



**DOKSORUBİSİN KARDİYOTOKSİSİTESİNDE p38 MAP
KİNAZ İNHİBİTÖRÜNÜN MOLEKÜLER GENETİK VE
BİYOKİMYASAL PARAMETRELERE ETKİSİ**

Berna ÖZYAZGAN

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ**

Doktora Tezi – 2021

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOKSORUBİSİN KARDİYOTOKSİSİTESİNDE p38 MAP KİNAZ
İNİHİTÖRÜNÜN MOLEKÜLER GENETİK VE BİYOKİMYASAL
PARAMETRELERE ETKİSİ**

Berna ÖZYAZGAN

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ

Bu araştırma TÜBİTAK tarafından 117S870 proje numarası ile, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2019-1691 proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA

2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLOLAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Doksorubisin Kardiyotoksitesisi.....	2
2.2. Mitojen Aktive Edilmiş Protein Kinazlar (MAPK).....	5
2.3. Kaveolin-3 (Kav-3).....	8
2.4. Matriks Metollaproteinaz-2 (MMP-2).....	11
2.5. Eşleşme Bozucu (Uncoupling) Protein (UCP-2).....	12
2.6. Kavin-4/(MURC).....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	15
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	15
3.2. Kullanılan Cihazlar	15
3.3. Sıçanların Temini ve Bakımı	16
3.4. Grupların Oluşturulması	16
3.5. Çözeltilerin Hazırlanması	17
3.5.1. p38 MAPK İnhibitör Çözeltisi.....	17
3.5.2. Kontrol Grubu Çözeltisi.....	17
3.5.3. Doksorubisin Çözeltisi.....	17
3.5.4. RNA Saklama Çözeltisi	17
3.5.5. 10X Tris-Borat-EDTA (TBE) Çözeltisinin Hazırlanışı.....	17
3.5.6. 10X Yürütme Tamponu (pH:8.3)	17
3.5.7. 10X Transfer Tamponu (pH: 8.3).....	18
3.5.8. Fosfat Salin Tamponu (PBS) (pH:7.4)	18
3.5.9. %5 Yağsız Süt Tozu Çözeltisi	18
3.5.10. Coomassie Boyama Solüsyonu.....	18
3.5.11. Boya Çıkartma Solüsyonu	18
3.6. Dokuların Alınması ve Örneklerin Analizleri	18

3.6.1. Dokudan RNA Safılaştırılması	19
3.6.2. cDNA Sentezi	20
3.6.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi (qRT-PZT)	20
3.6.4. Western Blot Analizi	21
3.7. Serum Biyokimyasal Analizler	23
3.7.1. Serum Hazırlanması.....	23
3.7.2. Doku Biyokimyasal Analizler	23
3.8. Kalp Fonksiyon Testleri.....	25
3.9. Histolojik Analizler.....	26
3.10. İstatistiksel Analizler	26
4. BULGULAR.....	27
4.1. Moleküler Genetik Bulgular	27
4.1.1. Gen İfadesi Bulguları.....	27
4.1.2. Western Blot Bulguları	33
4.2. Biyokimyasal Bulgular	34
4.2.1. Serum AST, ALT, CK-MB, Troponin I Seviyeleri	35
4.2.2. Doku CAT, SOD, GSH ve MDA Seviyeleri	37
4.3. Histopatolojik Bulgular.....	39
4.4. Kalp Fonksiyon Testleri.....	43
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
KAYNAKLAR	60
EKLER.....	79
EK-1. Etik kurul belgesi	79
Ek-2. Özgeçmiş.....	80
EK-3. <i>β-Aktin</i> gen dizilimi.....	81
EK-4. <i>MMP-2</i> gen dizilimi	82
EK-5. <i>Kavin-4</i> gen dizilimi.....	84
EK-6. <i>Kaveolin-3</i> gen dizilimi.....	85
EK-7. <i>UCP-2</i> gen dizilimi	86

TEŐEKKÖR

Doktora tez çalıőmama maddi destek sağlayan ile TŒrkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÖBİTAK, 117S870 no'lu proje), tezimin bir kısmı için maddi destek sağlayan İnönü Œniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (BAP, TDK-2019-1691 no'lu proje),

Tez danıőmanım Sayın Prof. Dr. Yılmaz İĒREMİŐ'e,

İnönü Œniversitesi Tıp Faköltesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Tıbbı Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen kıymetli aileme,
Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teőekkür ederim.

Berna ÖZYAZGAN

ÖZET

Doksorubisin Kardiyotoksitesinde p38 MAP Kinaz İnhibitörünün Moleküler Genetik ve Biyokimyasal Parametrelere Etkisi

Amaç: Sıçanlarda doksorubisin ile oluşturulan kardiyotoksisite modelinde p38 MAPK inhibitörü uygulamasının kalp dokusunda moleküler genetik ve biyokimyasal parametrelere olan etkisi.

Materyal ve Metot: 48 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan, her grupta 12 adet olmak üzere; K, DOX, p38 MAPKi, DOX+p38 MAPKi olarak 4 gruba ayrıldılar. Sıçanların kalp dokusundan SOD, MDA, GSH, CAT düzeyleri spektrofotometrik yöntemlerle, *Kav-3*, *MMP-2*, *UCP-2*, *Kavin-4* genlerinin ifadeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesi analiziyle yapıldı. Sıçanlara kalp fonksiyon testleri uygulandı. Kalp dokularından hemotoksilen-eozin boyaması ile histopatolojik incelemeler yapıldı.

Bulgular: DOX grubu *MMP-2* gen ifadesi, K ve p38 MAPKi grubuna göre yükselmişti ($p < 0.05$). DOX, p38 MAPKi, DOX+p38 MAPKi grupları *UCP-2* gen ifadeleri K grubuna göre artmıştı ($p < 0.05$). K ve p38 MAPKi grubuna göre, yükselen bir doku CAT aktivitesi DOX ve DOX+p38 MAPKi grubunda gözlemlendi ($p < 0.05$). DOX grubu MDA seviyesi K, p38 MAPKi ve DOX+p38 MAPKi gruplarına göre artmıştı ($p < 0.05$). DOX, p38 MAPKi ve DOX+p38 MAPKi gruplarında, K grubu ile karşılaştırıldığında artan bir SOD aktivitesi tespit edildi ($p < 0.05$). Histopatolojik olarak DOX grubunda görülen konjesyon-hemoraji ve dejenere kardiyomiyosit yoğunluğu K ve p38 MAPKi gruplarına göre anlamlı idi ($p < 0.05$).

Sonuç: Doksorubisin sonrası p38 MAPK inhibitörü uygulamasının kalp dokusunda bazı mekanizmalar üzerinden kalp hasarının korunmasında koruyucu bir etki sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: *MMP-2*, *Kaveolin-3*, *Kavin-4*, p38 MAPK, kardiyotoksisite

ABSTRACT

The Effect of p38 MAP Kinase Inhibitor on Molecular Genetic and Biochemical Parameters in Doxorubicin Cardiotoxicity

Aim: The effects of p38 MAPK inhibitor application on molecular genetic and biochemical parameters in doxorubicin induced cardiotoxicity model in rats.

Material and Method: 48 male Wistar albino rats were divided into 4 groups each containing 12 rats per group; The p38 MAPKi, DOX, C, DOX + p38 MAPKi group. In the heart tissue, expressions of *Kav-3*, *MMP-2*, *UCP-2*, *Kavin-4* genes were performed by real-time PCR, while analysis of SOD, MDA, GSH, CAT levels were determined spectrophotometrically. Heart function tests were applied to rats. Histopathological examinations in the heart tissue were performed with hemotoxylin-eosin staining.

Results: DOX group *MMP-2* gene expression was increased compared to C and p38 MAPKi group. It was found that *UCP-2* gene expression in DOX, p38 MAPKi, DOX + p38 MAPKi groups increased compared to the K group ($p < 0.05$). *UCP-2* gene expression in DOX + p38 MAPKi group showed a decrease compared to the DOX group ($p < 0.05$). There was a statistically significant increase in tissue CAT activity in the DOX and DOX + p38 MAPKi group compared to the C and p38 MAPKi group ($p < 0.05$). Elevated MDA level in the DOX group was found to be significant compared to the C, p38 MAPKi and DOX + p38 MAPKi groups ($p < 0.05$). Increased SOD activity in DOX, p38 MAPKi and DOX + p38 MAPKi groups was found to be significant compared to the C group ($p < 0.05$). Histopathologically, congestion-hemorrhage and degenerated cardiomyocyte density in the DOX group were found to be statistically higher than the C and p38 MAPKi groups ($p < 0.05$).

Conclusion: We consider that the administration of p38 MAPK inhibitor after doxorubicin may provide a protective effect in the protection of heart damage on some mechanisms in the heart tissue.

Key Words: *MMP-2*, *Caveolin-3*, *Cavin-4*, p38 MAPK, cardiotoxicity

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Akt	: Protein kinaz B
ALT	: Alanin amino transferaz
AST	: Aspartat amino transferaz
ATF-2	: Aktive edilmiş transkripsiyon faktörü
ATP	: Adenozintrifosfat
CAT	: Katalaz
cDNA	: Komplementer deoksiribonükleik asit
CK-MB	: Kreatin kinaz
CPK	: Kreatin fosfokinaz
Cu,Zn-SOD	: Bakır-Çinko superoksit dismutaz
DEPC	: Dietilpirokarbonat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DOX	: Doksorubisin
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
EKG	: Elektrokardiyografi
ELISA	: Enzim bağlı immünosorbent analizi
ERK	: Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz
GSH	: Glutasyon
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GPCR	: G protein kenetli reseptör
GSK 3-β	: Glikojen sentaz 3-β
GST	: Glutasyon-s-transferaz
qRT-PZR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
gyd	: Gram yaş doku
H-E	: Hematoksilen-eozin
H2O2	: Hidrojen peroksit
HSP27	: Isı şok proteini 27
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
iNOS	: İndüklenebilir nitrikoksit sentaz
JNK	: Jun amino-terminal kinaz

K	: Kontrol
Kav-1	: Kaveolin-1
Kav-2	: Kaveolin-2
Kav-3	: Kaveolin-3
KB	: Kan basıncı
KH	: Kalp hızı
LDH	: Laktat dehidrogenaz
MAPK	: Mitojenle aktive olmuş protein kinaz
MAPKi	: Mitojenle aktive olmuş protein kinaz inhibitörü
M-CK	: Kardiyak dokuya spesifik olan kreatin kinaz
MDA	: Malondialdehit
MKK-6	: Map kinaz kinaz-6
MMP-2	: Matriks metalloproteinaz-2
Mn-SOD	: Manganez süperoksit dismutaz
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
MURC	: Kasla sınırlanmış sarmal
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
ONOO-	: Preoksininitrit
PBS	: Fosfat salın tamponu
PI3K	: Fosfotidil inozitol 3 kinaz
PTRF	: Polimeraz transkripsiyon faktörü
PZT	: Polimeraz zincir tepkimesi
ROCK	: Rho ile ilişkili protein kinaz
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SAPK	: Stres ile aktive olmuş protein kinaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
SDPR	: Serum yoksunluk protein yanıtı
SRBC	: c-kinaz bağlanan sdr ilişkili gen ürünü
TAF	: Trombosit aktive edici faktör

TBE	: Tris borat etilendiamin tetra asetik asit
TNF-α	: Tumor nekroz faktörü- α
Top2β	: Topoizomeraz 2-beta
UCP-1	: Eşleşme bozucu (uncoupling) protein-1
UCP-2	: Eşleşme bozucu (uncoupling) protein-2
UCP-3	: Eşleşme bozucu (uncoupling) protein-3
UPS	: Ubiquitin proteozom sistem
μL	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. DNA'ya doksorubisin interkalasyonu	3
Şekil 2.2. Kardiyak miyositlerinde doksorubisin nedeniyle artmış apoptozisten sorumlu hücrel mekanizmalar	4
Şekil 2.3. p38 MAPK aktivasyonunun moleküler ağı	6
Şekil 2.4. Kaveola ilişkili Kav-3 diyagramı	10
Şekil 2.5. Kardiyomiyositte MMP-2'nin hücre içi hedefleri ve bağlanma noktaları	12
Şekil 2.6. Kardiyovasküler sistemde UCP-2'nin transkripsiyonel düzenlenmesi	13
Şekil 2.7. Miyokardiyal İ/R hasarında MURC yokluğunun kardiyoprotektif etkileri....	14
Şekil 4.1. Grupların toplam RNA görüntüsü	27
Şekil 4.2. Hydrolysis Probe" kimyası kullanılarak <i>Kav-3</i> , <i>MMP-2</i> , <i>Kavin-4</i> ve β - <i>Aktin</i> mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların gerçek zamanlı PZT ile çoğaltım eğrisi	29
Şekil 4.3. Hydrolysis Probe" kimyası kullanılarak <i>UCP-2</i> ve β - <i>Aktin</i> mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların gerçek zamanlı PZT ile çoğaltım eğrisi	29
Şekil 4.4. <i>MMP-2</i> , <i>Kav-3</i> , <i>Kavin-4</i> ve β - <i>Aktin</i> cDNA'larının PZT'deki çoğaltımının agaroz jel (%2) elektroforezi görüntüsü. Kullanılan DNA Markeri 50 bp plus DNA Ladder-for-use'dır (Bioron, 50 bp, catalog no: 304007).	30
Şekil 4.5. <i>UCP-2</i> ve β - <i>Aktin</i> cDNA'larının PZT'deki çoğaltımının agaroz jel (%2) elektroforezi görüntüsü. Kullanılan DNA Markeri 50 bp plus DNA Ladder-for-use'dır (Bioron, 50 bp, catalog no: 304007).	30
Şekil 4.6. Coomassie blue ile boyanmış jel görüntüsü	33
Şekil 4.7. Yüklenen proteinlerin membrana aktarılmış jel görüntüsü	33
Şekil 4.8. Syngene G:Box cihazıyla çekilmiş membran görüntüsü	34
Şekil 4.9. Kontrol grubu (longitudinal düzlem); miyokardiyumun normal histolojik görünümü. H-E; x20.....	39
Şekil 4.10. Kontrol grubu (transvers düzlem); miyokardiyumun normal histolojik görünümü. H-E; x20.	40

Şekil 4.11. p38 MAPKi grubu (longitudinal düzlem); miyokardiyumun normal histolojik görünümü. H-E; x20.	40
Şekil 4.12. p38 MAPKi grubu (transvers düzlem); miyokardiyumun normal histolojik görünümü. H-E; x20.	41
Şekil 4.13. DOX grubu (longitudinal düzlem); miyokardiyumda konjesyon-hemorajik alanlar (oklar) dikkati çekmekte. H-E; x20.	41
Şekil 4.14. DOX grubu (transvers düzlem); yoğun eozinofilik sitoplazmaları ve piknotik nükleusları ile dejenere kardiyomiyositler (ok başları) dikkati çekmekte. H-E; x20.	42
Şekil 4.15. DOX+p38 MAPKi grubu (longitudinal düzlem); miyokardiyumda konjesyon-hemorajik alanların (oklar) DOX grubuna göre belirgin şekilde azaldığı izlenmekte. H-E; x20.	42
Şekil 4.16. DOX+p38 MAPKi grubu (transvers düzlem); dejenere kardiyomiyositlerin (ok başları) DOX grubuna benzer şekilde devam ettiği izlenmekte. H-E; x20.	43
Şekil 4.17. Normal sinüs ritmi.....	46
Şekil 4.18. ST depresyonu.....	46
Şekil 4.19. Dal bloğu.....	47
Şekil 4.20. T negatifliği.....	47
Şekil 6.1. Doksorubisin kardiyotoksitesisi ve p38 MAPK inhibitörü etkisinin muhtemel mekanizması.....	59

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1. Fosfat Salin Tampon İçeriği	18
Tablo 3.2. Primer dizilimleri	21
Tablo 3.3. GSH analizinin yapılışı	23
Tablo 3.4. MDA analizinin yapılışı	24
Tablo 3.5. Katalaz analizinin yapılışı	25
Tablo 3.6. Cu Zn-SOD analizinin yapılışı	25
Tablo 4.1. Gruplarda ölçülen kalp dokusu RNA spektrofotometrik absorban değerleri ve RNA miktarları	28
Tablo 4.2. Gruplarda ölçülen kalp <i>Kaveolin-3, Kavin-4, MMP-2, UCP-2/β-Aktin</i> mRNA seviyelerinin oranı	32
Tablo 4.3. Gruplarda ölçülen serum ALT, AST, CK-MB ve Troponin I seviyeleri	36
Tablo 4.4. Gruplarda ölçülen kalp dokusu CAT, GSH, MDA ve SOD seviyeleri	38
Tablo 4.5. Hemodinamik ve elektrofizyolojik parametreler	45
Tablo 4.6. Elektrokardiyografik değişiklikler	45

1. GİRİŞ

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ajan olan doksorubisin, kalp yetmezliğine neden olabilmektedir (1). Kaveolin-3 (Kav-3) kardiyak miyositlerde, iskelet ve düz kaslarda ifade edilen kaveolanın yapısal bir proteindir (2). Matriks metalloproteinazlar (MMP) ekstraselüler matriksin birçok birleşenine karşı proteolitik aktiviteye sahip çinko bağımlı endopeptidazlardır (3). MMP'nin, embriyonik gelişim, yangı gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarda ekstraselüler matriks dokusunun yeniden şekillenmesinde görev aldığı bilinmektedir (3). MMP-2 ve MMP-9, gelatinazlar grubuna dahil olup endokardiyal ve subendokardiyal tabaka ve intersitial dokularda bulunmaktadır (4). Mitokondri iç membranında bulunan eşleşme bozucu (uncoupling) protein (UCP)'ler, solunum zinciri tarafından üretilen proton gradiyentinin deşarjının düzenlenmesine aracılık eden transmembran proteinleridir (5). Bilinen 5 tipi bulunan UCP'lerden, UCP-2'nin hücre tipleri arasında en geniş dağılıma sahip olup türler arasında farklılık gösterdiği bildirilmiştir (6). UCP-2 proton hareket gücünü azaltmak için mitokondrial membrandan protonların translokasyonlarını katalize etmektedir. Böylelikle mitokondrial membran potansiyeli hipopolarize edilip hücrel adenozin trifosfat (ATP) azalmaktadır (7). Sadece kas hücrelerinde bulunan *Kavin-4*'ün, kardiyak kası biyogenezinde önemli rolü olan Rho/ Rho ile ilişkili protein kinaz (ROCK) yolağında görev aldığı bilinmektedir (8). *Kavin-4* ifadesinin miyotübüllerde, miyoblastların farklılaşmasıyla birlikte arttığı ve transgenik farelerde artmış *Kavin-4* ifadesinin kardiyak kasılma bozukluğuna neden olduğu bildirilmiştir (9). *Kavin-4*, T tubul sisteminin düzenlenmesinde de sorumludur (9). p38 mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (p38 MAPK) sinyal yolağının, ilerlemiş kalp yetmezliğinde görülen artmış interstitiyal fibrozis, azalmış vazoreaktivasyon ve reaktif oksijen türleri (ROT)'nin üretiminin artışında rolü olduğu bilinmektedir (10). Bununla beraber kalsiyum geçişi ve sarkomerlerde kalsiyum duyarlılığı ile kardiyomiyosit kontraksiyonu üzerinde de p38'ün etkileri bulunmaktadır (10). p38 MAPK'nın inhibisyonunun kalp yetmezliklerinde terapötik değeri olduğu düşünülmektedir (11).

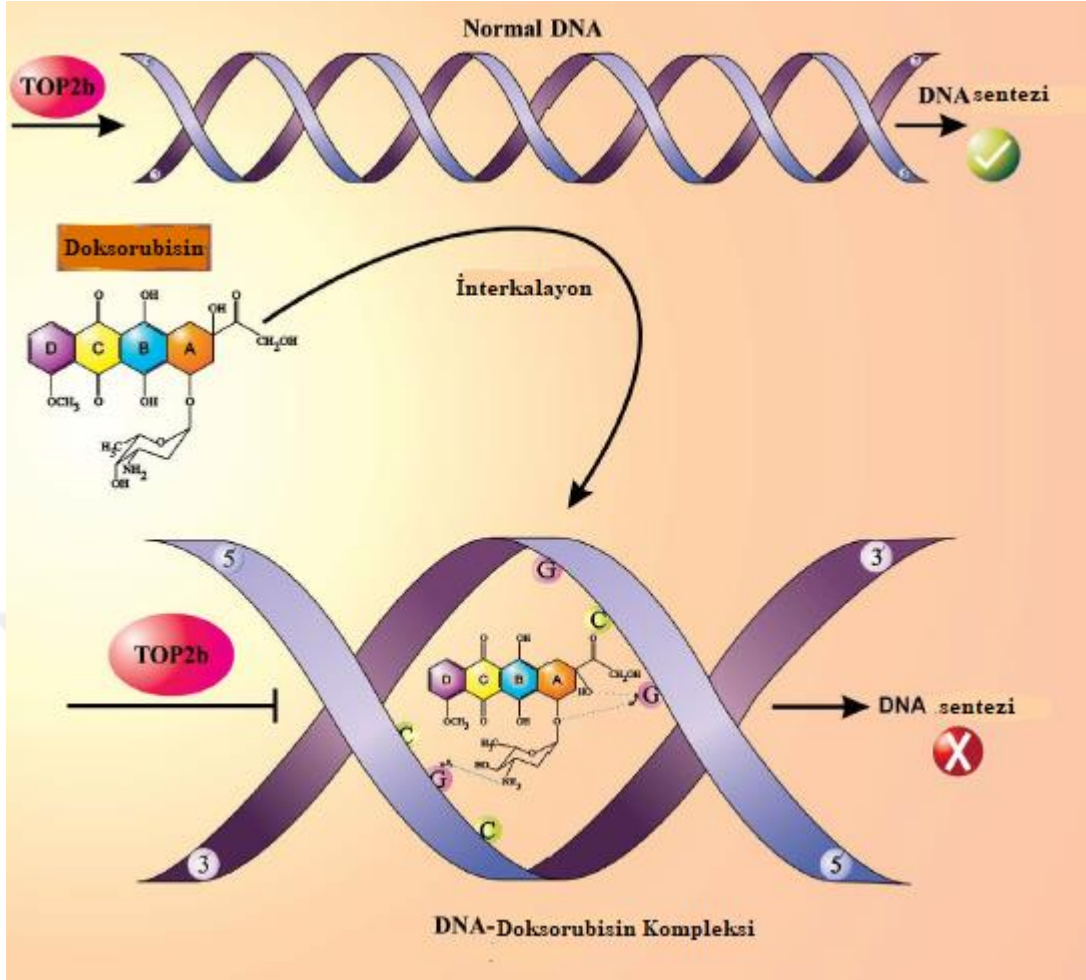
Bu doktora tezinde, sıçanlarda doksorubisin ile oluşturulan kardiyotoksisite modelinde p38 MAPK inhibitörünün (p38 MAPKi) *Kav-3*, *MMP-2*, *UCP-2* ve *Kavin-4* proteinleri üzerine moleküler genetik ve biyokimyasal etkileri ve varsa hastalık patolojisindeki rolünün incelenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Doksorubisin Kardiyotoksitesisi

İlk kez *Streptomyces peucetius*'in mutant ırkında keşfedilen doksorubisin, solid ve hematolojik kanserlerin tedavisinde kemoterapötik ilaç olarak kullanılan antrasiklin antibiyotik grubunda bulunmaktadır (12). Bu ilacın klinik kullanımı kalp üzerine toksik etkilerinden dolayı sınırlandırılmaktadır (12). Doksorubisin kardiyotoksitesisi sonrası aritmi, kardiyomiyopati, sol ventrikül disfonksiyonu ve konjestif kalp hasarı oluşabildiği bildirilmektedir (13). İnsanlarda doksorubisin'in 400 mg/m² dozda kardiyotoksite yapma riski % 5 iken, 550 mg/m² dozda % 26 ve 700 mg/m² dozda ise % 48 olmaktadır (14). Doksorubisin'in akut kardiyotoksitesisi, 2 veya 3 günlük ilaç uygulaması ile görülebilmektedir (13).

Doksorubisin, deoksiribonükleik asite (DNA) etki ederek hücre ölümüne (15), DNA'da çift zincir kırıkları meydana getirerek de hücre bölünmesinin bozulmasına neden olabilmektedir (16). ROT'un doksorubisin kaynaklı kardiyotoksiteside anahtar rol oynadığı bildirilmektedir (17). Doksorubisin kardiyotoksitesisinde; nitrik oksit (NO) salınımı, mitokondrial disfonksiyon, ATP azalması, kalsiyum disregülasyonu, ubiquitin proteaz sisteminin aktivasyonu, endotelial disfonksiyon ve otofajinin etkili mekanizmalar olduğu kabul edilmektedir (17). Oksidatif stresin, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin üretimi ile intrinsik antioksidan mekanizmaları arasındaki dengesizlik sonucunda ortaya çıktığı bilinmektedir (17). Doksorubisin, hücre DNA'sı ile etkileşime girerek mikromoleküllerin sentezini önleme ve ROT'un ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir (18). DNA'ya bağlanan doksorubisin'in, topoizomerez 2-beta'yı (Top2β) baskılayarak DNA hasarına ve apoptozun başlamasına neden olduğu bildirilmektedir (Şekil 2.1)(18). Top2β, replikasyon, transkripsiyon veya rekombinasyon sırasında DNA ipliklerini gevşetmektedir (18). Top2β zehiri olarak bilinen doksorubisin'in, DNA iplikçikleriyle interkalasyonu DNA sentezini önlediği bildirilmiştir (18). DNA topolojisindeki değişiklikler kardiyomiyositlerin ölümüne sebep olabilmektedir (18).



Şekil 2.1. DNA'ya doksorubisin interkalasyonu (18).

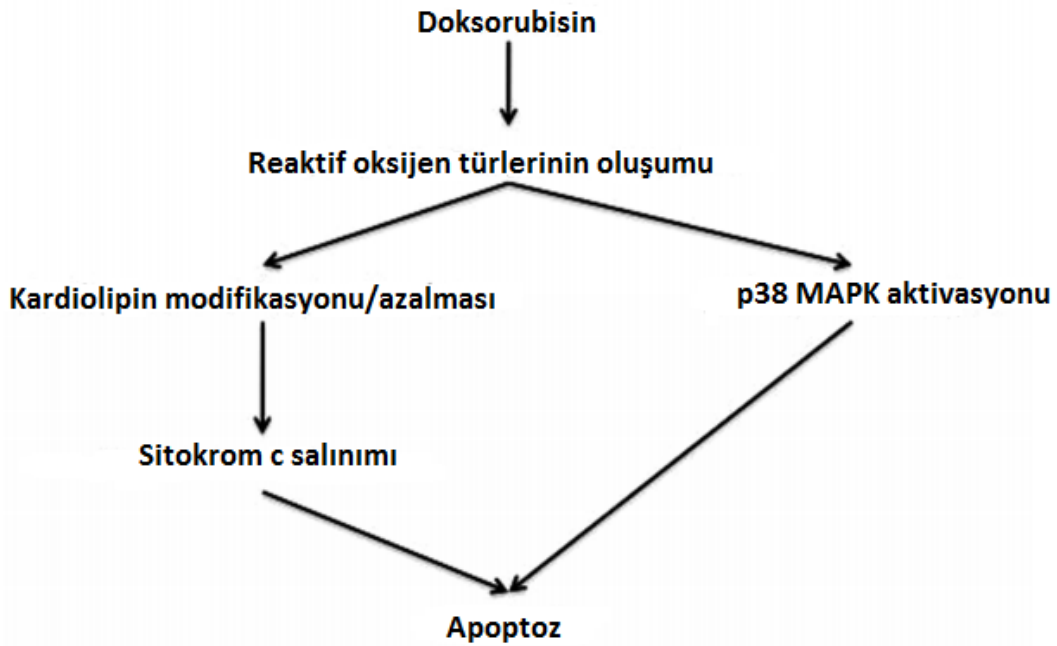
Top2β'nin kardiyomiyosit spesifik delesyonunun fareleri doksorubisin'in indüklediği progresif kalp yetmezliği gelişiminden koruduğu bildirilmiştir (19). Doksorubisin kardiyotoksitesinde p53 ve apoptotik yolağın aktive olduğu tespit edilmiştir (20). Diğer yandan doksorubisin kaynaklı ROT üretimine, antioksidan enzimlerin genlerinin ifadesindeki azalmanın eşlik ettiği de bildirilmektedir (21).

Doksorubisin, kalp kasındaki mitokondrial DNA'da delesyonlara, kopya sayılarında azalma gibi değişikliklere neden olarak mitokondrinin çalışmasını bozabilmektedir (22). Doksorubisin kaynaklı oksijen serbest radikal oluşumunda, enzimatik olmayan yollar ve mitokondrial solunum zincirinin kullanıldığı enzimatik yollar işe karışabilmektedir (23).

Kemoterapötik kardiyotoksisite, 2 tipe ayrılmaktadır. Tip I kardiyotoksisite, nekroz veya apoptoz aracıılığıyla geri dönüşümsüz kardiyomiyosit ölümüne neden

olmaktadır (1). Tip II kardiyotoksisite ise, hücre fonksiyon yetersizliğine sebep olduğundan geri dönüşümlü olabilmektedir (1).

Kardiyomiyositlerde oksidatif strese cevaben sitokrom c salınımına sebep olan doksorubisin, kardiyolipin gibi mitokondrial fosfolipidlere doğrudan bağlanabilmektedir. Doksorubisin, Kaspaz 9 ve 3 'ü aktive edebilmekte, ayrıca p38 MAPK aktivasyonu aracıılığıyla da apoptozu tetikleyebilmektedir (Şekil 2.2) (1). Antioksidanların etkisi ile aktive olan Protein kinaz B (Akt), kaspaz 3 ve 9 inaktivasyonunu sağlayarak apoptozisi önleyebilmektedir (1).



Şekil 2.2. Kardiyak miyositlerinde doksorubisin nedeniyle artmış apoptozisten sorumlu hücresel mekanizmalar (1).

En yaygın kabul gören doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisite teorisinin; “serbest radikal teorisi” olduğu kabul edilmektedir (24). Bu teoride, NADPH-sitokrom P450 redüktaz gibi bir flavoenzim yardımıyla doksorubisin, semiquinon radikali oluşumunu tetikleyebilmektedir (24). Bu radikal, anoksik ortamda kısmen stabilken, normoksik koşul altında eşleşmemiş elektronunu oksijene vererek süperoksit oluşumuna neden olmaktadır (24). Semiquinon radikali, doksorubisin-demir serbest radikal kompleksini oluşturmaktadır (24). Kompleks I gibi flavoproteinler, indirgenmiş semiquinon radikallerini nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) veya nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP)’dan elektron kabul edip doksorubisine teslim ederek katalize etmektedir. Bu reaksiyon zinciri redoks döngüsü olarak bilinmektedir (25). Çok

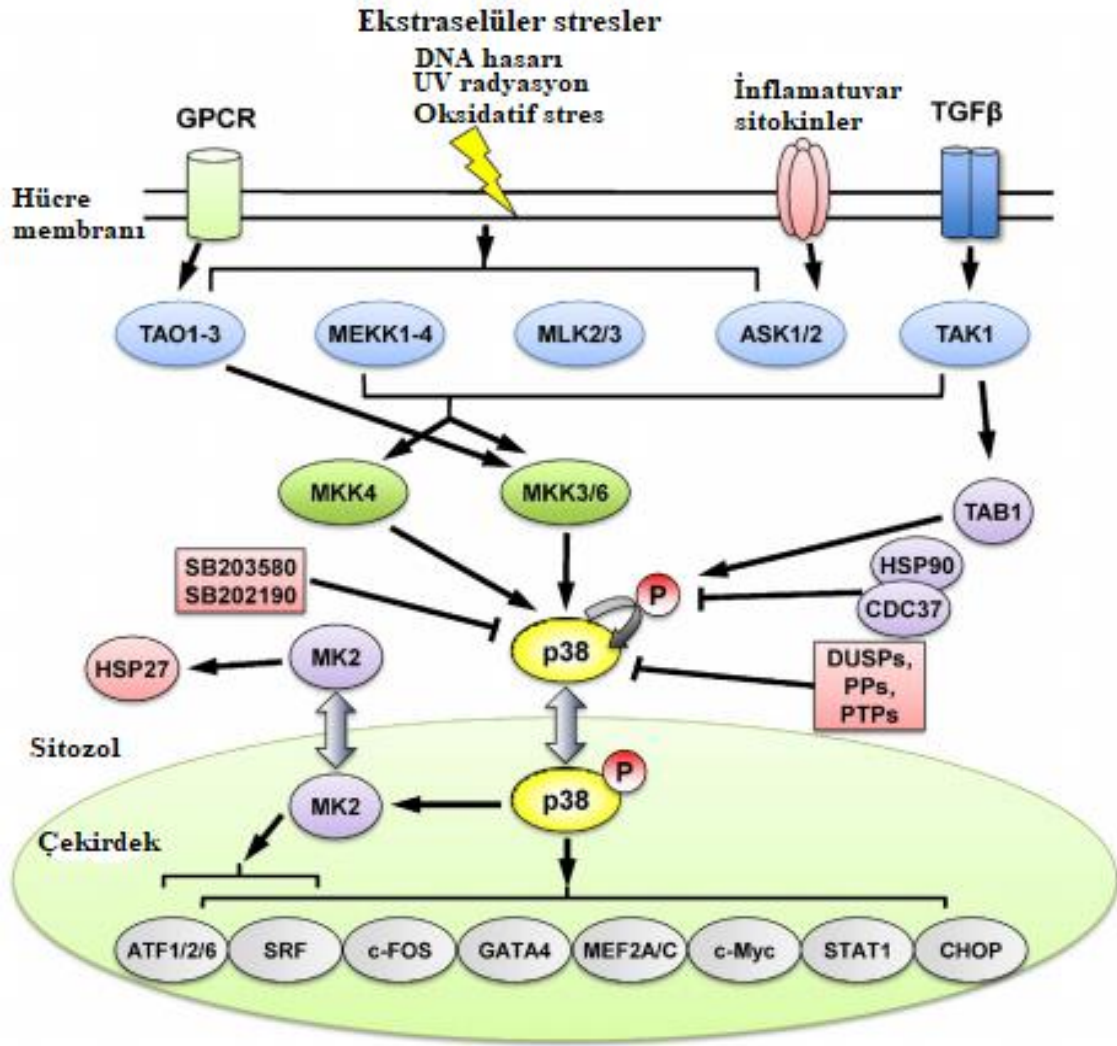
düşük miktarda doksorubisin bulunması bile birçok süperoksit radikalinin oluşumuna neden olabilmektedir (25). Bu durum malondialdehit (MDA) gibi yüksek toksik aldehytlerin üretilmesini tetikleyebilmektedir (26). Bu aldehytler kolayca hücre içine diffüze olurken, mikromoleküler hedeflere tutunarak sitotoksiteye neden olabilmektedir (26). ROT'un yanısıra reaktif azot türlerinin doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisitede etkili olduğu bilinmektedir. Araştırmalarda doksorubisin'in, NO'nun azalmasına ve süperoksit artmasına yol açtığı bildirilmektedir (27,28). Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS), doksorubisin'in neden olduğu akut kardiyotoksisitede işe karışabilmektedir (29). Doksorubisin, kardiyak bakır çinko süperoksit dismutaz (Cu,Zn-SOD), glutatyon S transferaz (GST) ve katalaz (CAT) enzimlerinin aktivitesini azaltabilmektedir (30). Doksorubisin varlığında artan mangan süperoksit dismutaz'ın (Mn-SOD) hücre sağ kalımını arttırdığı bildirilmiştir (30) .

Kalp dokusu, vücuttaki diğer organlara kıyasla daha düşük antioksidan içerdiğinden doksorubisin kaynaklı radikalik hasara daha duyarlı olabilmektedir (31). Doksorubisin mitokondri membranının iç zarında bol miktarda bulunan bir fosfolipid olan kardiolipine yüksek affinite göstermektedir (32). Bu affinite doksorubisinin kardiyomiyositlere nüfuz etmesine izin vermektedir (32).

2.2. Mitojen Aktive Edilmiş Protein Kinazlar (MAPK)

MAPK'ların; mayalardan insanlara kadar tüm ökaryotlarda hücre çoğalması, hücre farklılaşması ve hücre ölümü gibi hayati olaylarda anahtar bileşenlerden biri olduğu bilinmektedir (33). MAPK; memelilerde ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazlar (ERK), Jun amino-terminal kinazlar (JNK) ve stres ile aktive olmuş protein kinazlar (p38/SAPK) olarak 3 gruba ayrılmaktadır (34).

p38 MAPK yolağının aktivasyonu osmotik şok, ısı ve oksidatif stres gibi çeşitli stres yanıtlarında rol oynamaktadır. (35). MK2/3 ve MSK1/2 gibi protein kinazların yanısıra birçok transkripsiyon faktörü (ATF1/2/6, c-MYC, c-FOS, GATA4 MEF2A/C, SRF, STAT1, CHOP) p38 MAPK'ların direkt aşağı akış hedefleridir. Tümör oluşumunu düzenleyen ATF2, ATF/cAMP yanıt elementini bağlayan protein ailesinin bir üyesidir. ATF2, hücre dışı streslerde büyüme ve tümör oluşumu ile ilgili genler ve homeostaz ile ilişkili genlerin ifadesini düzenlemektedir (Şekil 2.3)(35).



Şekil 2.3. p38 MAPK aktivasyonunun moleküler ağı (35).

Bazal koşullarda, p38 MAPK'lar hem çekirdekte hem de sitoplazmada bulunurken aktive olmalarıyla birlikte çekirdek içine transloke olmaktadır. Bu translokasyon süreci sadece kendi katalitik aktivitesine bağlı olmayıp p38 MAPK'nin yukarı akış kinazları da fosforilasyonda görev almaktadır (35).

p38 MAPK sinyal yolağı, ilerlemiş kalp yetmezliğinde görülen artmış interstisyel fibrozis, azalmış vazoreaktivasyon ve artmış ROT'un üretimi gibi olumsuz etkilerde rol oynayabilmektedir (10).

Doksorubisinin neden olduğu inflamasyon ve sitotoksitenin, p38 MAPK/NF-κB yolağının uyarılmasına neden olduğu bildirilmiştir (36). p38 MAPK sinyal yolağı inhibisyonunun, iskemik hasarı artıran tümör nekroz faktör alfa (TNF-α), IL-1 ve interlökin-8 gibi inflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe edebileceği ve infarkt

boyutunu azaltabileceği ve p38 MAPK inhibisyonun, hücre ölümüne karşı kalp dokusunu koruyabileceği ileri sürülmüştür (36).

Kalp yetmezliğine neden olan birçok stres faktörüne yanıt veren sinyal yolağının bir üyesi olan p38 MAPK ailesi p38 α , p38 β , p38 γ ve p38 δ olmak üzere dört izoforma sahiptir (37). p38 α ve p38 β her yerde birlikte ifade edilirken, p38 γ izoformu iskelet ve kalp kasında, p38 δ ise akciğer, böbrek, testis, dalak, pankreas ve ince bağırsakta ifade edilmektedir (38, 39).

p38 MAPK'lar yukarı akış MAPK kinazları tarafından aktivasyon ilmeğindeki iki rezidünün fosforilasyonu ile aktive olmaktadır (40,41). Bu yukarı akış kinazları kanonikal bir aktivasyon yolu ile etkinleştirilmektedir (40,41). MAPK aktivasyon ilmeğindeki fosfoakseptörler, p38 MAPK durumunda glisinin eklenmesiyle treonin, tirozin rezidüleri ile birlikte TGY motifini oluşturmaktadır. (40,41).

p38'in katalitik çekirdeği N-terminal lobu, β -kıvrımlı tabakaları ve ağırlıklı olarak α -heliksten oluşan büyük C-terminal lobu ile çoğu kinazla benzerlik göstermektedir (42). Bu iki lob arasında oluşan esnek menteşe bölgesinde ATP'nin bağlandığı alan bulunmaktadır (42). ATP bağlanma alanındaki 106. treonin hidrofobik cebe girişi engellediği için kapıcı rezidü olarak adlandırılmaktadır (43). Bu cep ATP'nin bağlanmasına doğrudan katılmadığı için kinazlar arasında uyumsuzlukta önem teşkil etmektedir (43). Tip I, ATP yarışmalı kinaz inhibitörleri hem inhibitörün bağlanma affinitelerini artırmak hem de kinazlara karşı seçici hale getirmek için bu cebi araştırmak üzere tasarlanmıştır (43). 106. treoninin yerinin değişmesi Tip I inhibitörlerin bağlanmasını engellerken ATP'nin bağlanmasını etkilememektedir (43). Tip II ATP yarışmasız kinaz inhibitörleri ise, C- terminal lobdaki ATP bağlanma cebinin alt kenarındaki başka bir özelliği kullanmaktadır (44). 169. fenilalaninin fenil halkasının 168. aspartat , 169. fenilalanin, 170. glisin ile oluşan molekülün çekirdeğinin içinde ve dışında gerçekleşen biçimsel değişikliklerle kinazlar arasında değişen geçici cepler oluşturmaktadır (44). Tip II inhibitörler tarafından kullanılan bu cep kinazların inaktif halde kalmasını sağlamaktadır (44). SB203580, VX745, RO3201195 ve AMG548 gibi p38 MAPK inhibitörleri ATP yarışmalı bağlanarak; BIRB796 ise ATP bağlanmasının dışında biçimsel değişikliklerle p38 MAPK inhibe etmektedir (45). SB203580 ile yapılan inhibisyonun, kardiyomiyositlerde kontraktiletiyi azaltarak kardiak yeniden yapılanmaya katkı sağladığı bildirilmiştir (46). Bir p38 inhibitörü olan SD-282 ile p38 MAPK inhibisyonu yapılması, miyokardiumda apoptotik hücrelerde

azalmaya neden olabilmektedir (11). Kardiyomiyositlerin ölümünü azaltması nedeniyle p38 MAPK inhibisyonunun kardiyoprotektif etkiye sahip olduğu ileri sürülmektedir (11).

Artmış p38 MAPK α /Kav-1 etkileşimi ve azalmış p38MAPK β /Kav-3 etkileşimi iskemi reperfüzyon sonrası yaşamsal sinyalleri destekleyip kalp fonksiyonunu korumayı sağladığı bildirilmektedir (47). Doksorubisin indüklü kardiyotoksistide elektrokardiyografik anormallikler de ortaya çıkabilmektedir (48). Doksorubisin kardiyotoksistisine p38 MAPK'e bağımlı olarak oksidatif stres birikiminin neden olduğu ileri sürülmektedir (49).

p38 MAPK aktivasyonu, endotel hücreleri ve makrofajlar arasında inflamatuvar cevabın translasyonel ve transkripsiyonel yönlerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (50). Bu vasküler inflamatuvar cevabın en temel özelliği NADPH oksidazın aktivasyonu ile reaktif oksijen türlerinin oluşumuna aracılık etmesi olduğu bilinmektedir (50). Ayrıca aktive olmuş p38 MAPK, NADPH oksidaz subunitleri ve sitokin üretimini artırarak ROT artışına neden olabilmektedir (50).

2.3. Kaveolin-3 (Kav-3)

Latince "küçük mağaralar" anlamına gelen kaveola, 50 - 100 nm boyutunda daha çok endotel, düz kas ve adipositlerde bulunan plazma zarı invajinasyonlarıdır (51). Kaveolinler, kaveolanın ana bileşenleridir. Kaveolin-1, 1992 yılında ilk kez keşfedilmiş olup, kaveolanın yapısına girmekte, sinyal iletimi, lipid trafiği ve endositoz gibi işlemlerde görev aldığı düşünülmektedir (52). Kaveolin-1, çizgili kas hariç birçok hücre tipinde bulunabilmektedir (52). Kaveolin-2, kaveolin-1 ile benzer ifade profiline sahip olup kaveolanın şekillenmesinde etken rol oynamaktadır (52). Kaveolinlerin, kaveolanın tek yapısal bileşeni olmadığı bilinmektedir (53). Kaveolar mimarı ve fonksiyon için temel olan kavinerler yüksek dereceli hetero oligomerik düzeneklerden oluşmaktadır (54). Kavinerler olarak adlandırılan dört bağlantılı protein bulunmaktadır. Bunlar Kav-1 (polimeraz transkripsiyon faktörü (PTRF).), Kav-2 (serum yoksunluk protein yanıtı (SDPR), Kav-3 (c-kinaz bağlanan sdr ilişkili gen ürünü (SRBC) Kav-4 kasla sınırlanmış sarmal proteindir (MURC) (55).

Kav-3 kas yüzeyinde önemli bir laminin reseptörü olan distrofin ilişkili glikoprotein kompleksi ile etkileşime girmektedir (56,57). Bu transmembran kompleksi birçok sinyal molekülü için iskele olmasının yanı sıra ekstraselüler matriksi hücre

iskeletine bağlayarak kas lifi bütünlüğünde önemli rol oynamaktadır (56,57). Bu kompleksin çekirdeğinde α/β -dystroglikan, distrofin, utrofin, sarkospan, sarkoglikan, sintrofin, distrobrevin bulunmaktadır (56,57). Kav-3 peptidleri tedavide güçlü rol oynayabilmektedir (58). Adenovirüs ile ifadesi artırılmış Kav-3'ün kardiyoprotektif etkileri ortaya konulmuştur (58).

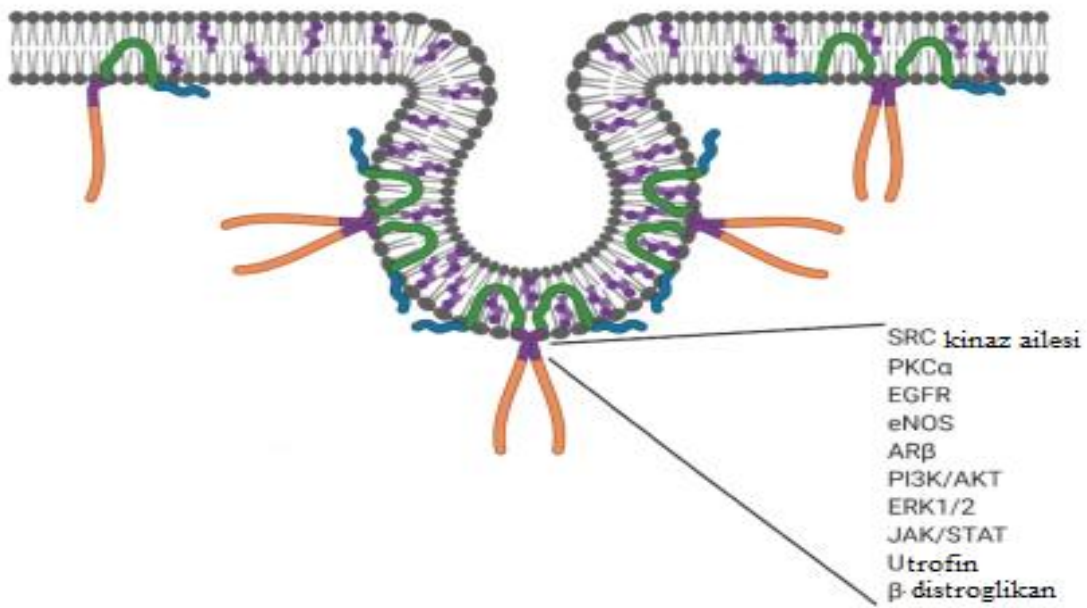
Kav-3'ün normal kardiyak fonksiyon için gerekli olan NO üretiminin ve eNOS aktivasyonunun devamlılığının sağlanmasında görevli olabileceği öngörülmektedir (28). Tek doz 20 mg/kg intraperitoneal doksorubisin verilen farelerde, kalp dokusundaki nitrik oksit sentetaz I enziminin indüksiyonuyla artan NO üretimi sonucu oluşan peroksinitrit radikallerinin kalp dokusuna spesifik olan kreatin kinaz (M-CK) proteininin hasar görmesine neden olduğunu bildirilmiştir (59). Kav-3'ün, NOS'un iskelet kasında ifade edilen izoformu olan nöronal NOS (nNOS) ile bağlantılı olduğu ortaya koyulmuştur (60). Katekolamin ile uyarılmış hipertrofik kalp hücrelerinde, Kav-3'ün plazma membranından sitozole translokasyonunda azalma olduğu bildirilmektedir (61). Doksorubisin'in uyardığı apoptoziste, kalbin atriumundaki kaspaz-3 aktivasyonu için Kav-1 ve Kav-3'ün birlikte ifade olmaları gerektiği ileri sürülmektedir (62). Doksorubisin indüklü apoptoziste, Kav-1 ifadesindeki azalmanın apoptozisin önlenmesinde yeterli olmadığını bildirmiştir (63). Kav-1 ve Kav-3 null farelerde kardiyak defektlerin geliştiği ayrıca rapor edilmiştir (62). Özellikle Kav-3 null farelerde kardiyak miyosit hipertrofisi ve kardiyomyopati ve p42/44 MAPK yolağında hiperaktivasyon görüldüğü bildirilmektedir (64). Kav-3 ifadesinin düzenlenmesinin normal muskuler homeostasinin sürdürülmesi için temel teşkil edebileceği öne sürülmektedir (62). Kav-3'ün üyesi olduğu kaveolinler, eNOS'un negatif düzenleyicileri olduğu bilinmektedir (28). Kardiyak miyositlerinde eNOS ile kompleks halinde bulunan Kav-3'ün, eNOS'un inaktivasyonundan sorumlu olduğu bildirilmektedir (65). Kav-3 ve kaveolanın, organeller arası sinyalizasyonda önemli düzenleyici role sahip olduğu öngörülmektedir (66). Kaveolinler, kalp hasarına karşı koruyucu rol üstlenebilen moleküllerle etkileşebilmektedir (67).

Kav-3 proteini, 151 amino asit uzunluğundadır. N-terminal, iskele, transmembran, C-terminal ile N-terminalde tüm kaveolinlerde bulunan özel bir dizi alanı olmak üzere beş kısma ayrılmıştır (68).

Kav-3, yetişkin miyofibrillerinde T tubul sistemleri boyunca sıcak nokta denilen subsarkolemmal boşluktaki tubullerin boynunda bulunmaktadır (68). T tubullerde

özelleşmiş bu alanlar, kasılma uyarısının elektrik iletimi ile iyon kanalları, kinazlar ve sinyal moleküllerinin platformu olarak kaveolar fonksiyonlar için kritik öneme sahiptir (68). Kav-3'ün kardiyomiyosit hipertrofisini inhibe ettiği ortaya konulmuştur (68)

Kav-3 proteininin C'- ve N'- terminal kısımları sitoplazmaya bakarken ortadaki hidrofobik kısmı lipid çift tabakası içinde tek bir ilmek oluşturmaktadır. Sitoplazmik C'- terminal bölgesi palmitoillenmiş üç bölgeye sahiptir. N' terminal sitoplazmik ucunun membrana yakın kısmı kaveolin iskelet alanı adı verilen büyük sinyal molekülleriyle etkileşimin sağlandığı motifleri içermektedir (Şekil 2.4) (69)



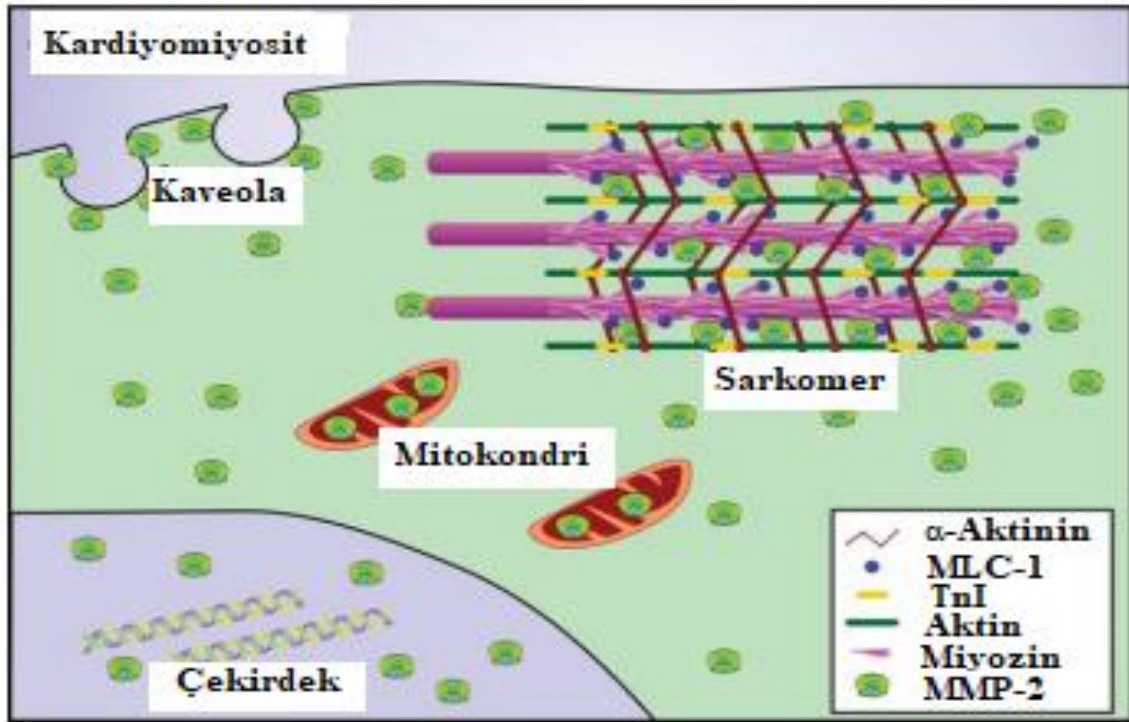
Şekil 2.4. Kaveola ilişkili Kav-3 diyagramı (69)

Kav-3'ün iskelet ve kalp kasındaki kaveolanın şekillenmesinde esas rol oynayan ve kardiyomiyositlerde baskın olan kaveolin izoformu olduğu bilinmektedir (70). Kav-3'ün hem kalp hastalıklarında hem de kalbin korunmasında rolü bulunmaktadır (71). Major patolojik kardiyovasküler özelliklerle ilişkili olan Kav-3 fonksiyonlarındaki değişikliklerin kardiyovasküler hastalıkların belirteçleri olan hipertrofiye ve miyopatiye neden olduğu bildirilmektedir (71). Kav-3'ün kardiyovasküler komponentleri olan muskuler distrofilerde anahtar rol oynadığı da bildirilmiştir (71). İskemi öncesi Kav-3'ün kardiyomiyositlerin iskemi sonrasındaki maruz kalacağı hasarda terapötik potansiyelinin güçlü olduğu ileri sürülmektedir (67).

2.4. Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2)

Matriks metalloproteinazlar (MMP); çinko bağımlı endopeptidazlar ailesinin bir üyesi olup, ekstraselüler matriks dokusunun yeniden şekillenmesinde görev almaktadır (3). MMP'ler zimojenler olarak bilinen uzun proenzimler olarak salınan endopeptidazlardır (3). Kullanabildiği substratlara göre; kollajenazlar (MMP 1, 8, 13,18), jelatinazlar (MMP-2, MMP-9), stromelsinler (MMP 3, 7, 10, 11, 19, 20), matrilsinler (MMP-7,16), membran tipi MMP (MMP- 14, 15, 16, 17, 24, 25) olarak sınıflandırılmaktadır (3). Aktif bölgesindeki blokajı sistein-çinko bağlantısını kırarak gerçekleştirilmektedir (72). *MMP-2* ve *MMP-9* ifadesinin memelilerdeki kalp yetmezliklerinde arttığı bildirilmektedir (3). *MMP-2* troponin I degradasyonundan sorumlu tutulmaktadır (73). *MMP-9* geninin susturulmasının fareleri miyokardial iskemi reperfüzyon hasarından koruduğu ileri sürülmektedir (74). MMP'ler birçok miyokardial hasar modelinde, ventriküler dilatasyonda ve kardiyak yeniden modellemede önemli rol oynamaktadır (75). Kronik doksorubisin tedavisinden sonra artmış *MMP* gen ifadesi ve aktivitesinin gösterilmesinin yanısıra kardiyak disfonksiyonun miyokardial *MMP-2* aktivasyonu ile ilişkili olduğu ifade edilmektedir (75). İnsan retinal pigment epitelyal hücrelerinde *MMP-2* aktivasyonunun p38 sinyal yolağı aracılığıyla arttığı bildirilmiştir (76). Antosiyanin ile inkübe edilmiş primer fibroblast hücre kültüründe *MMP-2* aktivitesinin azalmasıyla p38 fosforilasyon seviyelerinde ciddi azalma olduğu gösterilmektedir (77) .

MMP-2 kardiyak sarkomerlerin miyofilamentleri gibi hücre içi bölgelerde, çekirdekte ve kaveola içinde bulunmaktadır (Şekil 2.5) (78).



Şekil 2.5. Kardiyomiyositte MMP-2'nin hücre içi hedefleri ve bağlanma noktaları (78).

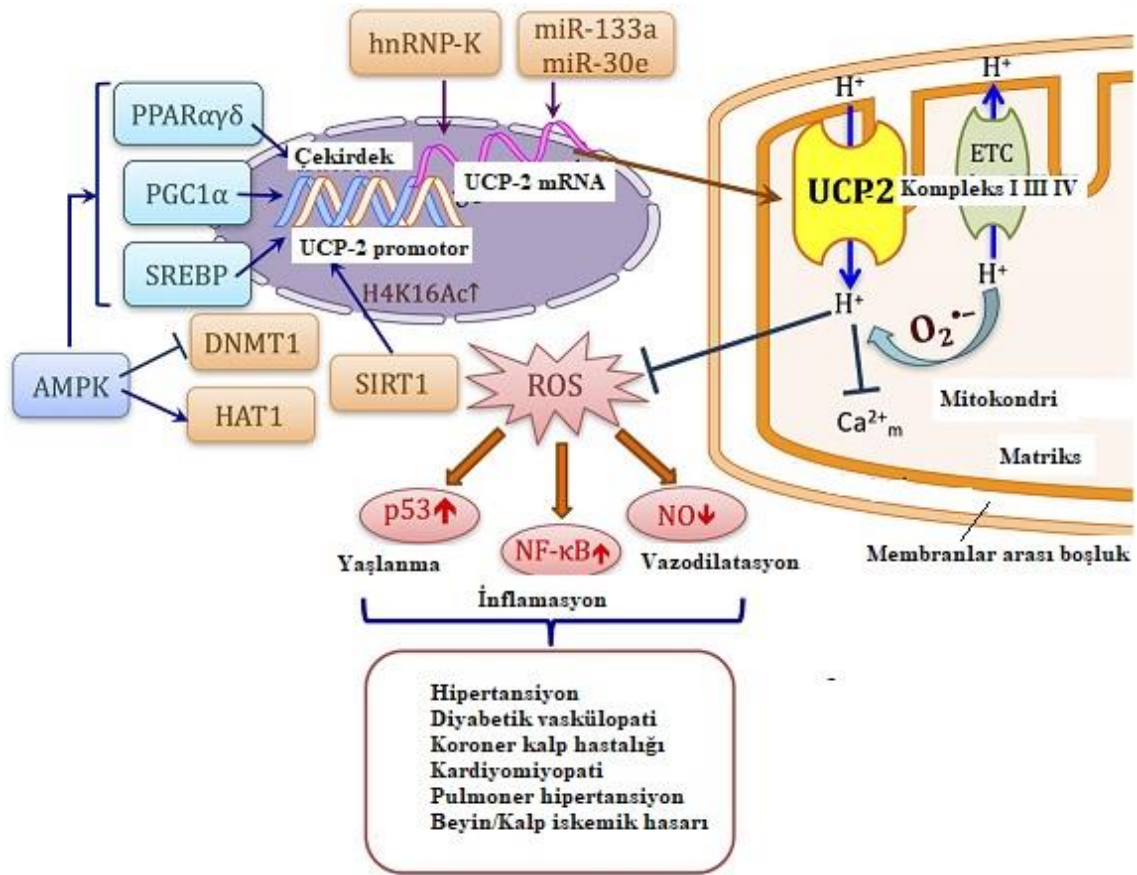
İnflamatuvar ve nörohormonal aktivite, hücre içi kalsiyum değişiklikleri, artmış oksidatif stres ve miyokardial gerilme gibi farklı uyarılar MMP aktivitesini artırabilmektedir (75). Artmış oksidatif stres süresince intraselüler *MMP-2* aktivasyonu akut kontraktıl disfonksiyonu uyaran troponin I, α -aktinin ve miyozin hafifi zinciri sarkomerik ve sitoskelet proteinlerinin degradasyonuna neden olduğu bildirilmektedir (75). Kalp miyozitlerinde doksorubisine karşı akut cevaptaki *MMP-2* ve *MMP-9*'un artışının, MAPK ve fosfotidil inozitol 3 kinaz (PI3K)/Akt yolları aracılığıyla olduğu gösterilmektedir (4).

2.5. Eşleşme Bozucu (Uncoupling) Protein-2 (UCP-2)

UCP'ler, iç mitokondriyal zar boyunca proton elektrokimyasal gradyanını dağıtan ve böylece mitokondriyal ROT'un oluşumunu azaltan mitokondriyal iç zar proteinleridir (79). Azalmış reaktif oksijen düzeyleri ile kardiyomiyositleri koruyabilmekte; ancak mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun ayrılmaması nedeniyle hücre içi ATP oluşumunun azalması düşük metabolizma verimine neden olabilmektedir (79). Bu ailenin ilk tanımlanan üyesi olan UCP-1 mitokondriyal ATP sentezinde metabolik substratların dönüşümünü azaltmaktadır (80).

Ayrıca UCP'ler reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunda da rol oynamaktadır (81). Bu nedenle, UCP'ler serbest radikal hasarını azaltabilmektedir (81). Memeli kalplerinde UCP-2 ve UCP-3 izoformları baskındır (82).

ROT üretimi, çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda ortaya çıkan hücrel yaşlanma, inflamasyon, bozulmuş vazodilatasyona neden olan NF- κ B ve p53 gibi çeşitli sinyal yollarının aktivasyonunu zayıflatmaktadır. UCP-2 çeşitli transkripsiyon faktörleriyle doğrudan transkripsiyon düzeyinde etkilerken post-transkripsiyonel ve translasyonel seviyelerde de farklı mekanizmalarla düzenlenmektedir (Şekil 2.6) (83).



Şekil 2.6. Kardiyovasküler sistemde UCP-2'nin transkripsiyonel düzenlenmesi (83).

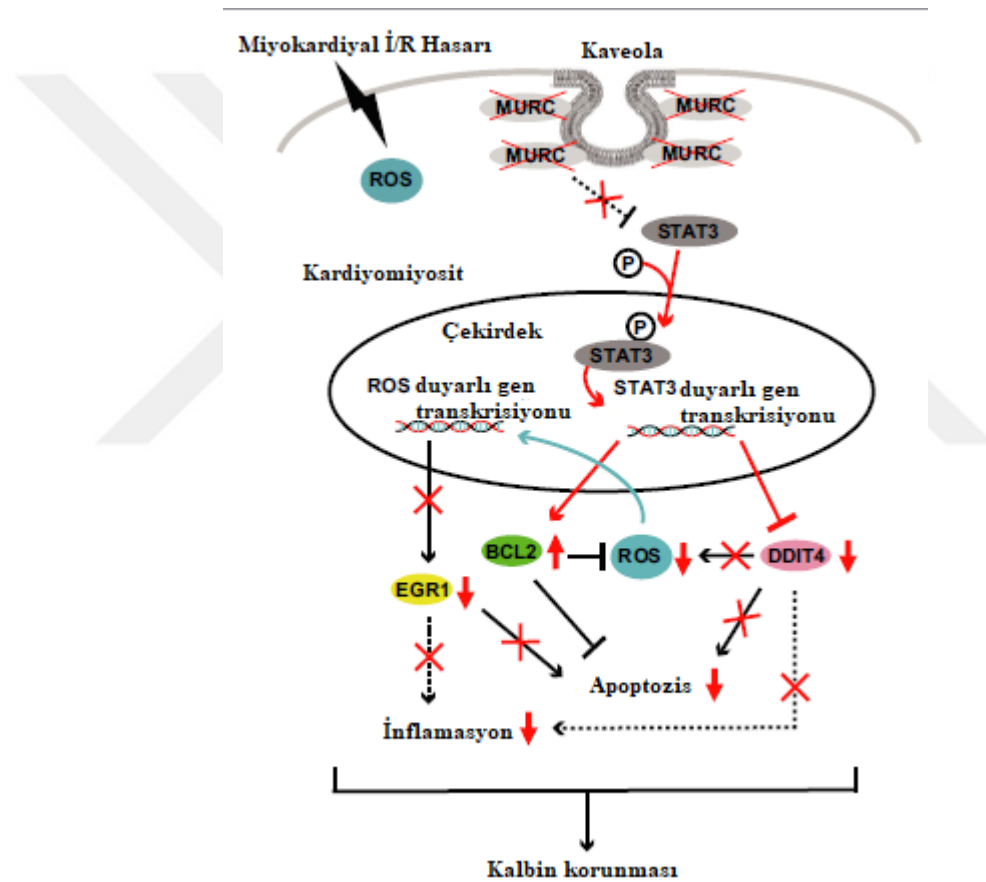
2.6. Kavin-4/(MURC)

Kavin-4/(MURC=Muscle-Restricted Coiled-coil protein) sitozolik bir protein olup sadece kas hücrelerinde bulunmaktadır (8). *Kavin-4*'ün, kardiyak kası biyogenezinde önemli rolü olan Rho/ROCK yolağında görev aldığı ileri sürülmektedir (8). Bastiani ve ark., fare miyoblast hücreleri ile yaptıkları hücre kültürü çalışmasında *Kavin-4*'ün kalp kası hücrelerinin farklılaşmasında etkili olduğunu ortaya koymuşlardır

(9). Miyotubüllerdeki *Kavin-4*'in ifadesinin miyoblastların farklılaşmasıyla birlikte artmasının yanısıra transgenik farelerde artmış *Kavin-4* ifadesinin kardiyak kontraktıl disfonksiyona neden olmasından dolayı *Kavin-4*'in T tubul sisteminin düzenlenmesinde görev aldığı bildirilmektedir (9).

Dilate kardiyomiopati hastalarda *Kavin-4/MURC* mutasyonları olduğu gösterilmektedir (9).

Kardiyak iskemik reperfüzyon hasarında MURC delesyonu, infarkt boyutunu azaltmış ve ROT uyarılı hücre ölümü ile STAT3 aracılı anti-apoptotik yolak aracılığıyla kalp kasılmasını korumuş olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.7) (84).



Şekil 2.7. Miyokardiyal İ/R hasarında MURC yokluğunun kardiyoprotektif etkileri(84).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim Merkezi'nde (İNÜTF-DEHÜM) ve İnönü Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirildi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanan (16.04.2019 tarihli ve 2016/A-115 protokol no'lu karar) bu çalışmada tüm uygulamalar etik kurul protokolüne uygun şekilde yapıldı.

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

SB203580 p38 MAPK inhibitörü (Selleckchem), Doksorubisin (Saba), Sığır serum albümin, Glutasyon (GSH, Sigma-Aldrich), 5,5'-ditiyobis-2 nitrobenzoik asit (DTNB, Sigma-Aldrich), 2-tiyobarbutirik asit (TBA, Sigma-Aldrich), sodyum klorür (NaCl, Merck), potasyum klorür (KCl, Merck), magnezyum klorür ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$, Sigma-Aldrich), kalsiyum klorür ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$, Sigma-Aldrich), sodyum dihidrojen fosfat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, Riedel-de-Haen), disodyum hidrojen fosfat ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, Riedel-de-Haen), (1,1,3,3, tetrametoksipropan, Sigma-Aldrich), n-butanol (Fluka), triklor asetik asit (TCA, Sigma-Aldrich), sodyum hidroksit (NaOH, Sigma-Aldrich), tri sodyum sitrat (Sigma-Aldrich), fosforik asit (H_3PO_4 , %85'lik, Riedel-de-Haen), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4 , Sigma-Aldrich), dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4 , Sigma-Aldrich), etilendiamintetraasetik asit (EDTA, Sigma-Aldrich), hidrojen peroksit (H_2O_2 , Sigma-Aldrich) Na-K-tartarat (Sigma-Aldrich), bakır sülfat ($CuSO_4$, Sigma-Aldrich), Etidyum bromid (EtBr, Fisher Scientific), Agaroz (Sigma-Aldrich), Sodyum sitrat tri bazik dihidrat (Sigma-Aldrich), Sodyum asetat (Sigma-Aldrich), Guanidin Tiyosiyanat(Sigma-Aldrich), Hidroklorik asit (HCl, Sigma-Aldrich), Tween-80 (Merck), Nitroblue tetrazolium (Sigma), Sığır serum albümin, EasyPure® RNA Kit (Trans), Evoscript Universal cDNA Master Kit (Roche), Fast Start Essential DNA Probes Master (Roche), Real Time Ready Assay (Roche) temin edildi.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada; millipore marka saf su ünitesi, Biorad-MyCycler marka polimeraz zincir tepkime (PZT) cihazı, Roche marka LC96 model gerçek zamanlı PZT cihazı, Denver Instrument marka terazi, Ohaus marka hassas terazi, Biorad marka elektroforez güç kaynağı, Retsch marka MM400 model bilyeli parçalama sistemi, Mettler Toledo

marka EL20 model pH metre, Hettich-zentrifugen marka 200 model masaüstü santrifüj cihazı, Hermle marka Z216MK model mikro santrifüj, EpochBiotek marka spektrofotometre cihazı, Heidolph marka vorteks, Heidolph marka manyetik karıştırıcı, bazı kimyasal reaksiyonlar için Memmert marka su banyosu kullanıldı.

3.3. Sıçanların Temini ve Bakımı

Araştırmada İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen, ortalama ağırlıkları 350-375 gram Wistar Albino cinsi toplam 48 adet erkek sıçan kullanıldı. Deney süresince sıçanlar sıcaklığın 21 °C ve ortam neminin % 55-60 olduğu, 12 saat ışık (08:00-20:00 saatleri, 12 saat karanlık uygulanan odalarda tutuldular, *ad libitum* olarak standart sıçan yemiyle beslendi ve normal musluk suyu içtiler.

3.4. Grupların Oluşturulması

Sıçanlar her bir grupta 12 adet olarak; Kontrol, p38 inhibitör grubu, doksorubisin grubu, doksorubisin+ p38 inhibitör grubu olmak üzere randomize dört gruba ayrıldı.

Kontrol Grubu (K): Bu gruba, üç gün boyunca her gün 1 ml kontrol grubu çözeltisi intraperitoneal (i.p) yolla uygulandı.

p38 MAPK İnhibitör Grubu (p38 MAPKi): Bu gruba, üç gün boyunca günde 1 mg/kg vücut ağırlığı dozunda p38 inhibitörü i.p. yolla uygulandı (11).

Doksorubisin Grubu (DOX): Bu gruba, günde bir defa 10 mg/kg vücut ağırlığı dozunda kumulatif dozu 30 mg/kg olacak şekilde 3 gün boyunca doksorubisin i.p. yolla uygulandı (85).

Doksorubisin+ p38 MAPK İnhibitör Grubu (DOX+p38 MAPKi): Bu gruba, günde 10 mg/kg vücut ağırlığı dozunda doksorubisin uygulaması sonrasında 1 mg/kg p38 inhibitörü i.p. yolla 3 gün boyunca uygulandı (11).

Deney sonunda kalp dokuları *Kav-3*, *MMP-2*, *Kavin-4*, *UCP-2* gen ifadeleri ve protein düzeylerinin incelenmesi ve biyokimyasal, histopatolojik analizler için uygun solusyonlara alındı. Sıçanların serumlarından ise kardiak belirteçlerin analizi yapıldı.

3.5. Çözeltilerin Hazırlanması

3.5.1. p38 MAPK İnhibitör Çözeltisi

Selleckchem firmasının S107610 lot numaralı SB203580 p38 MAPK inhibitörü propektüsüne uygun olarak % 4 DMSO+ % 30 PEG 300+ % 5 Tween 80+ddH₂O süspansiyonunda çözülerek p38 MAPK inhibitörü gruplarına enjekte edilecek çözelti hazırlandı.

3.5.2. Kontrol Grubu Çözeltisi

Kontrol grubuna uygulanacak çözelti; 720 µl DMSO, 5,4 µl PEG, 900 µl Tween 80 karıştırılarak üzere distile su ile 18 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.5.3. Doksorubisin Çözeltisi

Saba firmasının Adrimisin adlı 50 mg liyofilize enjeksiyonluk doksorubisin hidroklorür toz içeren flakon ve 25 ml'lik enjeksiyonluk suyu karıştırılarak doksorubisin gruplarına enjekte edilecek çözelti hazırlandı.

3.5.4. RNA Saklama Çözeltisi

70 gr Amonyum Sülfat 100 ml dietilpirokarbonat (DEPC)'lı suda çözüldü. Üzerine 10 mM EDTA (pH=8) ve 25 mM Sodyum Sitrat (pH=5.2) eklenip DEPC'li saf su ile 150 ml'ye tamamlandı ve pH 5.2'ye ayarlandı.

3.5.5. 10X Tris-Borat-EDTA (TBE) Çözeltisinin Hazırlanışı

1 litre 10X TBE tamponu hazırlarken; öncelikle 108 gr TRIS baz, 55 gr borik asit ve 40 ml 0.5 M EDTA çözeltisi 900 ml saf su içerisinde manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Çözeltinin pH değeri 8.0 oluncaya kadar HCl eklendi. Daha sonra çözeltinin toplam hacmi 1000 ml'ye tamamlandı ve son olarak otoklavda 121 °C' de 20 dakika otoklavlandı.

3.5.6. 10X Yürütme Tamponu (pH:8.3)

Tris 30.3 g, glycine 144.1 g, sodyum dodesil sülfat (SDS) 10 g tartıldı, 1 litre su içerisinde çözüldü. Hazırlanan 10X yürütme tamponundan 100 ml alıp 900 ml ddH₂O eklenerek 1X solüsyon hazırlandı ve pH 8.3'e ayarlandı.

3.5.7. 10X Transfer Tamponu (pH: 8.3)

Glisin 144 g, Tris 30 g tartıldı, 1 litre hacimde olacak şekilde su içerisinde çözüldü 10X tampondan 100 ml alınıp üzerine 100 ml metanol ve 800 ml ddH₂O eklenip pH'sı 8.3 olacak şekilde ayarlanarak 1X'e düşürüldü.

3.5.8. Fosfat Salin Tamponu (PBS) (pH:7.4)

Tablo 3.1. Fosfat Salin Tampon İçeriği

	(mmol/Lt)	g/ Lt (1x için)	g/ Lt (10x için)
NaCl	137	8	80
KCl	2.7	0.2	2
Na ₂ HPO ₄	10	1.44	14.4
KH ₂ PO ₄	1.76	0.24	2.4
pH	7.4	7.4	7.4

Tablo 3.1.'deki bileşenler tartılarak üzeri distile su ile 1 litreye tamamlandı. 10X PBS hazırlayıp kullanım öncesi 1X için 100 ml PBS+900 ml ddH₂O şeklinde pH 7.4 olarak kullandı.

3.5.9. %5 Yağsız Süt Tozu Çözeltisi

2.5 gram süt tozu 50 ml PBS içinde iyice vortekslenip çözdürülerek taze olarak hazırlandı ve +4 °C'de tutuldu.

3.5.10. Coomassie Boyama Solüsyonu

Metanol 25 ml, asetik asit 25 ml, coomassie blue 250 mg hazırlandı. ddH₂O ile 250 ml'ye tamamlandı.

3.5.11. Boya Çıkartma Solüsyonu

Metanol 250 ml, asetik asit 50 ml, ddH₂O ile 500 ml'ye tamamlandı.

3.6. Dokuların Alınması ve Örneklerin Analizleri

Deney sonunda kontrol ve deney grubundaki hayvanlar ksilazin-ketamin anestezisi altında (ketamin hidroklorür, Parke- Davis. Eczacıbaşı, İstanbul, 75 mg/kg ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid Rompun, Bayer İlaç) sakrifiye edilip kalp dokuları alındı. *Kav-3*, *MMP-2*, *UCP-2* ve *Kavin-4* mRNA seviyelerinin tespiti için, gruplardan alınan

kalp dokuları, steril şartlarda ve buz üzerinde küçük parçalar halinde kesildi ve RNA saklama çözeltisi içinde -80°C derin dondurucuda analiz gününe kadar saklandı. Geri kalan dokulardan spektrofotometreyle SOD, CAT, GSH, MDA ve histopatolojik analizler yapıldı.

3.6.1. Dokudan RNA Saflaştırılması

Kalp dokusu *Kav-3*, *MMP-2*, *UCP-2*, *Kavin-4* ve β -*Aktin* mRNA seviyelerinin tespiti için gruptan alınan kalp doku örnekleri RNA saklama çözeltisi içine konuldu ve bu dokulardan Trans firmasının “EasyPure® RNA Kit” (Lot no: L41223) saflaştırma kiti kullanılarak toplam RNA saflaştırılması yapıldı. Protokole göre önce 30 mg doku tartıldı ve üzerine 600 μl lizis tamponu eklendi. Daha sonra bilyeli doku parçalayıcıda 30 Hz titreşim hızıyla yaklaşık 3 dakika süresince homojenize edildi. Homojenat $12.000\times\text{g}$ 'de oda ısısında 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra supernatant temiz RNAaz free tube alındı. Lizatın üzerine eşit miktarda %70 etanol eklendi (%70'lık etanol RNAaz free su ile hazırlandı). Etanol eklendikten sonra oluşabilecek çökeltiyi dağıtmak için iyice vorteksledi. Kısa bir santrifüj yapıp tüm lizat spin kolonlarına eklendi. $12.000 \times \text{g}$ 'de 30 saniye santrifüj edildi. Spin kolonlarına 500 μl CB4 (Temizleme tampon 4.) eklendi. 30 saniye boyunca $12.000 \times \text{g}$ 'de santrifüj edildi. Spin kolon altındaki ependorf boşaltıldı. Genomik DNA'yı uzaklaştırmak için, 80 μl DNaz I solusyonu (Solüsyon, 10 μl DNaz I ve 70 μl reaksiyon tamponu karıştırılarak hazırlandı.) ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Spin kolonlarına 500 μl CB4 eklendi. 30 saniye boyunca $12.000 \times \text{g}$ 'de santrifüj edildi. Spin kolon altındaki tüp boşaltıldı. Spin kolonuna 500 μl WB4 çözeltisi eklendi (Çalışmaya başlamadan önce WB4 (Yıkama tampon 4.) üzerine 48 ml % 96- %100 etanol eklenip karıştırıldı.). Oda sıcaklığında 30 saniye boyunca $12.000 \times \text{g}$ 'de santrifüj edildi. Spin kolon altındaki tüp boşaltıldı. Spin kolonuna 500 μl WB4 çözeltisi eklendi. Oda sıcaklığında 30 saniye boyunca $12.000 \times \text{g}$ 'de santrifüj edildi. Spin kolon altındaki tüp boşaltıldı. Etanol kalıntısını gidermek için boş kolon maksimum hızda ($\geq 12.000 \times \text{g}$) oda sıcaklığında 2 dakika santrifüj edildi ve kolon matrisi birkaç dakika boyunca havada kurutuldu. Spin kolonunu temiz 1.5 ml'lik bir tüpe yerleştirildi. RNA'yı ayırmak için $12.000 \times \text{g}$ 'de 2 dakika santrifüjlendi. İzole RNA -80°C 'de saklandı. “EasyPure® RNA” kiti ile kalp dokusu örneklerinden saflaştırılan toplam RNA'larda herhangi bir yıkımın olup olmadığının belirlenmesi amacıyla örnekler, % 1 agaroz jelinde ve 1X TBE tamponu ile 100 mV'de elektroforez işlemine tabi tutuldu. Ayrıca dokulardan saflaştırılan RNA

örneklerinin spektrofotometrik analizleri yapıldı, örneklerin saf RNA içerdiği tespit edildi. Örneklerin RNA'ları miktar ve saflık tayini için "Biotek" marka spektrofotometre cihazı ile "Gen5" programları kullanılarak 260 ve 280 nm UV spektrumunda ölçüldü. RNA miktarı ng/µL cinsinden hesaplandı ve 260/280 oranları yaklaşık 2 olan saf RNA örnekleri komplementer deoksiribonükleik asit (cDNA) sentezinde kullanıldı.

3.6.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için Roche firmasının ürettiği "Evoscript Universal cDNA Master Kit" (Lot no: 31616500, Ref no: 07912439001) kullanıldı. cDNA sentezi firmanın önerdiği şekilde aşağıdaki protokole göre yapıldı. Kısaca 100 µl'lik polimeraz zincir tepkimesi (PZT) tüpüne 1000 ng toplam RNA, 4 µl '5x Master Reaction Mix' ve toplam hacim 18 µl olacak şekilde saf su eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra buz üzerinde en az 5 dakika primerlerin RNA'ya bağlanması için inkübasyona bırakıldı. Bu karışımın üzerine 2 µl '10x Enzyme Mix' eklendi ve böylece toplam hacim 20 µl oldu. Karıştırılan numuneler PZT makinesinde 42 °C'de 15 dakika, 85 °C'de 5 dakika ve 65 °C'de 15 dakika ısıtıldı ve +4 °C'de soğutulup daha sonra -20 °C'de analize kadar saklandı.

3.6.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi (qRT-PZT)

qRT-PZT analizi; Roche Light Cycler 96 gerçek zamanlı PZT cihazı, Roche firmasının ürettiği "Fast Start Essential DNA Probes Master kit (Lot no: 33042200, Ref no: 06402682001)" ve "Real Time Ready Assay *MMP-2* (Lot no: 0000078122, config no: 100143836.); "*Kav-3* (Lot no: 0000078121, config no: 100143818.)", "*Kavin-4* (Lot no: 0000078120, config no: 100143827.)", "*β-Aktin* (Lot no: 0000052091, config no: 100129896.)", "*UCP-2* (Lot no: 90014993, config no: 100072244.)" hidroliz problu primerler kullanılarak yapıldı. Reaksiyonlar 10 µl toplam hacimde hazırlandı. Bunun için 5 µl master mix, 0.5 µl real time ready mix, 2 µl PZT kalitesinde su ve 2.5 µl cDNA olacak şekilde hazırlandı. Çalışmada her örnek için 3 tekrar yapıldı. PZT şartları firmanın önerdiği şekilde yapıldı; ilk denaturasyon 95 °C'de 10 dakika, ikinci denaturasyon 95 °C'de 10 saniye, bağlanma 60 °C'de 30 saniye ve polimerizasyon 72 °C'de 1 saniye olarak oluşturuldu ve 55 döngü tekrarlandı. Tablo 3.2'de dizilimleri ve büyüklükleri verilen primerler gen ifadelerinin analizinde kullanıldı.

Her bir örnekten saflaştırılan RNA'lerden elde edilen cDNA'lar, *Kav-3*, *MMP-2*, *UCP-2*, *Kavin-4*, ve β -*Aktin* genlerine özgü primerler kullanılarak gerçek zamanlı PZT ile çoğaltıldı ve gen ifadesindeki değişimler β -*Aktin* genine oranla belirlendi.

Tablo 3.2. Primer dizilimleri (Ek 3-6).

Genler	Primer Dizileri	Gen Referans Dizi Numarası	Ürün Boyutu(bç)
<i>β-Aktin-F</i>	5'-CTGGCTCCTAGCACCATGA-3'	NM_031144.3	76
<i>β-Aktin-R</i>	5'-TAGAGCCACCAATCCACACA-3'		
<i>MMP-2-F</i>	5'-CACCACCGAGGATTATGACC-3'	NM_031054.2	71
<i>MMP-2-R</i>	5'-CACCCACAGTGGACATAGCA-3'		
<i>Kaveolin-3-F</i>	5'-GCCTGAGCAGAGGGTTC-3'	NM_019155.2	60
<i>Kaveolin-3-R</i>	5'-CAGTACATGTGATCGCAAAGC-3'		
<i>Kavin-4-F</i>	5'-CAAGTTCCGCGTGGTAATC-3'	NM_001107931.2	117
<i>Kavin-4-R</i>	5'-GGGGGATCGAAGACTTCCT-3'		
<i>UCP-2-F</i>	5'-ACTGTGCCCTGACCATGC-3'	NM_AB010743.1	72
<i>UCP-2-R</i>	5'-GGAGGAAGGAAGGCATGAA-3'		

F: forward (ileri primer), R:reverse (geri primer)

3.6.4. Western Blot Analizi

Toplam Protein İzolasyonu

Toplam protein izolasyonunda Bio Rad ReadyPrep toplam protein ekstraksiyon kiti (Katalog #163-2086.) kullanıldı. Çalışmaya başlamadan önce kit içinde bulunan Ready Prep 2-D Rehydration/Sample Buffer 1 üzerine 5.6 ml steril distile su eklendi. ReadyPrep TBP Reducing Agent da kit içinde gelen saklama şişesine aktarılıp, -20 °C'ye kaldırıldı.

Her 50-100 mg örnek için gerekli olan 1 ml 2-D Buffer+10 µl TBP karışımından 25 mg doku için 500 µl kullanıldı. Bu karışıma % 1 oranda proteaz inhibitörü (Thermo Scientific, Lot: RI236222A, Prod: 87786.) eklendi. Protein yıkımını en aza indirmek için buz üzerinde ve tek bir seferde 6 numune olmak üzere çalışıldı. Tartılan 25 mg doku üzerine çalışma başlangıcında taze hazırlanan parçalayıcı solüsyon eklenip 13.500 devirde Ultra-Turnax T25 markalı homojenizatör ile işlem gerçekleştirildi.

Homojenizasyon tamamlandıncam homojenatlar cam tüpten başka bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 16.000 rpm gibi maksimum hızda 18-20 °C’de 20-30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe alındı. Süpernatant istenen miktarlara göre bölünüp -80 °C’de saklandı.

Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Protein konsantrasyonunun belirlenmesinde Bio Rad RC DC Protein Assay (Katalog # 500-0119, 500-0120, 500-0121, 500-0122) kiti kullanıldı. 0.1 gr sığır serum albumin (BSA) 10 ml suda çözülerek ana stok hazırlandı. Bu stoktan belirli miktarlarda alınarak su ile çeşitli dilüsyon oranlarında standartlar elde edildi. 250 µl çözelti A içerisine 5 µl çözelti S eklendi. Her bir örnek için bu solüsyondan 127 µl kullanıldı. Standart ve örneklerden 25 µl ekleyip üzerine 125 µl çözelti I ekleyip 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 125 µl çözelti II eklenip vortekslenip 15.000 xg de 3-5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp tüp kuru filtre kağıdının üstüne dikkatlice ters çevrilerek pellet sıvı kalmayacak şekilde kurutuldu. Pellet üstüne 127 ul önceden hazırlanan çözelti A eklenip vortekslenip ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Her bir tüpe 1’er ml DC çözelti B eklenip vortekslenip ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüplerdeki standartlar/örnekler microplate okuyucu ile 750 nm’de spektrofotometrede ölçüldü.

Western Blotlama

Çalışmada % 4-15 konsantrasyondaki hazır jel (BioRad-4561083) kullanıldı. Örneklerin konsantrasyon optimizasyonu için protein standartlarından sonra jele 5 µg, 10 µg, 20 µg miktarda numune yüklemesi yapıldı. Örnekler laemmlili örnek solüsyonu ile 1:1 oranında karıştırılarak 20’şer ul olarak yüklendi. Laemmlili tampon ile 1:1 oranında karıştırılıp (5 µl numune + 5 µl örnek solüsyonu) 10 µl yüklendi. Jel 200 V’da yürütüldü ve yürütme tamamlandıncam jel coomassie boyası ile boyama yapılmak üzere çalkalayıcıya alındı. Oda sıcaklığında en az 2-4 saat kadar boyama işlemi yapıldı. Daha sonra jel, boya çıkartma solüsyonuyla oda sıcaklığında ve çalkalayıcıda 2-3 saat kadar muamele edildi. Boyanın temizlenmesi için bantlar netleşene kadar solüsyon birkaç kez değiştirildi. Boyama sonunda net bantların görüldüğü protein miktarı olan 20 µg protein seçildi. Standart ve örneklerle aynı şekilde yüklenen jel 200 V’da yürütüldükten sonra membrana transfer işlemi gerçekleştirildi. Yürümenin sonuna doğru membran jel boyutuna göre kesilip soğuk metanol içine kondu. Aynı şekilde süngerler ve filtre

kağıtları da geniş bir kapta transfer tamponu ile ıslatılmaya kondu. Jel, kasetten çıkarılıp transfer tamponu içine koyuldu ve 1-2 dk beklendi. Membran da transfer tamponu içine alındıktan sonra sünger+ 3 filtre kağıdı + membran+ jel + 3 filtre kağıdı + sünger şeklinde arada hava kabarcığı olmamasına dikkat edilerek transfer sandviç kasetine yerleştirildi. Jel ve membranın kaymamasına dikkat edildi. Transfer kasedi tanka yerleştirildi ve tankın blotting seviyesine kadar transfer tamponu eklendi. Transfer işlemi için tank 100 V'da +4 °C'de 1 saat boyunca tutuldu, sonra sandviç sistemi kasetten alındı. Süngerler ve filtre kağıtları dikkatlice ayrıldıktan sonra membranın protein olan yüzü işaretlendi. Jelden membrana geçiş görsel olarak ve boyamayla kontrol edildi.

3.7. Serum Biyokimyasal Analizler

3.7.1. Serum Hazırlanması

Hayvanlardan alınan kan örnekleri oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Kalpten alınan kan örnekleri 3.000 rpm de 15 dakika santrifüj edilerek numunelerin serumları ayrıldı. Serumlar biyokimya analizlerinde kullanılmak üzere ikiye ayrılıp -80 °C'de muhafaza edildi.

Serumdan Troponin- I Enzim Bağlı İmmünosorbent Analizi (ELISA)

Serumdan Troponin I analizi 'Sinogeneclon' firmasının SG-21063 katalog no'lu sıçan cTn-I konsantrasyonunun kantitatif belirlenmesinde kullanılan kiti ile yapıldı.

Serumdan Aspartat Amino Transferaz (AST), Alanin Amino Transferaz (ALT), Kreatin Kinaz (CK-MB) Analizi

Serumlardan AST, ALT, CK-MB enzim seviyeleri İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya laboratuvarında, Abbott architect I16000 otoanalizatöründe ölçüldü.

3.7.2. Doku Biyokimyasal Analizler

Glutatyon (GSH) Analizi

GSH, Ellman'ın yöntemine göre analiz edildi (86). Buz üzerinde homojenize edilerek elde edilen kalp doku homojenatı 3.000 devir/dakikada, +4 derecede, 15 dakika santrifüj edilerek supernatant ayrıldı. Elde edilen süpernatanta triklor asetik asit çözeltisi

ilave edilip santrifüj edildi ve bu numuneden GSH analizi yapıldı.

Tablo 3.3. GSH analizinin yapılışı

	Numune	Kör
% 10'luk homojenat	500 µl	---
Na ₂ HPO ₄ (0.3 M)	4 ml	4 ml
DTNB	500 µl	500 µl
Distile su	-----	500 µl

Çözelti 5 dakika bekletildi, sonra oluşan rengin şiddeti spektrofotometrede 410 nm'de okundu ve sonuçlar glutasyon standart grafiğinden değerlendirilerek nmol /gram yaş doku (gyd) olarak verildi.

Malondialdehit (MDA) Analizi

Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA, Uchiyama and Mihara'nın yöntemine göre çalışıldı (87). Buz üzerinde homojenize edilerek elde edilen kalp dokusu homojenatı doğrudan MDA analizinde kullanıldı.

Tablo 3.4. MDA analizinin yapılışı

	Numune
Homojenat	250 µl
% 1'lik fosforik asit	1500 µl
% 0.6'lık TBA	1500 µl

Hazırlanan çözeltiler deney tüplerine eklendi, tüpler kaynar suda (en az 95 derecede) 1 saat bekletildi. Daha sonra deney tüplerine 2 ml n-butanol eklendi ve 5 dakika boyunca vortekslendi. Vortekslenen numuneler 3.000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Spektrofotometrede 535 nm ve 520 nm'de numunelerin absorbansı okundu. Numune ve standartların MDA seviyeleri, 1,1',3,3' tetrametoksiopropan ile hazırlanan standarttan belirlendi, sonuçlar nmol/gram gyd olarak verildi.

Katalaz (CAT) Analizi

Doku CAT aktivitesi Luck'ün (88) yöntemine göre ölçüldü. Homojenize edilen dokulardan santrifüjle supernatant elde edildi. Süpernatant CAT analizinde kullanıldı.

Tablo 3.5. Katalaz analizinin yapılışı

	Kör	Numune
Fosfat tamponu (50 mM, pH=7)	2.99	----
H ₂ O ₂ 'li fosfat tampon	0.01	2.99
Süpernatant	----	0.01

Spektrofotometre 240 nm'ye getirilip körle sıfır absorbansa ayarlandı. Numunelerin her 15 sn'de bir okuması yapılarak 90 sn süre ile absorbans azalması takip edildi. Doğrusal absorbans azalmasının olduğu zaman aralığı değerlendirilmeye alındı. Sonuçlar K/gr protein olarak verildi.

Bakır, Çinko Superoksit Dismutaz (Cu,Zn-SOD) Analizi

Doku SOD aktivitesi Sun ve ark.'nın (89) yöntemine göre ölçüldü. Buz üzerinde homojenize edilerek elde edilen kalp doku homojenanti santrifüjlendikten sonra elde edilen supernatant üzerine kloroform/etanol karışımından (3 birim kloroform/5 birim etanol) eklendi. Karışım +4 derecede 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Berrak kloroform fazı pipetle dikkatlice alınarak ve Cu,Zn-SOD analizinde kullanıldı.

Tablo 3.6. Cu Zn-SOD analizinin yapılışı

	Kör	Numune
Assay reaktifi (0.3 mM/L ksantin, 0.6 mM/L Na ₂ EDTA, 150µmol/L NBT, 400 mmol/L Na ₂ CO ₃ , 1gr/L BSA)	2.45	2.45
Süpernatant	----	0.5
Bidistile su	0.5	----
Ksantin oksidaz (167 Ü/L)	0.05	0.05

Tüpler 25 °C'de 20 dakika oda ısısında bırakıldı. Sürenin sonunda her iki tüpede 1 ml CuCl₂ ilave edilecek ve reaksiyon durduruldu (0.8 mmol/L). Spektrofotometre 560 nm'ye dalga boyuna ayarlanadı, kör ve numunelerin absorbansı kaydedildi ve enzim aktivitesi hesaplandı. Sonuçlar U/gr protein olarak verildi.

3.8. Kalp Fonksiyon Testleri

Anestezi altındaki ratlara karotis arter kanülasyonu yapıldı ve göğüs Elektrokardiyografi (EKG) elektrotları bağlanmak sureti ile EKG, kalp hızı, kan basıncı ve oksijen saturasyonu tayini Bipoca MP-100 Data system ile İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Kardiyovasküler Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.9. Histolojik Analizler

Deney sonunda alınan dokular, % 10'luk formaldehit içerisinde alınarak tespit edildi. Doku takibi işlemlerinden sonra hazırlanan parafin bloklardan, 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler, genel morfolojik yapının belirlenmesi için hematoxilen-eozin (H-E) boyama metodu ile boyandı.

Kalp kesitleri; konjesyon-hemoraji ve kardiyomiyosit dejenerasyonu (yoğun eozinofilik sitoplazma, piknotik nükleus) yönünden değerlendirildi. Rastgele seçilen 10 alan incelendi ve alanlar histolojik değişikliklerin derecesine göre; 0: değişiklik yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli değişiklik olarak skorlandı.

Analizler, Leica DFC-280 araştırma mikroskopu ile Leica Q Win Image Analiz Sistemi (Leica Micros Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK) kullanılarak yapıldı.

3.10. İstatistiksel Analizler

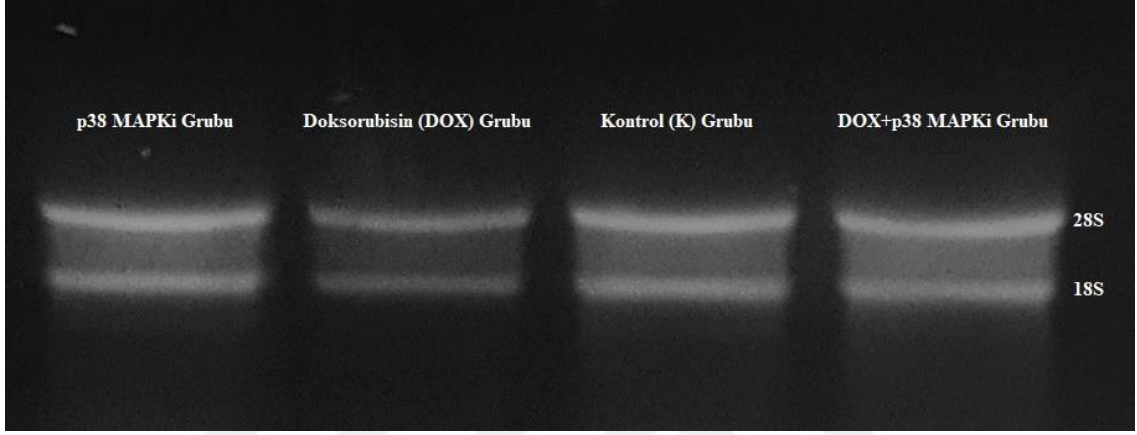
Biyokimyasal ve moleküler genetik bulguların istatistikî analizinde MedCalc® (11.4.2.0) programı kullanıldı. Grupların normal dağılıma sahip olup olmadıkları Shapiro-Wilk testi yapılarak belirlendi. Bu teste göre kalp dokusu gen ifade değerleri, serum ALT, AST, Troponin I ve kalp dokusu CAT, MDA değerleri normal dağılım gösterirken ($p > 0.05$), serum CK-MB, kalp dokusu GSH ve SOD verileri, kalp fonksiyon testleri ve histopatoloji skorları normal olmayan dağılım gösterdi ($p < 0.05$). Normal dağılım gösteren veriler tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildikten sonra gruplar arası çoklu karşılaştırma Student-Newman-Keuls testi veya LSD testi ile yapıldı. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal-Wallis H testi ile değerlendirildi. Daha sonra gruplar arası çoklu karşılaştırma Conover testine göre yapıldı. Karşılaştırmalarda “p” değerinin 0.05'den küçük bulunduğu değerler istatistikî olarak anlamlı kabul edildi. Veriler normal dağılım gösterenler için ortalama \pm standart hata (SH) olarak verildi. Normal dağılıma sahip olmayan gruplarda veriler ortanca (min-maks) olarak gösterildi.

4. BULGULAR

4.1. Moleküler Genetik Bulgular

4.1.1. Gen İfadesi Bulguları

Saflaştırılan RNA'larda 28S ve 18S ribozomal bantlarının varlığı ve herhangi bir yıkılım olmadığı görüldü (Şekil 4.1).



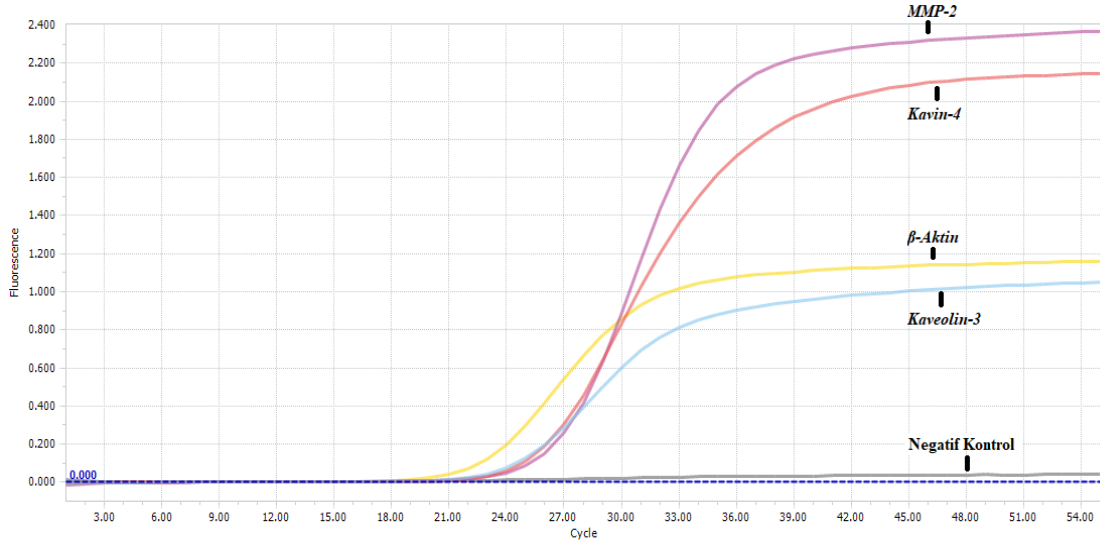
Şekil 4.1. Grupların toplam RNA görüntüsü

Örneklerin RNA'ları miktar ve saflık tayini için "Biotek" marka spektrofotometre cihazı ile "Gen5" programları kullanılarak 260 ve 280 nm UV spektrumunda ölçüldü. RNA miktarı ng/ μ L cinsinden hesaplandı (Tablo 4.1)

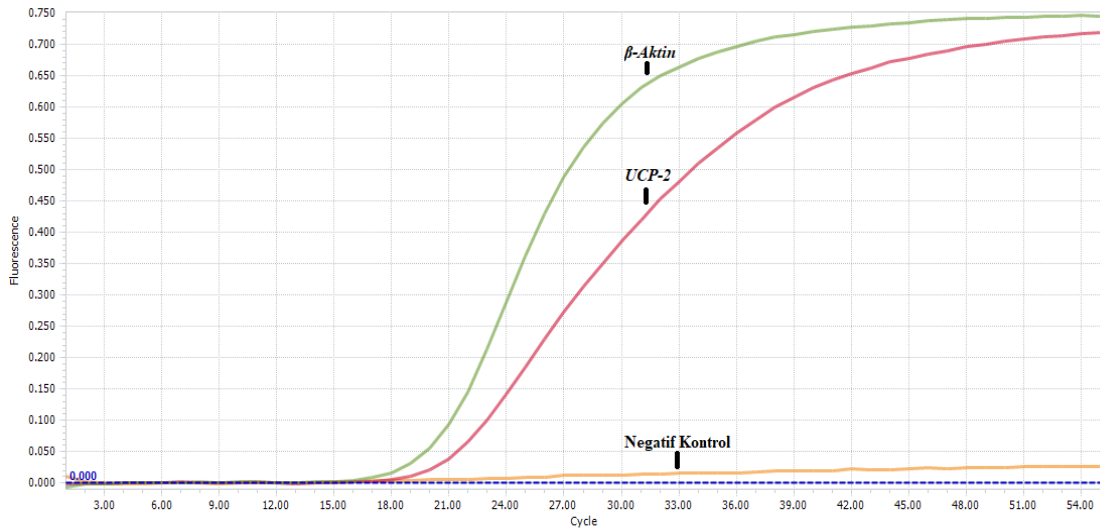
Tablo 4.1. Gruplarda ölçülen kalp dokusu RNA spektrofotometrik absorbans değerleri ve RNA miktarları.

Grup Adı	Numune No	Ortalama RNA (ng/μl)	Ortalama Absorbans (260/280)
p38 MAPKİ grubu	1	102.1	2.0
	2	213.2	2.0
	3	227.0	2.0
	4	131.3	2.0
	5	184.7	1.9
	6	127.8	2.0
	7	167.3	1.9
	9	162.7	2.0
	10	207.0	2.0
	11	233.3	2.0
	12	149.9	2.0
	DOX grubu	13	154.0
14		159.6	2.0
15		170.5	2.0
16		132.9	2.0
17		63.8	2.0
18		137.9	2.0
19		200.4	2.0
20		95.2	2.0
21		74.6	2.0
22		160.3	2.0
23		93.2	2.0
24		165.1	2.0
K Grubu	25	181.7	2.0
	26	215.4	2.0
	27	84.5	2.0
	28	126.7	1.9
	29	188.0	2.0
	30	252.5	2.0
	31	111.0	2.0
	32	82.4	2.0
	33	106.6	2.0
	34	51.7	2.0
	35	66.4	1.9
	36	95.3	2.0
DOX+ p38 MAPKİ Grubu	37	122.6	2.0
	38	79.8	2.0
	39	74.8	2.0
	40	195.4	2.0
	41	178.2	2.0
	42	177.2	1.9
	43	178.3	2.0
	44	146.5	1.9
	45	138.8	2.0
	46	186.5	2.0
	47	155.8	2.0
	48	69.9	1.9

Moleküler analizlerde “Hydrolysis Probe” kimyası kullanılarak *Kav-3*, *MMP-2*, *Kavin-4*, *UCP-2* ve β -*Aktin* mRNA’larından sentezlenen cDNA’ların gerçek zamanlı PZT ile çoğaltımı yapıldı (Şekil 4.2- 4.3).



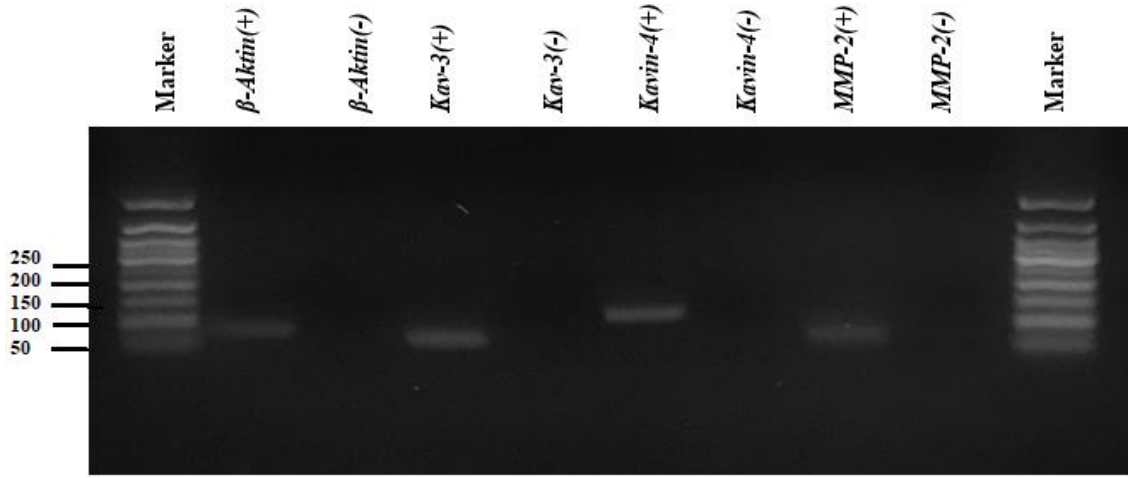
Şekil 4.2. Hydrolysis Probe” kimyası kullanılarak *Kav-3*, *MMP-2*, *Kavin-4* ve β -*Aktin* mRNA’larından sentezlenen cDNA’ların gerçek zamanlı PZT ile çoğaltım eğrisi



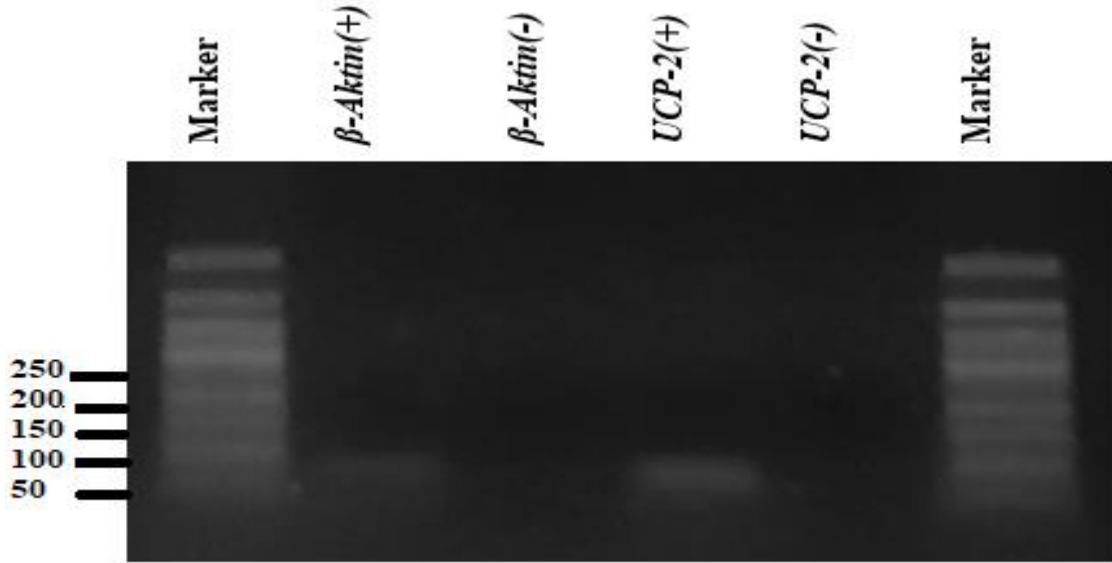
Şekil 4.3. Hydrolysis Probe” kimyası kullanılarak *UCP-2* ve β -*Aktin* mRNA’larından sentezlenen cDNA’ların gerçek zamanlı PZT ile çoğaltım eğrisi

Kav-3, *MMP-2*, *Kavin-4*, *UCP-2* ve β -*Aktin* cDNA’ları kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PZT sonrası agaroz jelinde örnekler koşturularak primer bağlanmasının

özgüllüğü kontrol edildi. Analiz sonucunda her dört gen için de tek ve istenilen boyda bir DNA bandı oluştuğu görüldü (Şekil 4.4-4.5).



Şekil 4.4. *MMP-2*, *Kav-3*, *Kavin-4* ve β -*Aktin* cDNA'larının PZT'deki çoğalımının agaroz jel (%2) elektroforezi görüntüsü. Kullanılan DNA Markeri 50 bp plus DNA Ladder-for-use'dır (Bioron, 50 bp, catalog no: 304007).



Şekil 4.5. *UCP-2* ve β -*Aktin* cDNA'larının PZT'deki çoğalımının agaroz jel (%2) elektroforezi görüntüsü. Kullanılan DNA Markeri 50 bp plus DNA Ladder-for-use'dır (Bioron, 50 bp, catalog no: 304007).

Gruplar arasında kalp dokusu *Kaveolin-3*, *Kavin-4*, *MMP-2*, *UCP-2* gen ifadeleri karşılaştırıldığında, *Kaveolin-3* ve *Kavin-4* gen ifadelerinde gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p > 0.05$). K, p38 MAPKi ve DOX+p38 MAPKi

gruplarına göre DOX grubu *MMP-2* gen ifadesi anlamlı olarak yükselmişti ($p < 0.05$). DOX+p38 MAPKi grubundaki *MMP-2* gen ifadesindeki yükseliş, K ve p38 MAPKi grubuna göre anlamlı idi ($p < 0.05$). DOX+p38 MAPKi grubundaki *MMP-2* gen ifadesi, DOX grubuna göre anlamlı bir azalma göstermişti ($p < 0.05$). DOX, p38 MAPKi, DOX+p38 MAPKi grupları *UCP-2* gen ifadesi K grubuna göre anlamlı olarak yükselmişti ($p < 0.05$). DOX+p38MAPKi grubu *UCP-2* gen ifadesi, DOX grubuna göre anlamlı bir düşüş göstermişti ($p < 0.05$) (Tablo 4.2).



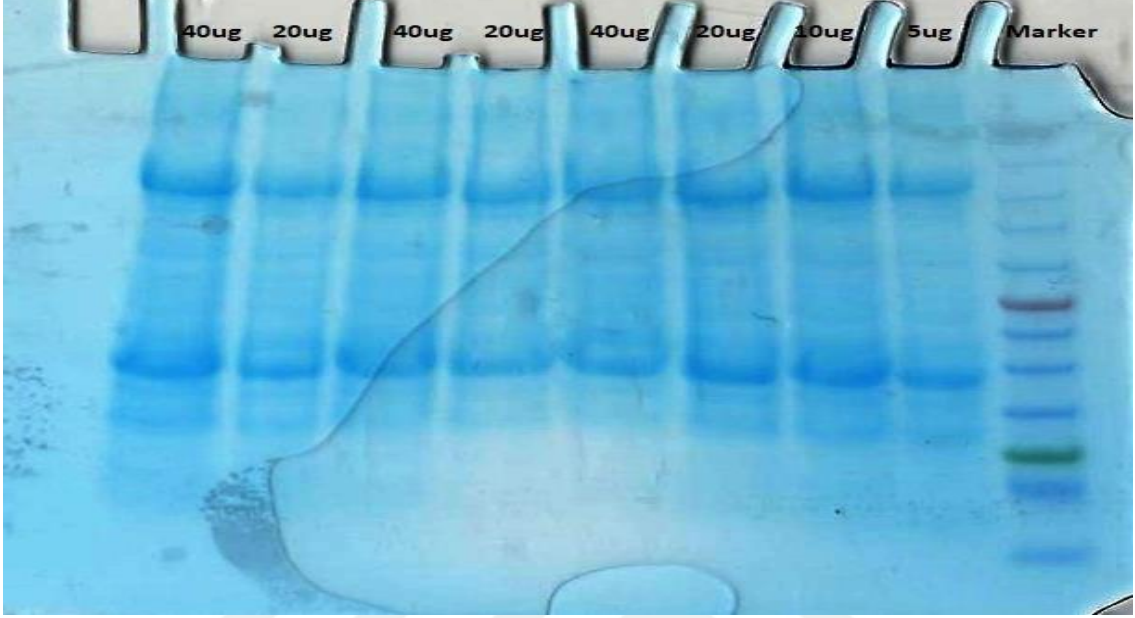
Tablo 4.2. Gruplarda ölçülen kalp *Kaveolin-3*, *Kavin-4*, *MMP-2*, *UCP-2/β-Aktin* mRNA seviyelerinin oranı.

Gruplar (n=12)	<i>Kaveolin-3/β-Aktin</i> mRNA oranı		<i>Kavin-4/β-Aktin</i> mRNA oranı		<i>MMP-2/β-Aktin</i> mRNA oranı		<i>UCP-2/β-Aktin</i> mRNA oranı									
	DOX	DOX+p38 MAPKi	K	p38 MAPKi	DOX	DOX+p38 MAPKi ^b	K	p38 MAPKi	DOX ^d	DOX+p38 MAPKi	K ^c	p38 MAPKi				
Ort±SH	0.19±0.017	0.20±0.008	0.19±0.016	0.20±0.019	0.17±0.020	0.16±0.008	0.20±0.015	0.20±0.024	0.14±0.023	0.10±0.008	0.036±0.004	0.030±0.004	0.61±0.058	0.43±0.066	0.23±0.036	0.51±0.039

^a K, p38 MAPKi, DOX+p38MAPKi grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) (ANOVA test, LSD Test), ^b K, p38 MAPKi ve DOX grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) (ANOVA test, LSD test), ^c DOX, p38 MAPKi, DOX+p38MAPKi grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) (ANOVA test, LSD test), ^d DOX+p38MAPKi grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) (ANOVA test, LSD test), Doksorubisin (DOX), kontrol (K), p38 MAPK inhibitörü (p38 MAPKi)

4.1.2. Western Blot Bulguları

Boyama sonunda net bantların görüldüğü protein miktarı olan 20 µg protein miktarı optimize olarak seçildi (Şekil 4.6.).



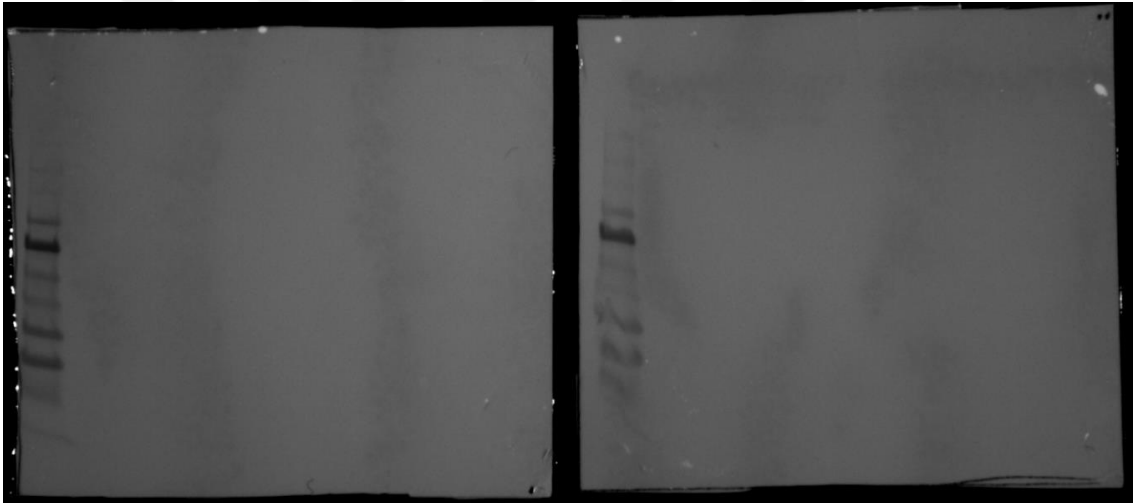
Şekil 4.6. Coomassie blue ile boyanmış jel görüntüsü

Jelden membrana geçiş görsel olarak ve coomassie blue boyamayla kontrol edildi (Şekil 4.7.), proteinlerin membrana geçtiği teyit edildi.



Şekil 4.7. Yüklenen proteinlerin membrana aktarılmış jel görüntüsü

Transfer sonrası membran hızlı bir şekilde kurutulmadan 10 dk % 5 süt tozu ile oda sıcaklığında bloklamaya alındı. Çalkalayıcı üstünde bloklama sonunda bir kez hızlı şekilde PBS ile yıkama yapıldı ve ardından 15 ml 1/1000 PBS içinde β -Aktin primer antikor (mAbcam 8226) ve Kaveolin-3 (Abcam ab2912) ile 15 dk oda sıcaklığında muamele edildi. Antikorlar alındıktan sonra 3 kez PBS ile yıkama yapıldı ve yıkama sonunda Thermo Polyvalent sekonder antikordan önce biotinylated goat anti-polyvalent oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Süre sonunda 3 kez PBS ile yıkama yapıldı ve sonrasında streptavidin peroxidase ile oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Süre sonunda 3 kez PBS ile yıkama yapıldı ve hemen ardından 5 ml ECL Substrat solüsyonu uygulanıp yaklaşık 5 dakika beklendikten sonra Syngene G:Box Markalı cihazla görüntüleme yapıldı (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Syngene G:Box cihazıyla çekilmiş membran görüntüsü

Western blot denemelerimizin tamamında gerek beta aktin gerekse kaveolin 3 için primer ve sekonder antikor bağlanması gerçekleşmedi ve bu nedenle de tezde analizler yapılamadı.

4.2. Biyokimyasal Bulgular

4.2.1. Serum AST, ALT, CK-MB, Troponin I Seviyeleri

Gruplar arası serum ALT seviyelerinde DOX+p38 MAPKi grubunun ALT seviyesinin diğer gruplara göre istatistiki olarak anlamlı bir artış gösterdiği ($p < 0.05$); DOX+p38 MAPKi grubundaki AST seviyesindeki artışın p38 MAPKi grubuna göre istatistiki olarak anlamlı olduğu ($p < 0.05$); CK-MB seviyesinin K ve p38 MAPKi grubuna göre diğer gruplarda istatistiki olarak farklılık gösterdiği ($p < 0.05$); DOX grubundaki troponin I seviyesindeki artışın ise yalnızca DOX+p38 MAPKi grubuna göre anlamlı olduğu ($p < 0.05$) tespit edildi (Tablo 4.3).



Tablo 4.3. Gruplarda ölçülen serum ALT, AST, CK-MB ve Troponin I seviyeleri

Gruplar (n=12)	ALT (IU/L)			AST (IU/L)			CK-MB (IU/L)			Troponin I (pg/ml)											
	DOX	DOX+p38 MAPK ^b	K	DOX	DOX+p38 MAPK ^b	K	DOX	DOX+p38 MAPK ^b	K	DOX	DOX+p38 MAPK ^b	K	p38 MAPK ^a								
Ort±SH	121.5±13.6	172.9±22.2	89.2±11.1	80.5±9.1	318.4±36.6	432.7±40.7	338±50.9	252.4±41.1	738.5	(306-4861.2)	702.6	(538-1010.3)	1432.4	(677.7-4944.8)	1778.8	(985.2-4381.3)	1281.6±29.6	1151.4±46.3	1197.1±24.2	1222.8±22.3	
Ortanca (Min-Maks)																					

^a DOX+p38 MAPK grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) (ANOVA test, Student-Newman-Keuls test), ^b DOX, p38 MAPK ve K grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) (ANOVA test, Student-Newman-Keuls test), ^c K ve p38 MAPK grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) (Kruskal-Wallis test, Conover), ^d DOX grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) (ANOVA test, Student-Newman-Keuls test), aspartat amino transferaz (AST), alanin amino transferaz (ALT), kreatin kinaz (CK-MB), Doksorubisin (DOX), kontrol (K), p38 MAPK inhibitörü (MAPKi)

4.2.2. Doku CAT, SOD, GSH ve MDA Seviyeleri

DOX ve DOX+p38 MAPKi grubundaki CAT aktivitesindeki artışın K ve p38 MAPKi grubuna göre ($p < 0.05$); DOX+p38 MAPKi ve p38 MAPKi gruplarında artan GSH seviyesinin K grubuna göre ($p < 0.05$); DOX grubundaki artan MDA seviyesinin K, p38 MAPKi ve DOX+p38 MAPKi gruplarına göre ($p < 0.05$); DOX, p38 MAPKi ve DOX+p38 MAPKi gruplarında artan SOD aktivitesinin K grubuna göre anlamlı olduğu ($p < 0.05$) tespit edildi (Tablo 4.4).



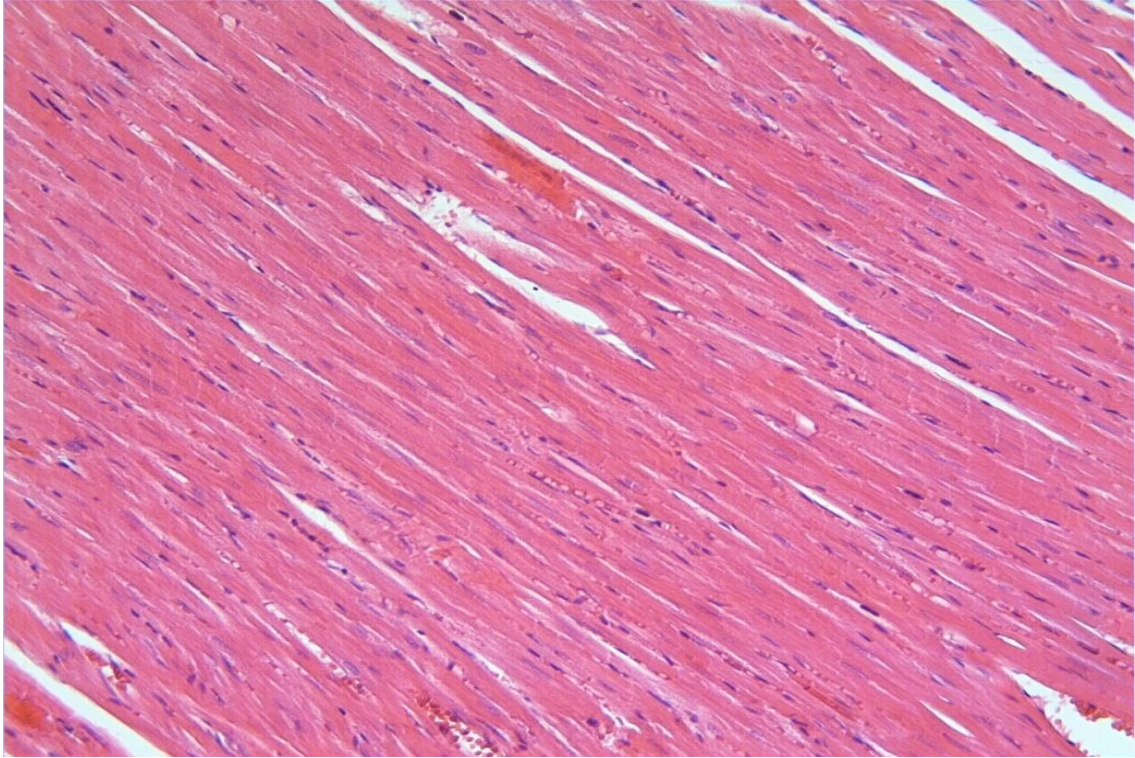
Tablo 4.4. Gruplarda ölçülen kalp dokusu CAT, GSH, MDA ve SOD seviyeleri

Gruplar (n=12)	CAT (K/gr protein)			GSH (mmol/gyd)			MDA (nmol/gyd)			SOD (U/gr protein)																
	DOX ^a	DOX+p38 MAPK ^a	K	p38 MAPK ^b	DOX	DOX+p38 MAPK ^b	K	DOX ^c	DOX+p38 MAPK ^c	K	p38 MAPK ^c	DOX	DOX+p38 MAPK ^c	K ^d	p38 MAPK ^c											
Ort±SH	715.3±63.5	853.7±128.1	450.9±31.1	428.2±32.9	904.5	(700.2-1333.8)	1087.9	(783.6-1317.1)	808.6	(650.2-1375.5)	934.7	(800.3-1108.7)	13.4±1.5	7.4±1.1	7.8±1.2	5.9±0.8	173.6	(114.2-242.5)	223.6	(146.6-491.9)	145.9	(87.5-183.3)	184.6	(150.2-220.3)		
Ortanca (Min-Maks)																										

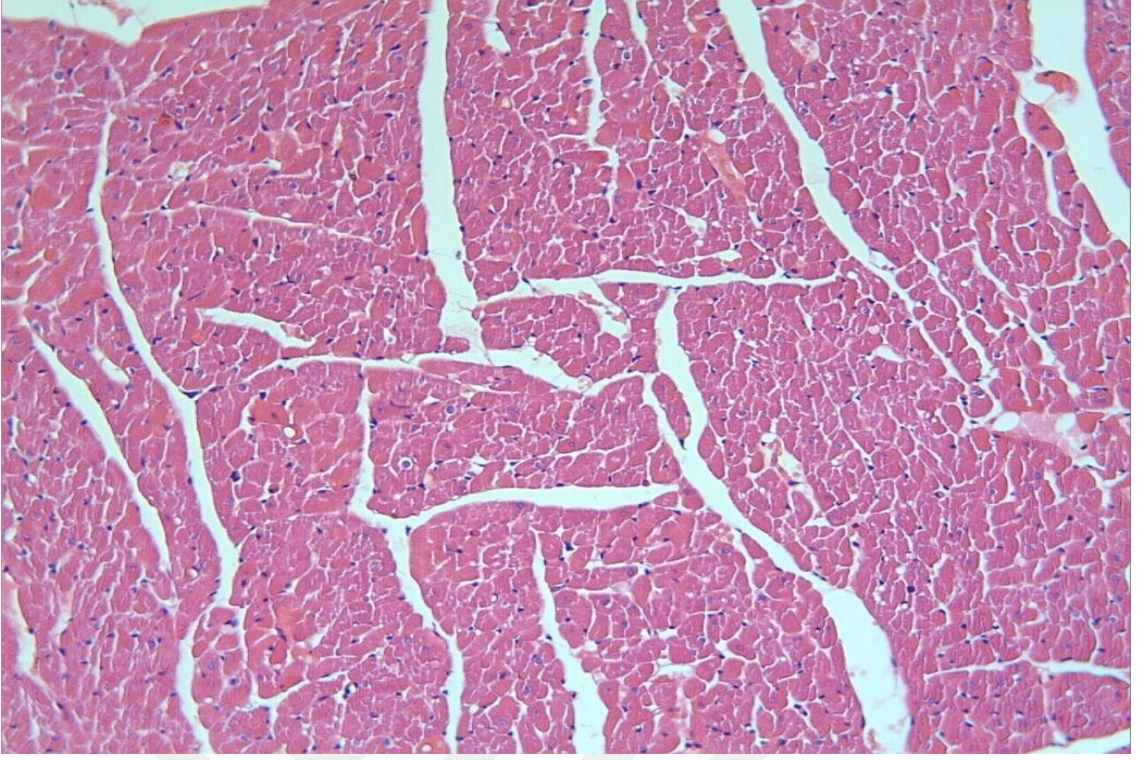
^a K ve p38 MAPK grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) (ANOVA test, Student-Newman-Keuls test), ^b K grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) (Kruskal-Wallis test, Conover), ^c K, p38 MAPK ve DOX+p38 MAPK grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) (ANOVA test, Student-Newman-Keuls test), ^d DOX, p38 MAPK ve DOX+p38 MAPK grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) (Kruskal-Wallis test, Conover), katalaz (CAT), glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA), bakır-çinko süperoksit dismutaz (CuZn-SOD), Doksorubisin (DOX), kontrol (K), p38 MAPK inhibitörü (p38 MAPK)

4.3. Histopatolojik Bulgular

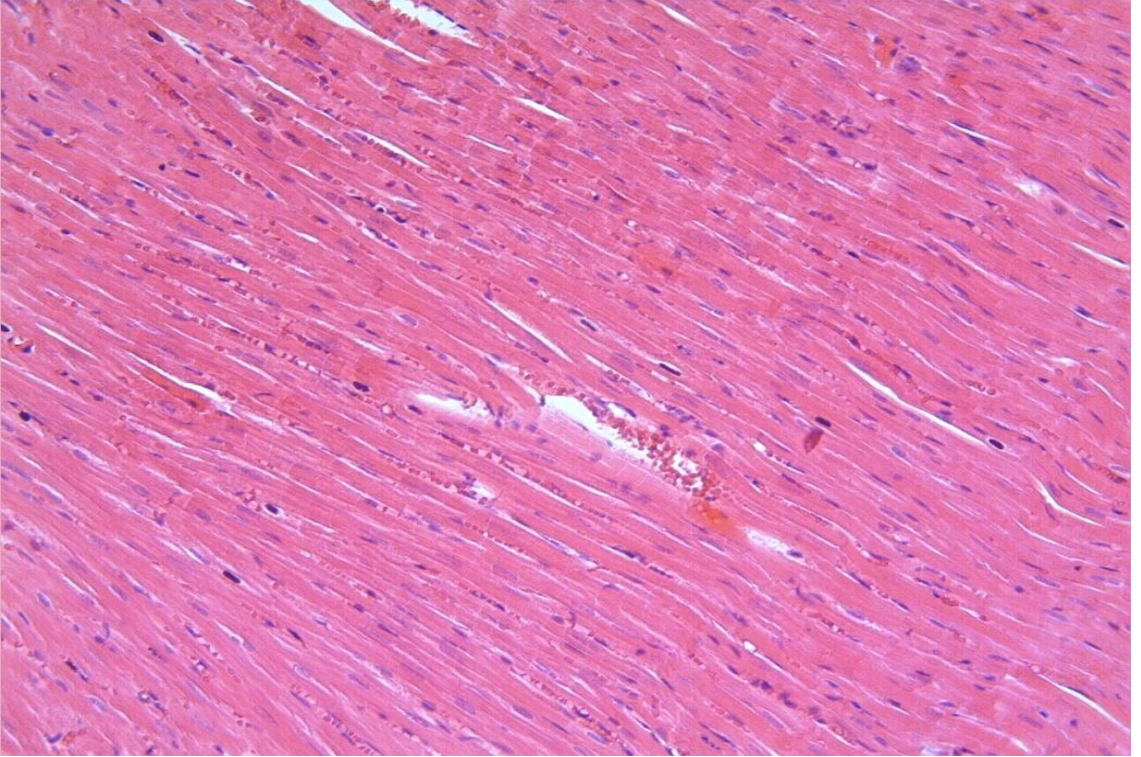
Genel morfolojik değerlendirme, konjesyon-hemoraji ve dejenere kardiyomiyosit varlığı yönünden yapıldı. Kontrol ve p38 MAPKi gruplarında, hafif düzeydeki değişiklikler dışında, kalp dokusu normal histolojik görünümdeydi (Şekil 4.9-4.12). Diğer yandan, DOX grubunda konjesyon-hemoraji ve dejenere kardiyomiyosit yoğunluğunda belirgin bir artışın olduğu gözlendi (Şekil 4.13-4.14). DOX grubunda izlenen bu histopatolojik değişikliklerin, kontrol ve p38 MAPKi gruplarına göre istatistiksel olarak yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). DOX+p38 MAPKi grubunda konjesyon-hemoraji şiddetinde, DOX grubu ile karşılaştırıldığında, belirgin bir azalmanın olduğu gözlendi ($p < 0.05$). Öte yandan, DOX+p38 MAPKi grubunda, dejenere kardiyomiyosit şiddetinin DOX grubuna benzer şekilde devam ettiği izlendi (Şekil 4.15-4.16) ($p > 0.05$).



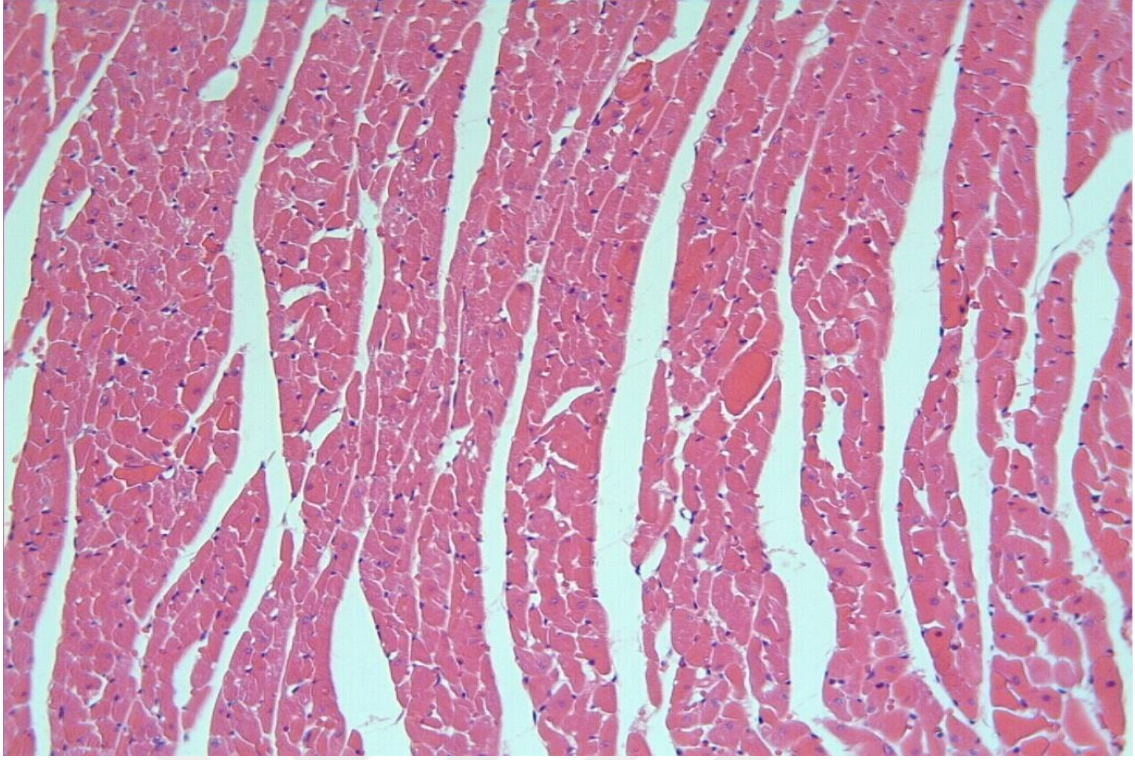
Şekil 4.9. Kontrol grubu (longitudinal düzlem); miyokardiyumun normal histolojik görünümü. H-E; x20.



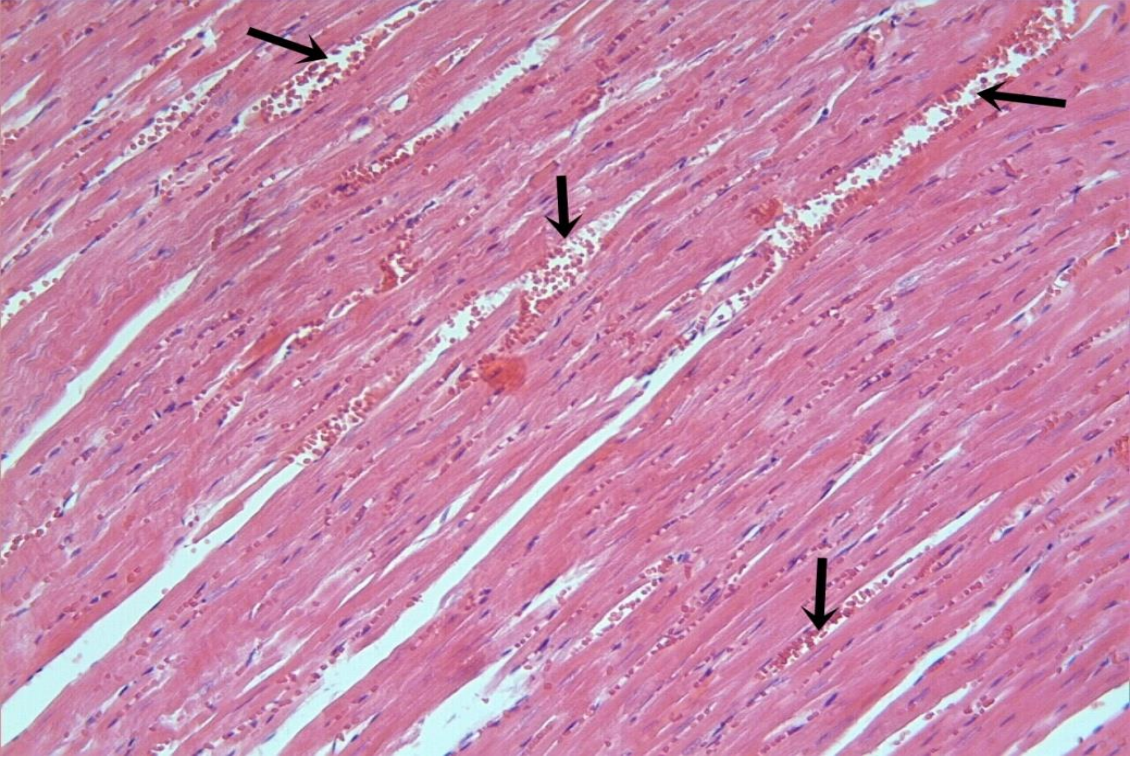
Şekil 4.10. Kontrol grubu (transvers düzlem); miyokardiyumun normal histolojik görünümü. H-E; x20.



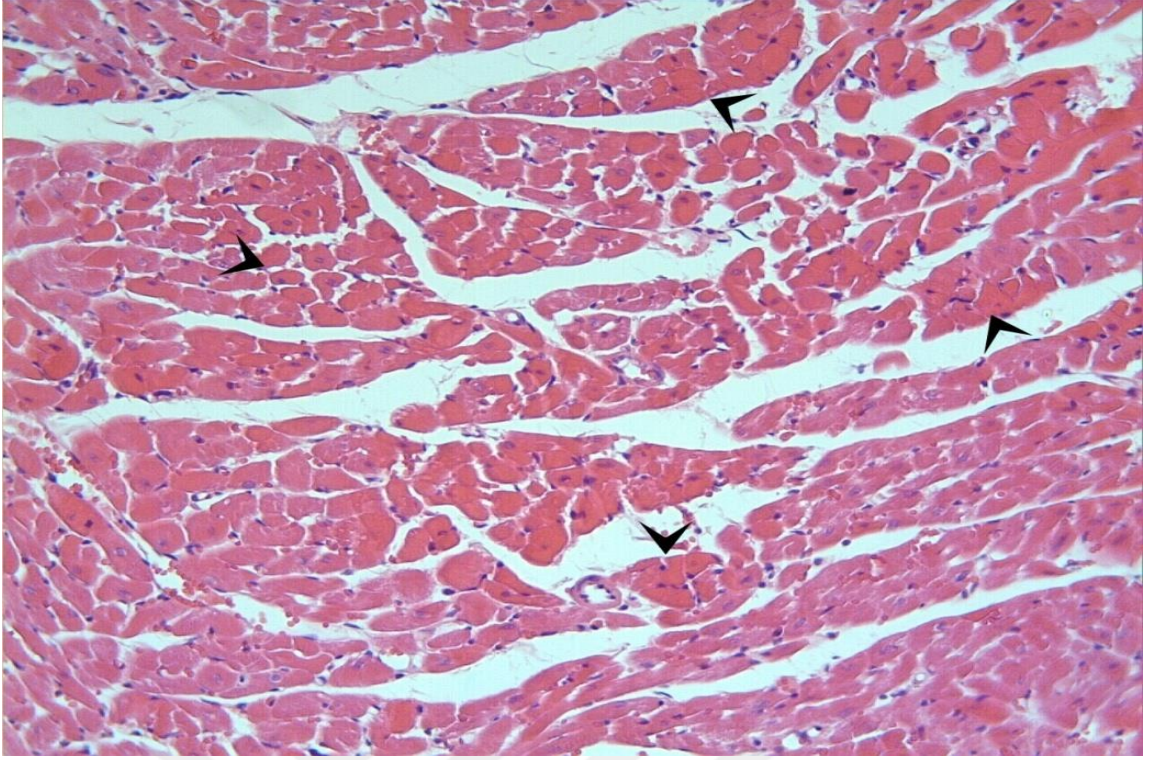
Şekil 4.11. p38 MAPKi grubu (longitudinal düzlem); miyokardiyumun normal histolojik görünümü. H-E; x20.



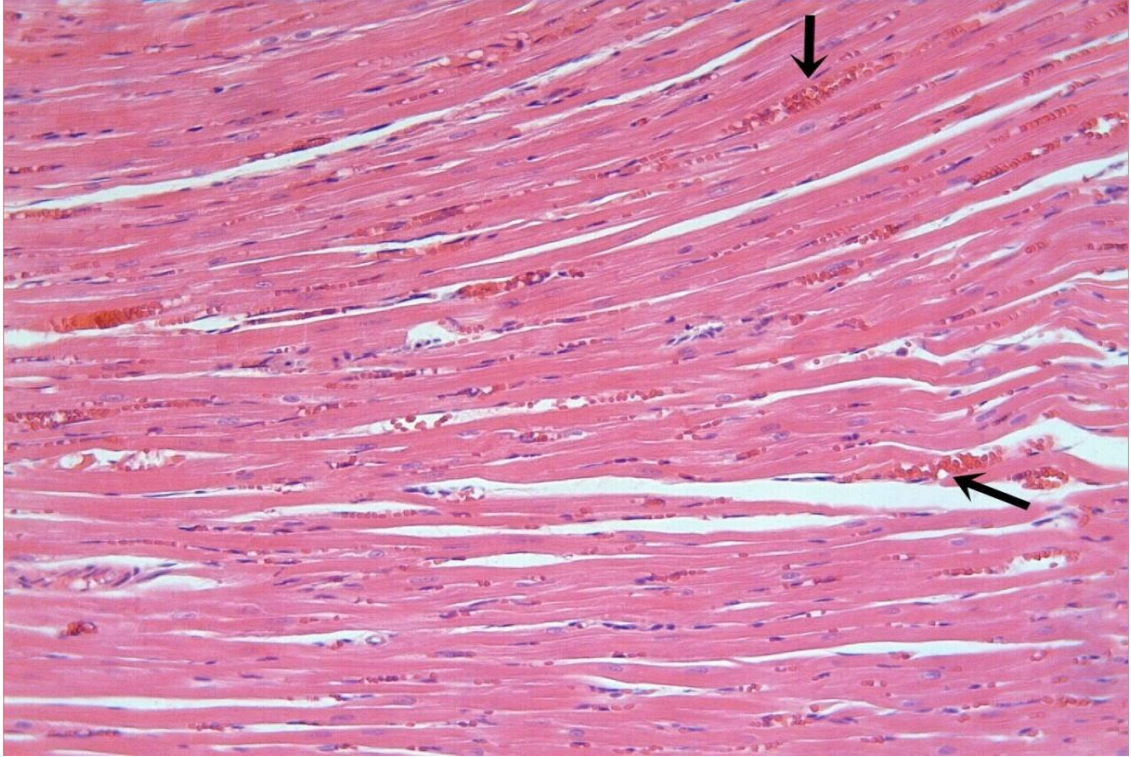
Şekil 4.12. p38 MAPKi grubu (transvers düzlem); miyokardiyumun normal histolojik görünümü. H-E; x20.



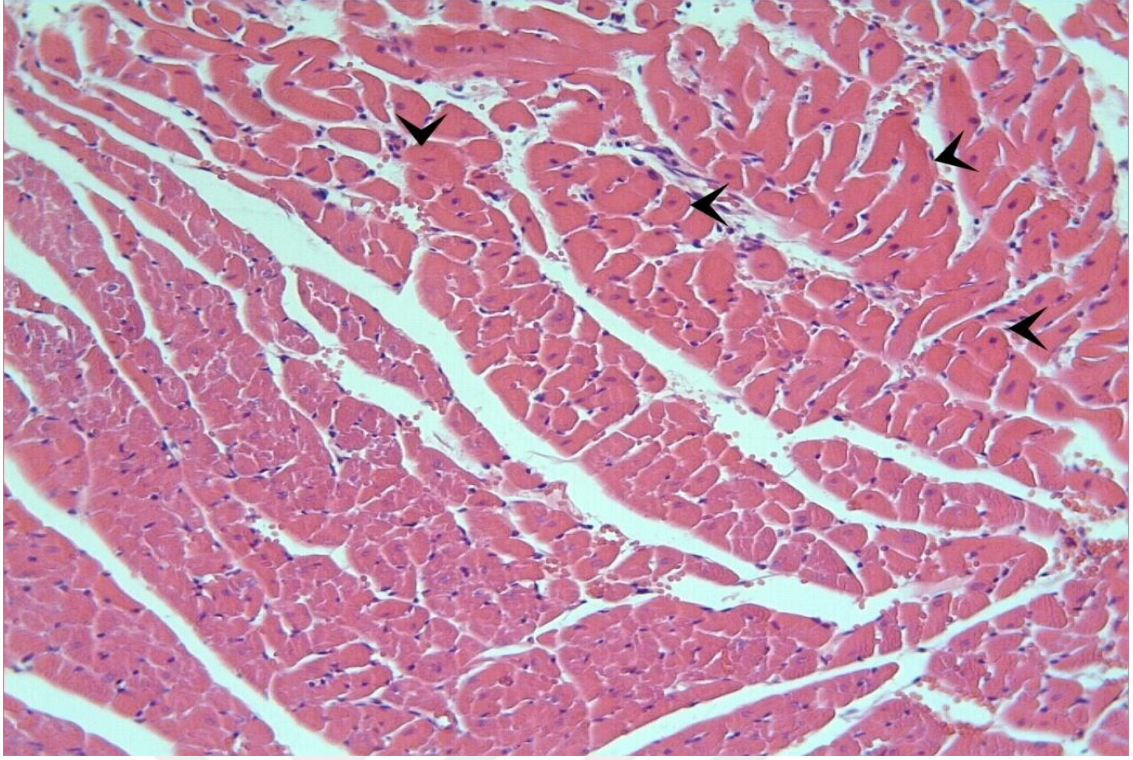
Şekil 4.13. DOX grubu (longitudinal düzlem); miyokardiyumda konjesyon-hemorajik alanlar (oklar) dikkati çekmekte. H-E; x20.



Şekil 4.14. DOX grubu (transvers düzlem); yoğun eozinofilik sitoplazmaları ve piknotik nükleusları ile dejenere kardiyomiyositler (ok başları) dikkati çekmekte. H-E; x20.



Şekil 4.15. DOX+p38 MAPKi grubu (longitüdünel düzlem); miyokardiyumda konjesyon-hemorajik alanların (oklar) DOX grubuna göre belirgin şekilde azaldığı izlenmektedir. H-E; x20.



Şekil 4.16. DOX+p38 MAPKi grubu (transvers düzlem); dejenere kardiyomiyositlerin (ok başları) DOX grubuna benzer şekilde devam ettiği izlenmekte. H-E; x20.

4.4. Kalp Fonksiyon Testleri

Anestezi altında ratların sistolik, diyastolik, ortalama kan basıncı (KB) ve kalp hızı (KH) (97) tayini için karotis arterlerden biri kanüle edildi. Karotis arterde kanama veya kopma dahil herhangi bir sorun olduğunda diğer damar yedek olarak kullanıldı. EKG değişiklerini izlemek için 3 derivasyonlu EKG elektrotları kullanıldı. KB, KH ve EKG değerleri Biopac MP-100 Data Acquisition sistem bilgisayar kayıt programı kullanılarak 3 dakika boyunca kaydedildi. Alınan bilgisayar kayıtlarından daha sonra Lambeth Convention kriterlerine göre (90) hem aritmi çeşitliliği hem de PR, QRS ve QT süreleri hesaplandı.

Sonuçlar Tablo 4.5 ve Tablo 4.6’te sunuldu. Hemodinamik parametrelere bakıldığında DOX grubunda sistolik, diyastolik ve ortalama KB değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış saptanmış iken DOX+p38 MAPKi grubunda bu değerler DOX grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. DOX grubunda artan kalp hızı, DOX+p38 MAPKi grubunda kontrol grubuna kıyaslandığında anlamlı bir artış görülmüştür. Elektrofizyolojik parametreler açısından gruplar arasında anlamlı

bir fark tespit edilememiştir (Tablo 4.5). EKG’de DOX grubunda iskemik kardiyak patolojilerden (ST depresyonu ve T negatifliği) toplamda 4 adet görülmüş iken DOX+p38 MAPKi grubunda ise sadece 2 adet görülmüştür. Bunun yanında DOX grubunda 3 adet dal bloğu saptanmış iken DOX+p38 MAPKi grubunda 2 adet saptanmıştır. Kontrol grubunda ve p38 MAPKi grubunda herhangi bir elektrokardiyografik patolojiye rastlanmamıştır (Tablo 4.6, Şekil 4.17-20).



Tablo 4.5. Hemodinamik ve elektrofizyolojik parametreler.

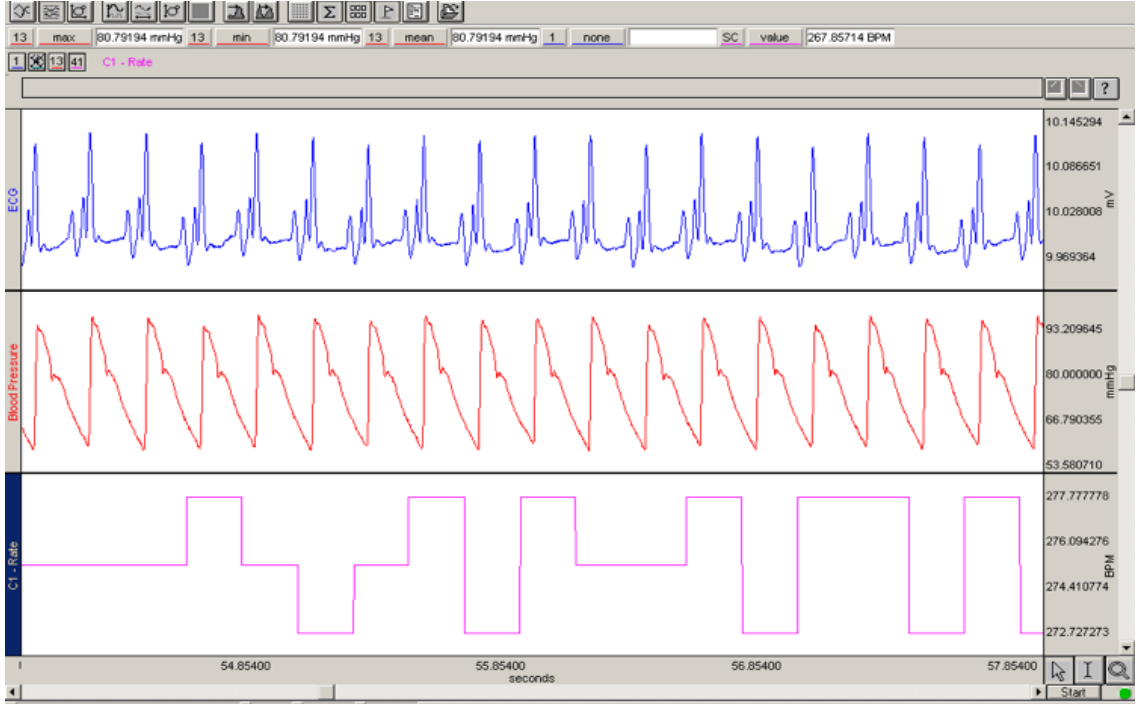
Gruplar (n=12)	Kalp Hızı	Sistolik KB	Diastolik KB	Ortalama KB	PR mesafesi	QRS aralığı	QT aralığı
K	315 (243-400)	98 (72-121)	59.5 (40-80)	77 (57-93)	44 (34-48)	65 (50-104)	98 (82-122)
DOX	350 (268-457)	123.5 (90-155) ^a	98 (67-142) ^a	112 (81-149) ^a	40 (30-48)	65 (52-120)	100 (90-150)
p38 MAPKi	288.5 (200-335) ^b	77 (55-112) ^{ab}	63 (36-95) ^b	66.5 (46-104) ^b	41.5 (38-58)	72.5 (60-82)	101.5 (90-108)
DOX+p38 MAPKi	361.5 (250-512) ^{ac}	131.5 (88-155) ^{ac}	94 (60-121) ^{ac}	107 (72-131) ^{ac}	38 (30-52)	66 (56-104)	98 (86-126)

Kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$), ^b DOX grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$), ^c p38 MAPKi grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$). Doksorubisin (DOX), kontrol (K), p38 MAPK inhibitörü (MAPKi)

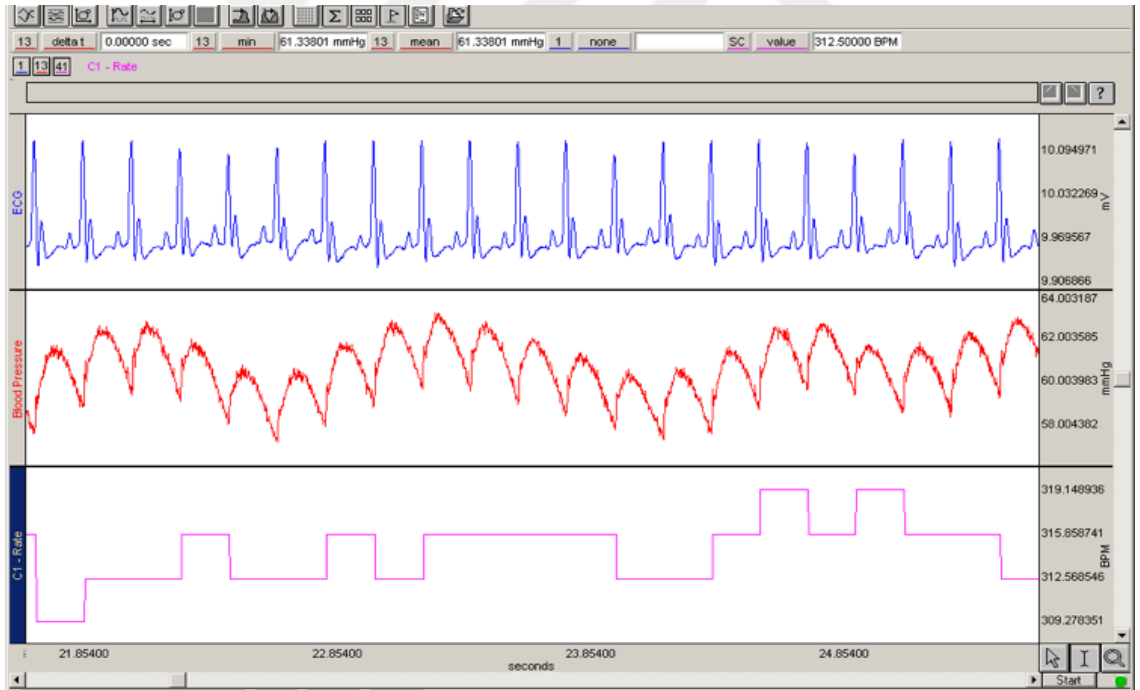
Tablo 4.6. Elektrokardiyografik değişiklikler

Gruplar (n=12)	ST Depresyonu	T negatifliği	Dal Bloğu
K	0	0	0
DOX	1	3	3
p38 MAPKi	0	0	0
DOX+p38 MAPKi	0	2	2

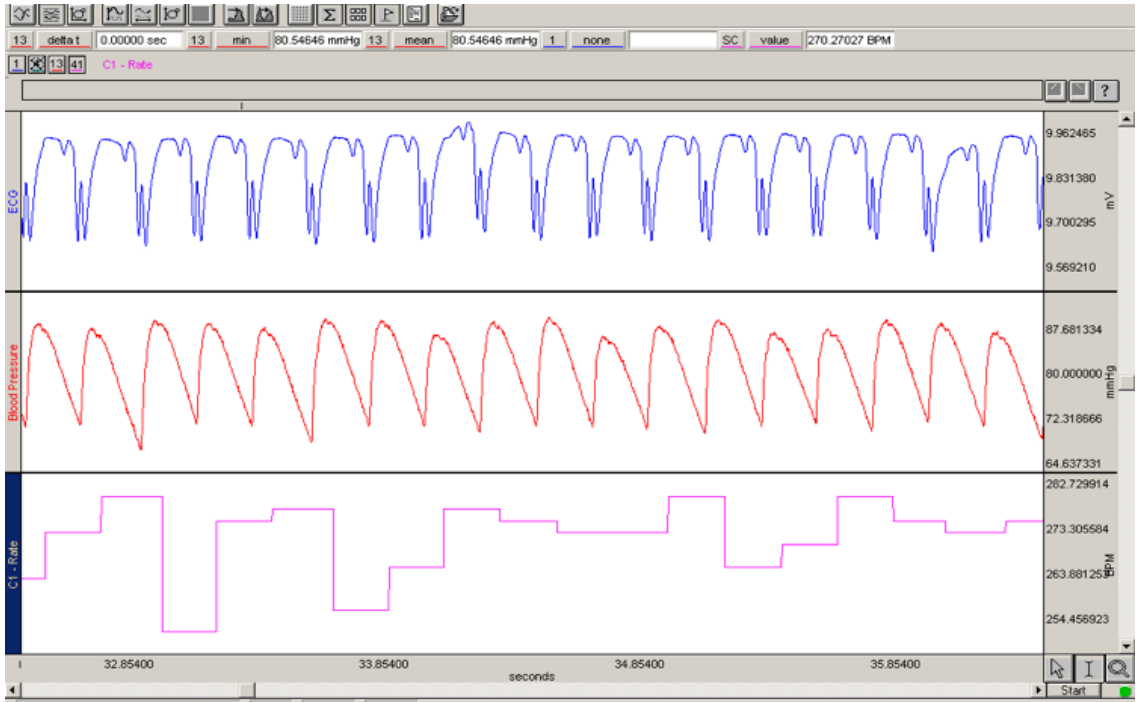
Doksorubisin (DOX), kontrol (K), p38 MAPK inhibitörü (MAPKi)



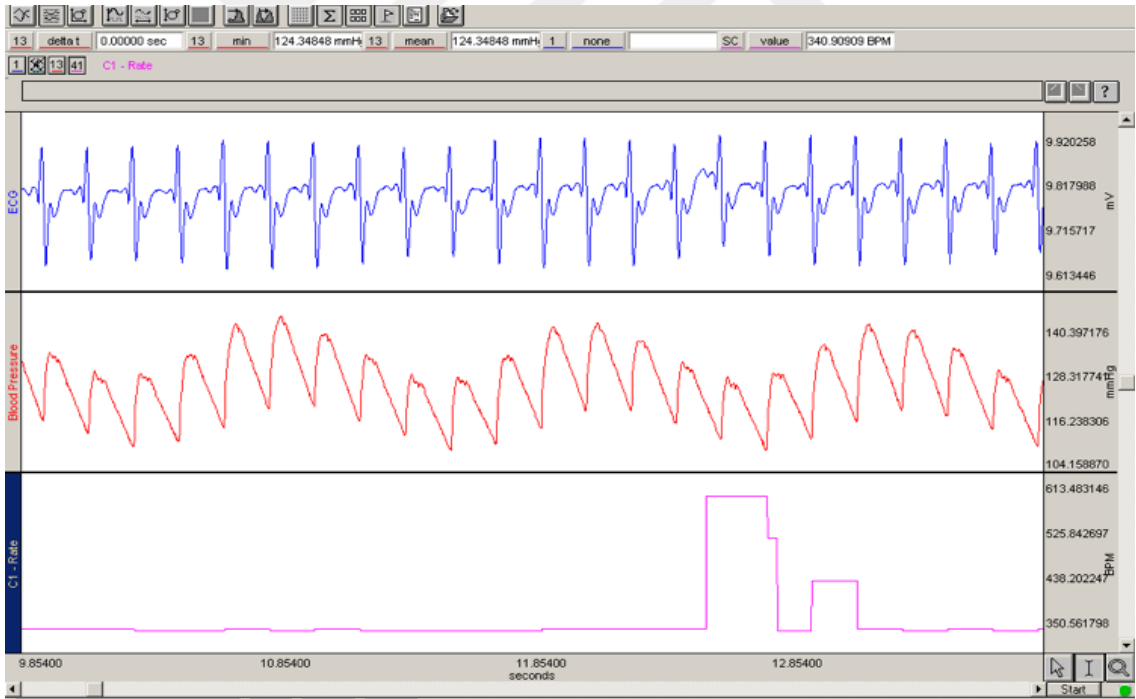
Şekil 4.17. Normal sinüs ritmi.



Şekil 4.18. ST depresyonu.



Şekil 4.19. Dal bloğu.



Şekil 4.20. T negatifliği.

5. TARTIŞMA

Araştırmamızda; DOX grubu *MMP-2* gen ifadesi, K, p38 MAPKi ve DOX+p38 MAPKi gruplarına göre anlamlı olarak yükselmişti ($p < 0.05$). DOX+p38 MAPKi grubundaki *MMP-2* gen ifadesindeki yükseliş, K ve p38 MAPKi grubuna göre anlamlı idi ($p < 0.05$). DOX+p38 MAPKi grubundaki *MMP-2* gen ifadesi, DOX grubuna göre anlamlı bir azalma göstermişti ($p < 0.05$).

Polegato ve ark. yaptıkları çalışmada doksorubisin uygulaması sonunda wistar albino sıçanlarda *MMP-2* aktivasyonu ile birlikte sol ventrikül sistolik disfonksiyonu görüldüğü tespit etmiştir (91). Diğer bir çalışmada Bai ve ark. tek doz doksorubisin uygulaması ile farelerde oluşturdukları kardiyotoksiste modelinde kalp ve damar dokularında zamana bağlı *MMP* aktivitesinin arttığını bildirmiştir (92). Akut doksorubisin kardiyotoksitesinde miyokardiyal *MMP*'lerin erken hasar belirteci olabileceği öne sürülmüştür (92). Bir başka çalışmada, kronik doksorubisin uygulamasının miyokard ventrikülünde *MMP-2* ve *MMP-9* gen ifadelerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (4). Farelere uygulanan 25 mg tek doz doksorubisin sonrasında ventriküler *MMP-2* ve *MMP-9* gen ifadelerinin indüklendiği gösterilmiştir (93). İnsan göğüs epitelyal hücrelerinde p38 MAPK'ın hedefi olan aktive edilmiş transkripsiyon faktörünün (ATF-2) kalpte fibrozis gelişmesine neden olan *MMP-2* gen ifadesinin düzenlenmesinde etkisi bulunduğu görülmüştür (94). Osteosarkom hücre kültüründe adrimisin direnci *MMP-2*'nin aktivitesine ve ERK 1/2 'nin fosforilasyonuna neden olduğu gösterilmektedir (95). Doksorubisin uygulanan tavşanların kalp örneklerinde pro- *MMP-2* enzimi sağlıklı kontrollere göre düşük seviyede bulunmaktadır. Pro-*MMP-2* kardiyomiyositlerin sarkomerinde bulunduğu için doksorubisin indüklediği oksidatif stres ile proteolitik süreç olmaksızın aktif olduğu ileri sürülmektedir (96) .

Araştırmamızda DOX, p38 MAPKi, DOX+p38 MAPKi grupları *UCP-2* gen ifadesi K grubuna göre anlamlı olarak yükselmişti ($p < 0.05$). DOX+p38 MAPKi *UCP-2* gen ifadesi, DOX grubuna göre anlamlı bir düşüş göstermişti ($p < 0.05$). Literatürde doksorubisin uygulamasının *UCP-2* ifadesini arttırdığı yönde çalışmalar mevcut olsa da *UCP*'lerin serbest radikal hasarın azaltılmasında görev aldığı bilinen bir gerçektir (81). Doksorubisin sebep olduğu oksidatif hasarın azaltılması için *UCP-2* ifadesinde artış olduğunu düşünmekteyiz. Bugger ve ark. deney hayvanları üzerinde yaptığı çalışmada

doksorubisin nedenli sol ventriküler kontraktıl disfonksiyon sonucu UCP-2 ve UCP-3 protein ifadelerinde azalma olduğunu ortaya koymuştur (97). Reaktif oksijen turlerinin uretiminin duzenlenmesinde rol olan UCP'lerin ifadelerindeki azalma doksorubisinin kalp uzerine toksik etkilerini artirabileceği bildirilmiştir (97). Kalp UCP-2 ifadesiyle kardiyak disfonksiyon ve hipertrofisi arasında bir ilişki olduğu duşunulmektedir (98). Safari ve ark. kalp iskemi reperfuzyon sonrası aşırı UCP-2 ifadesi gorulduğunu bildirmiştir (99). Bu çalışmada, iskeminin akut doneminde artmiş olan UCP-2 ifadesi ACE inhibitorleri kullanılarak baskılanmış ve miyokardiumun oksidatif hasara karşı korunduğunu belirtilmiştir (99). Bir başka araştırmada lipopolisakkaritin uyardığı p38 MAPK sinyal yolağı arayıcılığıyla UCP-2 seviyesindeki azalmanın mitokondride reaktif oksijen radikallerinin uretimini artirdığı tespit edilmiştir (100). Lipopolisakkaritin uyardığı p38 MAPK sinyal yolağı arayıcılığıyla UCP-2 seviyesindeki azalma mitokondride reaktif oksijen radikallerinin uretimini artirabilmektedir (100).

Ishizawa ve ark. yaptığı çalışmada izoproterenol uygulaması UCP-2 mRNA ifadesini arttırırken edaravone isimli antioksidan uygulaması UCP-2'nin ifadesini onlemektedir (101). Antioksidan Edaravone, oksidatif stresin azaltabilmekte, UCP-2 ifadesinin duzenlenmesinde rol oynayabilmektedir (101). UCP-2'nin ifade artışı mitokondrial oksidatif stresi azaltabilmektedir (101). UCP-2 mitokondrial ROT uretimini kontrol eden geri bildirim mekanizma komponentlerinden biri olabilmektedir (101). Gaussin ve ark. yaptıkları çalışmada UCP-2'nin beta adrenerjik uyarı ile induklenen kardiyomiyopati gelişiminde onemli rol oynayan bir aday gen olduğunu bildirmişlerdir (102). Yetişkin sıçan kardiyomiyositlerinde, UCP-2'nin aşırı ifadesi başlangıçta hucre sağkalımını etkilemezken, onemli olude ATP tuketimi, asidoz ve on olum proteini olan BNIP3 birikimine yol acığı ileri surulmuştur (103). Hu ve ark. doksorubisinin induklediği UCP-2 ifade azalımın onlenmesiyle kardiyomiyosit apoptozisi ve oksidatif hasarın şiddetinin azaldığını bildirmişlerdir (104). Doksorubisin temelli kemoterapi ROT'un neden olduğu konjestif kalp hastalığı ve sol ventrikul yetmezliği gelişimine neden olduğu için sınırlandırılmıştır (105). Tek doz doksorubisin enjeksiyonu ile oluşturulan kalp yetmezliği modelinde, kalpteki UCP-2 ve UCP-3 mRNA seviyelerinde azalma olduğu bildirilmiştir (106). Farelerde kalp hasarı oluşturmak için toplam doz 18 mg/kg olmak uzerine gunluk 2mg/kg doksorubisinin intraperitonel uygulaması sonrasında izole edilen mitokondrilerdeki UCP-2 protein

seviyesinin dikkat çekici bir şekilde azaldığı bildirilmiştir (97). Teshima ve ark. neonatal kardiyositlerde insan *UCP-2* geni içeren adenovirus vektörü kullanılarak *UCP-2* aşırı ifadesine eksojen oksidatif stresin etkisini incelemek için yaptıkları araştırmada, hücre ölüm belirteçlerinin baskılandığını ortaya koymuşlardır (107). Oksidatif strese maruz kalan kardiyomiyositlerin *UCP*'leri aktif ederek ve yeniden düzenleyerek oksidatif hasara karşı korunduğunu gösteren güçlü kanıtlar bulunmaktadır (107). Richard ve ark. çalışmalarında kullandıkları *UCP-2* geni susturulmuş farelerin paraziter enfeksiyonlara karşı direncin makrofajlardaki ROT üretimi ile geliştirildiğini ortaya koymuştur (108). Blanc ve ark. yaptığı çalışmada ROT aracılı ateroskleroze karşı *UCP-2*'nin koruyucu bir rol üstlendiğini ileri sürülmüştür (109). Mürin endotel hücrelerinin *UCP-2* antisense oligonükleotidleriyle tedavisinde ROT üretiminin azaldığı bildirilmiştir (110).

Araştırmamızda; kalp dokusu *Kaveolin-3*, *Kavin-4*, gen ifadelerinde gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p > 0.05$). Ichikawa ve ark. yaptığı çalışmada tavşanlarda doksorubisin uyarılı kalp hasarı sonrasında yapılan western blot analizi ile Kav-3 ile ilişkili olan MG53 proteinin membran hasarı tamirinde görev aldığı ileri sürülmektedir (111). MG53, Kav-3 ile fosfoinozitol 3 kinaz (PI3K) bağlayıp reperfüzyon hasarı kurtarma kinaz yolağını aktive ederek iskemi sonrasında kalbin korunmasında görev almaktadır (112). Kardiak miyositlerindeki Kav-3'ün aşırı ifadesi, natriüretik peptid ifadesini artırarak kalp hipertrofinin iyileştirilmesine olanak sağladığı için Kav-3'ün kalp hipertrofi tedavi stratejilerinde hedef teşkil edebileceği ileri sürülmektedir (113). Kav-3'ün, iskemik (113), anestezik (114) ve opioid (115) ajanların neden olduğu kalp hasarında kalbin korunmasında görev aldığı bildirilmektedir.

Hipertansif erkek sıçanlara intravenöz yolla yarım saatlik arayla 50 mg/kg deksrazoksan uygulama sonrası 3 mg/kg doksorubisin verilerek oluşturulan modelde gen ifadesindeki erken değişiklikleri mikroarray yöntemiyle incelenmiştir (106). Mitokondri, iyon taşıması, kas kontraksiyonu ve lipid metabolizması ile ilgili genlerin doksorubisin uygulamasının ilk gününde düzenlenmesinin azaldığı bildirilmiştir (106). Bu genlerin içerisinde Kav-3 ile ilişkili junktophilin2 de bulunmaktadır (106).

Nishi ve ark. *Kavin-4* geni susturulmuş kardiyomiyositlerde hipoksi, reoksijenizasyon ve hidrojen peroksitin uyardığı oksidatif hasarın p38 MAPK yolağının inhibisyonu ile hafiflediğini ortaya koymuştur (116). *Kavin-4* 'un kardiyomiyositlerde

radikal oksijen türlerinin uyardığı apoptoz sinyal yolağı vasıtasıyla kardiyak iskemi reperfüzyon hasarın gelişiminde kritik bir rol oynadığı ortaya konulmaktadır (116). Diğer yandan Ogata ve ark.'nın yaptığı çalışmada; *Kavin-4*'ün kardiyomiyopatilerde düzenleyici olarak rol aldığı belirtilmektedir (117). Araştırmamızda tespit ettiğimiz *Kav-3* ve *Kavin-4* gen ifade düzeylerinde gruplar arasında fark olmamasının nedeni, doksorubisin ve p38 MAPK inhibitörünün uygulama süresi ve uygulanan dozu ile alakalı olabilir. Galbiati ve ark.'nın C2C12 miyoblastlarıyla yaptıkları hücre kültür çalışmalarında p38 MAPK inhibitörü kullanmış; inhibisyonun *Kav-3* ifadesini ve miyotüp şekillenmesini bloke ettiğini bildirmiştir (118). Bu sonuçlar doğrultusunda *Kav-3* ifadesinin miyoblast füzyonu ve miyotüp şekillenmesinde gerekli olduğu fikri ileri sürülmektedir (118). Shen ve ark.'nın yaptığı çalışmada, sıçanların hipoksik kardiyomiyositlerinin yeniden oksijenlenmesiyle oluşan oksidatif hasarda *Kav-3* seviyelerinde azalma gözlemlendiği bildirilmektedir (119). Bu çalışmada sıçanlara *Kav-3* peptidleri verildiğinde oksidatif hasarın ortadan kalktığı gözlemlenmiştir (119). Transfekte olan kardiyomiyositlerde kaveola sayısı, Akt ve glikojen sentaz 3- β (GSK 3- β) seviyelerinin arttığı bildirilmektedir (120). E vitamini ailesinden olan tokotrienoller *Kav-1* ve *Kav-3*'ü düzenleyerek kalbin korunmasına aracılık ettiği ortaya konulmaktadır (121).

Birçok p38 MAPK inhibitörünün kardiyovasküler hastalıkları taklit eden in vivo ve in vitro hayvan modellerinde etkili olduğu bildirilmektedir(122). Willette ve ark., hipertansif sıçanlara uyguladıkları selektif p38 MAPK inhibitörü tedavisiyle endoteliumda iyileşmenin gerçekleştiğini göstermiştir (122). Guo ve ark., yapmış oldukları in vitro çalışmalarında doksorubisin ile muamele edilen H9c2 kalp hücrelerinde p38 MAPK ifadesinde belirgin artış gözlemlediklerini ortaya koymuştur (123). Ayrıca H9c2 kalp hücrelerindeki NF- κ B aktivasyonunun p38 MAPK'in spesifik inhibitörü olan SB203580 ile azaltıldığı da bildirilmiştir (123). Poizat ve ark. tarafından p38 MAPK aktivasyonunun transkripsiyonel kofaktör p300'un parçalanmasına neden olarak doksorubisin uyarılı kardiyomiyosit apoptozisine neden olduğu bildirilmektedir (124). Arabacılar ve ark., p38 MAPK'in inhibisyonunun kalp yetmezliklerinde terapötik değeri olabileceğini öne sürmektedir (10). Kyoji ve ark., dilate kardiyomiyopati oluşturulmuş hamsterleri bir p38 MAPK inhibitörü olan SB203580 ile muamele ettiklerinde kalpteki fibroziste azalma olduğunu göstermişlerdir (125). Ayrıca yetişkin sıçan kardiyomiyositlerine SB203580 uygulamasının p38 MAPK aktivitesini inhibe

ederek kontraktiletiyi azalttığı da bildirilmiştir (126). Transgenik farelere SB239068'nin uygulamasıyla TNF- α , interlökin-6 plazma seviyelerinde, intertisyel fibroziste azalma olduğu da gösterilmektedir (126). Yapılan bir diğer çalışmada doksorubisin indüklü apoptoziste p38 MAPK'ın aktivasyonunun etkili olduğunu gösterilmektedir (127). Yine p38 inhibitörlerinin (SB203580, SB239063, FR167653) kardiyak hücrelerde apoptozisi azalttığı da bildirilmiştir (10). p38 inhibitörlerinin kalp üzerinde koruyucu etkilerinin de olduğu ileri sürülmektedir (128). Yamaguchi ve ark. Raf-1 geni susturulmuş kalp fonksiyon bozukluklarına sahip olan fareler üzerinde yaptıkları çalışmalar neticesinde, p38 MAPK aktivitesindeki artışın apoptoziste artışa neden olduğunu bildirmiştir (129).

Araştırmamızda gruplar arasında sıçanların serum AST, ALT ve Troponin I seviyelerini karşılaştırdığımızda, gruplar arası ALT seviyelerinde DOX+p38 MAPKi grubunun ALT seviyesinin diğer gruplara göre istatistiki olarak anlamlı bir artış gösterdiği ($p < 0.05$); DOX+p38 MAPKi grubundaki AST seviyesindeki artışın p38 MAPKi grubuna göre istatistiki olarak anlamlı olduğu ($p < 0.05$), DOX grubundaki troponin I seviyesindeki artışın ise yalnızca DOX+p38 MAPKi grubuna göre anlamlı olduğu ($p < 0.05$) tespit edildi.

Doksorubisin ve p38 MAPK inhibitörünün AST ve ALT düzeyleri üzerine farklı etkileri mevcut olduğu literatürde görülmektedir. Xiao ve ark. rodentler üzerinde yaptığı çalışmada total parenteral nutrisyon modelinde SB203580 uygulanmasının AST ve ALT seviyelerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (130). Bu çalışmada farelerde dengue virüsü ile oluşturulan karaciğer hasarına SB203580 uygulaması sonrasında AST düzeylerinde değişiklik gözlenirken ALT düzeylerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (130). AST, ALT'ye göre karaciğer iltihabında daha spesifik rol oynayabilmektedir (131). Su ve ark. pnömoni modeli oluşturdukları farelere uyguladıkları SB203580'nin doza bağlı olarak kalp dokusunda iyileştirici bir rol oynarken akciğerdeki hasarın derinleşmesine sebep olduğunu bildirmiştir (132). Bunun yanısıra kapalı bir sisteme uygulanan ilacın gerek dozu gerekse yapısal özelliği nedeniyle organlarda farklı cevaplara neden olduğu ispatlanmıştır (132). Çalışmamızda da kullandığımız selektif p38 MAPK inhibitörü olan SB203580, p38'in katalitik aktivitesini inhibe edebilmektedir (132). Yalnızca p38 MAPK'yi inhibe eden SB203580, p44/42 MAPK veya SAPK/JNK'yi anlamlı bir şekilde inhibe edememektedir (133). p38 yolağın inhibisyonunun enzim düzeyleri üzerine beklenenin tersine olan etkilerinin nedenlerine Lee ve ark. yaptığı çalışma cevap olmaktadır (133).

Özbeý ve ark. Balb-c türü fareler üzerinde yaptığı çalışmada 6 hafta boyunca doksorubisin ve fluoksetin uygulamasının, erken dönem kardiyotoksisite biyobelirteçlerinden olan serum ALT, CK-MB düzeylerinde bir değişme yapmadığını, AST düzeyinde ise artışa neden olduğunu bildirmiştir (134).

Demir ve ark. tavşanlar üzerinde doksorubisin ile oluşturduğu kardiyotoksisitede serum Troponin I düzeylerinin sadece ağır kardiyotoksisitede artıp antioksidan verilen gruplarda değişmediğini bildirmiştir (135). Doksorubisin kardiyotoksisitesinde, aktin, miyozin hafif ve ağır zinciri, troponin-I ve desmin proteinlerinin gen ifadelerinde azalma olduğu bildirilmiştir (136). Kontraktıl proteinlerin azalmış ifadesinin, miyofibril kaybı ve miyokardial kontraktıl fonksiyonun azalmasıyla ilişkili olduğu öngörülmektedir (136). Kardiyak adrimisine duyarlı proteinin aşırı ifadesinin, kardiyomiyositlerde kardiyak Troponin C ve atrial natriüretik faktör transkripsiyonunu baskıladığı bildirilmektedir (137). Akut doksorubisin kardiyotoksisitesi hücre membranını etkileyerek sitoplazmik havuzdan hızla troponin azalmasını başlatırken (138), kronik doksorubisin maruziyetinin periferel kana tespit edilebilir troponin salınmasına neden olduğu bildirilmiştir (139). Doksorubisine maruziyetin artışıyla korele natriüretik peptid, kardiyak troponin (cTnI, cTnT) gen ifadesine artış olduğu da bildirilmiştir (140).

Araştırmamızda; serum CK-MB sonuçları gruplar arasında kıyaslandığında K ve p38 MAPKi grupları CK-MB değerlerinin DOX ve DOX+p38 MAPKi gruplarına göre daha yüksek olduğu tespit edildi. Garikipati ve ark. sıçanlar üzerinde yaptığı çalışmada sıçanlarda kalp hasarı oluşturduktan sonra ölçtükleri CK-MB seviyelerinde gruplar arasındaki belirgin artış 7. günde kendini gösterdiğini tespit etmiştir (141). Çalışma sonucumuza benzer olarak Kesik ve ark. doksorubisin uyguladıkları grubun CK-MB seviyelerinin kontrol grubuna göre azalmış olduğunu bildirmiştir (142).

Araştırmamızda gruplar arasında sıçanların kalp CAT, GSH, MDA ve SOD seviyeleri karşılaştırıldığında, DOX ve DOX+p38 MAPKi grubundaki CAT aktivitesindeki artışın K ve p38 MAPKi grubuna göre istatistiki olarak anlamlı bir artış olduğu ($p < 0.05$); DOX+p38 MAPKi ve p38 MAPKi gruplarında yükselen GSH seviyesinin K grubuna göre istatistiki olarak anlamlı olduğu ($p < 0.05$); DOX grubundaki yükselen MDA seviyesinin K, p38 MAPKi ve DOX+p38 MAPKi gruplarına göre istatistiki olarak farklılık gösterdiği ($p < 0.05$); DOX, p38 MAPKi ve

DOX+p38 MAPKi gruplarında artan SOD aktivitesinin K grubuna göre anlamlı olduğu ($p < 0.05$) tespit edildi.

Doksozobisin uyarılı mitokondri hasarında ilk olarak sitokrom c salınımına neden olan mitokondriyal hasarın ve serbest radikallerin sürekli üretimine izin veren solunum zincir defekti tetiklenmektedir (143). Araştırmalar, doksozobisin uygulamasının oksidatif ve glikolitik enzimleri içeren metabolik enzimlerin ifadesini değiştirerek mitokondriyal gen ifadesini etkilediğini göstermektedir (144). Doksozobisin kaynaklı miyokardiyal disfonksiyonun, bir ısı şok proteini olan HSP27'nin ifadesindeki artışın sonucu düzelen oksidatif strese cevap ile önlediği ileri sürülmektedir (145). Volkova ve ark. tarafından kardiyomiyositlerde oksidatif strese cevaben sitokrom c salınımına sebep olan doksozobisinin, p38 MAPK aktivasyonu aracılığıyla apoptozu tetiklediği ileri sürülmüştür (1). Biz de çalışmamızda uyguladığımız p38 MAPK inhibitörünün, dokuda neden olduğu CAT, GSH, SOD seviyelerindeki artışın, MDA seviyelerindeki azalış ile oksidatif stresi azaltarak oluşan hasarın hafifletilmesine olanak sağlandığını düşünmekteyiz.

Doksozobisinin ROT üretimine neden olarak kardiyotoksisiteyi tetiklediği bildirilmektedir (146). Diğer yandan Top2 β inhibisyonu ile DNA'nın hasarlanmasına ve apoptozis indüksiyonuna da neden olduğu da ileri sürülmektedir (147). Ayrıca reaktif oksijen ürünleri oluşmasına ve DNA ile etkileşime girerek makromoleküllerin sentezlenmesinin inhibisyonuna neden olduğu da belirtilmektedir (147). Doksozobisin kardiyotoksisitesindeki temel mekanizma, artmış ROT ve lipid peroksidasyonu ile kendini gösteren artmış oksidatif stres, nükleik asit ve protein sentezinin inhibisyonu, azalmış antioksidan seviyeleri ve sulfidril grupları ve ifadeleri azalmış kardiyak spesifik genler bulunmaktadır (148). Doksozobisinin, kardiyomiyositlerin mitokondrilerindeki serbest oksijen radikali üretiminde görev alan enzimleri etkileyerek toksik hasara neden olabileceği ortaya konulmaktadır (148). Ayrıca doksozobisin eNOS'ı artırarak superoksit oluşumunu arttırdığı da ileri sürülmektedir (148). Vücut ağırlığı başına 15 mg doksozobisin uygulamasının sıçanlarda sitokrom P450 enzimlerinin ifadesini artırarak metabolizmada değişikliğe neden olduğu gösterilmektedir (149). Doksozobisinin neden olduğu hidrojen peroksit ve superoksit oluşumunun p53 genini uyararak kardiyomiyositlerde apoptozisi başlattığı bildirilmektedir (150). DOX grubundaki sıçanların doku MDA düzeylerindeki artışın doksozobisinin neden olduğu oksidatif stres etkisiyle olabileceğini düşünmekteyiz. DOX grubu ile DOX+P38 grubu MDA

seviyeleri açısından kıyaslandığında p38'in doksorubisinin neden olduğu oksidasyonu azalttığı görülmektedir. Adachi ve ark. (151) yaptığı çalışmada farelere uygulanan tek doz 15 mg/kg doksorubisin muamelesi sonucu tespit ettikleri kalp dokusunda artmış SOD ve CAT bulguları bizim çalışmamız sonuçlarını da destekler niteliktedir. SOD aktivitesindeki yükselişin nedeni doksorubisine maruz kalan kalp dokusunda meydana gelen oksidatif stresin üstesinden gelmek için olabileceği düşünülmektedir (152).

Araştırmamızda CAT seviyeleri açısından gruplar kıyaslandığında DOX, DOX+MAPKi gruplarında K ve p38 MAPKi gruplarına göre artış görülmüştür. CAT aktivitesinin artışı doksorubisin kaynaklı oluşan serbest radikaller sebebiyle olabilir. Bu sonuçlarımızı destekler nitelikte olan Aniss ve ark. yaptıkları çalışmada doksorubisine maruz kalan farelerde artmış SOD ve CAT aktiviteleri ile doksorubisin ile indüklenmiş serbest oksijen radikallerinin detoksifiye edilme girişimi gösterilmiştir (153).

Çalışma sonuçlarımızla benzer olarak Yu ve ark. sıçanlarda yaptıkları doksorubisin uyarılı kardiyotoksisite çalışmasında SOD, glutasyon peroksidaz ve katalazı içeren endojen hücrel antioksidan sistemindeki belirgin azalmanın sorumlusunun doksorubisin olduğu bildirmiştir (154). Bunun yanısıra oksidatif stresin etkisiyle kalp dokusunda artmış lipid peroksidasyonu ile önemli miktarda MDA seviyelerinde artış tespit edilmiştir (154). Özdoğan ve ark. sıçanların kalp dokularında adrimisin ile oluşturdukları hasarda plazma MDA seviyelerinde belirgin bir artış tespit ederken, SOD, CAT ve GSH-Px seviyelerinde azalma olduğunu bildirmiştir (155). Serum CK, LDH, AST ve ALT seviyelerinde ise artış gözlenmiştir (155).

Artmış MDA seviyeleri doksorubisinin kalp hücrelerinden oksidatif strese neden olduğunun göstergesidir. Swamy ve ark. doksorubisin kardiyotoksisitesi oluşturdukları sıçanlara 15 gün boyunca 20 mg/kg askorbik asit uygulamış; DOX grubunda SOD, CAT ve GSH enzimleri kontrol gruplarına göre azaldığını, MDA, AST ve ALT düzeylerinde ise DOX uygulamasının artışa neden olduğunu tespit etmiştir (156). Farelerde vücut ağırlığı başına tek doz 20 mg/kg doksorubisin uygulaması ile serum CK-MB ve laktat dehidrogenaz (LDH) ile doku MDA seviyelerinin arttığı; SOD, CAT ve GSH gibi antioksidan enzimlerin seviyeleri azaldığı gösterilmiştir (157). Sıçanlara uygulanan 20 mg/kg doksorubisin sonrasında serumda kreatin fosfokinaz (CPK), LDH enzimlerinin aktiviteleri artarken; kalp dokusunda MDA seviyelerinde artış, GSH seviyelerinde azalma görüldüğü bildirilmiştir (158). Aynı çalışmada, intraperitonel 10 mg/kg resveratrol tedavisi sonucunda MDA üretiminde azalma ile CPK ve LDH

seviyelerinin azaldığı görülmüştür (158). Octavia ve ark., doksorubisin ile oluşturulan kardiyomiyopatide antioksidan seviyelerinde azalmayla birlikte reaktif oksijen radikallerinin tetiklediği doku hasarını göstermiş ve kardiyak oksidatif stres ile doksorubisin arasında güçlü bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur (33). Hidroksil radikallerinin, hücre membran lipidlerinin oksidasyonu, mitokondriyal solunum zincirinin bozulması, sülfhidril grupları içeren enzimlerin fonksiyonlarını yitirmesinden sorumlu olduğu bilinmektedir (34).

Araştırmamızda tespit ettiğimiz histopatolojik bulgularda; DOX grubunda konjesyon-hemoraji ve dejenere kardiyomiyosit yoğunluğunda belirgin bir artışın olduğu gözlemlendi. DOX grubunda izlenen bu histopatolojik değişikliklerin, kontrol ve p38 MAPKi gruplarına göre istatistiksel olarak yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). DOX+p38 MAPKi grubunda konjesyon-hemoraji şiddetinde, DOX grubu ile karşılaştırıldığında, belirgin bir azalmanın olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). Öte yandan, DOX+p38 MAPKi grubunda, dejenere kardiyomiyosit şiddetinin DOX grubuna benzer şekilde devam ettiği izlendi.

Kwatra ve ark. doksorubisin uygulamasının hayvanların kalp dokusunda vakuolizasyon, inflamasyon ve miyofibril kaybına neden olduğunu bildirmiştir (175). Sıçanlarda, vücut ağırlığı başına 15 mg tek doz intraperitoneal doksorubisin uygulamasıyla oluşturulan kardiyotoksisite çalışmasının histopatolojik bulgularında inflamatuvar hücreler çevresinde nekrotik alanlar, kas liflerinde fragmentasyon ve miyokardiyal damarlarda konjesyon görüldüğü bildirilmiştir (159).

Araştırmamızın hemodinamik parametrelerine bakıldığında DOX grubunda sistolik, diyastolik ve ortalama KB değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış saptanmış iken DOX+p38 MAPKi grubunda bu değerler DOX grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık göstermemiştir. EKG'de DOX grubunda iskemik kardiyak patolojilerden (ST depresyonu ve T negatifliği) toplamda 4 adet görülmüş iken DOX+p38 MAPKi grubunda ise sadece 2 adet görülmüştür. Bunun yanında DOX grubunda 3 adet dal bloğu saptanmış iken DOX+p38 MAPKi grubunda 2 adet saptanmıştır. Kontrol grubunda ve p38 MAPKi grubunda herhangi bir elektrokardiyografik patolojiye rastlanmamıştır.

Kardiyak toksisitelerin saptanmasında elektrokardiyografik parametreler önemli bir yere sahiptir. Antrasiklin türevi bir kemoterapötik ajan olan DOX ile ilgili literatür

verilerine bakıldığında elektrofizyolojik parametreler üzerine olumsuz etkisi görülmektedir. Sözelimi, DOX uygulanan ratlarda PR (160), QRS (161, 162), QT (161-165) ve QTc (165) süreleri ile farelerde QRS (166) ve QT (167, 168) sürelerinde kontrol grubuna kıyaslandığında anlamlı uzama bildirilmiştir. Mantawy ve ark. yaptıkları çalışmada DOX uygulanan sıçanlarda QRS, PR ve QTc sürelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış saptamıştır (170). Ancak çalışmamızda DOX uygulanan grupta elektrofizyolojik parametreler açısından anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Bu verilerin aksine DOX grubunun elektrokardiyografik verilerine bakıldığında 1 ratta ST depresyonu, 3 ratta T negatifliği ve 3 ratta da dal bloğu tespit edilmiştir. Genel olarak DOX kardiyotoksitesinde tanısal değerinin dışında EKG patolojileri sıklıkla tanıyı desteklemekte faydalı yöntemler olarak kullanılmaktadır (171). DOX kardiyotoksitesinde en sık görülen EKG patolojisi, tedavisi mümkün olan sinüs taşikardisidir (172-175). Uzamış doksorubisin kardiyotoksitesinde ise T negatifliği, uzamış QT aralığı ve aritmi vakaları bildirilmiştir (172). Çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında DOX grubundaki ratların %33'ünde EKG'de iskemik patolojiler, %25'inde ise aritmi saptanmıştır. Çalışmamızda, kalp hızı açısından DOX grubu ile kontrol grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. DOX kardiyotoksitesinin kalp hızı üzerindeki etkileri literatürde farklılık göstermektedir. Kutanis ve ark. yaptığı çalışmada DOX tedavisi alan 85 hastanın kalp hızı verileri kontrol grubuna kıyaslandığında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (175). Ancak daha önce de belirtildiği gibi bildirilen birçok sinüs taşikardisi vakası mevcuttur (174). p38 uygulanan ratlarda elektrokardiyografik ve elektrofizyolojik parametrelerde kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark tespit görülmemiştir. Bunun yanında DOX+p38 uygulanan grupta DOX grubuna göre iskemik patolojilerde % 50, aritmi oranlarında ise % 33 azalma görülmüştür.

Sıçanlarda, 14, 21, 28 ve 35. günlerde vücut ağırlığı başına uygulanan 3,75 mg doksorubisin, kontrol grubuna göre doksorubisin grubunda QT intervalinde artışa neden olduğu gösterilmektedir (176). Bu sonuç sadece kalbin mekaniksel disfonksiyonu sonucu değil ayrıca ventriküler depolarizasyon ve repolarizasyonun da homojen olmamasının bir sonucu olduğu ileri sürülmektedir (177). Doksorubisin uygulamasının neden olduğu azalmış kalp hızının altında yatan nedenin reaktif oksijen radikallerinin kalsiyum homeostasinin bozması olduğu ileri sürülmektedir (178). Doksorubisin hem sistolik hemde diastolik kalp fonksiyonlarını inhibe etmektedir (178). İyon pompalarına

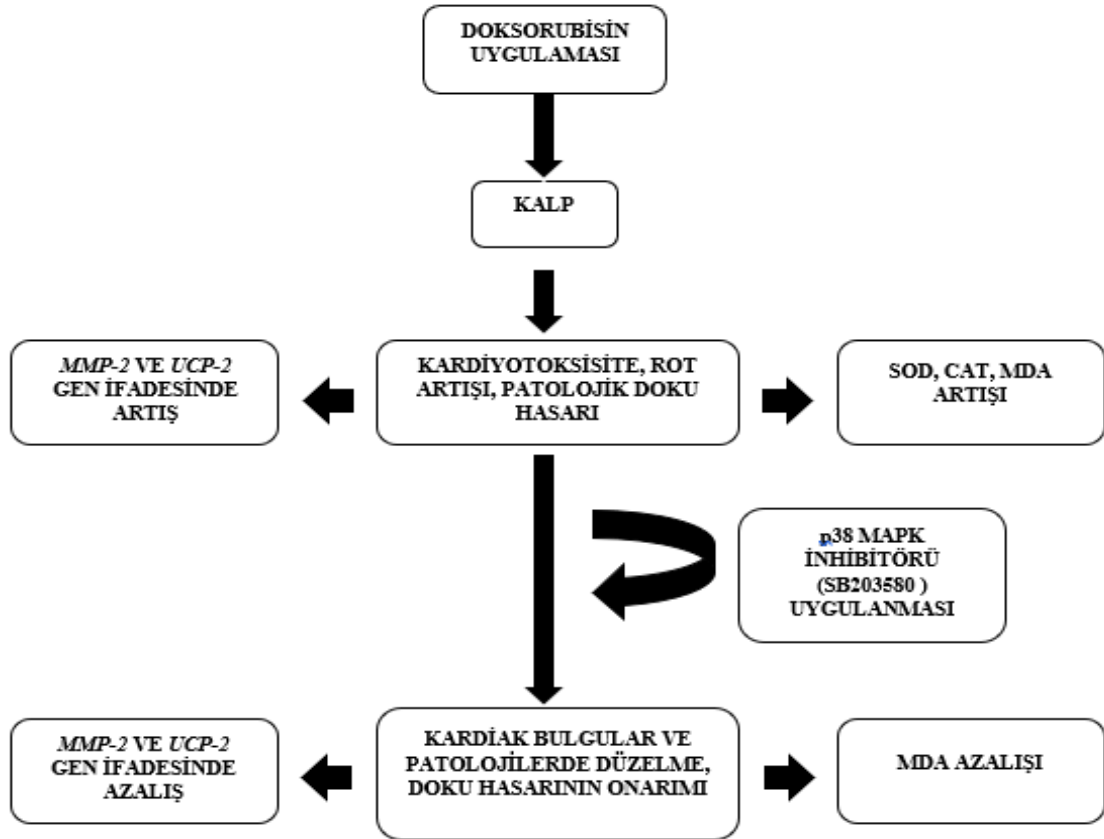
inhibe eden metabolitleri olan doksorubisin kalp sarkoplazmik retikulum vezikülüne kalsiyum alımını engellemektedir (178).

p38'in iskemik kalp hastalıkları üzerindeki rolü üzerine kapsamlı çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, deneysel kalp yetmezliği modelinde p38 aktivasyonu gözlenmiş ve alınan miyokard biyopsileri üzerine yapılan araştırmalar, “sağlıklı” kalplere kıyasla artmış p38 aktivitesi göstermiştir (179, 180). Kültür ortamında kardiyomiyositlerde, p38 aktivasyonu hipertrofiyi artırmış ve farmakolojik inhibisyon, endotelin-1 ve fenilefrin gibi uyarıcılara cevap olarak ortaya çıkan hipertrofiyi hafiflettiği görülmüştür (181). Yetişkin sıçan kardiyomiyositlerinde SB203580 kullanılarak p38 aktivitesini inhibe edilmiş, kontraktilite ise artırmıştır (182). Çalışmamızın verileri ile uyumlu olarak p38 MAPK inhibisyonunun kardiyoprotektif açıdan önemli olduğu görülmektedir (183).

Zhao ve ark. yaptığı çalışmada farelere uyguladıkları tek doz 15 mg/kg doksorubisin uygulaması sonucu mikroarray yöntemiyle 1185 gen içinden apoptozis ve ubiquitin proteozom sistem (UPS) genlerinde değişiklikler meydana geldiği bildirilmiştir (184). Doksorubisin kalpte proteozom aktivitesini azaltırken, poliubiquitinlenmiş proteinleri ise artırmaktadır (184). İmmunoproteozom katalitik subünitlerinin ifadelerindeki artışın, kardiyomiyositlerde doksorubisin uyarılı apoptozisi hızlandırdığı gösterilmektedir (184). Kiessling ve ark., farklı yaş grubundaki farelerde yaptığı kalp iskem-reperfüzyon çalışmasında yaşlı farelerin *Kav-3* ifadesinin genç farelere göre 1,6 kat daha azaldığını bildirmiştir (185). İskemik tolerans kaybı ve yaşlı kalplerdeki G protein kenetli reseptör (GPCR) aracılı korumanın bu ifade değişikliklerine katkıda bulunabileceği ileri sürülmektedir (185).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, doksorubisin sonrası p38 MAPK inhibitörü uygulamasının dokuda bazı gen ifadelerinde değişikliğe neden olabileceği değerlendirilmektedir. Aynı şekilde, ölçülen farklı antioksidan enzim seviyeleri ve biyokimya parametrelerinden sadece birkaçında doksorubisin uygulaması sonrası p38 MAPK inhibitörü varlığında değişme saptanmış, diğer enzim seviyeleri ve biyokimya parametrelerinde anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir. Patolojik bulgular değerlendirildiğinde, doksorubisin sonrası p38 MAPK inhibitörü uygulamasının doku hasarını iyileştirici yönde etkisi olduğu görülebilmektedir. Tüm bu bulgular ışığında, p38 MAPK inhibitörü uygulamasının kalp dokusunda bazı mekanizmalar üzerinden kalp hasarının korunmasında koruyucu bir etki sağlayabileceğini düşünmekteyiz. Konu ile ilgili olarak daha geniş kapsamlı araştırmalar yapılması gerektiği kanaatini taşımaktayız (Şekil 6.1).



Şekil 6.1. Doksorubisin kardiyotoksitesi ve p38 MAPK inhibitörü etkisinin muhtemel mekanizması

KAYNAKLAR

1. Volkova M, Russell R. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Curr Cardiol Rev* 2011, 7: 214-20.
2. Patel HH, Murray F, Insel PA. Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008, 48: 359-91.
3. Briest W, Hölzl A, Raßler B, Deten A, Leicht M, Baba HA, Zimmer HG. Cardiac remodeling after long term norepinephrine treatment in rats. *Cardiovasc Res* 2001, 52: 265-73.
4. Ivanová M, Dovinová I, Okruhlicová L, Tribulová N, Šimončíková P, Barte-Kova M, Vlkovičová J, Barančík M. Chronic cardiotoxicity of doxorubicin involves activation of myocardial and circulating matrix metalloproteinases in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2012, 33: 459-69.
5. Ledesma A, Lacoba MG, Rial E. The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biol* 2002, 3:1-9.
6. Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 1997, 15: 269-72.
7. Ricquier D, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol* 2000, 529: 3-10.
8. Low JY, Nicholson HD. Epigenetic modifications of caveolae associated proteins in health and disease. *BMC Genet* 2015, 16: 71.
9. Bastiani M, Liu L, Hill MM, Jedrychowski MP, Nixon SJ, Lo HP, Abankwa D, Luetterforst R, M Fernandez-Rojo M, Breen BR, Gygi SP, Vinten J, Walser PJ, North KN, Hancock JF, Pilch PF, Parton RG. MURC/Cavin-4 and cavin family members form tissue-specific caveolar complexes. *J Cell Biol* 2009, 185 : 1259-73.
10. Arabacilar P, Marber M. The case for inhibiting p38 mitogen-activated protein kinase in heart failure. *Front Pharmacol* 2015, 6 : 1-7.

11. Li Z, Ma JY, Kerr I, Chakravarty S, Dugar S, Schreiner G, Protter AA. Selective inhibition of p38 α MAPK Improves cardiac function and reduces myocardial apoptosis in rat model of myocardial injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006, 291:1972-7.
12. Damiani RM, Moura DJ, Viau CM, Caceres RA, Henriques JAB, Saffi J. Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone. *Arch Toxicol* 2016, 90: 2063-76.
13. Mitry MA, Edwards JG. Doxorubicin induced heart failure: phenotype and molecular mechanisms. *Int J Cardiol Heart Vasc* 2016, 10: 17-24.
14. Li DL, Hill JA. Cardiomyocyte autophagy and cancer chemotherapy. *J Mol Cell Cardiol* 2014, 71: 54-61.
15. Cheung KG, Cole LK, Xiang B, Chen K, Ma X, Myal Y, Hatch GM, Tong Q, Dolinsky VW. Sirtuin-3 (SIRT3) protein attenuates doxorubicin-induced oxidative stress and improves mitochondrial respiration in H9c2 cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2015, 290: 10981-93.
16. Eom YW, Kim MA, Park SS, Goo MJ, Kwon HJ, Sohn S, Kim WH, Yoon G, Choi KS. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene* 2005, 24: 4765-77.
17. Tham YK, Bernardo BC, Ooi JY, Weeks KL, McMullen JR. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol* 2015, 89: 1401-38.
18. Mobaraki M, Faraji A, Zare M, Dolati P, Ataei M, Manshadi HD. Molecular mechanisms of cardiotoxicity: A review on major side-effect of doxorubicin. *Indian J Pharm Sci* 2017, 79: 335-44.
19. Ghigo A, Li M, Hirsch E. New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Biochim Biophys Acta*.2016, 1863:16-25.
20. Nousiainen T, Jantunen E, Vanninen E, Remes J, Vuolteenaho O, Hartikainen J. Natriuretic peptides as markers of cardiotoxicity during doxorubicin treatment for non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 1999, 62: 135-41.

21. Minotti G, Mancuso C, Frustaci A, Mordente A, Santini SA, Calafiore AM, Liberi G, Gentiloni N. Paradoxical inhibition of cardiac lipid peroxidation in cancer patients treated with doxorubicin. Pharmacologic and molecular reappraisal of anthracycline cardiotoxicity. *J Clin Invest* 1996, 98: 650-61.
22. Pereira CG, Silva AM, Diogo CV, Carvalho FS, Monteiro P, Oliveira PJ. Drug-induced cardiac mitochondrial toxicity and protection: from doxorubicin to carvedilol. *Curr Pharm Des* 2011, 17: 2113-29.
23. Olson RD, Mushlin PS. Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *FASEB J* 1990, 4: 3076-86.
24. Alderton PM, Gross J, Green MD. Comparative study of doxorubicin, mitoxantrone, and epirubicin in combination with ICRF-187 (ADR-529) in a chronic cardiotoxicity animal model. *Cancer Res* 1992, 52: 194-201.
25. Keizer H, Pinedo H, Schuurhuis G, Joenje H. Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther* 1990, 47: 219-231.
26. Luo X, Evrovsky Y, Cole D, Trines J, Benson LN, Lehotay DC. Doxorubicin-induced acute changes in cytotoxic aldehydes, antioxidant status and cardiac function in the rat. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1997, 1360: 45-52.
27. Zhou S, Starkov A, Froberg MK, Leino RL, Wallace KB. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. *Cancer Res* 2001, 61: 771-7.
28. Chen Z, Qi Y, Gao C. Cardiac myocyte-protective effect of microRNA-22 during ischemia and reperfusion through disrupting the caveolin-3/eNOS signaling. *Int J Clin Exp Pathol* 2015, 8: 4614-26.
29. Neilan TG, Blake SL, Ichinose F, Raheer MJ, Buys ES, Jassal DS, Furutani E, Perez-Sanz TM, Graveline A, Janssens SP. Disruption of nitric oxide synthase 3 protects against the cardiac injury, dysfunction, and mortality induced by doxorubicin. *Circulation* 2007, 116: 506-14.
30. Kim DS, Kim HR, Woo ER, Kwon DY, Kim MS, Chae SW, Chae HJ. Protective effect of calceolarioside on adriamycin-induced cardiomyocyte toxicity. *Eur J Clin Pharmacol* 2006, 541: 24-32.

31. Halestrap AP. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans* 2006, 34: 232-7.
32. Dewolf FA. Binding of doxorubicin to cardiolipin as compared to other anionic phospholipids—An evaluation of electrostatic effects. *Biosci Rep* 1991, 11: 275-84.
33. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol* 2012, 52: 1213-25.
34. Wojtacki J, Lewicka-Nowak E, Leśniewski-Kmak K. Anthracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention—review of the literature. *Med Sci Monit Basic Res* 2000, 6: 411-20.
35. Yokota T, Wang Y. p38 MAP kinases in the heart. *Gene* 2016, 575: 369-76.
36. Cuevas B, Abell A, Johnson G. Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. *Oncogene* 2007, 26:3159.
37. Zhang Y, Dong C. Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling. *Cell Mol Life Sci* 2007, 64: 2771-89.
38. Li Z, Jiang Y, Ulevitch RJ, Han J. The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996, 228:334–40.
39. Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, Han J. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* 1996, 271: 17920–6.
40. Kumphune S, Bassi R, Jacquet S, Sicard P, Clark JE, Verma S, Avkiran M, O'Keefe SJ, Marber MS. A chemical genetic approach reveals that p38alpha MAPK activation by diphosphorylation aggravates myocardial infarction and is prevented by the direct binding of SB203580. *J Biol Chem.* 2010, 285:2968–75.
41. Sicard P, Clark JE, Jacquet S, Mohammadi S, Arthur JS, O'Keefe SJ, Marber MS. The activation of p38alpha, and not p38beta, mitogen-activated protein kinase is required for ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* 2010, 48:1324–8.

42. Zhang WX, Wang R, Wisniewski D, Marcy AI, LoGrasso P, Lisnock JM, Cummings RT, Thompson JE. Time-resolved Forster resonance energy transfer assays for the binding of nucleotide and protein substrates to p38alpha protein kinase. *Anal Biochem.* 2005, 343:76–83.
43. Young PR, McLaughlin MM, Kumar S, Kassis S, Doyle ML, McNulty D, Gallagher TF, Fisher S, McDonnell PC, Carr SA, Huddleston MJ, Seibel G, Porter TG, Livi GP, Adams JL, Lee JC. Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J Biol Chem.* 1997;272:12116–21.
44. Vogtherr M, Saxena K, Hoelder S, Grimme S, Betz M, Schieborr U, Pescatore B, Robin M, Delarbre L, Langer T, Wendt KU, Schwalbe H. NMR characterization of kinase p38 dynamics in free and ligand-bound forms. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2006, 45:993–7.
45. Zhang J, Shen B, Lin A. Novel strategies for inhibition of the p38 MAPK pathway. *Trends Pharmacol Sci.* 2007, 28:286–95.
46. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2007, 1773: 1358-75.
47. Das M, Cui J, Das DK. Generation of survival signal by differential interaction of p38MAPK α and p38MAPK β with caveolin-1 and caveolin-3 in the adapted heart. *J Mol Cell Cardiol* 2007, 42: 206-13.
48. Wang GX, Wang YX, Zhou XB, Korth M. Effects of doxorubicinol on excitation–contraction coupling in guinea pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* 2001, 423: 99-107.
49. Wold LE, Aberle NS, Ren J. Doxorubicin induces cardiomyocyte dysfunction via a p38 MAP kinase-dependent oxidative stress mechanism. *Cancer Detect Prev* 2005, 29: 294-9.
50. Bao W, Behm DJ, Nerurkar SS, Ao Z, Bentley R, Mirabile RC, Johns DG, Woods TN, Doe CP, Coatney RW. Effects of p38 MAPK inhibitor on angiotensin II-dependent hypertension, organ damage, and superoxide anion production. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007, 49:2–8.
51. Palade G. The fine structure of blood capillaries. *J Appl Phys* 1953, 24: 1424.

52. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 1992, 68: 673-82.
53. Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93: 131-5.
54. Gambin Y, Ariotti N, McMahon KA, Bastiani M, Sierrecki E, Kovtun O, Polinkovsky ME, Magenau A, Jung W, Okano S. Single-molecule analysis reveals self assembly and nanoscale segregation of two distinct cavin subcomplexes on caveolae. *Elife* 2014, 3: 1-18.
55. Hansen CG, Nichols BJ. Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *J Cell Sci* 2009, 122: 1713-21.
56. Gao QQ, McNally EM. The Dystrophin Complex: Structure, Function, and Implications for Therapy. *Compr. Physiol* 2015, 5: 1223-9.
57. Belhasan DC, Akaaboune M. The role of the dystrophin glycoprotein complex on the neuromuscular system. *Neurosci Lett* 2020, 722: 1-5.
58. Tsutsumi YM, Horikawa YT, Jennings MM, Kidd MW, Niesman IR, Yokoyama U, Head BP, Hagiwara Y, Ishikawa Y, Miyanohara A. Cardiac-specific overexpression of caveolin-3 induces endogenous cardiac protection by mimicking ischemic preconditioning. *Circulation* 2008, 118: 1979-88.
59. Weinstein DM, Mihm MJ, Bauer JA. Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2000, 294: 396-401.
60. García-Cardena G, Martasek P, Masters BSS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC. Dissecting the Interaction between Nitric Oxide Synthase (NOS) and Caveolin Functional Significance of The NOS Caveolin Binding Domain In Vivo. *J Biol Chem* 1997, 272: 25437-40.
61. Jeong K, Kwon H, Min C, Pak Y. Modulation of the caveolin-3 localization to caveolae and STAT3 to mitochondria by catecholamine-induced cardiac hypertrophy in H9c2 cardiomyoblasts. *Exp Mol Med* 2009, 41: 226-35.

62. Volonte D, McTiernan CF, Drab M, Kasper M, Galbiati F. Caveolin-1 and caveolin-3 form heterooligomeric complexes in atrial cardiac myocytes that are required for doxorubicin-induced apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008, 294: 392-401.
63. Takaguri A, Kamato M, Satoh Y, Ohtsuki K, Satoh K. Effect of alteration of caveolin-1 expression on doxorubicin- induced apoptosis in H9c2 cardiac cells. *Cell Biol Int* 2015, 39: 1053-60.
64. Woodman SE, Park DS, Cohen AW , Cheung M, Chandra M, Shirani J, Tang B, Jelicks LA, Kitsis RN, Christ GJ. Caveolin-3 knock-out mice develop a progressive cardiomyopathy and show hyperactivation of the p42/44 MAP kinase cascade. *J Biol Chem* 2002, 41: 38988–97.
65. Sbaa E, Frérart F, Feron O. The double regulation of endothelial nitric oxide synthase by caveolae and caveolin: a paradox solved through the study of angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2005, 15:157-62.
66. Fridolfsson HN, Kawaraguchi Y, Ali SS, Panneerselvam M, Niesman IR, Finley JC, Kellerhals SE, Migita MY, Okada H, Moreno AL. Mitochondria-localized caveolin in adaptation to cellular stress and injury. *FASEB J* 2012, 26: 4637-49.
67. Roth DM, Patel HH. Role of caveolae in cardiac protection. *Pediatr Cardiol* 2011, 32:329-33.
68. Gazzo E, Sotgia F, Bruno C, Lisanti MP, Minetti C. Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases. *Eur J Med Genet* 2010, 18: 137-45.
69. Pradhan BS, Prószyński T. A Role for Caveolin-3 in the Pathogenesis of Muscular Dystrophies. *Int J Mol Sci* 2020, 19: 1-22.
70. Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Kohtz DS, Lisanti MP. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem* 1996, 271: 15160-5.
71. Catteruccia M, Sanna T, Santorelli FM, Tessa A, Giacopo RD, Sauchelli D, Verbo A, Monaco ML, Servidei S. Rippling muscle disease and cardiomyopathy associated with a mutation in the CAV3 gene. *Neuromuscul Disord* 2009, 19: 779-83.

72. Loftus IM, Thompson MM. The role of matrix metalloproteinases in vascular disease. *Vasc Med* 2002, 7: 117-33.
73. Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JR, Sawicki G, Schulz R. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 2002, 106: 1543-9.
74. Romanic AM, Harrison SM, Bao W, Burns-Kurtis CL, Pickering S, Gu J, Grau E, Mao J, Sathe GM, Ohlstein EH. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by targeted deletion of matrix metalloproteinase-9. *Cardiovasc Res* 2002, 54: 549-58.
75. Polegato BF, Minicucci MF, Azevedo PS, Carvalho RF, Chiuso-Minicucci F, Pereira EJ, Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MB, Matsubara BB. Acute doxorubicin-induced cardiotoxicity is associated with matrix metalloproteinase-2 alterations in rats. *Cell Physiol Biochem* 2015, 35: 1924-33.
76. Hou X, Han QH, Hu D, Tian L, Guo CM, Du HJ, Zhang P, Wang YS, Hui YN. Mechanical force enhances MMP-2 activation via p38 signaling pathway in human retinal pigment epithelial cells. *Graefes Arch Clin Ex Ophthalmol* 2009, 247: 1477.
77. Hao J, Du H, Li W, Liu F, Lu J, Yang X, Cui W. Anthocyanins protected hearts against ischemic injury by reducing MMP-2 activity via Akt/P38 pathways. *Am J Transl Res* 2016, 8: 1100-7.
78. Kandasamy AD, Chow AK, Ali MAM, Schulz. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc Res* 2010, 85: 413-23.
79. Laskowski K, Russell, RR. Uncoupling proteins in heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 2008, 5: 75-9.
80. Liu SS. Cooperation of a “reactive oxygen cycle” with the Q cycle and the proton cycle in the respiratory chain—superoxide generating and cycle mechanism in mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 1999, 31: 367-76.
81. Negre-Salvayre AHC, Carrera G, Cazenave R, Trolly M, Salvayre R, Penicaud L, Casteilla L. A role for uncoupling protein -2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J* 1997, 11: 809-15

82. Pecqueur CAGM, Gelly C, Levi-Meyrueis C, Couplan E, Collins S, Ricquier D, Bouillaud F, Miroux B. Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem* 2001, 276: 8705–12.
83. Tian XY, Ma S, Tse G, Wong WT, Huang Y. Uncoupling Protein 2 in Cardiovascular Health and Disease. *Front Physiol* 2018, 9: 1-13.
84. Nishi M, Ogata T, Cannistraci CV, Ciucci S, Nakanishi N, Higuchi Y, Sakamoto A, Tsuji Y, Mizushima K, Matoba S. Systems Network Genomic Analysis Reveals Cardioprotective Effect of MURC/Cavin-4 Deletion Against Ischemia/Reperfusion Injury. *J Am Heart Assoc.* 2019, 8: 1-106.
85. Ichikawa Y, Ghanefar M, Bayeva M, Wu R, Khechaduri A, Prasad SVN, Mutharasan RK, Naik TJ, Ardehali H. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *J Clin Invest* 2014, 124: 617-30.
86. Ellman GL. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch Biochem* 1958, 74: 443-50.
87. M Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978, 86: 271-8.
88. Luck H. Quantitative determination of catalase activity of biological material. *Enzymologia* 1954, 17: 31-40.
89. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988, 34: 497-500.
90. Walker MJ, Curtis, MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse, MJ, Yellon DM, Cobbe, SM, Coker SJ, Harness, JB, Harron DW. The lambeth conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction and reperfusion. *Cardiovasc. Res* 1988, 22: 447-55.
91. Polegato BF, Minicucci MF, Azevedo PS, Carvalho RF, Chiuso-Minicucci F, Pereira EJ, Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MB, Matsubara BB. Acute doxorubicin-induced cardiotoxicity is associated with matrix metalloproteinase-2 alterations in rats. *Cell Physiol Biochem* 2015, 35: 1924-33.

92. Bai P, Mabley JG, Liaudet L, Virag L, Szabo C, Pacher P. Matrix metalloproteinase activation is an early event in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncol Rep* 2004, 11: 505-8.
93. Kizaki K, Ito R, Okada M, Yoshioka K, Uchide T, Temma K, Mutoh K, Uechi M, Hara Y. Enhanced gene expression of myocardial matrix metalloproteinases 2 and 9 after acute treatment with doxorubicin in mice. *Pharmacol Res*, 2006, 53: 341-6.
94. Kim ES, Y-W Sohn YW, Moon A. TGF- β -induced transcriptional activation of MMP-2 is mediated by activating transcription factor (ATF) 2 in human breast epithelial cells. *Cancer Lett* 2007, 252: 147-56.
95. Ren Y, Guo F, Chen A, Deng R, Wang J. Involvement of MMP-2 in adriamycin resistance dependent on ERK1/2 signal pathway in human osteosarcoma MG-63 cells. *J Huazhong U Sci-Med* 2012, 32: 82-6.
96. Nogueira SS, Sousa MG, Gava FN, Rosa FA, Melo GD, Dittrich G, Machado GF, Camacho AA. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in rabbits with doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Pesqui Vet Bras* 2018, 38: 320-7.
97. Bugger HGC, Zechner C, Palmeri M, Russell KS, Russell RR. Uncoupling protein downregulation in doxorubicin-induced heart failure improves mitochondrial coupling but increases reactive oxygen species generation. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011, 67: 1381-8.
98. Murakami K, Mizushige K, Noma T. Perindopril effect on uncoupling protein and energy metabolism in failing rat hearts. *Hypertension* 2002, 40: 251-5.
99. Safari FBG, Shekarforoush S, Hekmatimoghaddam S, Anvari Z, Moghadam MF, Haiizadeh S. Expressional profile of cardiac uncoupling protein-2 following myocardial ischemia reperfusion in losartan- and ramiprilat-treated rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2014, 15: 209-17.
100. Emre YHC, Nubel T, Criscuolo F, Ricouier D, Cassard M. Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages. *Biochem. J* 2007, 402: 271-8.
101. Ishizawa MMK, Noma T, Namba T, Guo P, Murakami K. An antioxidant treatment potentially protects myocardial energy metabolism by regulating uncoupling

- protein 2 expression in a chronic beta-adrenergic stimulation rat model. *Life Sci* 2006, 78: 2974-82.
102. Gaussin V, Tomlinson, JE, Depre C, Engelhardt S, Antos CL, Takagi G, Hein L, Topper JN, Liggett SB, Olson EN, Lohse MJ, Vatner SF, Vatner DE. Common genomic response in different mouse models of β -adrenergic-induced cardiomyopathy. *Circulation* 2003, 108: 2926–33.
103. Bodyak NRD, Chen YS, Han Y, Bisping E, Pu WT. Uncoupling protein 2 modulates cell viability in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, 293: 829-35.
104. Hu C, Zhang X, Wei W, Zhang N, Wu H, Zhenguang M, Li L, Deng W, Tang Q. Matrine attenuates oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity via maintaining AMPK α /UCP2 pathway. *Acta Pharm Sin B* 2019, 9: 690-701.
105. Wang GWKJ, Kang YJ. Metallothionein inhibits doxorubicin -induced mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in cardiomyocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2001, 298: 461–8.
106. Thompson KL, Rosenzweig BA, Zhang J, Knapton AD, Honchel R, Lipshultz SE, Retief J, Sistare FD, Herman EH. Early alterations in heart gene expression profiles associated with doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010, 66: 303–14.
107. Teshima Y, Akao M, Jones S. Uncoupling protein 2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ Res* 2003, 93: 192–200.
108. Richard D, Clavel S, Huang Q, Sanchis D, Ricquier D. Uncoupling protein 2 in the brain: distribution and function. *Biochem. Soc. Trans* 2001, 29: 812–7.
109. Blanc J, Alves-Guerra MC, Esposito B, Rousset S, Gourdy P, Ricquier D, Tedgui A, Miroux B, Mallat Z. Protective role of uncoupling protein 2 in atherosclerosis. *Circulation* 2003, 107: 388–90.
110. Duval C, Negre-Salvayre A, Dogilo A, Salvayre R, Penicaud L, Casteilla L. Increased reactive oxygen species production with antisense oligonucleotides directed against uncoupling protein 2 in murine endothelial cells. *Biochem. Cell Biol* 2002, 80: 757–64.

111. Ichikawa Y, Zemljicharf AE, Zhang Z, McKirnan MD, Manso AM, Ross RS. Modulation of caveolins, integrins and plasma membrane repair proteins in anthracycline-induced heart failure in rabbits. *PLoS ONE* 2017, 12: 1-18.
112. Cao C, Zhang Y, Weisleder N, Ferrante C, Wang X, Lv F, Zhang Y, Song R, Hwang M, Jin L, Guo J, Peng W, Li G, Nishi M, Takeshima H, Ma J, Xiao RP. MG53 constitutes a primary determinant of cardiac ischemic preconditioning. *Circulation* 2010, 121: 2565-74.
113. Horikawa YT, Panneerselvam M, Kawaraguchi Y, Tsutsumi YM, Ali SS, Balijepalli RC, Murray F, Head BP, Niesman IR, Rieg T. Cardiac-specific overexpression of caveolin-3 attenuates cardiac hypertrophy and increases natriuretic peptide expression and signaling. *J Am Coll of Cardiol* 2011, 57: 2273-83.
114. Tsutsumi YM, Horikawa YT, Jennings MM, Kidd MW, Niesman IR, Yokoyama U, Head BP, Hagiwara Y, Ishikawa Y, Miyanoara A. Cardiac-specific overexpression of caveolin-3 induces endogenous cardiac protection by mimicking ischemic preconditioning. *Circulation* 2008, 118: 1979-88.
115. Horikawa YT, Patel HH, Tsutsumi YM, Jennings MM, Kidd MW, Hagiwara Y, Ishikawa Y, Insel PA, Roth DM. Caveolin-3 expression and caveolae are required for isoflurane-induced cardiac protection from hypoxia and ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2008, 44: 123-30.
116. Nishi M, Ogata T, Nakanishi N, Kasahara T, Maruyama N, Higuchi Y, Matoba S. MURC/Cavin-4 deficiency reduces infarct size and preserves cardiac function in a mouse model of ischemia-reperfusion injury. *Am Heart Assoc* 2016, 134: 1-5.
117. Ogata T, Naito D, Nakanishi N, Hayashi YK, Taniguchi T, Miyagawa K, Hamaoka T, Maruyama N, Matoba S, Ikeda K. MURC/Cavin-4 facilitates recruitment of ERK to caveolae and concentric cardiac hypertrophy induced by α 1-adrenergic receptors. *PNAS* 2014, 10: 38811-6.
118. Galbiati F, Volonté D, Engelman JA, Scherer PE, Lisanti MP. Targeted Down-regulation of Caveolin-3 Is Sufficient to Inhibit Myotube Formation in Differentiating C2C12 Myoblasts Transient Activation of p38 Mitogen- Activated Protein Kinase is Required For Induction of Caveolin-3 Expression and Subsequent Myotube Formations. *J Biol Chem* 1999, 274: 30315-21.

119. Shen J, Lee W, Chen J, Yang D. Caveolin-3 peptide protects cardiomyocytes from apoptotic cell death via preserving superoxide dismutase activity and inhibiting caspase-3 activation under hypoxia-reoxygenation. *Am J Biomed Sci* 2011, 3: 126-44.
120. Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM. The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends Cardiovasc Med* 2005, 15: 69-75.
121. Das M, Das S, Wang P, Powell S, Das D. Caveolin and proteasome in tocotrienol mediated myocardial protection. *Cell Physiol Biochem* 2008, 22: 287-94.
122. Willette RN, Eybye ME, Olzinski AR, Behm DJ, Aiyar N, Maniscalco K, Bentley RG, Coatney RW, Zhao S, Westfall TD. Differential effects of p38 mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase 2 inhibitors in a model of cardiovascular disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2009, 330: 964-70.
123. Guo RM, Xu WM, Lin JC, Mo LQ, Hua XX, Chen PX, Wu K, Zheng DD, Feng JQ. Activation of the p38 MAPK/NF- κ B pathway contributes to doxorubicin-induced inflammation and cytotoxicity in H9c2 cardiac cells. *Mol Med Rep* 2013, 8: 603-8.
124. Poizat C, Puri PL, Bai Y, Kedes L. Phosphorylation-dependent degradation of p300 by doxorubicin-activated p38 mitogen-activated protein kinase in cardiac cells. *Mol Cell Biol* 2005, 25: 2673-87.
125. Kyoji S, Otani H, Matsuhisa S, Akita Y, Tatsumi K, Enoki C, Fujiwara H, Imamura H, Kamihata H, Iwasaka T. Opposing effect of p38 MAP kinase and JNK inhibitors on the development of heart failure in the cardiomyopathic hamster. *Cardiovasc Res* 2006, 69: 888-98.
126. Manxiang Li, Georgakopoulos D, Lu G, Hester L, Kass DA, Hasday J, Wang Y. p38 MAP kinase mediates inflammatory cytokine induction in cardiomyocytes and extracellular matrix remodeling in heart. *Circulation* 2005, 111:2494-502.
127. Kang YJ, Zhou ZX, Wang GW, Buridi A, Klein JB. Suppression by metallothionein of doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 2000, 275: 13690-8.

128. Barancik M, Htun P, Strohm C, Kilian S, Schaper W. Inhibition of the cardiac p38-MAPK pathway by SB203580 delays ischemic cell death. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000, 35: 474-83.
129. Yamaguchi O, Watanabe T, Nishida K, Kashiwase K, Higuchi Y, Takeda T, Hikoso S, Hirotani S, Asahi M, Taniike M. Cardiac-specific disruption of the c-raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis. *J Clin Investig* 2004, 114: 937-43.
130. Xiao YT, Yana WH, Cao Y, Yan JK, Cai W. p38 MAPK Pharmacological inhibitor SB203580 alleviates total parenteral nutrition-induced loss of intestinal barrier function but promotes hepatocyte lipoapoptosis. *Cell Physiol Biochem* 2017, 41: 623-34.
131. Sreekanth GP, Chuncharunee A, Sirimontaporn A, Panaampon J, Noisakran S, Yenchitsomanus P, Limjindaporn T. SB203580 Modulates p38 MAPK signaling and dengue virus induced liver injury by reducing MAPKAPK2, HSP27, and ATF2 Phosphorylation. *Plos One* 2016, 11: 1-26.
132. Su J, Cui X, Li Y, Mani H, Ferreyra GA, Danner RL, Hsu LL, Fitz Y, Eichacker PQ. SB203580, a p38 inhibitor, improved cardiac function but worsened lung injury and survival during Escherichia coli pneumonia in mice. *J Trauma* 2010, 68:1317-27.
133. Lee JC, Kassis S, Kumar S, Badger A, Adams JL. p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors--mechanisms and therapeutic potentials. *Pharmacol Ther* 1999, 82 : 389-97.
134. Özbey G, Dalaklıoğlu S, Özdem S, Uzun G. Erken Dönmdeki Doksorubisin-Fluoksetin Kardiyotoksitesinde Biyokimyasal Belirteçler. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2018, 16 : 25-31.
135. Demir F, Narin F, Akgün H, Üzüm K, Saraymen R, Baykan A, Köklü E. Doksorubisin ile oluşturulmuş deneysel kardiyotoksiste üzerine melatoninin etkisi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Derg* 2004, 47: 260-8.
136. Kim Y, Ma A, Kitta K, Fitch SN, Ikeda T, Ihara Y, Simon AR, Evans T, Suzuki YJ. Anthracycline induced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis. *Mol Pharmacol* 2003, 63: 368–77.

137. Jeyaseelan R, Poizat C, Baker RK, Abdishoo S, Isterabadi LB, Lyons GE, Kedes L. A novel car-diac-restricted target for doxorubicin. CARP, a nuclear modulator of gene expression in cardiac progenitor cells and cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1997, 272: 22800-8.
138. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, White HD. Clarifying the proper definitions for type 2 myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol* 2018, 71: 1291.
139. Cardinale D, Biasillo G, Salvatici M, Sandri MT, Cipolla CM. Using biomarkers to predict and to prevent cardiotoxicity of cancer therapy. *Expert Rev. Mol. Diagn* 2017, 17: 245–56.
140. Herman E, Lipshultz SE, Rifai N. Use of cardiac troponin T levels as an indicator of doxorubicin induced cardiotoxicity. *Cancer Res* 1998, 58: 195-7.
141. Garikipati V, Prakash P, Tripathy N, Dikshit M, Nityanand S. Establishment of a rat model of myocardial infarction with a high survival rate: A suitable model for evaluation of efficacy of stem cell therapy. *J Stem Cells Regen Med* 2009, 1: 30-6.
142. Kesik V, Honca T, Gulgun M, Uysal B, Kurt YG, Caycı T, Babacan O, Gocgeldi E, Korkmazer N. Myostatin as a marker for doxorubicin induced cardiac damage. *Ann Clin Lab Sci* 2016, 1: 26-31.
143. Cui H, Schroering A, Ding HF. p53 Mediates DNA Damaging Drug-induced Apoptosis through a Caspase-9-dependent pathway in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Mol Cancer Ther* 2002, 1 : 679-86.
144. Suliman HB, Carraway MS, Ali AS, Reynolds CM, Welty-Wolf KE, Piantadosi CA. The CO/HO system reverses inhibition of mitochondrial biogenesis and prevents murine doxorubicin cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 2007, 117 : 3730-41.
145. Fan GC, Zhou X, Wang X, Song G, Qian J, Nicolaou P, Chen G, Ren X, Kranias EG. Heat Shock Protein 20 Interacting With Phosphorylated Akt Reduces Doxorubicin-Triggered Oxidative Stress and Cardiotoxicity. *Circ Res* 2008, 103:1270-9
146. Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *J. Med* 1998, 339: 900–5.

147. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004, 56: 185–229.
148. Chatterjee K, Jianqing Z, Honbo N, Karlner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology* 2010, 115: 155–62.
149. Zordoky B, Mohamed AA, Aboutabl, ME, El-Kadi AO. Acute doxorubicin cardiotoxicity alters cardiac cytochrome P450 expression and arachidonic acid metabolism in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010, 242: 38-46.
150. Wang S, Leonard, SS, Ye J, Ding M, Shi X. The role of hydroxyl radical as a messenger in Cr(VI)-induced p53 activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000, 279: 868–75.
151. Adachi T, Nagae T, Ito Y, Hirano K, Sugiura M. Relation between cardiotoxic effect of doxorubicin and superoxide anion radical. *J. Pharmacobiodyn* 1983, 6: 114–23.
152. Reddy P, Reddy PS, Rao MR. Studies on the effect of doxorubicin on MDA, NO₂, NO₃, Se-GSH peroxidase and SOD levels in albino rat tissues. *Afr J Biotechnol* 2007, 6 : 2303-9.
153. Aniss HA, Metwally A, Sayed IH, AdLy C. Doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice; protection by silymarin. *Egyptian J Hosp Med* 2012, 48: 383– 93.
154. Yu X, Cui L, Zhang Z, Zhao Q, Li S. α -Linolenic acid attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats through suppression of oxidative stress and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* 2013, 45: 817–26.
155. Özdoğan K, Taşkın E, Dursun N. Protective effect of carnosine on adriamycin-induced oxidative heart damage in rats. *Anadolu Kardiyol Derg* 2011, 1: 3-10.
156. Swamy AHM, Wangikar U, Koti BC, Ronad PM. Cardioprotective effect of ascorbic acid on doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats. *Indian J Pharmacol* 2011, 43: 507-11.
157. Patel MK, Mehta AA. Beneficial effect of capsaicin on acute doxorubicin induced cardiotoxicity In Mice : Possible Role Of Oxidative Stress. *World J Pharm Pharm Sci* 2016, 2: 848-65.

158. Al-Harathi S, Alarabi O, Ramadan W, Alaama M, Al-Kreathy H. Amelioration of doxorubicin induced cardiotoxicity by resveratrol. *Mol Med Rep* 2014, 10: 1455-60.
159. Kwatra M, Kumar V, Jangra A, Mishra M, Ahmed S, Ghosh P, Vohora D, Khanam R. Ameliorative effect of naringin against doxorubicin-induced acute cardiac toxicity in rats. *Pharm Biol* 2016, 54: 637-47.
160. Alsowayan NS, Mahmoud NH. The Protective Effect of Grape Seed Extract on Cardiotoxicity Induced by Doxorubicin Drug in Male Rats. *Adv Biosci Biotechnol* 2014, 5: 1078-89.
161. Xin YF, Zhou GL, Deng ZY. Protective effect of Lycium barbarum on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Phytother Res* 2007, 21 : 1020-4.
162. Jensen RA, Acton EM, Peters JH. Doxorubicin cardiotoxicity in the rat: comparison of electrocardiogram, transmembrane potential, and structural effects. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984, 6: 136- 200.
163. Kelishomi RB, Ejtemaemehr S, Tavangar SM. Morphine is protective against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rat. *Toxicology* 2008, 243 : 96-104.
164. Elberry AA, Abdelnaim AB, Abdelsattar EA. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 2010, 48: 1178-84.
165. Ashour OM, Elberry AA, Alahdal AM, Almohamadi AM, Nagy AA, Abdelnaim AB, Abdelsattar EA, Mohamadin AM. Protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against doxorubicin-induced oxidative cardiotoxicity in rats. *Int Med J Exp Clin Res* 2011, 17: 110-5.
166. Saeed NM, Elnaga RN, Elbakly WM. Epigallocatechin-3- gallate pretreatment attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a mechanistic study. *Biochem Pharmacol* 2015, 95: 145-55.
167. Jiang B, Zhang L, Wang Y. Tanshinone IIA sodium sulfonate protects against cardiotoxicity induced by doxorubicin in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology* 2009, 47 : 1538-44.
168. Vanacker SA, Kramer K, Grimbergen JA. Monohydroxyethylrutoside as protector against chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Br J Pharmacol* 1995, 115: 1260-4.

169. Naidu MU, Kumar KV, Mohan IK, Sundaram C, Singh S. Protective effect of Ginkgo biloba extract against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Indian J Exp Biol* 2002, 40: 894-900.
170. Mantawy EM, Elbakly WM, Esmat A, Badr AM, Eldemerdash E. Chrysin alleviates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Eur J Pharmacol* 2014, 728: 107-18.
171. Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb JA. A clinicopathologic analysis of Adriamycin cardiotoxicity. *Cancer* 1973, 32: 302-14.
172. Gilladoga AC, Manuel C, Tan CT, Wollner N, Sternberg SS, Murphy ML. The cardiotoxicity of Adriamycin and daunomycin in children. *Cancer* 1976, 37: 1070-8.
173. Praga C, Beretta G, Vigo PL. Adriamycin cardiotoxicity: A survey of 1273 patients. *Cancer Treat Rep* 1979, 63: 827-34.
174. Bristow MR, Billingham ME, Mason JW, Daniels JR. Clinical spectrum of anthracycline antibiotic cardiotoxicity. *Cancer Treat Rep* 1978, 62: 873-9.
175. Kutanis E. Çocukluk çağı akut lösemilerinde geç dönem antrasiklin kardiyotoksitesinin ekokardiyografi, elektrokardiyografi ve 24 saatlik holter monitörizasyonu ile değerlendirilmesi. İstanbul Bakırköy Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, İstanbul: Sağlık Bakanlığı, 2009.
176. Warpe VS, Mali VR, Arulmozhi S, Bodhankar SL, Mahadik KR. Cardioprotective effect of ellagic acid on doxorubicin induced cardiotoxicity in wistar rats. *J Acute Med* 2015, 5: 1-8.
177. Dursun N, Taşkın E, Öztürk F. Protection against adriamycin-induced cardiomyopathy by carnosine in rats: role of endogenous antioxidants. *Biol Trace Elem Res* 2011, 143: 412-24.
178. Olson RD, Mushlin PS, Brenner DE, Fleischer S, Cusack BJ, Chang BK, Boucek RJ. Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, 85: 3585-9.

179. Takeishi Y, Huang Q, Abe J, Che W, Lee JD, Kawakatsu H. Activation of mitogen-activated protein kinases and p90 ribosomal S6 kinase in failing human hearts with dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res* 2002, 53: 131–7.
180. Bellahcene M, Jacquet S, Cao XB, Tanno M, Haworth RS, Layland J, Kabir AM, Gaestel M, Davis RJ, Flavell RA, Shah AM, Avkiran M, Marber MS. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase contributes to the early cardiodepressant action of tumor necrosis factor. *J. Am. Coll. Cardiol* 2006, 48: 545–55.
181. Nemoto S, Sheng, Z, Lin A. Opposing effects of Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinases on cardiomyocyte hypertrophy. *Mol. Cell. Bio* 1998, 18: 3518–26.
182. Liao P, Wang SQ, Wang S, Zheng M, Zheng M, Zhang SJ. p38 Mitogen-activated protein kinase mediates a negative inotropic effect in cardiac myocytes. *Circ. Res* 2002, 90: 190–6.
183. Martin ED, Bassi R, Marber MS. p38 MAPK In cardioprotection-are we there yet?. *J. Pharmacol* 2015, 172: 2101–13.
184. Zhao WJ, Wei SN, Zeng XJ, Xia YL, Du J, Li HH. Gene expression profiling identifies the novel role of immunoproteasome in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicology* 2015, 333: 76-88.
185. Kiessling C, Reichelt M, Headrick J, Ashton K. Transcriptional analysis of caveolin and cavin expression in the normoxic and post-ischaemic ageing mouse heart. *Heart Lung Circ* 2013, 22: 234.

EKLER

EK-1. Etik kurul belgesi



Ek-2. Özgeçmiş

ADRES

İnönü Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Malatya/Türkiye

EĞİTİM BİLGİLERİ

2013-2021: Doktora; İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı (Danışman: Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ)

Tez başlığı: Doksorubisin Kardiyotoksitesinde p38 MAP Kinaz İnhibitörünün Moleküler Genetik ve Biyokimyasal Parametrelere Etkisi

2010-2013: Yüksek Lisans; İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı (Danışman: Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ)

Tez başlığı: Ratlarda Kronik Böbrek Yetmezliği Modelinde Kaveolin Gen Ekspresyonu

2001-2005: Lisans; İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü

EK-4. MMP-2 gen dizilimi

Sıçan *MMP-2* geninin 3053 baz çiftinden oluşan mRNA dizilimi ve primerlerin dizilimdeki yerleri gösterilmektedir. Gen Bankası Kayıt No: NM_031054.2 (951-1001)
71bp

```
1  ctggcgctctgcccgcccttgtttccgctgcatccagacttccccgggtggctggaggctc
61  tgtgtgcatccagaactttagatatacaaagggattactaggacctgcaagcaccgagc
121  ccgtggtgctgactggtagctgggatcccggtatgagaccctgagccccggagaagctgag
181  gcaattgagtaaaggggtctcagaacccgtggagagcaggcgcagccccgggtggacccc
241  agggcacagccagcgacctcagggtgacacggagccccgggagcgcaaggatggaggca
301  cgattggtctggggagtgtcgtcgccctctgctgggttctctgctcctgtgtgtcctg
361  ctgggccacgccatcgtgcaccgctgcccatcatcaagtccccggcgatgtctcccc
421  aaaacagacaaagagttggcagtgcaatacctgaacactttctatggctgcccgaaggag
481  agttgcaacctctttgtgctgaaggacacctcaagaagatgcagaagttctttgggctg
541  cccagacaggtgaccttgaccagaacaccatcgagaccatgcggaaaccaagatgtggc
601  aaccagatgtggccaactacaacttcttccccgcaagccaagtgggacaagaatcag
661  atcacatacaggatcattggttacacacctgacctggaccctgagacagtggatgatgcc
721  tttgctcgggccttaaagatggagcgcacgtaactccaactacgctttttctcgaatccat
781  gatggggaagctgacatcatgatcaactttggtcgatgggagatggagatggataccca
841  tttgacggcaaggacggactcctggcacatgcctttgccccgggactggtgtttggggga
901  gattctcactttgatgacgatgagctgtggactctaggagaaggacaagtgggtccgagta
961  aagtatgggaacgctgatggcagtagtcaagttccccttcttgtttaatggtcgggaa
1021  tacagcagctgcacagacactggccggagtgaaggcttctctgggtgttccaccacgtac
1081  aactttgagaaggacggcaaatatggcttctgtccccacgaagccttgtttaccatgggt
1141  ggcaatggagatggacagccctgcaagttcccgttccgcttccagggcacctcttacaac
1201  agctgtaccaccgagggccgtacagacggctaccgctggtgtggcaccaccgaggattat
                                         >>>>>>>>>>>>>>>>>>
1261  gaccgggataagaagatggattctgccagagactgctatgtccactgtgggtggaaat
                                         >>>>                                   <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
1321  tcagaagggtgccccatgtgtcttccccctcacttttctgggcaacaagtatgagagctgc
1381  accagcgctggccgaagcagtgcaaggtgtgggtgtgcaaccacaaccaactacgatgat
1441  gaccggaagtggggcttctgtcccgaccaaggatatagcctattccttgtggcagcccat
1501  gagttcggccatgccatgggctggaacactcacaggacctggagctttgatggccctt
1561  atctacacctacaccaagaacttccgactatccaatgatgacatcaaggggatccaggag
1621  ctctatgggcccctcccctgatgctgatactgacactggtactggaccacgcctacactg
1681  ggacctgtcactcccagatctgcaagcaagacattgtctttgatggcattgctcagatc
1741  cgtggtgagatcttcttctcaaggatcggtttatttggcgagactgacaccacgtgac
1801  aagccacaggtcccttctgtgtggccacattctggcctgagctccccgaaaagattgat
```

1861 gccgtgtacgaggccccacaggaagagaaggctgtgttcttcgcagggaaatgagtactgg
1921 gtctattctgccagcactttggaaagaggataccccaagccactgaccagcctgggttta
1981 cccctgatgtccagcaagtagacgctgcctttaactggagtaagaacaagaagacatac
2041 atcttttctggggacaagtcttgagatacaatgaagtaagaagaaaatggaccccggt
2101 ttcccgaagctcatcgcagactcctggaatgccatccctgataacctggatgcagtcgtg
2161 gacctgcaggggtggtggtcacagctatcttcaagggtgcttattacctgaagttggag
2221 aaccaaagtctgaagagtggaagtttggaaagcatcaaatcggactggctgggtgctga
2281 gctggccctgttctgacgggccgtacaatcttcaactgcacaccgggcccaggaccctggg
2341 gaaggacgtgaagaggcctggttaccctgtctcctgctctgtagttaatcagccttctcc
2401 ttcacctggtgatttcagatttaagagggtggcttctttttgtgccc aaagaaagggtgc
2461 tgaccgtatccctcccaggtgctactttctcccgccacc caaggggatgcttggatatt
2521 cacaatgcagccctcctttgggctgccctggtgctccacacttcaggttctccagcatga
2581 atgatcttttgtgggttacagcacactcagagtcaacagagactgtcttaggagggcact
2641 ggtggctcaacagcctggcacagggcagtgggatacaggtgtgccaaggtggaaaccaga
2701 gacatctggtgtctcccttacggctgccctggcacttttactacttttagctgtttgcttt
2761 gtttggcctttgctgtttggttcaaccttttcagttttccaccacactgcatttttctca
2821 ccgaaggactccggttgtcggacatcactgcacgatgcacatctggcctggcctatggatgg
2881 ctccccctcctcactttgtgtagaagcaactccagtcacttccctccactggttggaggaga
2941 accaagtcacatggcttctcctgctcagccttcttctccttcccttaacagttccccatggg
3001 aaatggcaaaaagtataaataaaggcaccctttgagtggcaaaaaaaaaaaaaa

>>>>> İleri primer

<<<<<< Geri primer

EK-5. *Kavin-4* gen dizilimi

Sıçan *Kavin-4* geninin 1089 baz çiftinden oluşan mRNA dizilimi ve primerlerin dizilimdeki yerleri gösterilmektedir. Gen Bankası Kayıt No: NM_001107931.2 (384-500) 117bps

```

1  atggaacacaatggatctgcttcaaagtctggtaaaaatccaccagaaccgattgtcaagt
61  gtgactgaagatgaagaccaggacgcagctctcacaattgtgactgtgctggacaggggtg
121 gccaccgtcgtggacagcgtgcaggcaagccagaagagaatcgaggagagacacagagag
181 atggggaacgccatcaagtctgtccagatagacctgctgaagctctcacaatcacacagc
241 aacacgggtacgttgtaacaagctgtttgagaagaccggaaagtcaagctcacatt
301 aaagatgtgaaggccccggtagagaagcaacaggttcgagtaaccaaagtcgaaaccaag
361 caagaagaataatgaagaagaacaagttccgcgtgtaattcttcaggaggatgttccc
      >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
421 tgccccgcatccctgtctgttgtaaaagacagaagcctgccggagaacgaggaggaagct
481 gaggaagtcttcgatcccccgatcgcgtctctcatcggatgaagaatactatggtgaagaa
      <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
541 agcagatctgccaggcttagaaaagtcaggcaaagagcacatcgatcatattaagaaggca
601 ttttccaaaagaaaacatgcagaagacgcggcagaattttgataagaaagtgagtggaatt
661 agaaccaggatagttacacctgagagaagagagaggctgagggcagtcaggagagagggctg
721 aggcagtcgggggagaggctgagggcagtcgggggaaagatttaagaaatcgatctcaaat
781 gccaccctccaaggaagcttttaagatccggagccttagaaaaccgaaggaccaccaag
841 gcagaaggccaggaggtagacagggggatgggggtggacatcatctcaggtagcctggct
901 ctggggcccatccatgagttccactctgatggggtcagtgaaacagaaaaggagggtgacc
961 aaagtagggtacattccccaagaggaggggaccccccaacgcctgagcctttgaagggtg
1021 acctttaaacctcaggtgagagtagaggatgacgagtcactcctgttgaattaaagcag
1081 tcctcatag
```

>>>>> İleri primer

<<<<<< Geri primer

EK-6. Kaveolin-3 gen dizilimi

Sıçan *Kaveolin-3* geninin 1380 baz çiftinden oluşan mRNA dizilimi ve primerlerin dizilimdeki yerleri gösterilmektedir. Gen Bankası Kayıt No: NM_019155.2 (803-862) 60 bps

```
1  gcatgctgggtggggcctatthtagccggcaggggcaccagtctggagaccctaagcttgg
61  tctttctgccccaggactgtcaacaataccagccacaagattctgatctcctcccgaagg
121 tgccccagcctcacaatgatgaccgaagagcacacagatctggaggcacggatcatcaag
181 gacattcactgcaaggagatagacttgggtgaacagagacccaagaacatcaatgaggac
241 attgtgaagggtgattttgaagatgtgattgCGgagcccgagggcacttacagcttcgat
301 ggCGtgtgagggtgagctacaccactttcaccgtctccaagtactggtgctaccgctg
361 ctgtctacactgctgggtgttccactggccctgctctggggattcctgtttgctgtatc
421 tccttctgccacatctgggccgtggtgcctgcattaagagctacctgattgagatccag
481 tgcattcagccacatctactcactgtgtatccgcaccttctgcaaccgctctttgCGca
541 ctgggcccaggctctgcagcaacattaagggtggtgctgCGaagggaaggctaaagccgggct
601 gggctgtgggaaggctggcgaggggaataggGCCaggtgtaccccattggctctgctc
661 cacatgggctgctggcgagctcatgcttttaagattctcctcagttccacctcaaaatgg
721 gaggatcaggtgcaggggagccaaaaggaaaagacagcccaggtggaactgctcagcc
781 taccatgatccccagcgaccctgCCTgagcagaggggttCCTtaagaggcagctatcacia
>>>>>>>>>>>>>>>>>>
841 ggctttgCGatcacatgtactgtaagagcaciaaccaaccagctcttctagaggggtag
<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
901 ccCGtctcctcatgctagggagagcaagcgggtgactGCCagcatgaggaagggtgctgcaa
961 taaagggtttcgctGCaccaggaacactatgctctgtgtctgtaagggtggttgtgtgt
1021 cttttctagttctgaaaccagaaacttcagttggtcctctgcaaatgaaaaccagaa
1081 ctaagttttgttccttcaggattctacttgtttgctgggcataaataagggtttccata
1141 tgaggaaattgtttcaaatgacttctgctgtctctgaggcagctgagggtggactgaggg
1201 cagggtagcatccccgggcactgctgaaaatgggcccacttcagacccccagaggaatc
1261 ccCGctctggtcagacacggagcgggaaacacactggcctttccatgcagcttgtgCG
1321 caccaccagccgtaataaacacattgaatgagagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

>>>>> İleri primer

<<<<<< Geri primer

EK-7. UCP-2 gen dizilimi

Sıçan *UCP-2* geninin 1575 baz çiftinden oluşan mRNA dizilimi ve primerlerin dizilimdeki yerleri gösterilmektedir. Gen Bankası Kayıt No:NM_AB010743.1 72 bps

```
1  atcgcttgcttcttgggagccaccgcccgtcggacctagccgtctgcactcctgtgt
61  tctcctgtgtattctcctgcggtocggacacaaatagtagatctttaagtgtttcgtctc
121 ccagacattttctatgggaaatcaaggggatcaggccatgatagccactggcagcttga
181 agaacgggacacctttagagaagcttgatcttggaggcctcagcgtgagacctcaaagca
241 ccctcccgactccggcagagtctcctctgtctcgtcttgacgattgaaggccccactgct
301 tcagtttttctccatcttctgggaggttagcaggaagtcagaatcatggttggtttcaagg
361 ccaccgatgtgccccccacagccaccgtgaagttcctggggctgggacagcagcctgta
421 ttgcagatctcatcactttccctctagacaccgccaagtccggctgcagatccaaggag
481 agagtcaagggttagcgcgaccgcccagcggcagtcaccgggcgtgctgggacca
541 tcctaaccatgggtgcgactgagggtccgpcagcctctacaatgggctggtcgccggcc
601 tacagcgccagatgagctttgctcctcgccattggcctctacgactctgtaaagcagt
661 tctacaccaagggctcagagcatgcaggcattgggagcgcctcctggcaggttagacca
721 caggtgccctggctgtggctgtggcccaacctacagatgtggtaaaggccgcttccagg
781 cccagggcccggctggcggtggtcggagataaccagagcactgtcgaagcctacaagacca
841 ttgcacgagaggaagggtccggggcctctggaaagggacctctccaatggtgccgaa
901 atgccattgtcaactgtactgagctgggtgacctatgacctcatcaaagatactctcctga
961 aagccaacctcatgacagacgacctcccttgccacttcacttctgcttcggggcgggct
1021 tctgaccaccgctcattgcctccccgcttgcctgtagtggtcaagacgagatatatgaactctg
1081 ccttggggcagtagccacagcgccggccactgtgacctgacctgctcggaggaggaggc
>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
1141 cccgaaccttctacaaggggttcatgccttccctccctcgtggtcctggaacgtag
<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
1201 taatgttgtcacctatgagcagctcaaaagggccctgatggctgcctatgaatcccggg
1261 aggacccttttgagcctctccagctgatgacctggacctgctccccattcctgcctg
1321 tctttctctcatcctctgcccagcccaacctcttcccatttcccacactccaactccc
1381 ttcccagctcatctccctataacctcctcagcaaggaggccttacctagcacatctcact
1441 atgcctcctcagcgaggaggcctgacccccgacctgacctcagtcctgctaacagtt
1501 aagcccaaatctttgctcctattcccagcccagcttagccagccttcgcccataaagca
1561 agctccaatgtaaaa
```

>>>>>> İleri primer

<<<<<<

Geri

primer