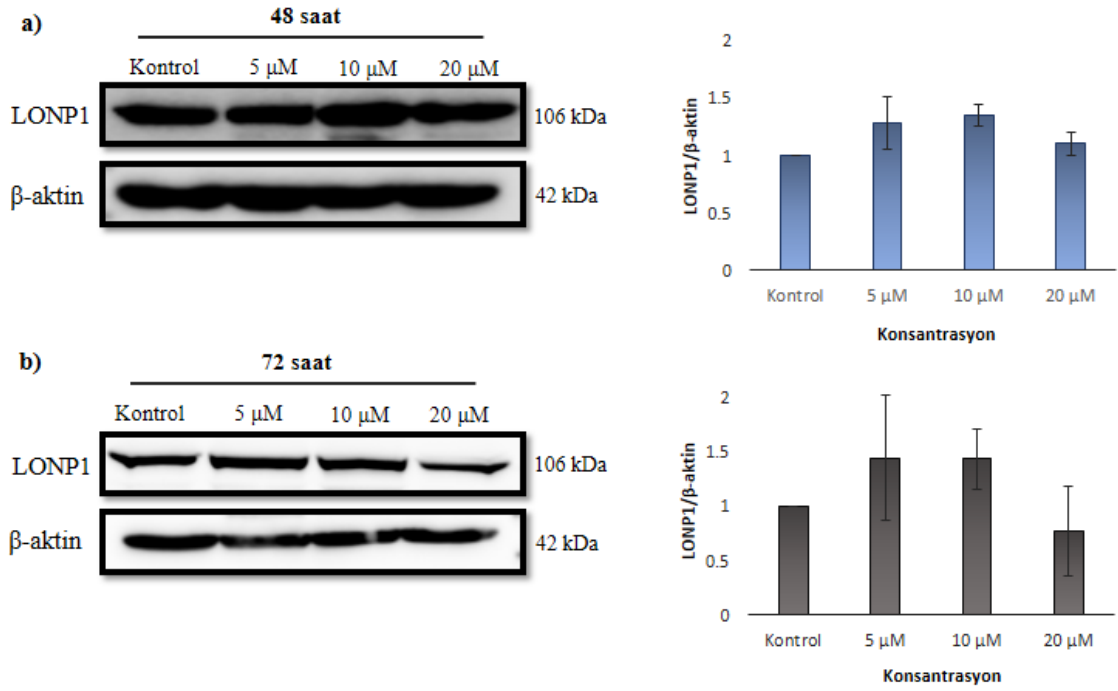
Mitokondriyal bir protein olan UCP2 protein ekspresyonunun 48 saatlik maruziyet sonucunda doza bağılı olarak arttığı ($p>0,05$) belirlendi. 72 saatlik 10 ve 20 μM Regorafenib maruziyeti sonucunda UCP2'nin arttığı ($p>0,05$) ancak bu artışın 48 saate göre daha az olduğu gözlemlendi ($p>0,05$) (Şekil 4-12).



Şekil 4-12: 0-20 μM Regorafenib a) 48 saatlik ve b)72 saatlik maruziyeti sonrasında UCP2 protein ekspresyonunda meydana gelen değişimler

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. UCP2: Eşleşme bozucu protein 2.

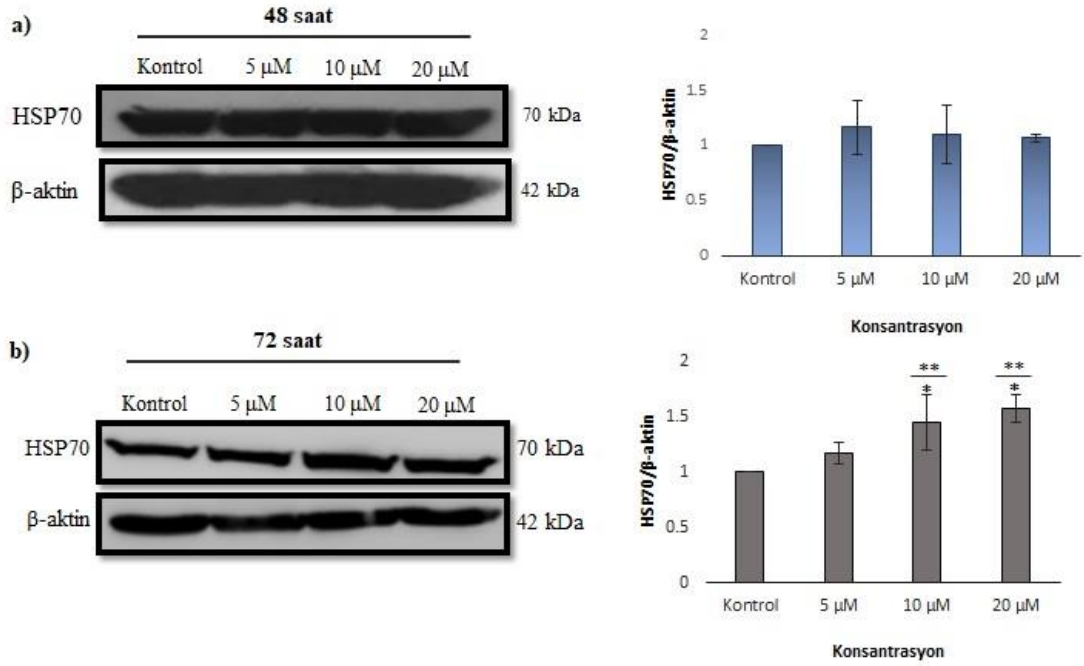
Mitokondriyal bir proteaz enzimi olan LONP1 ekspresyonunun, her iki maruziyet süresinde 5 ve 10 μM konsantrasyonda arttığı tespit edildi, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0,05$). 20 μM konsantrasyonda 48 saat maruziyet süresinde LONP1 kontrole göre minimal ve anlamlı olmayan artış gösterdi ($p>0,05$). 72 saat, 20 μM Regorafenib maruziyetinin LONP1 ekspresyon seviyesinde anlamlı olmayan ($p>0,05$) azalmaya neden olduğu saptandı (Şekil 4-13).



Şekil 4-13: 0-20 μM Regorafenib a) 48 saatlik ve b)72 saatlik maruziyeti sonrasında LONP1 protein ekspresyonunda meydana gelen değişimler

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. LONP1: Lon proteaz 1.

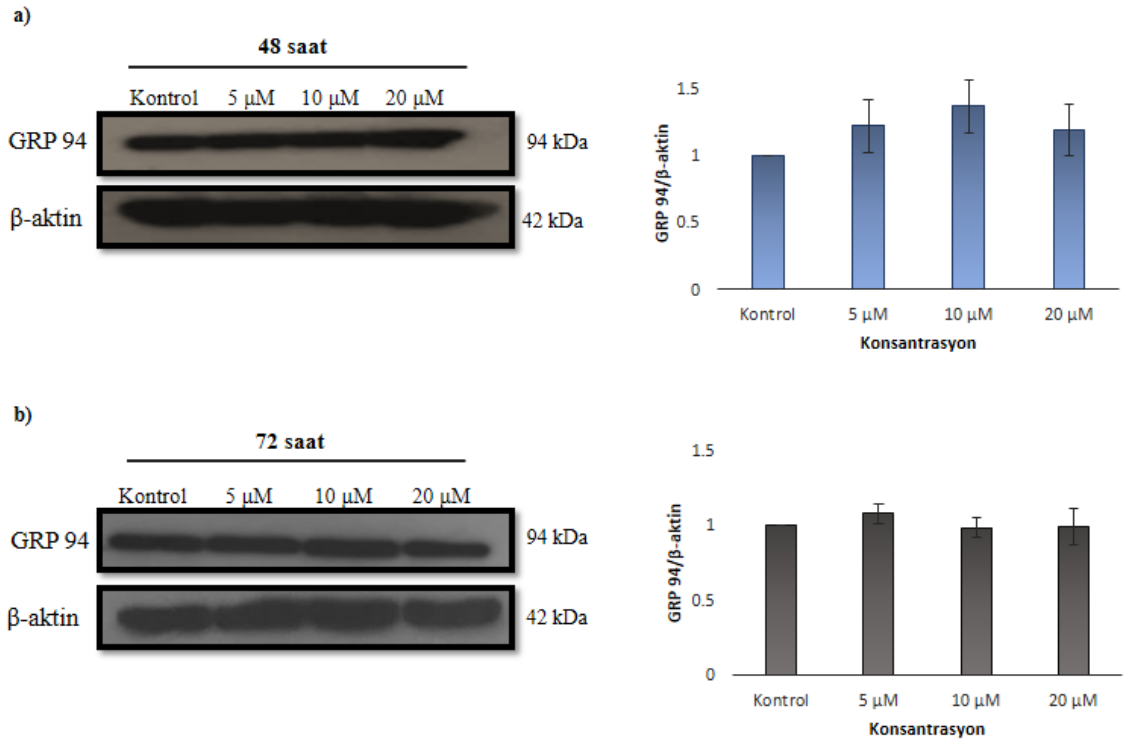
HSP70 protein ekspresyonunda 48 saatlik maruziyet sonucu istatistiksel olarak anlamlı olmayan artış görüldü. 72 saatlik maruziyet sonucu, HSP70 ekspresyonunda doza bağlı olarak artış tespit edildi. Bu artış 10 ve 20 μM dozlarında ($\geq 0,45$ kat) istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,02$) bulundu (Şekil 4-14). Aynı dozlarda HSP70 ekspresyonunun 72 saatlik maruziyet gruplarında 48 saatlik maruziyet gruplarına göre anlamlı şekilde artış gösterdiği saptandı ($p < 0,05$).



Şekil 4-14: 0-20 μM Regorafenib a) 48 saatlik ve b)72 saatlik maruziyeti sonrasında HSP70 protein ekspresyonunda meydana gelen değişimler

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. * $p<0,05$ kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir (ANOVA, Post-Hoc Tukey testi). ** $p<0,05$ 48 saat ve 72 saat grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir (Eşleştirilmiş gruplar T testi). HSP70: Isı şok proteini 70.

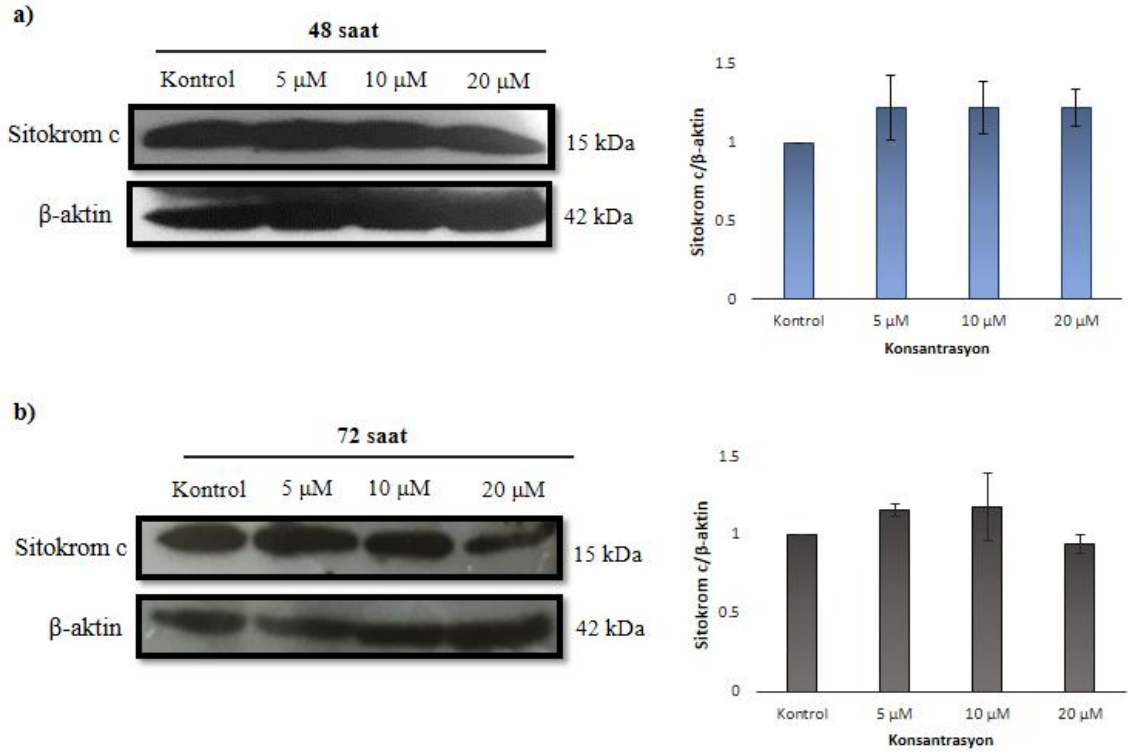
Endoplasmik retikulumda bulunan ve şaperon olarak görev yapan GRP94 ekspresyonunda, 48 saat Regorafenib maruziyeti sonunda kontrol grubuna kıyasla az miktarda artış saptandı ($p>0,05$). 72 saatlik 5 μM maruziyet grubunda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmayan minimal bir artış tespit edilirken; 10 ve 20 μM dozlarda kontrole göre belirgin bir değişiklik gözlemlenmedi (Şekil 4-15).



Şekil 4-15: Şekil 4-15: 0-20 μ M Regorafenib a) 48 saatlik ve b)72 saatlik maruziyeti sonrasında GRP94 protein ekspresyonunda meydana gelen değişimler

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. GRP94: glukoz ile regüle edilen protein 94.

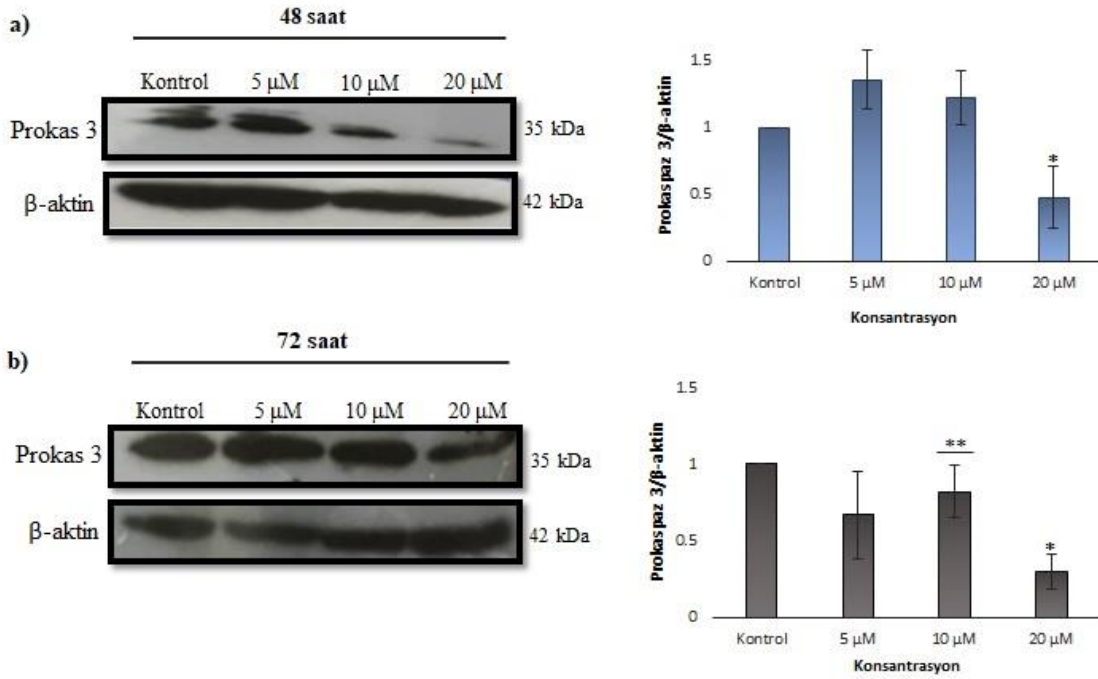
Mitokondriyal apoptotik yolağın başlatılması için gerekli olan sitokrom c ekspresyonunda 48 saatlik ve 72 saatlik maruziyet sonucunda anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi (Şekil 4-16).



Şekil 4-16: 0-20 μ M Regorafenib a) 48 saatlik ve b)72 saatlik maruziyeti sonrasında Sitokrom c protein ekspresyonunda meydana gelen değişimler

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir

Prokaspaz 3 ekspresyonunun, 20 μ M dozda 48 saat maruziyet sonrasında 0,52 kat ($p=0,041$), aynı konsantrasyonda 72 saatlik maruziyet sonucunda 0,76 kat ($p=0,005$) azaldığı tespit edildi (Şekil 4-17). 10 μ M konsantrasyonda 48 saatlik maruziyet grubuna kıyasla 72 saatte istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma saptandı ($p<0,05$).

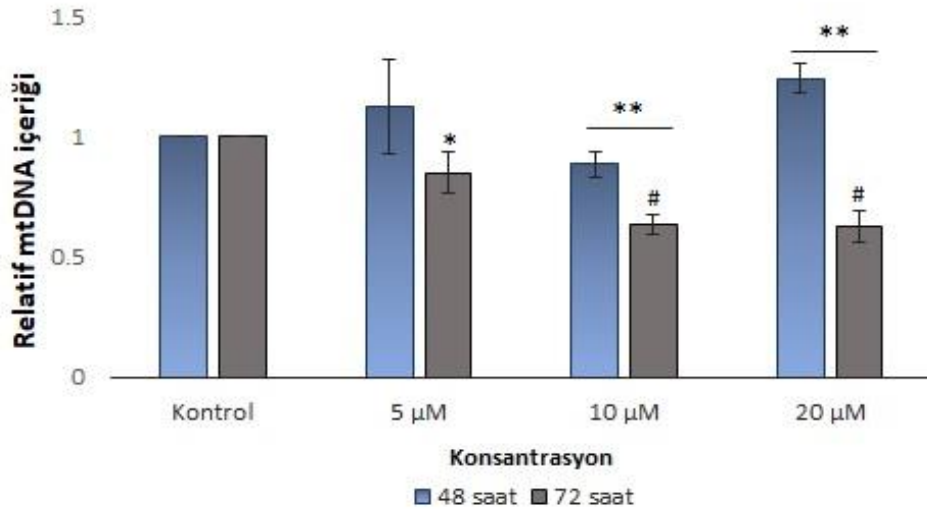


Şekil 4-17: 0-20 µM Regorafenib a) 48 saatlik ve b)72 saatlik maruziyeti sonrasında prokaspaz 3 protein ekspresyonunda meydana gelen değişimler

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. * $p < 0,05$ kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir (ANOVA, Post-Hoc Tukey testi). ** $p < 0,05$ 48 saat ve 72 saat grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir (Eşleştirilmiş gruplar T testi).

4.7. mtDNA İçeriği

Şekil 4-18'de görüldüğü gibi mtDNA içeriğinde, 48 saatlik maruziyet sonucunda anlamlı bir değişim saptanmadı ($p > 0,05$). 72 saatlik maruziyet sonucunda, tüm maruziyet gruplarında mtDNA içeriğinin anlamlı olarak azaldığı görüldü. 72 saatlik maruziyette, 10 ve 20 µM dozlarında mtDNA içeriğinin kontrol grubuna göre eşit oranda (yaklaşık 0,4 kat) anlamlı şekilde ($p \leq 0,0002$) azaldığı tespit edildi.

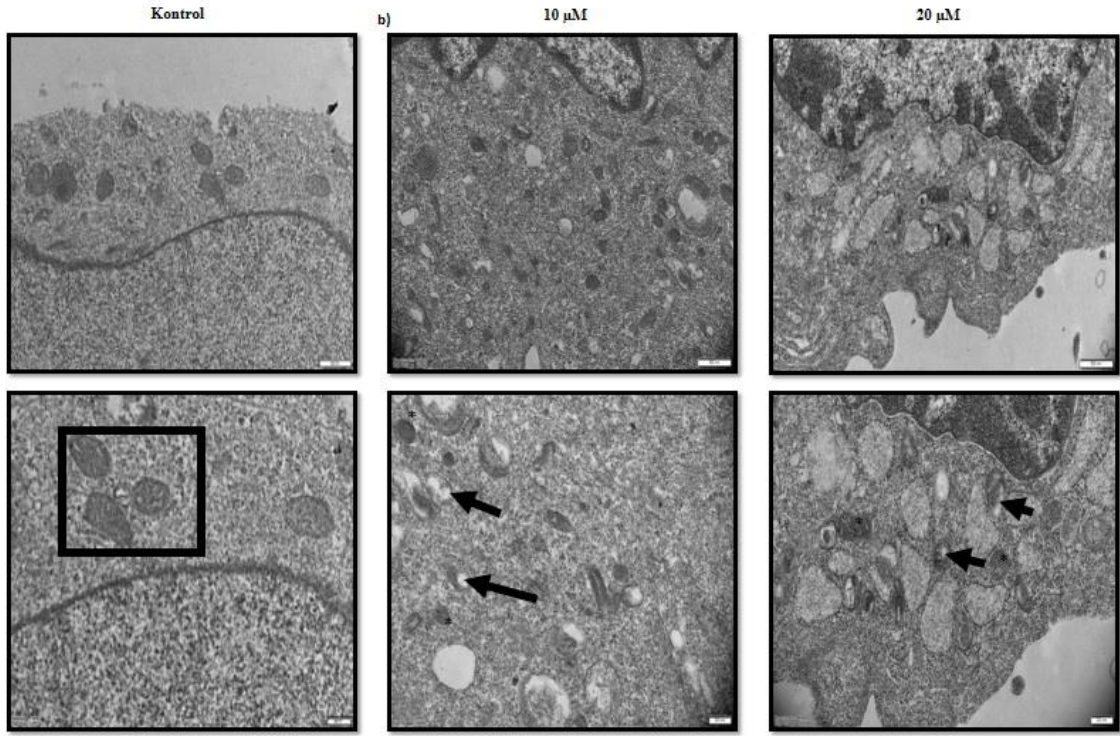


Şekil 4-18: 48 ve 72 saat, 0-20 µM Regorafenib maruziyeti sonucunda mtDNA içeriğinde meydana gelen değişimler

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. * $p < 0,05$ ve # $p < 0,001$ kontrol grubuna karşı anlamlı farklılık görülen grupları göstermektedir (ANOVA, Post-Hoc Tukey testi). ** $p < 0,05$ 48 saat ve 72 saat grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir (Eşleştirilmiş gruplar T testi). mtDNA: mitokondriyal DNA.

4.8. Elektron Mikroskobu Sonuçları

72 saatlik maruziyet sonucu 10 ve 20 µM maruziyet sonucunda Şekil 4-19'da da gösterildiği gibi mitokondride krista hasarı, çift katlı membran yapısında bozulma ve matriks kavitasyonlarının olduğu saptandı.



Şekil 4-19: 72 saat, Kontrol, 10 ve 20 μM Regorafenib maruziyeti sonucunda mitokondrilerde meydana gelen değişimler

Oklar (➡) mitokondriyal matriks kavitasyonlarını yıldız (*) işaretleri elektronca yoğun mitokondrileri göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Tirozin kinaz inhibitörleri, tümör proliferasyonunda etkili olan yolları spesifik olarak hedefleyen moleküllerdir. Bundan dolayı yan etkilerinin konvansiyonel tedavilere kıyasla daha az olması beklenir. Ancak klinikte kullanımlarının artması ile ortaya çıkan advers etkileri endişe yaratmaktadır. Bu advers etkilerden biri de kardiyotoksisitedir. Kardiyovasküler hastalığı olan kişilerde bu durum daha da büyük bir risk oluşturmaktadır. Kardiyotoksik etkiler ilacın hedeflediği sinyalizasyon yollarına bağlı olabileceği gibi hedef dışı etkilerinden de kaynaklanabilmektedir (Lee ve Kim, 2018).

Regorafenib, kolorektal kanser, gastrointestinal stromal tümörler ve hepatoselüler karsinom tedavisinde kullanılan, VEGFR, PDGFR gibi kanser oluşumuna katkı yapan pek çok sinyalizasyon yolağını bloke eden tirozin kinaz inhibitörü bir ilaçtır. Başka solid tümörlerde de kullanılabileceğine dair klinik çalışmaları devam etmektedir. Regorafenib ile en fazla görülen kardiyotoksik etki hipertansiyondur ve Regorafenib'in neden olduğu hipertansiyon insidansının %30-59 arasında olduğu raporlanmıştır (Agarwal ve ark., 2018). Ayrıca Regorafenib'in kardiyak iskemi ve enfarktüse de neden olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada amaç; kolorektal kanser, gastrointestinal stromal tümör ve hepatoselüler karsinoma tedavisinde umut vadeden bir ilaç olan Regorafenib'in doz kısıtlayıcı veya tedavinin sonlanmasına neden olabilen kardiyotoksik etkilerinin moleküler mekanizmasının mitokondriyal ve diğer hücrel stres yolları üzerinden *in vitro* ortamda araştırılmasıdır. Bu amaçla, H9c2 sıçan kardiyomiyoblastik hücre modeli kullanılmıştır. *In vitro* kardiyotoksisite çalışmalarında sıklıkla kullanılan H9c2 hücre modeli, primer kardiyomiyosit hücrelerine alternatif olarak kullanılmaktadır. Yetişkin kardiyomiyositlerde bulunan hormonal ve elektriksel sinyal yollarının bu hücrelerde de bulunduğu gösterilmiştir (Hescheler ve ark., 1991). Ayrıca H9c2 hücre modelinin hücrel enerji mekanizması bakımından da başka immortalize hücre hattına kıyasla primer kardiyomiyositlere daha fazla benzediği saptanmıştır (Kuznetsov ve ark., 2015). Bu nedenlerden dolayı H9c2 hücre modelinin çalışmamız için oldukça uygun olduğuna karar verilmiştir.

Regorafenib (160 mg), klinikte 28 günlük döngünün ilk 21 günü boyunca kullanılmaktadır ve sürekli kullanım gerektirmektedir (FDA, 2017a). Bu nedenle uzun dönemli etkilerini araştırabilmek için maruziyet süresi olarak görece daha uzun süreler olan 48 ve 72 saat seçilmiştir. Bir çalışmada, tek doz 160 mg Regorafenib uygulanmasını takiben maksimum plazma konsantrasyonu (C_{max}) yaklaşık 5 µM olarak saptanmıştır. Kararlı durum konsantrasyonu ise yaklaşık olarak 10 µM olarak belirlenmiştir (Shirley ve Keating, 2015) Başka bir çalışmada ise C_{max} değeri 8.08 µM olarak belirtilmiştir (Zhang ve ark., 2017). Bu sonuçlardan hareketle çalışmamızda 5 µM, 10 µM ve 20 µM konsantrasyonları ile çalışılması uygun görülmüştür.

Elde ettiğimiz tripan mavisi ve LDH sitotoksosite sonuçlarına baktığımızda dozlar arasında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. MTT testinde hücre proliferasyonunda 48 saatlik maruziyet süresinde yalnızca 20 µM dozda azalma görülürken; 72 saatlik maruziyet sonucunda tüm maruziyet gruplarında hücre proliferasyonun doza bağımlı şekilde inhibe olduğu saptanmıştır. Bu üç çalışma sonucunda Regorafenib'in kardiyomiyoblastik hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermekten ziyade antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. Benzer şekilde, tümör hücrelerinde de Regorafenib'in tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederek antikanser etki gösterdiği bildirilmiştir (Kim ve ark., 2019; Marks ve ark., 2016). Buna karşın, HepG2 hücrelerinde 20 µM dozda 24 saat maruziyet sonucunda sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (Paech ve ark., 2018). Weng ve ark. (2015) tarafından yapılan başka bir çalışmada da 24 saat Regorafenib maruziyetinin 5 µM ve daha yüksek dozlarda primer sıçan hepatositlerde sitotoksik etkiye neden olduğu gösterilmiştir (Weng ve ark., 2015). Bu durum, kardiyomiyoblastik hücrelerinin kinaz ekspresyonlarının farklılığından, oksidatif fosforilasyon ve ATP'ye duyulan ihtiyacın farklı olmasından kaynaklanabilir (French ve ark., 2010).

Bilindiği üzere mitokondriler hücrelerin ATP üretim merkezleridir. ATP üretimi için; karbonhidrat, protein, lipidlerin oksidasyonu sonucu elde edilen NADH, FADH₂ gibi indirgenmiş kofaktörler mitokondri ETZ'ye elektron taşımaktadır. Bu elektronlar kompleks I ve IV arasında taşınır ve kompleks IV moleküler oksijeni suya indirger. ETZ boyunca elektronların hareketi protonların matriksten membranlar arası boşluğa proton pompalanmasını kontrol eder. Bu şekilde bir proton gradienti (proton motive

force- mitokondri membran potansiyeli) oluşur. Kompleks V oluşan bu proton gradienti sayesinde ATP sentezini gerçekleştirir (Busiello vd., 2015; Ramsden vd., 2012).

Kardiyomiyositler kasılma ve gevşeme fonksiyonlarını gerçekleştirebilmek için ATP'ye yüksek derece ihtiyaç duymaktadırlar. Çalışmamızda 48 ve 72 saatlik maruziyetler sonucunda, tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna kıyasla hücre içi ATP miktarında belirgin azalma saptanmıştır. Mitokondri membran potansiyeli, proteinlerin mitokondriye transportundan ATP sentezine kadar mitokondrinin sağlıklı bir şekilde çalışması için son derece önemlidir. (Zorova ve ark., 2018). Çalışmamızda 72 saatlik maruziyet sonucunda, 20 μ M dozda mitokondri membran potansiyelinin belirgin şekilde bozulduğu saptanmıştır.

Hepatoselüler karsinom hücre hattı olan HepG2 hücrelerinde 24 saatlik 10 ve 20 μ M dozlarda Regorafenib maruziyetinde hücre içi ATP miktarı anlamlı şekilde azalmıştır. Aynı hücre hattında 5 μ M maruziyette mitokondri membran potansiyeli bir değişiklik göstermezken, 10 ve 20 μ M dozda kontrol grubuna göre düşmüştür (Paech ve ark., 2018). HepaRG hücre hattında 5, 10 ve 20 μ M dozlarında, 24 saatlik maruziyet sonucunda hücre içi ATP miktarının anlamlı şekilde azaldığı saptanmıştır (Mingard ve ark., 2018).

Mesane kanseri hücresi TSGH 8301 hücre hattında 30 μ M dozda 24 ve 48 saatlik Regorafenib maruziyeti sonucunda mitokondri membran potansiyelinde bozulma, kaspaz 3 ve kaspaz 8 aktivasyonunda artma saptanmıştır (Hsu ve ark., 2017). Yine aynı hücre hattı kullanılarak yapılan başka bir çalışmada 15 μ M 48 saatlik Regorafenib'in aynı etkilere neden olduğu gösterilmiştir (Chiang ve ark., 2019). Oldukça metastatik özellik gösteren, insan akciğer kanseri hücre hattında (CL1-5-F4) da Regorafenib 10 ve 20 μ M dozda doza bağlı olarak kaspaz 3 aktivasyonuna, mitokondri membran potansiyelinin bozulmasına neden olmuş, erken ve geç apoptozu artırmıştır (Weng ve ark., 2019). Osteosarkom hücre hattında ise 48 saat 5 ve 10 μ M Regorafenib maruziyetinin aynı etkilere sebep olduğu gösterilmiştir (Pan ve ark., 2019).

ETZ'de bulunan komplekslerin eksikliği de hücrelerde ATP üretiminin bozulmasına neden olabilir. Çalışmamızda her iki maruziyet süresi sonucunda, özellikle 20 μ M dozda ETZ'de bulunan komplekslerin ekspresyonunda azalma görülmüştür. Komplekslerin ekspresyonunun azalması kompleks aktivitelerinde de azalmaya neden olarak membran potansiyelinde bozulmaya, dolayısıyla ATP üretiminin bozulmasına ve

ATP içeriğinin azalmasına yol açabilir (Tu ve ark., 2012; Leipnitz ve ark., 2018). Bu durum özellikle 72 saatlik 20 μ M maruziyet grubunda belirgin şekilde görülmektedir. Bu konsantrasyonda, kompleks V ve kompleks I ekspresyonu anlamlı şekilde azalmış, membran potansiyeli belirgin şekilde bozulmuş ve hücre içi ATP miktarında önemli ölçüde düşme tespit edilmiştir.

Kompleks I'in 7 alt ünitesi mtDNA tarafından kodlanmaktadır. Bu nedenle mitokondride ve mtDNA'da meydana gelen hasarın kompleks I aktivitesini daha fazla etkileyeceği düşünülmektedir (Lenaz ve ark., 1997). Çalışmamızda 72 saat maruziyet sonucunda 10 ve 20 μ M konsantrasyonda mtDNA içeriğinde belirgin azalma saptanmıştır. Bu duruma paralel şekilde 10 μ M ve 20 μ M dozda kompleks V ve I ekspresyonunda azalma görülmüştür. Bu azalma, 10 μ M için istatistiksel olarak anlamsız iken 20 μ M için anlamlı bulunmuştur. mtDNA hasarı, mtDNA kopya sayısının azalmasına ve sonuçta mitokondriyal disfonksiyona neden olmaktadır. Dolayısıyla mtDNA kopya sayısının mitokondriyal fonksiyonun değerlendirilmesinde belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Kardiyovasküler hastalık riskine sahip hastalarda düşük mtDNA kopya sayısı saptanmıştır (Yue ve ark., 2018). Bu nedenle mtDNA içeriğindeki azalma Regorafenib'in mitokondriyal hasara yol açığının bir diğer göstergesi olabilir. Ayrıca mtDNA miktarının azalması disfonksiyonel mitokondrilerin artmasına neden olur ve bu durumun çeşitli hastalıklara zemin hazırladığı bilinmektedir (Tocchi ve ark., 2015).

Kompleks I'in diğer mitokondriyal komplekslere kıyasla kardiyovasküler hastalıklarda daha fazla etkisinin olduğu düşünülmektedir (Forte ve ark., 2019). Kardiyak hipertropi ve kalp yetmezliği durumlarında sağlıklı kontrollere kıyasla kompleks I ekspresyonunda azalma saptanmıştır (Wüst ve ark., 2016). Ayrıca kardiyomiyopatide de kompleks I fonksiyonunun bozulduğu belirtilmiştir (Karamanlidis ve ark., 2013).

Regorafenib'in fareden izole edilen karaciğer mitokondrilerine 15 dakikalık maruziyeti sonucunda kompleks II aktivitesinde doza bağlı bir azalma, 10 μ M dozda kompleks III aktivitesinde azalma, 5, 10 ve 20 μ M dozlarda ise kompleks V aktivitesinde düşme saptanmıştır. Kompleks I ve IV aktivitesinde değişiklik saptanmamıştır (Paech ve ark., 2018). Sıçanlardan izole edilen mitokondriler ile yapılan çalışmada 15 dakikalık 80,8 μ M Regorafenib maruziyeti sonucunda yalnızca kompleks

II aktivitesinin düştüğü tespit edilmiştir. 8,08 μ M, 20,2 μ M, 40,4 μ M ve 80,8 μ M konsantrasyonlarda sitokrom c salınımı artmıştır (Zhang ve ark., 2017).

Mitokondriyal dinamiğin korunması için mitokondriyal fisyon ve füzyon olaylarının bir denge içerisinde olması gerekmektedir. Bilindiği üzere mitokondriler yeniden üretilmez, var olan mitokondrilerin bölünmesi, protein ve lipidlerin sentezi ve taşınması sonucu oluşurlar (Hom ve Sheu, 2009). Mitokondriyal dış zar füzyonunda rol alan proteinler MFN1, MFN2'dir. İç zar füzyonunda OPA1 görevlidir. Mitokondriyal fisyonda ise DRP1 ve FIS1 proteinleri rol oynamaktadır (Bonora ve ark., 2019). Memelilerde OPA1'in mitokondriyal krista yapısının sürdürülmesinde önemli rolünün olduğu gösterilmiştir (Frezza ve ark., 2006). Ayrıca mitokondriyal komplekslerin etkin şekilde çalışması için de OPA1'in gerekli olduğu saptanmıştır. Bundan dolayı OPA1 mitokondriyal solunumun düzenlenmesinde önemli bir regülatör olarak görev yapmaktadır (Cogliati ve ark., 2013; Ong ve ark., 2015). OPA1'in ekspresyonunun artmasının canlı için koruyucu olabileceği düşünülmektedir. (Civiletto ve ark., 2015). Çalışmamızda, 72 saatlik 10 ve 20 μ M dozlarda Regorafenib maruziyeti sonucunda kardiyomyoblast hücrelerinin elektron mikroskop görüntülerinde mitokondrilerin krista yapılarının bozulmuş olduğu görülmektedir. Bu durum, aynı dozlarda oluşan strese karşı koruyucu olarak OPA1 ekspresyonunun artmasına neden olabilir. Çalışmamızda 5 μ M dozda OPA1 ekspresyonunun 72 saatlik maruziyette 48 saatlik maruziyete kıyasla daha fazla artması, ATP üretimini destekleyerek ilacın oluşturduğu strese yönelik koruyucu bir etki olabilir. Bu durumun tersine 20 μ M konsantrasyonda 72 saat maruziyette OPA1 seviyesinin aynı dozda 48 saatlik maruziyet grubuna kıyasla azalması, bu dozda mitokondriyal fonksiyonları olumsuz olarak etkileyebilir. Hem sıçanlarda hem de insanlarda, kalp yetmezliğinde, OPA1 ekspresyonunun azaldığı raporlanmıştır (Chen ve ark., 2009). HepG2 hücrelerinde OPA1 protein ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla 24 saat 5 ve 10 μ M Regorafenib maruziyeti sonucunda artma; 20 μ M'da ise azalma görülmüş ancak istatistiksel bir anlamlılık saptanamamıştır (Paech ve ark., 2018).

Dış mitokondriyal zar füzyonunda görev alan MFN1 ve MFN2'nin kalpte bulunmamasının orta derecede OXPHOS disfonksiyonuna neden olduğu tespit edilmiştir (Mourier ve ark., 2015). MFN2'nin mitokondriyal fonksiyonların sürdürülmesinde ve koenzim Q homeostazisinin sağlanması için gerekli olduğu

gösterilmiştir (Mourier ve ark., 2015). Çalışmamızda MFN1 ve MFN2 genlerinin ekspresyonunun özellikle 20 μ M konsantrasyonda her iki maruziyet süresi sonunda anlamlı şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum kardiyomiyoblast hücrelerini oluşturan strese karşı korumaya yönelik olabilir. Ayrıca MFN1 ve MFN2'nin mitokondriyal füzyonun yanı sıra kalpte başka fonksiyonlarının da bulunabileceği öne sürülmektedir (Sebastián ve ark., 2017). Ayrıca *in vitro* ve *in vivo* kardiyak hipertropi modellerinde MFN2 mRNA ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır (Fang ve ark., 2007)

İç zar füzyonunun gerçekleşebilmesi için mitokondri membran potansiyelinin bozulmamış olması gerekmektedir (Meeusen ve ark., 2006). Füzyon mtDNA'nın bütünlüğü ve hasarlı mitokondrilerin ortadan kaldırılması için önemlidir (Westermann, 2002). Membran potansiyelinin bozulması iç zar füzyonunu da olumsuz etkileyeceği için, bu durum hasarlı mitokondrilerin birikmesine neden olabilir ve hücrenin ölümüne gitmesine yol açabilir. Ayrıca füzyonun düzgün şekilde gerçekleşmemesi mtDNA içeriğinin de azalmasına neden olabilir. Çalışmamızda 72 saatlik 20 μ M maruziyet sonucunda mitokondri membran potansiyelinde belirgin şekilde bir bozulma tespit edilmiştir. Bu durum füzyon olayını da olumsuz etkileyebilir. Dolayısıyla füzyonda görevli olan MFN1, MFN2 ve OPA1 genlerinin ekspresyonunda görülen artış, hücrelerin stresin üstesinden gelmek için verdiği tepkinin bir sonucu olabilir.

DRP1'in artmasının membran potansiyelinin bozulmasına ve apoptoza yol açtığı gösterilmiştir (Ong ve ark., 2015). Dolayısıyla DRP1 gen ekspresyonunun her iki maruziyet süresinde yüksek dozlarda artması ile membran potansiyelinde bozulma ve hücrelerin apoptoza gitmesi arasında bir ilişki olabilir. Bununla beraber, DRP1 ekspresyonunun azalması, mitofajinin inhibe olmasına ve mitokondri disfonksiyonuna neden olmaktadır. Bu durumun kalpte sol ventrikül disfonksiyonuna zemin hazırladığı ve iskemi-reperfüzyon hasarına yatkınlığı artırdığı gösterilmiştir (Ikeda ve ark., 2015). DRP1 baskılanmasının, yetişkin kardiyomiyositlerde mitokondriyal solunumu inhibe ettiği ve bunun mitokondriyal fisyonun bağımsız olarak gerçekleştiği belirtilmiştir (Zhang ve ark., 2016). Dolayısıyla, DRP1 ekspresyonundaki artış, yüksek dozların hücrelerde yarattığı strese karşı koruyucu bir yanıt olarak düşünülebilir. Çalışmamızda en yüksek doz olan 20 μ M konsantrasyonda DRP1 ekspresyon seviyelerinin 48 saatte 72 saatlik maruziyete kıyasla daha fazla indüklendiği görülmektedir. Bu durum 72 saat

20 μ M dozda Regorafenib'in kardiyomiyoblast hücrelerinde oluşturduğu hasarın bir göstergesi de olabilir.

Bilindiği üzere oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi için iç mitokondriyal zar boyunca oluşan elektrokimyasal proton gradientinin büyük önemi vardır. Elektron taşıyıcı sistem boyunca elektron taşınması esnasında kompleks I, III ve IV tarafından membranlar arası boşluğa proton salınır, kompleks V'ten matrikse proton girmesi ve ADP'den ATP üretimi eş zamanlı olarak gerçekleşir. Ancak bu protonlar iç mitokondriyal zarda bulunan eşleşme bozucu proteinler aracılığı ile ATP üretimi olmadan da mitokondriyal matrikse geçebilirler. Bu durum mitokondri membran potansiyelinin bozulmasına neden olmaktadır (Cadenas, 2018). Ayrıca UCP2'nin mitokondri membran potansiyelini düşürerek ROS üretimini azalttığı kabul edilmektedir. ROS üretimi ve mitokondri membran potansiyelini arasında güçlü bir ilişki olduğu doğrulanmıştır. UCP2 geni susturulan farelerde ROS üretiminin arttığı gösterilmiştir. mitokondri membran potansiyelinin azalması ile ETZ'deki elektron transferi hızlanabilir ve doğrudan O₂'ye iletilen elektronlar azalabilir bu sayede mitokondride ROS oluşumu da azaltılmış olur (Cadenas, 2018; Zhao ve ark., 2019). Çalışmamızda her iki maruziyet süresinde de UCP2 protein ekspresyonunda anlamlı olmayan artış saptanmıştır. Bu durum membran potansiyelinin bozulmasına katkı yapabileceği gibi, hücrelerde oluşan oksidatif stresin azalmasına da yardımcı olabilir. Dolayısıyla UCP2 ekspresyonunun artması ROS üretiminin azalmasına yönelik bir cevap olarak düşünülebilir. Ayrıca antioksidan bir enzim olan SOD2 gen ekspresyonlarına bakıldığında, 48 saatlik maruziyet sonucunda 20 μ M'da ekspresyonun en fazla olduğu, aynı dozda UCP2'deki artışın da fazla olduğu görülmektedir. 72 saatlik maruziyette, SOD2 ekspresyonunda yine artış görülmüş, ancak bu artışın 48 saatlik maruziyete kıyasla daha az olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılık 72 saat 20 μ M maruziyet grubunda UCP2 ekspresyonunun, 48 saate kıyasla daha az olması ile ilişkili olabilir.

HepG2 hücrelerinde, mitokondriyal süperoksid birikim miktarında 24 saat 10 ve 20 μ M Regorafenib maruziyeti sonucunda anlamlı bir artış saptanmasına rağmen, SOD2 protein ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Bu durumun, maruziyet süresinin kısa olmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Paech ve ark., 2018).

Lon proteaz 1 (LONP1) mitokondriyal matrikste bulunan ATP-bağımlı bir proteazdır. Mitokondriyal proteinlerin kalite kontrolünün yapılmasını ve katlanmamış, denatüre ve okside olmuş proteinlerin mitokondriden uzaklaştırılmasını sağlar ve mitokondri homeostazisinin sağlanmasında oldukça önemli bir role sahiptir (Tatsuta, 2009). DNA'ya bağlanma, şaperon aktivitesi, ETZ'de bulunan proteinlerin katlanması gibi mitokondride LONP1'nin pek çok görevinin olduğu bilinmektedir (Ngo ve Davies, 2007). LONP1'nin mtDNA'ya bağlanmasının replikasyonda da önemli olabileceği böylece mitokondriyal genomun sürdürülmesinde rolü olduğu düşünülmektedir (Liu ve ark., 2004). İnsan fibroblastlarında LONP1'nin ekspresyonunun azalmasının mitokondriyal solunumun bozulmasına, mitokondriyal kütlenin azalmasına ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (Bota ve ark., 2005). LONP'nin stres koşullarında protektif etkiye sahip bir enzim olduğu bilinmektedir. LONP indüksiyonunun oksidatif hasara karşı koruyucu olduğu, mitokondriyal fonksiyonu koruduğu ve hücre proliferasyon kaybını azalttığı saptanmıştır. LONP1 aktivitesindeki azalmanın protein hasarını artırdığı ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu görülen yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların oluşmasına neden olabileceği düşünülmektedir (Ngo ve Davies, 2009). Çalışmamızda her iki maruziyet süresinde 5 ve 10 μ M dozlarda LONP1 protein ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. 72 saatlik 20 μ M deney grubunda ise ekspresyonun kontrol ve diğer deney gruplarına kıyasla azalmasının bu dozda stresin yüksek olmasından ve artık stres ile baş edilememesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülebilir.

HSP70'in, stres ile indüklenen kardiyak hücre hasarına karşı korumada önemli rolü olduğu düşünülmektedir. HSP70 kalpte eksprese edilen, hipoksi, oksidatif stres, UV radyasyon gibi hücrede stres oluşturan durumlara karşı koruyucu olarak görev yapan şaperon proteindir. HSP70'in çevresel değişikliklere ve patojenik durumlara toleransı artırarak hücrenin hayatta kalmasını sağladığı düşünülmektedir (Chen ve ark., 2015). HSP70'in tümör hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği, ancak herhangi bir stres altında olmayan normal hücrelerde oldukça düşük ekspresyon gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca kanser hücre hattında HSP70 inhibisyonunun mitokondriyal proteinlerin kalite kontrol mekanizmasını bozduğunu ve mitokondriyal fonksiyonların olumsuz etkilenmesine neden olduğu gösterilmiştir (Radons, 2016; Julia ve ark., 2017). Ayrıca ısı ile hasar oluşturulan kardiyak dokuda yoğun stres durumunda HSP70 seviyelerinin azaldığı ve HSP70 seviyesinin düşmesinin hasarlı dokuda ısıya karşı

koruyucu etkinin azalmasına yol açtığı gösterilmiştir (Chen ve ark., 2015). Dolayısıyla 72 saatlik maruziyette 10 ve 20 μM gruplarında görülen artış hücresel strese karşı koruyucu bir cevap olarak düşünülebilir. Ek olarak aynı dozlarda 48 saatlik maruziyete kıyasla 72 saatte HSP70 ekspresyonunun artması maruziyet süresi uzadıkça hücresel stresin arttığının bir göstergesi olabilir.

Diğer taraftan HSP70 gen ekspresyonundaki artışın ROS'un temizlenmesinde görevli olan süperoksid dismutaz, katalaz, gibi enzimlerin aktivitelerini de arttırabileceği düşünülmektedir (Snoeckx ve ark., 2001). Ancak çalışmamızda 48 saatte 20 μM 'da SOD2 gen ekspresyonun aşırı derecede artmasına rağmen HSP70 protein ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla minimal bir artış saptanmıştır. Bu durum maruziyet süresi ile ilişkilendirilebilir. Çünkü 72 saatlik maruziyet grubunda HSP70'in belirgin derecede arttığı 10 ve 20 μM deney gruplarında, SOD2 gen ekspresyonunda da belirgin bir artış söz konusudur.

HSP70'in mitokondriyal dış zar permeabilizasyonunu engelleyerek, sitokrom c salınımını, dolayısıyla intrinsik yolak olarak da bilinen mitokondriyal apoptozu engellediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Stankiewicz ve ark., 2005; Yang ve ark., 2012). Çalışmamızda 72 saatlik 20 μM maruziyette sitokrom c protein ekspresyonunun azalması HSP70 ekspresyonunun artması ile ilişkilendirilebilir, ancak 10 μM 'da HSP70 ekspresyonunun artmasına karşın sitokrom c seviyesinde de anlamlı olmayan bir artış tespit edilmiştir. Bu durum, 20 μM 'daki HSP70 ekspresyonunun 10 μM 'dan daha fazla olmasından kaynaklanabilir.

Endoplasmik retikulumda stres yaratacak durumlarda, hücreler bu strese adapte olabilmek için endoplasmik retikulumda katlanmamış protein yanıtı oluştururlar. GRP94 de katlanmamış protein yanıtı boyunca aktive olan bir stres proteinidir (Argon ve Simen 1999; Sozen ve ark., 2015). GRP94 ekspresyonunun artmasının kardiyomiyosit hücrelerinde koruyucu etki oluşturduğu saptanmıştır (Minamino ve ark., 2010). Çalışmamızda GRP94 ekspresyonunda 48 saatte deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış saptanmış ve 20 μM dozdaki bu artışın diğer konsantrasyonlardan daha az olduğu görülmüştür. 72 saatte ise bu artışın yok olduğu görülmektedir. Bu durumun, 72 saatlik maruziyet gruplarında ve 48 saatlik 20 μM Regorafenib maruziyetinde hücrelerdeki stresin artmasından ve artık stres ile başa çıkılamadığı için hücrelerin apoptoza gitmesinden kaynaklandığı düşünülebilir.

Hücrelerde apoptoz, ekstrinsik ve intrinsik yolak olmak üzere 2 ana yolak üzerinden gerçekleşmektedir. İntrinsik yolakta mitokondriler önemli rol oynamaktadır, bu nedenle mitokondriyal yolak olarak da isimlendirilmektedir. İntrinsik yolakta, mitokondrilerden sitozole sitokrom c salınımı sonrasında, sitozolde sitokrom c APAF-1'e bağlanır ve apoptozom oluşur. Apoptozomda kaspaz 9 aktive edilir ve aktif kaspaz 9 kaspaz 3'ü aktiveleştirir (Jin ve El-Deiry, 2005). Sitokrom c mitokondriyal yolak üzerinden apoptozu indüklemenin yanı sıra oksidatif fosforilasyonda da rol oynamaktadır. Sitokrom c kompleks III'ten kompleks IV'e elektron taşınımını sağlamaktadır. Ayrıca kardiyovasküler hastalıklarda da önemli olduğu söylenmektedir. Kardiyomiyopatinin kalp kası hücrelerinin apoptozu ile başladığı ve normal kalbe kıyasla daha fazla kaspaz 3 ve sitokrom c eksprese ettiği belirtilmiştir (Das, 2019). Çalışmamızda sitokrom c ekspresyonlarında anlamlı bir artış saptanamamıştır. Buna karşın apoptozda efektör kaspaz olarak bilenen kaspaz 3'ün öncü formu olan prokaspaz 3'ün azalması apoptoz ile ilişkilendirilebilir. Çalışmamızda her iki maruziyet süresinde 20 μ M konsantrasyonda prokaspaz 3 ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azaldığı saptanmıştır. Bununla beraber 72 saatlik maruziyette 5 ve 10 μ M dozlarda da prokaspaz 3'te azalma saptanmış, ancak istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır.

Mitokondri membran potansiyelinin, mitokondrinin dış zar permeabilizasyonu veya sitokrom c salınımı içi gerekli olmadığı görülmektedir. Mitokondri membran potansiyeli, sitokrom c'nin sitozole salınmasından sonra düzelebilir ve mitokondri ATP üretimini sürdürebilir (Ow ve ark., 2008). Bu durum, apoptoz görülen hücrelerde neden membran potansiyelinde aşırı bir bozulma görülmediğini de açıklayabilir (Grimm ve Brdiczka, 2007). Dolayısıyla, 72 saatlik, 20 μ M maruziyet grubunda membran potansiyelinde anlamlı derecede bozulma görülmesine rağmen, sitokrom c ekspresyonlarında anlamlı bir artış saptanmamış olabilir. Ayrıca fizyolojik şartlarda iç ve dış membranda bulunan taşıyıcılar birbiri ile etkileşime girmez, ancak mitokondri permeabilitesini etkileyen bir durum olduğu zaman birbiri ile etkileşime geçerek mitokondriyal geçirgenlik porunun oluşmasına ve sitokrom c salımına neden olur (Jeong ve Seol, 2008). Çalışmamızda Regorafenib 48 saatlik maruziyet sonucunda tüm maruziyet dozlarında sitokrom c ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan artışa sebep olmuştur. 72 saatlik maruziyet sonucunda 5 ve 10 μ M dozlarında anlamlı olmayan artma; 20 μ M konsantrasyonda ise anlamlı olmayan azalma görülmüştür. Bu

dozda mitokondri membran potansiyelinde bozulma en fazla olmasına rağmen sitokrom c protein seviyesinde azalma görülmesi geçiş poru oluşturan proteinlerdeki bozukluktan kaynaklanabilir.

Çalışmamızda sitokrom c seviyelerinde anlamlı bir artış görülmemesine rağmen hem 48 saatlik hem de 72 saatlik maruziyetler sonucunda en yüksek konsantrasyonda prokaspaz 3 seviyelerinde anlamlı derecede azalma gözlemlenmiştir. Prokaspaz 3 seviyesinin azalması apoptoz ile ilişkilendirilmektedir (Faraone ve ark., 2009). Kalpte sitokrom bağımlı kaspaz aktivasyonu çeşitli mekanizmalar tarafından sıkı şekilde kontrol altındadır. Kardiyomiyositlerde düşük seviyede Apaf-1 eksprese edildiği ve sitokrom bağımlı kaspaz aktivasyonunu X'e bağlı inhibitör apoptoz proteini (XIAP) ile sıkı şekilde kontrol altında olduğu söylenmiştir. Bundan dolayı sitokrom c seviyesinin artması kalpte apoptoz ile sonuçlanmayabilir (Chiong ve ark., 2011). Çalışmamızda da sitokrom c protein ekspresyonunda belirgin değişiklik saptanmamıştır. Bu nedenle en yüksek dozda görülen apoptozun mitokondriyal yoldan ziyade ekstrinsik yoldan üzerinden gerçekleşmiş olabileceği düşünülebilir. Ayrıca sitokrom c ekspresyonundaki azalma kas güçsüzlüğü ile ilişkilendirilmiştir (Barreto et al 2016). Çalışmamızda 72 saatlik maruziyet süresini takiben sitokrom c ekspresyonunun azalması kardiyak kas güçsüzlüğüne işaret edebilir. Benzer şekilde Huot ve ark. 2019 tarafından hayvanlar üzerine yapılan çalışmada sitokrom c seviyesinin, Regorafenib'e maruz bırakılan hayvanların kalp kasında azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca Regorafenib'in çeşitli kanser hücre hatlarında apoptoz indüksiyonuna sebep olduğu da gösterilmiştir (Wu ve ark., 2019; Chiang ve ark., 2019; Pan ve ark., 2019)

Sonuç olarak, Regorafenib çalışma koşullarında kardiyomiyoblastik hücre hattında antiproliferatif etki göstermiş, hücre içi ATP miktarında ve mitokondri membran potansiyelinde azalmaya neden olmuştur. Mitokondri dinamiğinde rol oynayan genlerde genellikle en yüksek dozda artış tespit edilmiştir. Oksidatif fosforilasyonda görevli kompleks I ve V protein ekspresyonlarında özellikle 72 saatte en yüksek konsantrasyonda belirgin azalma saptanmıştır. Mitokondriyal proteinlerden UCP2 ve LONP1 ekspresyonlarında maruziyet süresi ve dozuna bağlı olarak anlamlı olmayan değişimler tespit edilmiştir. Ayrıca mtDNA içeriğinde 72 saatlik maruziyet sonucunda belirgin azalma görülmüştür. Tüm bu değişiklikler, Regorafenib'in kardiyomiyoblast hücrelerinde mitokondri hasarına yol açtığını düşündürmektedir.

HSP70 ekspresyonunda 72 saatte en yüksek iki dozda saptanan anlamlı artış ise, uzun süre maruziyette hücrelerde yüksek derecede stres oluştuğunun bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Prokaspaz 3 seviyelerinin her iki maruziyet süresinde özellikle en yüksek konsantrasyonda belirgin şekilde azalması ise, kardiyomiyoblast hücrelerin apoptoza gittiğini düşündürmektedir. Çalışmamızda H9c2 hücrelerinde 48 ve 72 saatlik 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M Regorafenib maruziyeti sonucunda meydana gelen tüm değişiklikler Şekil 5-1’de özetlenmiştir.



Maruziyet süresi	48 saat			72 saat		
Maruziyet konsantrasyonu	5 µM	10 µM	20 µM	5 µM	10 µM	20 µM
Tripan mavisi sitotoksosite testi	-	-	-	-	-	-
LDH sitotoksosite testi	-	-	-	-	-	-
MTT hücre proliferasyon testi			↓	↓	↓↓	↓↓
Hücre içi ATP miktarı	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
Mitokondri membran potansiyeli	-	-	-	-	-	↓
Gen ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler						
<i>FTS1</i>	-	-	↑	-	↑↑	↑↑
<i>DRP1</i>	-	-	↑↑	-	↑	↑
<i>MFN1</i>	-	-	↑↑	-		
<i>MFN2</i>	-	-	↑	-	↑	↑
<i>OPA1</i>	-	-	↑	-	↑	-
<i>SOD2</i>	-	-	↑↑	-	↑↑	↑↑
Protein ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler						
Mitokondriyal kompleksler						
<i>Kompleks I</i>	-	-	-	-	-	↓
<i>Kompleks II</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Kompleks III</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Kompleks IV</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Kompleks V</i>	-	-	-	-	-	↓
<i>UCP2</i>	-	-	-	-	-	-
<i>LONP1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Sitokrom c</i>	-	-	-	-	-	-
<i>HSP70</i>	-	-	-	-	↑	↑
<i>GRP94</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Prokaspaz 3</i>	-	-	↓	-	-	↓
<i>mtDNA içeriği</i>				↓	↓↓	↓↓

Şekil 5-1: H9c2 hücrelerinde 48 ve 72 saatlik maruziyet sonucu meydana gelen değişiklikler

↑, ↓ $p < 0,05$; ↑↑, ↓↓ $p < 0,001$

KAYNAKLAR

Abdel-Rahman, O. ve Fouad, M. (2014). Risk of cardiovascular toxicities in patients with solid tumors treated with sunitinib, axitinib, cediranib or regorafenib: an updated systematic review and comparative meta-analysis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **92**(3), 194-207.

Afolayan, A. J., Teng, R. J., Eis, A., Rana, U., Broniowska, K. A., Corbett, J. A. ve ark. (2014). Inducible HSP70 regulates superoxide dismutase-2 and mitochondrial oxidative stress in the endothelial cells from developing lungs. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **306**(4), L351-L360

Agarwal, M., Thareja, N., Benjamin, M., Akhondi, A. ve Mitchell, G. D. (2018). Tyrosine kinase inhibitor-induced hypertension. *Current Oncology Reports*, **20**, 65.

Anand, R., Langer, T. ve Baker, M. J. (2013). Proteolytic control of mitochondrial function and morphogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **1833**(1), 195-204.

Argon, Y. ve Simen, B. B. (1999, October). GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 10, No. 5, pp. 495-505). Academic Press.

Arora, A. ve Scholar, E. M. (2005). Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **315**(3), 971-979.

Ban, T., Ishihara, T., Kohno, H., Saita, S., Ichimura, A., Maenaka, K. ve Ishihara, N. (2017). Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin. *Nature Cell Biology*, **19**(7), 856-863.

Barreto, R., Mandili, G., Witzmann, F. A., Novelli, F., Zimmers, T. A., & Bonetto, A. (2016). Cancer and chemotherapy contribute to muscle loss by activating common signaling pathways. *Frontiers in Physiology*, **7**, 472.

Barth, E., Stämmler, G., Speiser, B. ve Schaper, J. (1992). Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **24**(7), 669-681.

Baselga, J. (2006). Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave. *Science*, **312**(5777), 1175-1178.

Bernardi, P. (2013). The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Frontiers in physiology*, **4**, 95.

Bertram, J. S. (2000). The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, **21**(6), 167-223.

Bota, D. A., Ngo, J. K., & Davies, K. J. (2005). Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, **38**(5), 665-677.).

Bonora, M., Wieckowski, M. R., Sinclair, D. A., Kroemer, G., Pinton, P. ve Galluzzi, L. (2019). Targeting mitochondria for cardiovascular disorders: therapeutic potential and obstacles. *Nature Reviews Cardiology*, **16**(1), 33-55.

Breitkreutz, I., Podar, K., Figueroa-Vazquez, V., Wilhelm, S., Hayden, P. J., Anderson, K. C. ve Raab, M. S. (2018). The orally available multikinase inhibitor Regorafenib (BAY 73-4506) in multiple myeloma. *Annals of Hematology*, **97**(5), 839-849.

Brinda, B. J., Viganego, F., Vo, T., Dolan, D. ve Fradley, M. G. (2016). Anti-VEGF-Induced Hypertension: a Review of Pathophysiology and Treatment Options. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*, **18**(5), 1-13.

Brown, D. A., Perry, J. B., Allen, M. E., Sabbah, H. N., Stauffer, B. L., Shaikh, S. R., ... & Anker, S. D. (2017). Expert consensus document: mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. *Nature Reviews Cardiology*, **14**(4), 238.

Budolfsen, C., Faber, J., Grimm, D., Krüger, M., Bauer, J., Wehland, M. ve ark. (2019). Tyrosine kinase inhibitor-induced hypertension: Role of hypertension as a biomarker in cancer treatment. *Current Vascular Pharmacology*, **17**(6), 618-634.).

Busiello, R. A., Savarese, S. ve Lombardi, A. (2015). Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Frontiers in Physiology*, **6**, 1-7.

Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, **25**, 169-193.

Cadenas, S. (2018). Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **1859**(9), 940-950.

Cao, Y. P. ve Zheng, M. (2019). Mitochondrial dynamics and inter-mitochondrial communication in the heart. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **663**, 214-219.

Capra, M., Nuciforo, P. G., Confalonieri, S., Quarto, M., Bianchi, M., Nebuloni, M., ve ark. (2006). Frequent alterations in the expression of serine/threonine kinases in human cancers. *Cancer Research*, **66**(16), 8147-8154.

Chaar, M., Kamta, J. ve Ait-Oudhia, S. (2018). Mechanisms, monitoring, and management of tyrosine kinase inhibitors-associated cardiovascular toxicities. *OncoTargets and Therapy*, **11**, 6227.

Chen, H., Adam, A., Cheng, Y., Tang, S., Hartung, J. ve Bao, E. (2015). Localization and expression of heat shock protein 70 with rat myocardial cell damage induced by heat stress in vitro and in vivo. *Molecular Medicine Reports*, **11**(3), 2276-2284.

Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E. ve Chan, D. C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of Cell Biology*, **160**(2), 189-200.

Chen, J. ve Wang, J. (2018). Risk of regorafenib-induced cardiovascular events in patients with solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, **97**,41.

Chen, L., Gong, Q., Stice, J. P. ve Knowlton, A. A. (2009). Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. *Cardiovascular Research*, **84**(1), 91-99.

Chen, M. H., Kerkelä, R. ve Force, T. (2008). Mechanisms of cardiac dysfunction associated with tyrosine kinase inhibitor cancer therapeutics. *Circulation*, **118**(1), 84-95.

Chen, W., Yang, J., Zhang, Y., Cai, H., Chen, X. ve Sun, D. (2019). Regorafenib reverses HGF-induced sorafenib resistance by inhibiting epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *FEBS Open Bio*, **9**(2), 335-347.

Chen, Y., Liu, Y. ve Dorn, G. W. (2011). Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis. *Circulation Research*, **109**(12), 1327-1331

Cheng, H. ve Force, T. (2010). Why do kinase inhibitors cause cardiotoxicity and what can be done about it? *Progress in Cardiovascular Diseases*, **53**(2), 114-120.

Chiang, C. H., Chung, J. G. ve Hsu, F. T. (2019). Regorefenib induces extrinsic/intrinsic apoptosis and inhibits MAPK/NF- κ B-modulated tumor progression in bladder cancer in vitro and in vivo. *Environmental Toxicology*, **34**(6), 679-688.

Chiong, M., Wang, Z. V., Pedrozo, Z., Cao, D. J., Troncoso, R., Ibáñez, M. ve ark. (2011). Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death & Disease*, **2**(12), e244-e244.

Chiong, M., Cartes-Saavedra, B., Norambuena-Soto, I., Mondaca-Ruff, D., Morales, P. E., García-Miguel, M., ve ark. (2014). Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle cell proliferation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **2**, 72.

Choy, K. W., Murugan, D. ve Mustafa, M. R. (2018). Natural products targeting ER stress pathway for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmacological Research*, **132**, 119-129.

Civiletto, G., Varanita, T., Cerutti, R., Gorletta, T., Barbaro, S., Marchet, S. ve ark. (2015). Opa1 overexpression ameliorates the phenotype of two mitochondrial disease mouse models. *Cell Metabolism*, **21**(6), 845-854.

Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M. E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M. ve ark. (2013). Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell*, **155**(1), 160-171.

Cooper, G.M. ve Hausman, R.E. The Cell: Molecular Approach 7th edition: Cell regulation (Çev. N. Atabey, E. Kalay, M. Sakızlı). İzmir Tıp Kitabevi. (Ekim 2016).

Cossarizza, A. ve Salvioli, S. (2000). Flow cytometric analysis of mitochondrial membrane potential using JC-1. *Current protocols in cytometry*, **13**(1), 9-14.

D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, **43**(6), 582-592/

Das A. (2019). Review on cytochrome C. *International Journal of Clinicopathological Correlation*, **3**, 7-11.

De Jesus-Gonzalez, N., Robinson, E., Moslehi, J. ve Humphreys, B. D. (2012). Management of antiangiogenic therapy-induced hypertension. *Hypertension*, **60**(3), 607-615.

De Maio, A. ve Vazquez, D. (2013). Extracellular heat shock proteins: a new location, a new function. *Shock*, **40**(4), 239-246.

De Wit, M., Boers-Doets, C. B., Saettini, A., Vermeersch, K., de Juan, C. R., Ouwerkerk, J. ve ark. (2014). Prevention and management of adverse events related to regorafenib. *Supportive Care in Cancer*, **22**(3), 837-846.

DiMauro, S. ve Schon, E. A. (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. *New England Journal of Medicine*, **348**(26), 2656-2668.

Dominic, E. A., Ramezani, A., Anker, S. D., Verma, M., Mehta, N. ve Rao, M. (2014). Mitochondrial cytopathies and cardiovascular disease. *Heart*, **100**(8), 611-618

Du, Z. ve Lovly, C. M. (2018). Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Molecular Cancer*, **17**(1), 58.

Ebner, S., Lang, R., Mueller, E. E., Eder, W., Oeller, M., Moser, A. ve ark. (2011). Mitochondrial haplogroups, control region polymorphisms and malignant melanoma: a study in middle European Caucasians. *PLoS One*, **6**(12), e27192.

Eisen, T., Joensuu, H., Nathan, P. D., Harper, P. G., Wojtukiewicz, M. Z., Nicholson, S., ve ark. (2012). Regorafenib for patients with previously untreated metastatic or unresectable renal-cell carcinoma: a single-group phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, **13**(10), 1055-1062.

El Golli-Bennour, E. ve Bacha, H. (2011). Hsp70 expression as biomarkers of oxidative stress: Mycotoxins' exploration. *Toxicology*, **287**, 1-7.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, **35**(4), 495-516.

Elston, T., Wang, H. ve Oster, G. (1998). Energy transduction in ATP synthase. *Nature*, **391**, 510-513.

Erol, N. (2007). Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü ve Anti-VEGF Ajanlar. *Journal of Retina Vitreus*, **15**, 35-40.

Esteves, T. C., & Brand, M. D. (2005). The reactions catalysed by the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **1709**(1), 35-44.

Fan, F. ve Wood, K. V. (2007). Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay and Drug Development Technologies*, **5**(1), 127-136.

Fang, L., Moore, X. L., Gao, X. M., Dart, A. M., Lim, Y. L. ve Du, X. J. (2007). Down-regulation of mitofusin-2 expression in cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. *Life Sciences*, **80**(23), 2154-2160.

Faraone, D., Aguzzi, M. S., Toietta, G., Facchiano, A. M., Facchiano, F., Magenta, A., ... & Capogrossi, M. C. (2009). Platelet-derived growth factor-receptor α strongly inhibits melanoma growth in vitro and in vivo. *Neoplasia*, **11**(8), 732-742.

FDA 2012a Highlights Of Prescribing Information Gleevec (İmatinib mesilat) tablets (İnternette) Erişim 27.09.2019
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/021588s035lbl.pdf

FDA, 2012b. Highlights Of Prescribing Information Stivarga (Regorafenib) (İnternette) Erişim 27.09.2019
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/203085lbl.pdf

FDA, 2013. Highlights Of Prescribing Information Stivarga (Regorafenib) (İnternette) Erişim 27.09.2019
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/204369lbl.pdf

FDA, 2017a. Highlights Of Prescribing Information Stivarga (Regorafenib) (İnternette) Erişim 27.09.2019
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/203085s007lbl.pdf

FDA, 2017b. FDA expands approved use of Stivarga to treat liver cancer (İnternette) Erişim 27.09.2019 <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-expands-approved-use-stivarga-treat-liver-cancer>

Force, T., Krause, D. S. ve Van Etten, R. A. (2007). Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nature Reviews Cancer*, **7**(5), 332-344.

Forte, M., Palmerio, S., Bianchi, F., Volpe, M. ve Rubattu, S. (2019). Mitochondrial complex I deficiency and cardiovascular diseases: current evidence and future directions. *Journal of Molecular Medicine*, **97**(5), 579-591.

French, K. J., Coatney, R. W., Renninger, J. P., Hu, C. X., Gales, T. L., Zhao, S., ve ark. (2010). Differences in effects on myocardium and mitochondria by angiogenic inhibitors suggest separate mechanisms of cardiotoxicity. *Toxicologic pathology*, **38**(5), 691-702.

Frezza, C., Cipolat, S., De Brito, O. M., Micaroni, M., Beznoussenko, G. V., Rudka, T. ve ark. (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell*, **126**(1), 177-189.

Gocek, E., Moulas, A. N. ve Studzinski, G. P. (2014). Non-receptor protein tyrosine kinases signaling pathways in normal and cancer cells. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, **51**(3), 125-137

Goel, G. (2018). Evolution of Regorafenib from bench to bedside in colorectal cancer: is it an attractive option or merely a “me too” drug?. *Cancer Management and Research*, **10**, 425-437.

Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M. ve Baradaran, B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **16**(6), 2129-2144.

Grimm, S. ve Brdiczka, D. (2007). The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis*, **12**(5), 841-855.

Groarke, J. D., Choueiri, T. K., Slosky, D., Cheng, S. ve Moslehi, J. (2014). Recognizing and managing left ventricular dysfunction associated with therapeutic inhibition of the vascular endothelial growth factor signaling pathway. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*, **16**(9), 1-18.

Hartmann, J. T., Haap, M., Kopp, H. G., & Lipp, H. P. (2009). Tyrosine kinase inhibitors-a review on pharmacology, metabolism and side effects. *Current Drug Metabolism*, **10**(5), 470-481.

Hedger, G., Sansom, M. S. ve Koldsø, H. (2015). The juxtamembrane regions of human receptor tyrosine kinases exhibit conserved interaction sites with anionic lipids. *Scientific Reports*, **5**, 9198.

Heldin, C. H. (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, **80**(2), 213-233.

Hescheler, J., Meyer, R., Plant, S., Krautwurst, D., Rosenthal, W. ve Schultz, G. (1991). Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circulation research*, **69**(6), 1476-1486.

Hom, J. ve Sheu, S. S. (2009). Morphological dynamics of mitochondria—a special emphasis on cardiac muscle cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **46**(6), 811-820.

Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E. ve Swanson, P. E. (2009). Cell death. *New England Journal of Medicine*, **361**(16), 1570-1583.

Hsiao, F. C., Yeh, C. N. ve Chu, P. H. (2016). Regorafenib-Related Myocardial Injury during Atrial Fibrillation. *Acta Cardiologica Sinica*, **32**(2), 243.

Hsu, F. T., Sun, C. C., Wu, C. H., Lee, Y. J., Chiang, C. H., & Wang, W. S. (2017). Regorafenib induces apoptosis and inhibits metastatic potential of human bladder carcinoma cells. *Anticancer Research*, **37**(9), 4919-4926.

Hu, X., Wu, L. W., Zhang, Z. Y., Chen, M. L., Li, Y. L. ve Zhang, C. (2018). The anti-tumor effect of Regorafenib in lung squamous cell carcinoma in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **503**(2), 1123-1129.

Hubbard, S. R. ve Till, J. H. (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annual Review of Biochemistry*, **69**(1), 373-398.

Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, **80**(2), 225-236.

Huot, J. R., Essex, A. L., Gutierrez, M., Barreto, R., Wang, M., Waning, D. L., ... & Bonetto, A. (2019). Chronic treatment with multi-kinase inhibitors causes differential toxicities on skeletal and cardiac muscles. *Cancers*, **11**(4), 571.

Ikeda, Y., Shirakabe, A., Maejima, Y., Zhai, P., Sciarretta, S., Toli, J. ve ark. (2015). Endogenous Drp1 mediates mitochondrial autophagy and protects the heart against energy stress. *Circulation Research*, **116**(2), 264-278.

Ishihara, N., Jofuku, A., Eura, Y. ve Mihara, K. (2003). Regulation of mitochondrial morphology by membrane potential, and DRP1-dependent division and FZO1-dependent fusion reaction in mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **301**(4), 891-898.

Jeong, S. Y. ve Seol, D. W. (2008). The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Reports*, **41**, 11-22.

Jiang, J., Zhang, L., Chen, H., Lei, Y., Zhang, T., Wang, Y. ve ark. (2019). Regorafenib induces lethal autophagy arrest by stabilizing PSAT1 in glioblastoma. *Autophagy*, **16**, 110-126.

Jin, Z. ve El-Deiry, W. S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy*, **4**(2), 147-171.

Julia, I., Leu, J., Barnoud, T., Zhang, G., Tian, T., Wei, Z. ve ark. (2017). Inhibition of stress-inducible HSP70 impairs mitochondrial proteostasis and function. *Oncotarget*, **8**(28), 45656.

Kang, Z. J., Liu, Y. F., Xu, L. Z., Long, Z. J., Huang, D., Yang, Y. ve ark. (2016). The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chinese Journal of Cancer*, **35**(1), 48.

Kao, T. Y., Chiu, Y. C., Fang, W. C., Cheng, C. W., Kuo, C. Y., Juan, H. F. ve ark. (2015). Mitochondrial Lon regulates apoptosis through the association with Hsp60-mtHsp70 complex. *Cell Death & Disease*, **6**(2), e1642-e1642.

Karamanlidis, G., Lee, C. F., Garcia-Menendez, L., Kolwicz Jr, S. C., Suthammarak, W., Gong, G. ve Tian, R. (2013). Mitochondrial complex I deficiency increases protein acetylation and accelerates heart failure. *Cell Metabolism*, **18**(2), 239-250.

Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S. ve Lemasters, J. J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **462**(2), 245-253.

Kim, J.E., Chae, S.Y., Kim, J.H., Kim, H.J., Kim, T.W., Kim, Kpyo, ve ark. (2019). 30-Deoxy-3'-18F- Fluorothymidine and 18F-Fluorodeoxyglucose positron emission tomography for the early prediction of response to Regorafenib in patients with metastatic colorectal cancer refractory to all standard therapies. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **46**, 1713–1722.

Kolibaba, K. S. ve Druker, B. J. (1997). Protein tyrosine kinases and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, **1333**(3), F217-F248.

Koshiba, T., Detmer, S. A., Kaiser, J. T., Chen, H., McCaffery, J. M. ve Chan, D. C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*, **305**(5685), 858-862.

Kuznetsov, A. V., Javadov, S., Sickinger, S., Frotschnig, S. ve Grimm, M. (2015). H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **1853**(2), 276-28.

Kühlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biology*, **13**(1), 89.

Lamore, S., Kohnken, R. A., Peters, M. F. ve Kolaja, K. L. (2019). Cardiovascular toxicity induced by kinase inhibitors: mechanisms and preclinical approaches. *Chemical Research in Toxicology*, **33**, 125-136.

Lee, W. S. ve Kim, J. (2018). Cardiotoxicity associated with tyrosine kinase-targeted anticancer therapy. *Molecular & Cellular Toxicology*, **14**(3), 247-254).

Legros, F., Lombès, A., Frachon, P. ve Rojo, M. (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Molecular Biology of the Cell*, **13**(12), 4343-4354.

Lehman, J. J., Barger, P. M., Kovacs, A., Saffitz, J. E., Medeiros, D. M. ve Kelly, D. P. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, **106**(7), 847-856.

Leipnitz, G., Mohsen, A. W., Karunanidhi, A., Seminotti, B., Roginskaya, V. Y., Markantone, D. M., ... Vockley, J. (2018). Evaluation of mitochondrial bioenergetics,

dynamics, endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk, and reactive oxygen species in fibroblasts from patients with complex I deficiency. *Scientific Reports*, **8**(1), 1-14.

Lemmon, M. A. ve Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, **141**(7), 1117-1134.

Lenaz, G., Bovina, C., Castelluccio, C., Fato, R., Formiggini, G., Genova, M. L., ... & Biagini, G. (1997). Mitochondrial complex I defects in aging. In *Detection of Mitochondrial Diseases* (pp. 329-333). Springer, Boston, MA.).

Leu, J. J., Pimkina, J., Frank, A., Murphy, M. E. ve George, D. L. (2009). A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70. *Molecular Cell*, **36**(1), 15-27.

Li, Q., Zhou, L. Y., Gao, G. F., Jiao, J. Q. ve Li, P. F. (2012). Mitochondrial network in the heart. *Protein & Cell*, **3**(6), 410-418.

Liu, T., Lu, B., Lee, I., Ondrovičová, G., Kutejová, E. ve Suzuki, C. K. (2004). DNA and RNA binding by the mitochondrial lon protease is regulated by nucleotide and protein substrate. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(14), 13902-13910.

Livak, K. J. ve Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, **25**(4), 402-408.

Lopes, L. F. ve Bacchi, C. E. (2010). Imatinib treatment for gastrointestinal stromal tumour (GIST). *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **14**, 42-50.

Madhusudan, S. ve Ganesan, T. S. (2004). Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Clinical Biochemistry*, **37**(7), 618-635.

Mahmood, T. ve Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, **4**(9), 429.

Marín-García, J. ve Goldenthal, M. J. (2002). The mitochondrial organelle and the heart. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, **55**(12), 1293-1310.

Marks, E. I., Tan, C., Zhang, J., Zhou, L., Yang, Z., Scicchitano, A. ve ark. (2015). Regorafenib with a fluoropyrimidine for metastatic colorectal cancer after progression on multiple 5-FU-containing combination therapies and regorafenib monotherapy. *Cancer biology & therapy*, **16**(12), 1710-1719.).

Martindale, J. J., Fernandez, R., Thuerauf, D., Whittaker, R., Gude, N., Sussman, M. A. ve ark. (2006). Endoplasmic reticulum stress gene induction and protection from ischemia/reperfusion injury in the hearts of transgenic mice with a tamoxifen-regulated form of ATF6. *Circulation Research*, **98**(9), 1186-1193.

Mastroeni, D., Khmour, O. M., Delvaux, E., Nolz, J., Olsen, G., Berchtold, N. ve ark. (2017). Nuclear but not mitochondrial-encoded oxidative phosphorylation genes are altered in aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, **13**(5), 510-519.

Matthias, A., Ohlson, K. B., Fredriksson, J. M., Jacobsson, A., Nedergaard, J. ve Cannon, B. (2000). Thermogenic responses in brown fat cells are fully Ucp1-dependent UCP2 or UCP3 do not substitute for UCP1 in adrenergically or fatty acid-induced thermogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, **275**(33), 25073-25081.

Mayer, M. P. ve Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **62**(6), 670-684.

Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J. M. ve ark. (2006). Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell*, **127**(2), 383-395.

Mellor, H. R., Bell, A. R., Valentin, J. P. ve Roberts, R. R. (2011). Cardiotoxicity associated with targeting kinase pathways in cancer. *Toxicological Sciences*, **120**(1), 14-32.

Minamino, T., Komuro, I. ve Kitakaze, M. (2010). Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circulation Research*, **107**(9), 1071-1082.

Mingard, C., Paech, F., Bouitbir, J. ve Krähenbühl, S. (2018). Mechanisms of toxicity associated with six tyrosine kinase inhibitors in human hepatocyte cell lines. *Journal of Applied Toxicology*, **38**(3), 418-431.

Mondal, P., Jain, D., Aronow, W. S. ve Frishman, W. H. (2019). Cardiotoxicity of Cancer Therapies. *Cardiology in Review*, **27**(5), 230-235.

Moudgil, R. ve Yeh, E. T. (2016). Mechanisms of cardiotoxicity of cancer chemotherapeutic agents: cardiomyopathy and beyond. *Canadian Journal of Cardiology*, **32**(7), 863-870.

Mourier, A., Motori, E., Brandt, T., Lagouge, M., Atanassov, I., Galinier, A. ve ark. (2015). Mitofusin 2 is required to maintain mitochondrial coenzyme Q levels. *Journal of Cell Biology*, **208**, 429-442.

Murphy, E., Ardehali, H., Balaban, R. S., DiLisa, F., Dorn, G. W., Kitsis, R. N. ve ark. (2016). Mitochondrial function, biology, and role in disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation Research*, **118**(12), 1960-1991.

Murray, A. J., Anderson, R. E., Watson, G. C., Radda, G. K. ve Clarke, K. (2004). Uncoupling proteins in human heart. *The Lancet*, **364**, 1786-1788.

Neet, K. ve Hunter, T. (1996). Vertebrate non-receptor protein-tyrosine kinase families. *Genes to Cells*, **1**(2), 147-169.

Ngo, J. K. ve Davies, K. J. (2009). Mitochondrial Lon protease is a human stress protein. *Free Radical Biology and Medicine*, **46**(8), 1042-1048.

Ngo, J. K., ve Davies, K. J. (2007). Importance of the lon protease in mitochondrial maintenance and the significance of declining lon in aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1119**(1), 78-87.

Ohno, R. (2006). Treatment of chronic myeloid leukemia with imatinib mesylate. *International Journal of Clinical Oncology*, **11**(3), 176-183.

Ong, S. B., Kalkhoran, S. B., Cabrera-Fuentes, H. A. ve Hausenloy, D. J. (2015). Mitochondrial fusion and fission proteins as novel therapeutic targets for treating cardiovascular disease. *European Journal of Pharmacology*, **763**, 104-114.

Orphanos, G. S., Ioannidis, G. N. ve Ardavanis, A. G. (2009). Cardiotoxicity induced by tyrosine kinase inhibitors. *Acta Oncologica*, **48**(7), 964-970.

Otera, H., Ishihara, N. ve Mihara, K. (2013). New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **1833**(5), 1256-1268.

Ott, M., Amunts, A. ve Brown, A. (2016). Organization and regulation of mitochondrial protein synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, **85**, 77-101.

Ow, Y. L. P., Green, D. R., Hao, Z. ve Mak, T. W. (2008). Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **9**(7), 532-542.

Paech, F., Mingard, C., Grünig, D., Abegg, V. F., Bouitbir, J. ve Krähenbühl, S. (2018). Mechanisms of mitochondrial toxicity of the kinase inhibitors ponatinib, regorafenib and sorafenib in human hepatic HepG2 cells. *Toxicology*, **395**, 34-44.

Palmer, C. S., Osellame, L. D., Stojanovski, D., Ryan, M. T. (2011). The regulation of mitochondrial morphoHology: intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cellular Signalling*, **23**(10), 1534-1545.

Pan, P. J., Liu, Y. C. ve Hsu, F. T. (2019). Protein Kinase B and Extracellular Signal-Regulated Kinase Inactivation is Associated with Regorafenib-Induced Inhibition of Osteosarcoma Progression In Vitro and In Vivo. *Journal of Clinical Medicine*, **8**(6), 900, 1-16.

Paul, M. K. ve Mukhopadhyay, A. K. (2004). Tyrosine kinase-Role and significance in Cancer. *International Journal of Research in Medical Sciences*, **1**(2), 101-115.

Pinti, M., Gibellini, L., Nasi, M., De Biasi, S., Bortolotti, C. A., Iannone, A. ve ark. (2016). Emerging role of Lon protease as a master regulator of mitochondrial functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **1857**(8), 1300-1306.

Pockley, A. G. ve Henderson, B. (2018). Extracellular cell stress (heat shock) proteins—immune responses and disease: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **373**, 2016052, 1-15.

Pockley, A. G., Georgiades, A., Thulin, T., De Faire, U. ve Frostegård, J. (2003). Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. *Hypertension*, **42**(3), 235-238.

Qi, W. X., Shen, Z., Tang, L. N., Yao, Y. (2014). Congestive heart failure risk in cancer patients treated with vascular endothelial growth factor tyrosine kinase inhibitors: a systematic review and meta-analysis of 36 clinical trials. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **78**(4), 748-762.

Quiros, P. M., Goyal, A., Jha, P. ve Auwerx, J. (2017). Analysis of mtDNA/nDNA ratio in mice. *Current protocols in mouse biology*, **7**(1), 47-54.).

Radons, J. (2016). The human HSP70 family of chaperones: where do we stand?. *Cell Stress and Chaperones*, **21**(3), 379-404.

Ramsden, D. B., Ho, P. W. L., Ho, J. W. M., Liu, H. F., So, D. H. F., Tse, H. M. ve ark. (2012). Human neuronal uncoupling proteins 4 and 5 (UCP4 and UCP5): structural properties, regulation, and physiological role in protection against oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Brain and Behavior*, **2**(4), 468-478.

Riss, T. L., Moravec, R. A., O'Brien, M. A., Hawkins, E. M. ve ark. Niles, A. (2006). Homogeneous Multiwell Assays for Measuring Cell Viability, Cytotoxicity, and Apoptosis. In *Handbook of Assay Development in Drug Discovery* (pp. 403-424). CRC Press.

Robinson, D. R., Wu, Y. M. ve Lin, S. F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, **19**(49), 5548.

Roskoski, R. (2015). A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacological Research*, **100**, 1-23.

Roskoski, R. (2016). Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacological Research*, **103**, 26-48.

Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J. M. ve Venkatachalam, M. A. (1999). Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *The American Journal of Medicine*, **107**(5), 489-506.

Savage, D. G. ve Antman, K. H. (2002). Imatinib mesylate—a new oral targeted therapy. *New England Journal of Medicine*, **346**(9), 683-693.).

Schlessinger, J. (1994). SH2/SH3 signaling proteins. *Current Opinion in Genetics & Development*, **4**(1), 25-30.

Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, **103**(2), 211-225.

Sebastián, D., Palacín, M. ve Zorzano, A. (2017). Mitochondrial dynamics: coupling mitochondrial fitness with healthy aging. *Trends in Molecular Medicine*, **23**(3), 201-215.

Shah, D. R., Shah, R. R. ve Morganroth, J. (2013a). Tyrosine kinase inhibitors: their on-target toxicities as potential indicators of efficacy. *Drug Safety*, **36**(6), 413-426.

Shah, R. R. ve Morganroth, J. (2015). Update on cardiovascular safety of tyrosine kinase inhibitors: with a special focus on QT interval, left ventricular dysfunction and overall risk/benefit. *Drug Safety*, **38**(8), 693-710.

Shah, R. R., Morganroth, J. ve Shah, D. R. (2013c). Hepatotoxicity of tyrosine kinase inhibitors: clinical and regulatory perspectives. *Drug Safety*, **36**(7), 491-503.

Shah, R. R., Morganroth, J., ve Shah, D. R. (2013b). Cardiovascular safety of tyrosine kinase inhibitors: with a special focus on cardiac repolarisation (QT interval). *Drug Safety*, **36**(5), 295-316.

Shirley, M., ve Keating, G. M. (2015). Regorafenib: a review of its use in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours. *Drugs*, **75**(9), 1009-1017.).

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. ve ark. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, **150**(1), 76-85.

Snoeckx, L. H., Cornelussen, R. N., Van Nieuwenhoven, F. A., Reneman, R. S., & Van der Vusse, G. J. (2001). Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. *Physiological Reviews*, **81**(4), 1461-1497.

Sozen, E., Karademir B. ve Ozer N.K. (2015). Basic mechanisms in endoplasmic reticulum stress and relation to cardiovascular diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, **78**, 30-41.

Stankiewicz, A. R., Lachapelle, G., Foo, C. P., Radicioni, S. M. ve Mosser, D. D. (2005). Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(46), 38729-38739.

Strober, W. (1997). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, **21**(1), A3B1-A3B2.

Stuttfeld, E., ve Ballmer-Hofer, K. (2009). Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB life*, **61**(9), 915-922.

Taegtmeyer, H. (1994). Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications applications. *Current Problems in Cardiology*, **19**(2), 61-113.).

Tatsuta, T. (2009). Protein quality control in mitochondria. *The Journal of Biochemistry*, **146**(4), 455-461.

T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (2020). Stivarga Kısa Ürün Bilgisi (İnternette) Erişim 04.06.2020 https://titck.gov.tr/storage/Archive/2020/kubKtAttachments/TTCKOnaylKBSTVARGA_b9d6ffaf-ce2e-4b4b-a017-20bc06e0f8d9.pdf

Teshima, Y., Akao, M., Jones, S. P., & Marbán, E. (2003). Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circulation Research*, **93**(3), 192-200).

Tian, F., Li, J., Liu, X. W., Tong, T. J. ve Zhang, Z. Y. (2016). Age-dependent accumulation of mitochondrial DNA deletions in the aortic root of atherosclerosis-prone apolipoprotein E-knockout mice. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, **63**, 72-77.).

Tocchi, A., Quarles, E. K., Basisty, N., Gitari, L., & Rabinovitch, P. S. (2015). Mitochondrial dysfunction in cardiac aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **1847**(11), 1424-1433.

Tu, H., Liu, J., Zhu, Z., Zhang, L., Pipinos, I. I., & Li, Y. L. (2012). Mitochondria-derived superoxide and voltage-gated sodium channels in baroreceptor neurons from chronic heart-failure rats. *Journal of Neurophysiology*, **107**(2), 591-602.

Vitadello, M., Penzo, D., Petronilli, V., Michieli, G., Gomirato, S., Menabo, R. ve ark. (2003). Di Lisa, F.; Gorza, L. Overexpression of the stress protein Grp94 reduces cardiomyocyte necrosis due to calcium overload and simulated ischemia. *The FASEB Journal*, **17**(8), 923-925.

Wang, H., ve Oster, G. (1998). Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. *Nature*, **396**(6708), 279.

Wang, G., Zhang, J., Dewilde, A. H., Pal, A. K., Bello, D., Therrien, J. M. ve ark. (2012). Understanding and correcting for carbon nanotube interferences with a commercial LDH cytotoxicity assay. *Toxicology*, **299**(2-3), 99-111.

Wang, Y. J., Zhang, Y. K., Zhang, G. N., Al Rihani, S. B., Wei, M. N., Gupta, P., ve ark. (2017). Regorafenib overcomes chemotherapeutic multidrug resistance mediated by ABCB1 transporter in colorectal cancer: In vitro and in vivo study. *Cancer Letters*, **396**, 145-154.

Wang, Y., Lei, T., Yuan, J., Wu, Y., Shen, X., Gao, J., ve ark. (2018). GCN2 deficiency ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by decreasing cardiomyocyte apoptosis and myocardial oxidative stress. *Redox Biology*, **17**, 25-34.

Weng, M. C., Li, M. H., Chung, J. G., Liu, Y. C., Wu, J. Y., Hsu, F. T. ve ark. (2019). Apoptosis induction and AKT/NF- κ B inactivation are associated with regorafenib-inhibited tumor progression in non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **116**, 109032, 1-11.

Westermann, B. (2002). Merging mitochondria matters. *EMBO reports*, **3**(6), 527-531.

Wilhelm, S. M., Dumas, J., Adnane, L., Lynch, M., Carter, C. A., Schütz, G., ve ark. (2011). Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *International Journal of Cancer*, **129**(1), 245-255.

Wu, L. W., Zhou, D. M., Zhang, Z. Y., Zhang, J. K., Zhu, H. J., Lin, N. M. ve ark. (2019). Suppression of LSD1 enhances the cytotoxic and apoptotic effects of regorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **512**(4), 852-858.

Wüst, R. C., de Vries, H. J., Wintjes, L. T., Rodenburg, R. J., Niessen, H. W. ve Stienen, G. J. (2016). Mitochondrial complex I dysfunction and altered NAD (P) H kinetics in rat myocardium in cardiac right ventricular hypertrophy and failure. *Cardiovascular Research*, **111**(4), 362-372.

Yang, X., Wang, J., Zhou, Y., Wang, Y., Wang, S. ve Zhang, W. (2012). Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells. *Cancer Letters*, **321**(2), 137-143.).

Yilmaz, B., Kemal, Y., Teker, F., Kut, E., Demirag, G. ve Yucel, I. (2014). Single dose regorafenib-induced hypertensive crisis. *Experimental Oncology*, **36**(2), 134-135.

Ylikallio, E. ve Suomalainen, A. (2012). Mechanisms of mitochondrial diseases. *Annals of Medicine*, **44**(1), 41-59.

Yoon, C. Y., Park, J. T., Kee, Y. K., Han, S. G., Han, I. M., Kwon, Y. E. ve ark. (2016). Low mitochondrial DNA copy number is associated with adverse clinical outcomes in peritoneal dialysis patients. *Medicine*, **95**(7), e2717.

Yue, P., Jing, S., Liu, L., Ma, F., Zhang, Y., Wang, C. ve ark. (2018). Association between mitochondrial DNA copy number and cardiovascular disease: Current evidence based on a systematic review and meta-analysis. *PloS one*, **13**(11), e0206003, 1-15.

Zhang, H., Wang, P., Bisetto, S., Yoon, Y., Chen, Q., Sheu, S. S., & Wang, W. (2016). A novel fission-independent role of dynamin-related protein 1 in cardiac mitochondrial respiration. *Cardiovascular Research*, **113**, 160-170.

Zhang, J., Salminen, A., Yang, X., Luo, Y., Wu, Q., White, M. ve ark. (2017). Effects of 31 FDA approved small-molecule kinase inhibitors on isolated rat liver mitochondria. *Archives of Toxicology*, **91**(8), 2921-2938.

Zhang, J., Yang, P. L. ve Gray, N. S. (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, **9**(1), 28-39.

Zhao, R. Z., Jiang, S., Zhang, L. ve Yu, Z. B. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. *International Journal of Molecular Medicine*, **44**(1), 3-15.

Zhu, G. ve Lee, A. S. (2015). Role of the unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis. *Journal of Cellular Physiology*, **230**(7), 1413-1420.

Zhu, J., Quyyumi, A. A., Wu, H., Csako, G., Rott, D., Zalles-Ganley, A., ve ark. (2003). Increased serum levels of heat shock protein 70 are associated with low risk of coronary artery. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **23**, 1055-1059.

Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S. ve ark. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical biochemistry*, 552, 50-59.

Xia, P., Liu, Y. ve Cheng, Z. (2016). Signaling pathways in cardiac myocyte apoptosis. *BioMed Research International*, **2016**, 9583268.



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRÜ REGORAFENİB'İN KARDİYOTOKSİSİTESİNİN MOLEKÜLER TEKNİKLERLE İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

ORIJİNALLIK RAPORU

% 7	% 6	% 3	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
2	Tugce Boran, Aysenur Gunaydin Akyildiz, Ayse Tarbin Jannuzzi, Buket Alpertunga. "Extended regorafenib treatment can be linked with mitochondrial damage leading to cardiotoxicity", Toxicology Letters, 2021 Yayın	% 1
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
4	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<% 1
6	Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi	<% 1

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayınlar

Boran, T., Akyildiz, A. G., Jannuzzi, A. T., & Alpertunga, B. (2021). Extended regorafenib treatment can be linked with mitochondrial damage leading to cardiotoxicity. *Toxicology Letters*, **336**(1), 39-49.

Arici, M., Abudayyak, M., **Boran, T.**, & Özhan, G. (2020). Does pendimethalin develop in pancreatic cancer induced inflammation? *Chemosphere*, **252**, 126644.

Arıcan, E., Gökçeoğlu, K., Ulus, K., **Boran, T.**, Öztürk, N., Okyar, A., Ercan, F., & Özhan, G. (2020). Reproductive effects of subchronic exposure to acetamiprid in male rats. *Scientific Reports*, **10**, 8985.

Karaca B. U., Arıcan, Y.E., **Boran, T.**, Binay, S., Okyar, A., Kaptan, E., & Ozhan G. (2019). Toxic effects of subchronic oral acetamiprid exposure in rats. *Toxicology and Industrial Health*, **35**, 679-687.

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

Boran, T., Jannuzzi, A.T., & Alpertunga, B. (2018). İlaçlar İle İndüklenen Fosfolipidozis ve Katyonik Amfifilik İlaçlar. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, **38**, 65-75.

Tebliğler

Poster Bildirileri

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

Boran, T., Ulus Karaca, B., & Özhan G. Molecular effects of SGLT-2 inhibitor dapagliflozin on the kidney. 10th International congress of the Turkish Society of Toxicology, Antalya, Türkiye, 16 - 19 October 2019, ss.147.

Günaydın, A., **Boran, T.**, Jannuzzi, A.T., & Alpertunga B. In vitro Investigation of the Antineoplastic Agent Lenvatinib Induced Cardiotoxicity in Terms of Mitochondrial

Toxicity. SOT 2019 58th Annual Meeting & ToxExpo, Baltimore, Amerika Birleşik Devletleri, 10 - 14 March 2019, ss.252.

Boran, T., Günaydın, A., Jannuzzi, A.T., & Alpertunga, B. Mitochondrial Alterations May Play a Role in Cardiotoxicity of the Tyrosine Kinase Inhibitor Regorafenib. SOT 2019 58th Annual Meeting & ToxExpo, Baltimore, Amerika Birleşik Devletleri, 10 - 14 March 2019, ss.252.

Abudayyak, M., **Boran, T.**, Öztaş, E., Tükel, R., & Özhan G. The Role of Pon1 Variants in Disease Susceptibility. 10th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC10) 12th Congress of the Serbian Society of Toxicology (12th SCT), Belgrad, Sırbistan, 18 - 21 April 2018, ss.169.

Boran, T., Gunaydin, A., Jannuzzi, A.T., Ozcagli, E., & Alpertunga, B. Assessing the role of celastrol on cisplatin induced nephrotoxicity under in vitro conditions. 53rd Congress of the European-Societies-of-Toxicology (EUROTOX), Bratislava, Slovakya, 10 - 13 September 2017, ss.257

Ödüller/Burslar

TÜBİTAK- 2211/C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurtiçi Doktora Bursu (2017-2019)

