



**WİSTAR RATLARDA DOKSORUBİSİN İLE
İNDÜKLENEN KARDİYOTOKSİSİTE ÜZERİNE
KROSİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Sara Asaad Abdulkareem ALJUMAILI

**2021
YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Eyüp ALTINÖZ**

**WİSTAR RATLARDA DOKSORUBİSİN İLE İNDÜKLENEN
KARDİYOTOKSİSİTE ÜZERİNE KROSİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Sara Asaad Abdulkareem ALJUMAILI

**T.C.
Karabük Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında
Yüksek Lisans Tezi
Olarak Hazırlanmıştır**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Eyüp ALTINÖZ**

**KARABÜK
Haziran 2021**

Sara Asaad Abdulkareem ALJUMAILI tarafından hazırlanan “WİSTAR RATLARDA DOKSORUBİSİN İLE İNDÜKLENEN KARDİYOTOKSİSİTE ÜZERİNE KROSİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Eyüp ALTINÖZ

.....

Tez Danışmanı, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından Oy Birliği ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 10/06/2021

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)

İmzası

Başkan : Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ (İNÜ)

.....

Üye : Prof. Dr. Tahir KAHRAMAN (KBÜ)

.....

Üye : Doç. Dr. Eyüp ALTINÖZ (KBÜ)

.....

KBÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu, bu tez ile, Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Hasan SOLMAZ

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”

Sara Asaad Abdulkareem ALJUMAILI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

WİSTAR RATLARDA DOKSORUBİSİN İLE İNDÜKLENEN KARDİYOTOKSİSİTE ÜZERİNE KROSİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sara Asaad Abdulkareem ALJUMAILI

Karabük Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Eyüp ALTINÖZ

Haziran 2021, 78 sayfa

Antrasiklin glikozit antibiyotiklerinden biri olan doksorubisin (DOKS), meme kanseri, lösemi ve sarkom gibi hastalıklarda DNA interkalasyonuna neden olarak ve DNA replikasyonunu inhibe ederek çeşitli maligniteleri tedavi etmesi nedeniyle kemoterapötik bir ilaç olarak sıklıkla kullanılan bir ilaçtır. DOKS tedavisinin başlıca yan etkisi, antikanser tedavisinde uzun süreli uygulama sırasında ilacın klinik kullanımı için sınırlayıcı bir faktör olan doza bağlı kardiyotoksisitedir. DOKS kaynaklı toksisitenin neden olduğu ana kardiyotoksosite mekanizması bilinmemekle birlikte, DOKS, lipid peroksidasyonu, mitokondriyal DNA hasarı, apoptoz ve bozulan kalsiyum homeostazı dahil olmak üzere kalp dokusunda inflamasyonu ve oksidatif stresi artırır.

Mitokondride artan hem kalsiyum hem de reaktif oksijen türleri (ROS), lipid peroksidasyonuna ve oksidatif hasar ve kardiyomiyositlerin hücre zarında hasara oluşumuna yol açar. Ayrıca, DOKS tedavisinden sonra artan oksidatif stres, apoptotik sinyal yollarının aktivasyonuna katkıda bulunur ve miyositler de apoptotik hücre ölümüne yol açar. Miyokardiyal enfarktüs, kalp yetmezliği ve kardiyak disfonksiyonun miyokardiyal apoptoz ile ilişkili olduğu görülmektedir. DOKS'un birçok kanserde kemoterapötik bir ilaç olarak yüksek etkinliği nedeniyle, son çalışmalar DOKS ile birlikte fitokimyasallar veya ilaç kullanarak DOKS'un olumsuz kardiyak etkilerini önlemek ve tedavi etmekle ilişkilidir.

Geleneksel tıpta safran (*Crocus sativus* L.) uzun süredir gaz giderici, tonik, balgam söktürücü ve yatıştırıcı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, safranın kardiyovasküler bozukluklar, ürolojik enfeksiyonlar ve astım dahil olmak üzere çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kullanıldığı bildirilmektedir. Safranın en yaygın biyoaktif bileşenlerinden biri olan krosin, antioksidan, serbest radikal temizleyici, anti-kanser, antiinflamatuvar, antiaterosklerotik ve kardiyoprotektif etkiler gibi birçok farmakolojik özelliğe sahiptir. Suda çözünür karotenoid pigment olan krosinin yapısı, krosetin adı verilen ve safranın kırmızı renginden sorumlu olan bir polien dikarboksilik asidin mono ve diglikosil esterleridir. Bazı çalışmalar, krosinin kardiyoprotektif etkilerinin antioksidan enzimatik aktivitelerin ve kardiyak belirteçlerin düzenlenmesi ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Krosinin, anjiyojenik bir protein olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) düzeyini artırarak kardiyomiyositleri hipoksik hasara karşı koruduğunu göstermiştir.

Biz burada, Wistar albino ratlarda spesifik kardiyak biyobelirteçler, biyokimyasal parametreler, oksidatif stres belirteçleri, histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmelere dayanarak, DOKS ile kombine edilmiş krosinin kardiyotoksisite üzerindeki olası etkilerini ve DOKS kaynaklı kardiyotoksisite patogenezinin olası rolünü değerlendirmeyi amaçladık. Bu amaçla kırk rat dört gruba ayrıldı; (a) kontrol (15 gün süreyle ip yoluyla 1 ml / kg'lık dozda normal salin aldı), (b) Krosin (15 gün süreyle ip yoluyla 40 mg / kg / 24 saatlik dozda krosin aldı), (c) DOKS (altı enjeksiyonda ip yoluyla 2 mg / kg / 48 saat doz olarak, kümülatif doz 12 mg / kg) ve (d) DOKS + Krosin (DOKS'u ip yoluyla 2 mg / kg / 48 saat doz olarak altı enjeksiyon

uygulandı ve 15 gün süreyle 40 mg / kg / 24 saat ip dozunda krosin uygulandı). Çalışmamızın sonuçlarına göre DOKS uygulaması, lipid indekslerinde (trigliserid, düşük yoğunluklu lipoproteinler ve çok düşük yoğunluklu lipoproteinler) ve ayrıca kardiyak belirteçlerde (Kreatin kinaz-kas / beyin ve Kardiyak Troponin I) önemli artışlara neden olmuştur. Dahası, DOKS, oksidatif stres parametrelerinde (malondialdehit ve toplam oksidan seviyesi) önemli artışlara ve ayrıca antioksidan savunma sistemlerinde (glutasyon, süperoksit dismutaz, katalaz ve toplam antioksidan seviyesi) azalmaya neden oldu. Bu çalışma ayrıca, krosinin DOKS ile birlikte uygulanmasının, DOKS alan ratlarda lipid profilini ve biyokimyasal parametreleri önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir. Sonuçlar histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmelerle desteklenmiştir. Bütün bu veriler birlikte ele alındığında, sonuçlarımız krosinin DOKS ile tedavi edilen kanser hastalarında kardiyoprotektif bir ajan olabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Sözcükler : Krosin, Kalp Hasarı, Kreatin Kinaz, Troponin, Doksorubisin, Oksidatif Stres

Bilim Kodu : 1090

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECTS OF CROCIN ON DOXORUBICIN INDUCED CARDIOTOXICITY IN WISTAR RATS

Sara Asaad Abdulkareem ALJUMAILI

**Karabük University
Institute of Graduate Programs
Department of Medical Biochemistry**

Thesis Advisor:

Assoc. Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ

June 2021, 78 pages

Doxorubicin (DOX), one of the anthracycline glycoside antibiotic, is a frequently used as a chemotherapeutic drug owing to treat several malignancies in patients, such as breast cancer, leukemia, and sarcoma by causing DNA intercalation and inhibiting the DNA replication. The chief adverse effect of DOX treatment is dose depended on cardiotoxicity that is a limiting factor for clinical usage of the drug during long-term administration in anticancer therapy. Although the main mechanism of cardiotoxicity caused by DOX-induced toxicity is unknown, DOX raises inflammation and oxidative stress in heart tissue including lipid peroxidation, mitochondrial DNA damage, apoptosis as well as deteriorate calcium homeostasis.

Increased both calcium and reactive oxygen species (ROS) in mitochondria leads to generate lipid peroxidation and the formation of oxidative injury in cell membrane of cardiomyocytes.

Also, an increase oxidative stress which raised after DOX treatment contributes to the activation of apoptotic signaling pathways and leads to apoptotic cell death of myocytes. It seems that myocardial infarction, heart failure and cardiac dysfunction are associated with myocardial apoptosis. Due to the high effectiveness of DOX as a chemotherapeutic drug in many cancers, recent studies are associated with preventing and treating its adverse cardiac effects of DOX by using phytochemicals or drug along with DOX.

In traditional medicine, saffron (*Crocus sativus* L.) has been used for a long time as carminative, tonic, expectorant, and sedative. Also, it is reported that saffron is used to treat for several diseases including cardiovascular disorders, urological infections, and asthma. Crocin, one of the most common bioactive constituents of saffron, has many pharmacological properties, such as antioxidant, free radical scavenger, anti-cancer, anti-inflammatory, antiatherosclerotic and cardioprotective effects. The structure of crocin, water-soluble carotenoid pigment, is mono and diglycosyl esters of a polyene dicarboxylic acid, named crocetin and responsible for the red color of saffron. Some studies have reported that cardioprotective effects of crocin are associated with regulation of antioxidant enzyme activities and cardiac markers. It has shown that crocin protects for cardiomyocytes against hypoxic damage by increasing the level of vascular endothelial growth factor (VEGF), which is an angiogenic protein.

Here, we aimed to assess the possible effects of crocin combined with DOX on cardiotoxicity and the possible role of pathogenesis of DOX-induced cardiotoxicity, based on the specific cardiac biomarkers, biochemical parameters, oxidative stress markers, histopathological and immunohistochemical evaluations in Wistar albino rats. Forty rats were divided into four groups; (a) control (received normal saline as a dose of 1 ml/kg by ip for 15 days), (b) Crocin (received crocin as a dose of 40 mg/kg/24h by ip for 15 days), (c) DOX (received DOX as a dose of 2 mg/kg/48h by ip in six injection, cumulative dose 12 mg/kg), and (d) DOX+Crocin (received DOX as a dose of 2 mg/kg/48h by ip in six injection and crocin as a dose of 40 mg/kg/24h ip for 15 days). According to the present study, DOX administration caused significant increases in lipid indices (triglyceride, low-density lipoproteins and very low-density lipoproteins) as well as cardiac markers (Creatine kinase-muscle/brain and Cardiac

Troponin I). Moreover, DOX caused significant increases in oxidative stress parameters (malondialdehyde and total oxidant status) as well as decreases in antioxidant defense systems (glutathione, superoxide dismutase, catalase, and total antioxidant status). The present study also demonstrated that co-administration of crocin with DOX significantly ameliorated the lipid profile and biochemical parameters in rats receiving DOX. The results were supported by histopathological and immunohistochemical evaluations. Taken together, our results reveal that crocin might be a cardioprotective agent in cancer patients treated with DOX treated patients for cancer.

Key Words : Crocin, Myocard Injury, Creatine Kinase, Troponin, Doxorubicin
Oxidative Stress

Science Code : 1090

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Doç. Dr. Eyüp ALTINÖZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Histoloji ve immünohistokimyasal incelemeleri yaparak tezimin tamamlanmasında yardımcı olan Muğla Sıtkı KOÇMAN Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Hülya ELBE' ye teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmalarım esnasında maddi destek sağlayan Karabük Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: TYL-2020-2298) teşekkür ederim.

Sevgili aileme manevi hiçbir yardımı esirgmeden yanımda oldukları için tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	viii
TEŞEKKÜR.....	x
İÇİNDEKİLER	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	5
DOKSORUBİSİN.....	5
2.1. KİMYASAL YAPISI.....	6
2.2. TERAPÖTİK ETKİSİ.....	7
2.3. METABOLİZMASI.....	8
2.4. YAN ETKİLERİ	9
2.4.1. Nörotoksisite.....	10
2.4.2. Hepatotoksisite	10
2.4.3. Nefrotoksisite.....	10
2.5. DOKSORUBİSİNİN ETKİ MEKANİZMASI	11
2.6. DOKSORUBİSİNİN KARDİYOTOKSİK ETKİLERİ.....	12
2.7. FİTOKİMYASALLARIN KARDİYOPROTEKTİF MEKANİZMALARI..	13
2.7.1. Antioksidan ve Anti-inflamatuar Etkiye Sahip Fitokimyasallar	14
2.7.2. Anti-apoptik veya Sağkalımı Artırıcı Etkileri Olan Ajanlar.....	14
2.7.3. Fitokimyasalların Diğer Kardiyoprotektif Mekanizmaları.....	15

	<u>Sayfa</u>
BÖLÜM 3	16
SAFRAN (<i>Crocus sativus</i> , L.)	16
3.1. KROSİN	19
BÖLÜM 4	26
OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ	21
4.1. OKSİDATİF STRES VE REAKTİF OKSİJEN SEVİYELERİ	26
4.2. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ	23
4.2.1. Enzimatik Antioksidanlar	24
4.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	25
BÖLÜM 5	36
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	26
5.1. GEREÇLER	26
5.1.1. Kimyasal Malzemeler ve Kullanılan Yöntemler	26
5.2. YÖNTEMLER	26
5.2.1. Doksorubisin ve Krosin Hazırlanması.....	26
5.2.2. Ratların Temini ve Bakımı	27
5.2.3. Rat Deney Protokolü	27
5.2.4. Ratlardan Numune Alınması	28
5.2.5. Biyokimyasal Analizler	28
5.2.5.1. Numunelerin Hazırlanması	28
5.2.5.2. Oksidatif Stres Belirteç Analizi	29
5.2.5.3. Kardiyak Belirteçlerin Analizi	31
5.2.6. Histopatolojik Analiz.....	32
5.2.7. İmmünohistokimyasal Analiz	34
5.2.8. İstatistiksel Analiz	35
BÖLÜM 6	36
DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....	36
6.1. BİYOKİMYASAL BULGULAR	36
6.1.1. Oksidatif Stres Belirteçleri Düzeyleri.....	36

	<u>Sayfa</u>
6.1.1.1. Kalp Dokusu MDA ve GSH Düzeyleri	36
6.1.1.2. Kalp Dokusu SOD Aktivite Düzeyleri	37
6.1.1.3. Kalp Dokusu CAT Aktivite Düzeyleri	38
6.1.1.4. Kalp Dokusu TAS ve TOS Aktivite Düzeyleri.....	39
6.1.2. Kardiyak Belirteçleri Düzeyleri.....	41
6.1.2.1. Serum CK-MB Düzeyleri	41
6.1.2.2. Serum Troponin-I Düzeyleri.....	42
6.1.3. Serum Lipid Parametreleri Düzeyleri.....	43
6.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....	45
6.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR	47
6.3.1. TNF- α İmmünoreaktivitesi	47
6.3.2. Kaspaz-3 İmmünoreaktivitesi	48
6.4. TARTIŞMA.....	49
KAYNAKLAR	58
EK AÇIKLAMALAR ETİK KURUL İZİNİ	76
ÖZGEÇMİŞ	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Doksorubisinin kimyasal yapısı	6
Şekil 2.2. Doksorubisin-Nükleotit etkileşim diyagramı ve şeması.	11
Şekil 2.3. Doksorubisinin kardiyotoksik mekanizması	12
Şekil 3.1. <i>Crocus sativus</i> L.....	16
Şekil 3.2. Krosin, pikrokrosin ve safranal kimyasal yapısı.	17
Şekil 4.1. ROS'un oluşumu ve antioksidanlarla detoksifikasyonunu.	22
Şekil 4.2. HücreSEL ROS seviyeleri ve hücreler üzerindeki etkileri..	23
Şekil 6.1. Ortalama doku MDA ve GSH değerleri.....	37
Şekil 6.2. Ortalama doku SOD değerleri.....	38
Şekil 6.3. Ortalama doku CAT değerleri.....	39
Şekil 6.4. Ortalama doku TAS ve TOS değerleri.....	40
Şekil 6.5. Ortalama kan CK-MB değerleri.....	42
Şekil 6.6. Ortalama kan Troponin-I değerleri.	43
Şekil 6.7. Ortalama serum Lipid değerleri	44
Şekil 6.8. Kalbin histopatolojisini gösteren fotomikrograf	46
Şekil 6.9. Kalp dokusunda TNF- α immünohistokimyasal boyaması.....	47
Şekil 6.10. Kalp dokusunda Kaspaz-3 immünokimyasal boyaması	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 5.1. Hematoksilen&Eozin boyama protokolü.....	33
Çizelge 5.2. IHC boyama protokolü.	334
Çizelge 6.1. Ortalama doku Oksidan-Antioksidan parametrelerinin karşılaştırılması.	36
Çizelge 6.2. Ortalama doku TAS ve TOS değerlerinin karşılaştırılması.....	40
Çizelge 6.3. Ortalama kan CK-MB ve Troponin-I değerlerinin karşılaştırılması.....	41
Çizelge 6.4. Ortalama serum Lipid parametrelerinin karşılaştırılması.	44
Çizelge 6.5. Ortalama Histopatolojik hasar skoru.	45
Çizelge 6.6. TNF- α ve Kaspaz-3 immünreaktivitesi.....	49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

- Na_2HPO_4 : disodyumdihidrojen fosfat
 H_2O_2 : hidrojen peroksit
 Na_2EDTA : disodium etilendiamin tetraasetik asit
 O_2 : oksijen
 O_2^- : süperoksit
 HOCl : hipokloröz asit
 ONOO^- : peroksinitrit anyonu
 $\text{C}_{44}\text{H}_{64}\text{O}_{24}$: krosin
CPR : sitokrom P450 redüktaz

KISALTMALAR

- DOKS : Doksorubisin
MDA : Malondialdehit
TAS : Total Antioksidan Seviyesi
TOS : Total Oksidan Seviyesi
GSH : Redükte Glutasyon
SOD : Süperoksit Dismutaz
CAT : Katalaz
CK-MB : Kreatin Kinaz-MB
TNF- α : Tümor Nekroz Faktörü- α
ROS : Reaktif Oksijen Türleri
LDL : Düşük Ağırlıklı Lipoprotein
TL : Toplam Kolestrol
TAG : Triaçilgliserol
GR : Glutasyon Redüktaz
JNK : Jun-N-terminal kinaz
TNF- α : Tümor Nekroz Faktörü- α
GST : Glutasyon-S-Transferaz
LDL : Düşük Ağırlıklı Lipoprotein
SV : Sol Ventrikül
SVDd : Sol Ventrikül Sistolik Çap
MET : Mitokondriyal Elektron Taşınması
GP_x : Glutasyon Peroksidaz
MPO : Miyeloperoksidaz
NTF : Nötral Tamponlanmış Formalin
eNOS : Endotelyal Nitrik Oksid Sentaz
TBA : Tiyobarbitrik Asit
DTNB : Dithiobis-2 Nitrobenzoik Asit
BSA : Bovine Serum Albumin
Nrf2 : Nükleer Faktör Eritroid 2
TGF-b1 : Dönüştürücü Büyüme Faktörü-b1
ICRF-187: Deksrazoksan

RNS : Reaktif Azot Türleri
MMS : Metil Metan Sülfonat
Bcl-2 : Antiapoptotik Protein
Bax : Pro-apoptotik Protein

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Kanser, dünya çapında morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenidir. 2030 yılında kanser nedeniyle yaklaşık 13 milyon kişinin öleceği tahmin edilmektedir [1]. ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanmış 132 antikanser ilacı vardır [2]. Antrasiklinler şimdiye kadar geliştirilen en etkili ve yaygın kullanılan antikanser ilaçları arasındadır. Antrasiklinlerin sitotoksitesisi genellikle hücre zarı boyunca yayılma, DNA baz çiftleri arasında interkalasyon ve hedef topoizomerez II yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. Doksorubisin en eski antrasiklinlerden biridir ve yaygın olarak lösemi, Hodgkin lenfoma, mesane ve meme kanserlerini tedavi etmek için kullanılır [3, 4]. Doksorubisin, *Streptomyces peucetius* bakterileri tarafından üretilen antrasiklin bir antibiyotiktir ve ilk olarak 1969'da sitotoksik bir ilaç olarak kullanılmıştır [5].

Doksorubisin klinikte çok fazla kullanılmasına rağmen etki mekanizması halen tartışılmaktadır. Artan kanıtlar, bu ilacın çift kenarlı bir kılıç gibi olabileceği görüşünü desteklemektedir. Tedavide kullanılan doksorubisinin tümör hücrelerinde mitokondriyal yapı ve işlevi bozduğu kanıtlanmıştır. Bu hücre inhibisyon mekanizması, doksorubisinin tedaviden yıllar sonra bile geri dönüşsüz kardiyomiyopatiye ve konjestif kalp yetmezliği gibi birincil yan etkilerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır [6, 7]. Doksorubisinin toksik etkileri arasında kardiyomiyosit hasarı apoptotik ve nekrotik hücre ölümü bulunur. Kalp hastalığının şiddeti antikanser tedavisi sırasında biriken doksorubisin dozu ile bağlantılıdır [8].

Doksozubisin bir mitokondriyal toksindir ve mitokondriyal hasar doksozubisin kaynaklı kardiyak disfonksiyon ve hücre ölümünün merkezinde yer alır. Kardiyomiyositler, kasılma fonksiyonu ve hücrelerin hayatta kalması için yeterli ATP üretimi sağlamak için çok sayıda sağlıklı işlev gören mitokondri içermesi gerektirir. Süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve peroksinitrit gibi reaktif oksijen ve azot türlerinin doksozubisin kaynaklı aşırı üretiminin çeşitli moleküler yapı ve organelere zarar vererek doksozubisin kaynaklı akut kardiyomiyosit toksisitesinin ve hücre ölümünün ana nedeni olduğu ileri sürülmüştür [8, 9]. Ayrıca doksozubisin kaynaklı kardiyotoksitesinin patogenezinde antioksidanların azalmasının ve lipid peroksidasyonunun artmasının da rol oynadığı çeşitli çalışmalarda görülmüştür. Bu nedenle lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehitin de (MDA) patogeneze katkı sağladığı bilinmektedir. Doksozubisin kaynaklı kardiyotoksitesindeki en önemli etken oksidatif strestir. Doksozubisin verildikten birkaç saat sonra kalp mitokondriyal hasarın başladığı varsayılır. Bu nedenle doksozubisin kaynaklı oksidatif stresi azaltmak için yeni ilaçlar ve tedaviler araştırılmaktadır [10].

Tarih boyunca, bitkilerden ekstrakte edilen doğal ürünler, antikanser bileşikler olarak önemli bir rol oynamıştır. Bitkiler, baharatlar ve diğer sebzeler, yeni terapötikler ve bileşiklerin tasarımında yer almıştır. 2000 yıl önce 400 şifalı bitkinin faydalarından bahseden tıbbın babası Hipokrat, “gıdaların ilacınız olmasına izin verin ve ilacın gıdalarınız olmasına izin verin” diyerek bitkilerin hastalıklarda koruyuculuğuna dikkat çekmiştir [11, 12].

Fitokimyasalların kanser hücrelerindeki çoklu sinyal yolları aracılığıyla doğrudan veya dolaylı olarak hedefe etki ettikleri birçok çalışmada belgelenmiştir. Dahası, bu yeni moleküllerin toksik olmamaları, maliyetsiz olmaları, insidansı ve invazivliği azaltma gibi büyük avantajları vardır [11].

Safran ve ana bileşenleri geleneksel olarak farmasötik ajanlar olarak kullanılan başlıca fitokimyasallardandır [13]. Safranın ana bileşenleri; krosin (şekerler ile krosetin

esterleştirmesi ile türetilmiş), krosetin, pikrokrosin ve safranaldır, ancak safrandaki uçucu ve uçucu olmayan bileşiklerin 150'den fazla olduğu tahmin edilmektedir [11].

Safranal safranda en çok bulunan bileşendir ancak safranın bir çok faydalı etkilerinin birincil sorumlusu krosin olarak bilinmektedir [14]. Krosin safranın parlak kırmızı rengini içeren ve suda çözünen bir karotenoiddir. Krosin ($C_{44}H_{64}O_{24}$), kloroetin monoglikozil veya diglikosil polien esterlerinden oluşan bir dizi hidrofilik karotenoidin ortak bir adıdır [15].

Krosin sahip olduğu antiapoptotik, antiinflamatuvar, antioksidan gibi bir çok faydalı özelliğinden dolayı başlıca kanser ve nörodejenaratif hastalıklarda tedavi amaçlı kullanılmaktadır [11, 14, 15]. Krosin çeşitli moleküler mekanizmalar sayesinde kanserde kemo önleyici etkiler gösterir. Bu etkiler; DNA, RNA ve protein sentezinin down regülasyonu, serbest radikallerin azaltılması ve detoksifikasyonu, retinoidlere metabolik dönüşüm, topoizomeraz II aktivitesinin direkt veya indirekt düzenlenmesi, lektinlerle etkileşimler ve Human Telomeraz Katalitik Subünit Ekspresyonlarının down regülasyonudur [11, 16, 17]. Ayrıca hayvan modellerinde hematolojik, biyokimyasal ve patolojik parametreler açışından krosinin herhangi bir toksik etkisi görülmemiştir [15].

Krosinin anti-oksidan ve anti-inflamatuvar özellikleri bir çok hayvan modelinde ve hücre kültüründe kanıtlanmıştır. Krosinin ratlarda MDA seviyelerini azaltıp, glutatyon peroksidaz, glutatyon reduktaz, süperoksit dismutaz ve total antioksidan seviyeyi arttırarak kronik strese karşı koruyucu etki gösterdiğı görölmüştür [18]. Yine ratlarda ksantin oksidaz ve malondialdehit seviyelerini azaltarak beyni oksidatif strese karşı koruduğı görölmüştür [19]. P12 hücre kültür hattında, membran lipid peroksidasyonunu önlediğı ve iskemik stres aracılı nöronal hücre ölümünü Jun-N-terminal kinaz (JNK) yolağına bloke ederek ve glutatyonu arttırarak önlediğı görölmüştür [20, 21].

Tüm bu etkileri göz önüne alındığında krosinin, doksorubisin aracılı kardiyotoksisiteye karşı koruyucu etki göstereceği düşünülmektedir. Ancak, krosinin DOKS kaynaklı kardiyotoksisiteye karşı kardiyoprotektif etkinliği henüz araştırılmamıştır. Bu nedenle, bu çalışma DOKS kaynaklı miyokard toksisitesi olan Wistar rat modelinde krosinin olası kardiyoprotektif rolünü ve olası altta yatan mekanizmalarını ortaya çıkaracaktır.

Bu çalışmada kalp dokusunda lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA ile oksidatif bir belirteç olan dokunun total oksidan seviyesi (TOS) ve total antioksidan seviyesini (TAS), endojen bir non enzimatik antioksidan olan redükte glutatyon (GSH) seviyelerini ve enzimatik antioksidanlar olan süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktivitelerine bakıldı. Ayrıca alınan kan numunelerinden elde edilen serumda kardiyak hasarı gösteren kalbe spesifik kreatin kinaz (CK-MB) enzim ve kardiyak troponin düzeyleri ölçüldü. Ayrıca kalp dokusunda histopatolojik incelemeler yapıldı.

BÖLÜM 2

DOKSORUBİSİN

Doksorubisin (DOKS) antrasiklin temelli bir antibiyotik bileşiktir. Kemoterapide lösemiler, Hodgink's lenfoma, multiple miyeloma, yumuşak doku kanseri, mesane, göğüs, mide, akciğer, over ve tiroid gibi çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılan bir antitümör ilaçtır [22].

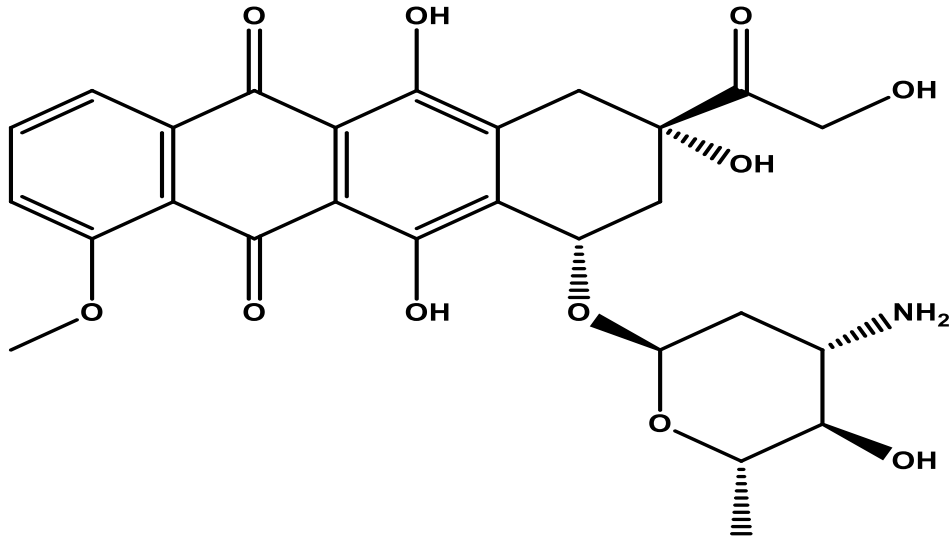
Doksorubisin son zamanlarda en çok kullanılan potansiyel antikanser ilaçlardan biri olmasının yanısıra şiddetli yan etkilerinden dolayı birçok tedavide küçük dozlarda verilmesi zorunludur. DOKS enjeksiyondan önce nominal konsantrasyonu 30 mg/kg olacak şekilde su veya serum fizyolojikte çözdürülür. Daha sonra DOKS çözeltisi tümör bölgesine yakın bir noktadan damardan intravenöz olarak verilir. Fleboskleroz ve ekstremitasyon doku nekrozu gibi yan etkiler gelişebileceğinden DOKS çözeltisi enjeksiyon bölgesine dikkat ederek yavaş yavaş verilmelidir [23].

Antrasiklin temelli ilaçlarla ilgili başlıca sorun diğer tip anti kanser ilaçlarla karşılaştırıldığında yüksek düzeyde kardiyotoksik etkilerinin olmasıdır. Kalıcı kardiyolojik hasarı önlemek için doksorubisin dozu hastanın ağırlığını temel alarak 500-550 mg/kg 'ı aşmayacak şekilde sınır değere ayarlanmalıdır [24]. DOKS ile ilgili ikinci sorun typhlitis olarak bilinen nütrofenik enterokolit gelişimine neden olmasıdır. Bu durum, bağırsağın çekum bölümünde meydana gelen akut hayatı tehdit eden bir enfeksiyondur. Bu hastalık beyaz kan hücrelerinin en yoğunu olan nütrofil granüositlerin seviyesinin azalmasından kaynaklanır. Bu durum tedavi edilebilir ancak tedavi edilmezse bağırsağa doğru yayılabilir ve ölümcül olabilir [25]. DOKS ile ilgili üçüncü sorun; el ayak sendromu olarak da bilinen kemoterapi ile uyarılan acral eritemaya neden olmasıdır. Bu durum, hastanın elleri ve ayaklarında uyuşmaya, şiddetli ağrıya ve şişmeye neden olur. Bu durum geri dönüşümlüdür ve genellikle

tedaviden sonra düzelir. Dokсорubisinin renginin kırmızı olması ayrıca bu yan etkilere sahip olmasından dolayı 'kırmızı şeytan' olarak bilinir [26].

2.1. KİMYASAL YAPISI

Dokсорubisin, *Streptomyces peucetius* bakterisinden dolayı olarak sentezlenir. *Streptomyces peucetius* doğal olarak oluşan bir antrasiklin türevi olan daunorubisin üretir. Bu daha sonra yapay olarak, tetrasiklik halka üzerindeki 4 ve 14 pozisyonlarında karbonların hidroksilasyonu yoluyla DOKS oluşturmak üzere modifiye edilir. DOKS, Aglyconic tetrasiklik omurga ve Daunosamin şeker grubu olmak üzere iki ana bileşenden oluşur [27].



Şekil 2.1. Dokсорubisinin kimyasal yapısı [27].

Aglyconic tetrasiklik, ara bağları paylaşan dört heksasiklik halkadan oluşur. 1. ve 3. halka (soldan başlayarak) aromatiktir, heksasiklik halkaların her biri farklı bir fonksiyonel gruba sahiptir. İlk halkada 4 pozisyonuna bağlı bir metoksi grubu, ikinci halkada bir kinon grubu, üçüncü halkada bir hidrokinon grubu ve sonuncusu 2. pozisyonda bir karbonil ve bir hidroksil grubu olan bir heksan halkasıdır. Tetrasiklik grubun 4. halkasındaki 4-pozisyonunda, bir glikosidik grup bir daunosamin şeker grubunu moleküle bağlar. Molekülün tetrasiklik kısmı molekül için florofor işlevi

görür ve bir floresan spektrumu üzerinde iki tepe noktası oluşturur, birincisi 580 nm'de ve ikincisi 550 nm'de olur [27].

2.2. TERAPÖTİK ETKİSİ

Doksorubisin tek başına veya diğer ajanlarla birlikte kullanılabilen ve sınıfının en geniş aktivite spektrumuna sahip bileşiği olarak bilinen en güçlü antineoplastik ilaçlardan biridir. Gerçekten de DOKS; meme, safra kanalları, prostat, rahim, yumurtalık, özofagus, mide ve karaciğer tümörleri, çocukluk çağı solid tümörleri, osteosarkomlar ve yumuşak doku sarkomları, Kaposi sarkomları gibi solid tümörlerin ve akut miyeloblasti, lenfoblastik lösemi ve Wilms tümörü gibi hematolojik malignitelerin tedavisinde kullanılır [2, 28, 29].

Birçok çalışma DOKS'un antitümör aktivitesinin DNA sarmalında araya girme ve/veya DNA replikasyonu ve transkripsiyonunda yer alan proteinlere kovalent olarak bağlanma yeteneğinden kaynaklandığını düşünmüşlerdir [30]. Bu tür etkileşimler, hücre ölümüne yol açarak DNA, RNA ve protein sentezinin inhibisyonu ile sonuçlanır [31, 32]. Son zamanlarda, Ashley ve Poulton [33], floresan DNA boyası PicoGreen'i kullanan yeni bir yöntem kullanarak, antrasiklinlerin sadece nükleer DNA'nın değil mitokondriyal DNA'nın da arasına girdiğini buldular.

Birçok çalışma DOKS'u topoizomeraz II zehiri olarak sınıflandırmıştır. Topoizomeraz enzim ailesi DNA'nın topolojisini DNA yapısını ve sekansını değiştirmeden değiştirir ve DNA çift sarmalının bir kısmının bölünmesini ve bu geçici bölünmeden ikinci bir dubleks geçmesini içeren transkripsiyon ve replikasyon için DNA'nın çözülmesini katalize eder. Oluşan ara ürün bölünebilir kompleks olarak adlandırılır [34]. DOKS, bölünebilir çift zincirin yeniden bağlanmasını inhibe ederek bölünebilir kompleksi zehirler, bu da DNA çift iplikli kopmaya yol açan bir lezyondur [35, 36]. DNA çift iplikli kopmanın onarılmaması apoptotik bir yanıtla sonuçlanır [2].

Son birkaç yılda proteazomun antrasiklin aktivitesini modüle ettiği ileri sürülmüştür [37]. DOKS'un kanser hücrelerine basit difüzyonla girdiği ve sitoplazmada

proteazoma yüksek afinite ile bağlandığı gösterilmiştir. DOKS daha sonra 20S proteazomal alt birimine bağlanır ve nükleer lokalizasyon sinyalleri ile kolaylaştırılan ATP' ye bağlı bir süreçte nükleer gözenekler yoluyla nükleusa geçen bir DOKS proteazom kompleksi oluşturur. Son olarak, DOKS proteazomdan ayrılır ve DNA'ya proteazomdan daha yüksek afinitesi nedeniyle DNA'ya bağlanır [38].

İlginç bir şekilde, ilaçların metabolik aktivasyonu tümör hücrelerinin içinde de meydana gelebilir. Hücre içi NADPH sitokrom P450 redüktaz (CPR) ekspresyonunun, hücrelerde oksijen eksikliği, hücre içi pH değişiklikleri ve malign transformasyon gibi birçok iç faktör tarafından modüle edilebileceği bilinmektedir [39, 40]. DOKS, NADH dehidrojenaz, NADPH sitokrom P450 redüktaz (CPR), ksantin oksidaz ve nitrik oksit sentaz dahil olmak üzere bir dizi hücrel oksidoredüktaz ile bir elektron indirgenmesine maruz kalabilir [41, 42]. İşlem, antrasiklin molekülünü bir yarı kinon radikal formuna dönüştüren indirgenmiş nükleotitlerden tek elektron transferini içerir. Daha sonra moleküler oksijen (O_2) ile enzimatik olmayan yarı kinon radikal yeniden oksidasyonu, çeşitli makromoleküllerle etkileşime giren süperoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturabilir [43, 44].

2.3. METABOLİZMASI

Serbest ilaç olarak doksorubisin, başlangıçta alınan doza kıyasla tümör hedef bölgesine sadece küçük bir oranda ulaşır ve bu nedenle etki eder [45]. Uygulamadan terminal klerensi nispeten yavaş olmasına rağmen ilaç plazmadan hızla temizlenir. Daha sonra, doksorubisin, doksorubisinin kimyasal modifikasyonunun meydana geldiği karaciğerde birikir. Doksorubisinin biyotransformasyonu, majör metabolit olan doksorubisinol oluşturmak için sitozolik karbonil redüktaz ve aldo-ketoredüktaz yoluyla C-13'teki ketonun stereo spesifik olarak indirgenmesiyle başlar. Hem doksorubisin hem de doksorubisinol atılmadan önce bir dizi reaksiyona girmelidir. Bu işlemlerin bazıları, örneğin, hidrolitik glikozidik ve indirgeyici yarıma, O-sülfatlama, O-demetilasyon ve O-glukuronidasyonu içerir [22, 46]. Metabolizma sürecinin tamamlanmasında, ilacın ve metabolitlerinin sadece yaklaşık %40'ı metabolizma meydana geldikten sonra atılır. Bunun sonucu, uygulanan ilacın miktarının sadece küçük bir kısmının amaçlanan neoplastik hücrelere ulaşması ve etkilemesidir [6].

2.4. YAN ETKİLERİ

Mevcut tüm sitotoksik kemoterapi rejimlerine alopesi, miyelosupresyon, mukozit, bulantı ve kusma gibi doğal akut toksisiteler eşlik eder [47]. Doksorubisin bir istisna değildir. Bununla birlikte, doksorubisin kullanımı ile ilişkili en ciddi komplikasyon kardiyotoksisitedir [47, 48]. DOKS tarafından kardiyomiyositlere verilen hasar, dozun sınırlandırılmasının ana nedenidir. Doksorubisin, kardiyomiyositlerin yapısını değiştirerek, onları genişleterek ve nihayetinde kardiyak hipertrofi, kardiyomiyopati ve disfonksiyon ile sonuçlanan kardiyotoksisiteye neden olduğu birçok mekanizmaya sahiptir [9, 22, 48]. Bu esas olarak doksorubisin ile tedavinin oksidatif streste bir artışa neden olduğu intrinsik apoptotik yol yoluyla meydana gelir; sitozolik kalsiyum homeostazını bozar [9].

Doksorubisin bir elektron alıcısıdır ve bu nedenle, yarı kinon radikalleri oluşturmak için NADH dehidrojenaz, ksantin oksidaz ve sitokrom P450 redüktaz içeren enzimler tarafından azaltılır [49, 50]. Bu yarı kinon radikalleri daha sonra hızla otooksidasyona uğrar, eşleştirilmemiş elektronlarının oksijene bağlanmasıyla süperoksit anyonları oluşturur [51, 52]. Üretilen Reaktif Oksijen Türleri (ROS), ryanodin reseptörünü açarak Sarkoplasmik Retikulum'dan (SR) kalsiyum salınımını teşvik eder, sonuçta kardiyomiyositlerde kalsiyum temizleme sistemlerinin tıkanmasına neden olarak hücre içi kalsiyum seviyelerini artırır [53]. Hücre içi kalsiyum seviyelerindeki bu artış daha sonra ROS üreten enzimleri ROS üretimini yukarı regüle etmek için işaret eder. Özellikle kardiyomiyosit hücreleri içinde mitokondri, kalsiyumun salındığı SR üzerindeki bölgelerin yakınında bulunur ve bu nedenle kalsiyumun önemli bir bölümünü yakalayabilir ve tutabilir [53, 54]. Oksidatif streste bu önemli artış nedeniyle, mitokondriyal kalsiyum seviyeleri eşik değerlerini aşarak mitokondriyal geçirgenlik geçişini tetikleyerek mitokondriyal membran potansiyeli, mitokondriyal şişme ve mitokondriyal ve dış zar rüptürü kaybına neden olur [54]. Mitokondriye verilen hasar, nihai sonucu kardiyomiyosit apoptotik hücre ölümü olan sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktörün salınımını başlatır [54, 55].

2.4.1. Nörotoksisite

Beyindeki doksorubisin, TNF- α üretimini uyararak dolaylı olarak toksisiteye neden olur ve beynin mikroglial hücrelerinin inflamatuvar sitokinleri serbest bırakmasına neden olur. Yüksek seviyelerde TNF- α nitrik oksit sentezini indükler, reaktif nitrojen türlerinin seviyelerini arttırır, bu da beyindeki globüler proteinlerin nitrasyonuna neden olur. Protein nitrasyonu ROS üretir, sonuçta mitokondri üzerindeki ROS etkisi ile apoptoz yoluyla hücre ölümüne yol açar. Bu, görsel-uzamsal becerilerde ve bilişsel hatırlamada bozukluk olarak ortaya çıkmaktadır, ancak, çoğunlukla doksorubisin kesilmesi ile geri dönüşümlüdür [22].

2.4.2. Hepatotoksisite

Diğer ilaçlara gelince, karaciğer ağırlıklı olarak doksorubisinin metabolizmasından ve detoksifikasyonundan sorumludur. Bir ilacın metabolize olması için önce karaciğerde birikmesi gerekir. Beklendiği gibi, bu yüksek ilaç konsantrasyonu çeşitli mekanizmalar tarafından önemli hasara neden olur, buna ROS üretiminin (oksidatif dengesizlik ve DNA hasarına neden olur) yanı sıra hücrelerde inorganik fosfat seviyelerini azaltarak hücrel homeostazda bozulma içerir. İnorganik fosfatlardaki bir azalma, enerji üretimindeki anahtar moleküller olan AMP, ADP ve ATP'deki bir azalma ile ilişkilidir. Bu kemoterapi sırasında hastanın fiziksel ve zihinsel yorgunluğunun altında yatan önemli bir nedeni temsil eder [22].

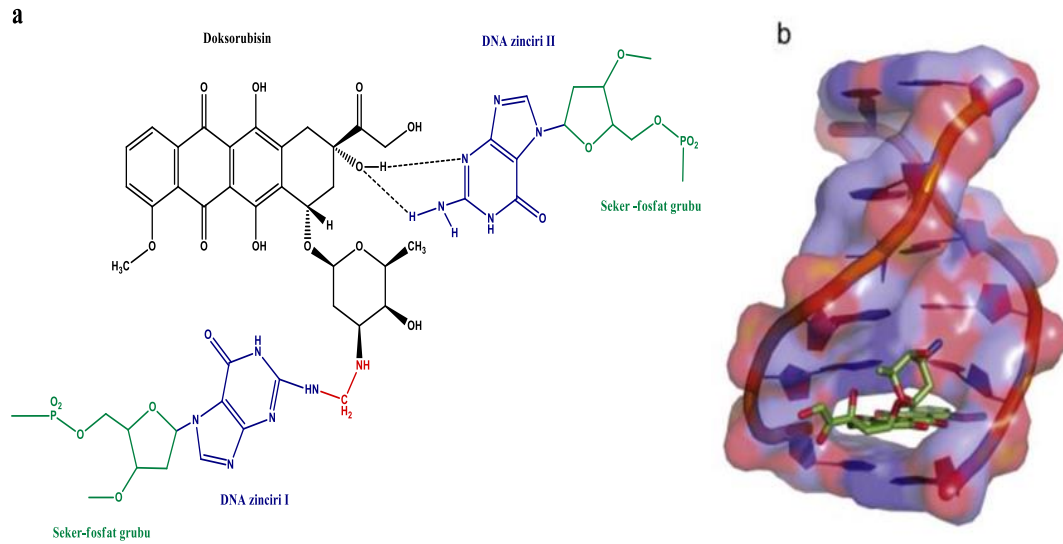
2.4.3. Nefrotoksisite

Son olarak, böbrekler doksorubisin kullanımı ile neredeyse geri dönüşü olmayan bir şekilde hasar görür, çünkü yenilenme kabiliyeti (özellikle karaciğer gibi organlara kıyasla) ve iyileşme sınırlıdır. Nefropati, doksorubisin mitokondriyal fonksiyona müdahale ederek oksidatif dengesizliğe neden olduğunda nefropati, proteinüri ve glomerüloskleroz şeklinde ortaya çıkan yaralanmalarla sonuçlanır. Böbrek, kan homeostazı, sıvı dengesi ve D vitamini aktivasyonu gibi bir dizi temel bedensel süreç

için hayati önem taşıdığından, böbreğe verilen hasarın tüm vücut üzerinde ciddi bir etkisi vardır, bu da potansiyel olarak ciddi, zararlı ve geri dönüşümsüz yan etkilere neden olur [22].

2.5. DOKSORUBİSİNİN ETKİ MEKANİZMASI

Dokсорubisin bir kanser hücresine ulaştığında, DNA'nın interkalasyonu ve makromoleküllerin biyosentezi olmak üzere iki yolla etki gösterir. Şekil 2.2' de gösterildiği gibi Dokсорubisin, iki karşıt baz çifti ile etkileşim yoluyla iki DNA dizisini birbirine bağlamak için tetrasiklik parçayı kullanarak DNA dizilerinin arasına girer. Daunosamin şekeri daha sonra araya yerleştirme bölgesine bitişik baz çiftleriyle etkileşime girmek için DNA şeridindeki küçük bir oluğa oturur [27].



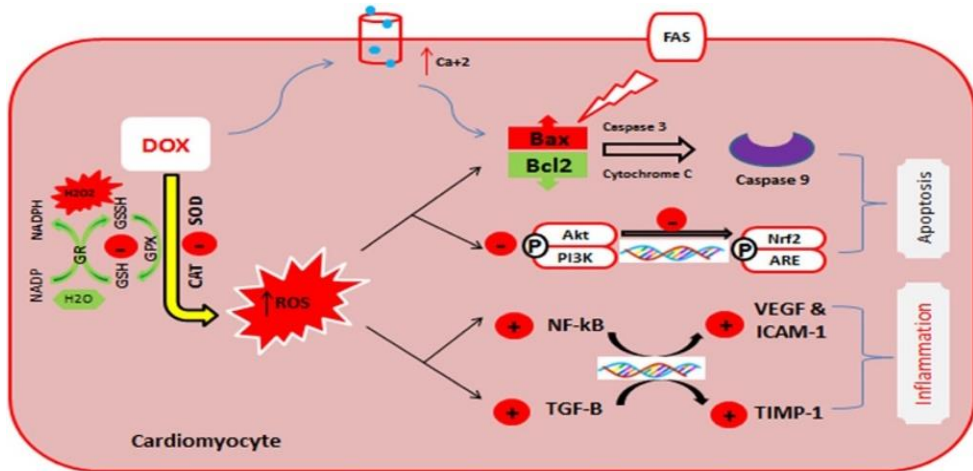
Şekil 2.2. Dokсорubisin-Nükleotit etkileşim diyagramı ve şeması. a) Dokсорubisin-Nükleotit etkileşim diyagramı b) Dokсорubisin etkileşiminin şeması [56].

Dokсорubisin, enzim topoizomeraz II'nin ilerlemesini engelleyerek makromoleküllerin biyosentezini inhibe eder. Topoizomeraz II, DNA çift ipliklerini ATP hidrolizi yoluyla kesmek ve DNA transkripsiyonunun gerçekleşmesini sağlamak için kullanılır [57].

2.6. DOKSORUBİSİNİN KARDİYOTOKSİK ETKİLERİ

DOKS ile uyarılan kardiyotoksisite için çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Oksidatif stres önerilen mekanizmaların başında gelir. Oksidatif stres; reaktif oksijen türleri (ROS) ve hücre içi demir gibi artmış serbest radikallerden ve glutatyon gibi azalmış antioksidan seviyelerinden kaynaklanır [53]. Bu oksidatif stres hücre içi kalsiyumun artmasına [58], hücre zarına ve diğer hücrel bileşenlere zarar veren lipid peroksidasyonunun hızlanmasına neden olur [59, 60].

Ayrıca DOKS, dilate kardiyomyopati ve konjestif kalp yetmezliği ile ilişkili nitrik oksit (NO) üretimini artırarak indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enzimini uyarabilir [61]. NO ve süperoksit (O_2^-) arasındaki etkileşim, DNA hasarına neden olduğu bilinen peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) üretir [62]. Yüksek aktif metabolik süreç ve kalp kası hücrelerinde zayıf gelişmiş antioksidan sistem, bu tür toksik mekanizmaya karşı daha savunmasız kalmaktadır [63]. Doksorubisin ayrıca iki farklı yoldan apoptozu indükleyebilir: p53 ve kaspaz-3'ün ekspresyonunu arttırarak intrinsik yol [64, 65] ve ölüm reseptörünü (Fas) ve ligandını (FasL) artan hücre içi kalsiyum ile uyararak ekstrinsik yol [66]. Ayrıca, artan ROS seviyesi, oksidatif stres ve apoptoza karşı hücrel duyarlılığı arttıran nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktörün (Nrf2) ekspresyonunu baskılar [67]. Bu da, histolojik düzeyde sarkoplazmik retikulumun dilatasyonu nedeniyle miyofibriler kaybı ve hücre içi vakuoller şeklinde saptanabilir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Doksorubisinin kardiyotoksisite mekanizması (5).

Birkaç klinik öncesi çalışma DOKS'un tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) seviyelerini arttırarak ve nötrofil adezyon moleküllerinin vasküler endotelial hücrelerde ekspresyonunu indükleyerek kardiyak dokuda inflamatuvar bir tepki indükleyebildiğini göstermiştir [68, 69]. Arafa vd, DOKS tedavisinin, apoptoz ve kalp fibrozu oranını arttırmak için kardiyak miyofibroblastlar tarafından salgılanan dönüştürücü büyüme faktörü-b1 (TGF-b1) ekspresyonunu indüklediğini göstermiştir. Bu ventriküllerde daha fazla kollajen birikmesine ve kalp dokusunda yüksek seviyelerde fibrotik belirteçlerin olmasına yol açar [70]. Miyokardiyal fibrozis uzun süreli QT aralığı şeklinde elektrofizyolojik olarak yansıtılan dürtü iletkenliğinde rahatsızlığa neden olur [71]. Vasküler duvarlarla ilgili olarak, Viero ve Soares DOKS tedavisinin renal arter duvarlarında geniş kapsamlı fibrinoid nekroza ve ratlarda arteriyollere neden olduğunu göstermiştir [72].

Doksorubisin ayrıca lipit metabolizmasını değiştirerek kardiyotoksisiteyi indükleyebilir. Abdelaleem vd, DOKS kardiyotoksisitesinin kısmen kalp yağ asidi oksidasyonunu inhibe ederek, enerji dengesizliğine ve konjestif kalp yetmezliğine neden olarak açıklanabileceğini öne sürmektedir [73]. Diğer çalışmalar DOKS tedavisinin plazma toplam kolesterolü (TC), trigliseritleri (TAG) ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) seviyelerini arttırdığını göstermiştir [74].

2.7. FİTOKİMYASALLARIN KARDİYOPROTEKTİF MEKANİZMALARI

Doksorubisin malignitelerin tedavisi için oldukça etkili bir ilaçtır; bu nedenle, DOKS kardiyotoksisitesini önlemek ve tedavi etmek için araştırmalarının çoğalması yönlendirilmelidir. Demir şelasyonu ile DOKS kaynaklı kardiyotoksisiteyi azaltmak için kullanılan bir ilaç olan deksrazoksan (ICRF-187) günümüzde miyelosüpresif etkisi nedeniyle tercih edilmemektedir [75]. Ayrıca DOKS'un antitümör etkisini azaltıp azaltmadığı konusunda geniş bir tartışma var. Bu nedenle araştırmacılar DOKS kaynaklı kardiyotoksisitenin önlenmesi ve tedavisi için fitokimyasallar kullanmaya çalışmaktadır [76].

Fitokimyasallar koruyucu veya hastalık önleyici özelliklere sahip besleyici olmayan bitki kimyasallarıdır [77]. Bu kimyasallar, mevcut ilaçlardan daha yüksek farmasötik

değerlere sahip olabilir, çünkü doğal gıdalarda daha ucuz ve kolayca bulunabilirler [78]. Klinik öncesi çalışmalar, antioksidan, anti-inflamatuar ve antiapoptotik mekanizmalar dahil olmak üzere fitokimyasalların gözlenen kardiyoprotektif etkilerinin altında yatan çeşitli mekanizmalar tanımlamıştır [5].

2.7.1. Antioksidan ve anti-inflamatuar etkiye sahip fitokimyasallar

Fitokimyasal bileşikler çeşitli yollardan oksidatif stresi azaltabilir. DOKS kaynaklı lipid peroksidasyonunun düzeltilmesi yoluyla ROS oluşumunu azaltır. Güçlü bir serbest radikal süpürme aktivitesini gerçekleştirir. Hücrel antioksidan mekanizmalarının güçlendirilmesi ve süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutasyon redüktaz (GR) enzimlerinin aktivitesinin artırır. Hem oksijenaz-1 ekspresyonunu yukarı yönde regüle eden Nrf2 ekspresyonunu arttırmaktır. Bu sayede oksidatif strese karşı hücrel duyarlılık azalır. Ek olarak, bu kimyasallar anti-inflamatuar etkiler de gösterebilir. Bunlar; siklooksijenaz-II ve lipoksijenaz enzimlerini inhibe ederek proinflamatuar araçların sentezini azaltmak, vasküler endotel üzerinde TNF- α ve nötrofil adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltmak ve iltihaplı dokularda kollajen birikiminin azaltılması ve DOKS ile indüklenen fibrinoid nekrozunun iyileştirilmesi olarak sıralanabilir. Bazı klinik öncesi çalışmalar *Aerva lanata*, *Aronia melanocarpa*, *Astragalus polisakkarit*, *Bombyx mori*, *Boswellia ovalifoliolata*, *Allium staviium* ve üzüm çekirdeği dahil olmak üzere çok çeşitli fitokimyasalların antioksidan ve anti-inflamatuar aktivitelerini göstermiştir [5].

2.7.2. Anti-apoptik veya sağkalımı arttırıcı etkileri olan ajanlar

Astragalus polisakkarit, *Azadirachta indica*, *Bombyx mori* ve *Allium staviium* özleri gibi fitokimyasallar apoptozu inhibe edebilir ve DNA hasarını azaltabilir [5]. Klinik öncesi çalışmalar, fitokimyasalların anti-apoptotik etkisi için bazı moleküler mekanizmaları önermiştir: Jun N-terminal kinazın (JNK) [131] fosforilasyonunun azaltılması, DOKS'un neden olduğu kaspazların bölünmesinin (-3, -7, -9) ve poli-ADP-riboz polimerazın inhibe edilmesi [79], p53'ün ve hücre dışı sinyale bağlı kinazların (ERK) DOKS kaynaklı aşırı ekspresyonunu inhibe edilmesi ve MAPK apoptotik yollarını düzenleyen Akt kinaz seviyelerinin arttırılması [80].

2.7.3. Fitokimyasalların Diğer Kardiyoprotektif Mekanizmaları

Plazma lipit profilinin iyileştirilmesi ve TAG ve LDL seviyelerinin azaltılması hakkında Barman vd *Urtica parviflora* yapraklarının ekstresinin (3 hafta boyunca günde 400 mg / kg) DOKS ile uygulanan ratlarda TAG ve LDL plazma seviyelerini önemli ölçüde düşürdüğünü bulmuşlardır. *Flacourtia indica*, *Curcuma longa* ve lipistat polih Herbal kombinasyonunun kimyasal ekstralarında benzer bulgular bildirilmiştir [5].

Gen ekspresyonunun değiştirilmesi hakkında Choi vd, DOKS'a maruz kalan H9C2 kardiyak kas hücrelerinin 1500 mg/ mL *Schisandra fructus* ekstresi ile ön tedavisinin, hücresel glutatyon S-transferaz (GST) enziminin ekspresyonunu indüklediğini bulmuştur. Affymetrix cDNA mikrodizilerini kullanarak 31.100 genin analizleri, SFE tedavisinin glutatyon metabolizması ve detoksifikasyona dahil olan genlerin ekspresyonunu yukarı doğru düzenlediğini göstermiştir [81]. DOKS enjekte edilen farelerin 20 mg/kg resveratrol ile tedavisinin, TGF-B1'in gen ekspresyonunu iyileştirdiğini bildirmiştir [70].

Hücre içi kalsiyum modülasyonu ve sol ventrikül (SV) kasılma fonksiyonunun iyileştirilmesi hakkında Liu vd, 5 gün boyunca 100 mg/kg saponin (*Panax notoginseng* özü) ile DOKS uygulanan farelerin günlük tedavisinin, miyokard hücrelerine Ca^{+2} akışını düzenleyerek LV kas kasılmasını iyileştirdiğini bulmuşlardır [82]. Wang vd, tarafından daha düşük dozlarda (10-40 mg/ kg) saponinler için benzer bulgular bildirilmiştir [83]. Meme kanseri hastalarında Yi vd, DOKS'a *Ginkgo biloba* özütünün (EGB 761) eklenmesinin sol ventrikül sistolik çapını (SVSd), sol ventrikül diyastolik çapını (LVDd), erken ve geç diyastolik transmmitral tepe akış hızını (E/A) ve fraksiyonel kısalmayı (FS) artırdığını bulmuşlardır [84].

BÖLÜM 3

SAFRAN (*Crocus sativus* L.)

İnsanlık tarihi boyunca *Crocus sativus* L. (Iridaceae), dünyadaki en pahalı baharat olan safranı elde etmek için yetiştirilmiştir [85, 86]. Tarihi efsanelerde, masalarda bazı mitolojilerde safrandan sıklıkla bahsedilir [87]. "Safran" terimi muhtemelen "sarı" anlamına gelen Arapça "zafran" dan gelmektedir ve günümüzde safran adı, *C. sativus*'un yanı sıra kurutulmuş stigmalarından elde edilen baharat içinde kullanılmaktadır [87, 88]. Safranın bilimsel adı, 1762'de ona *Crocus staivus*' a adını veren Linnaeus'a dayanır [87].

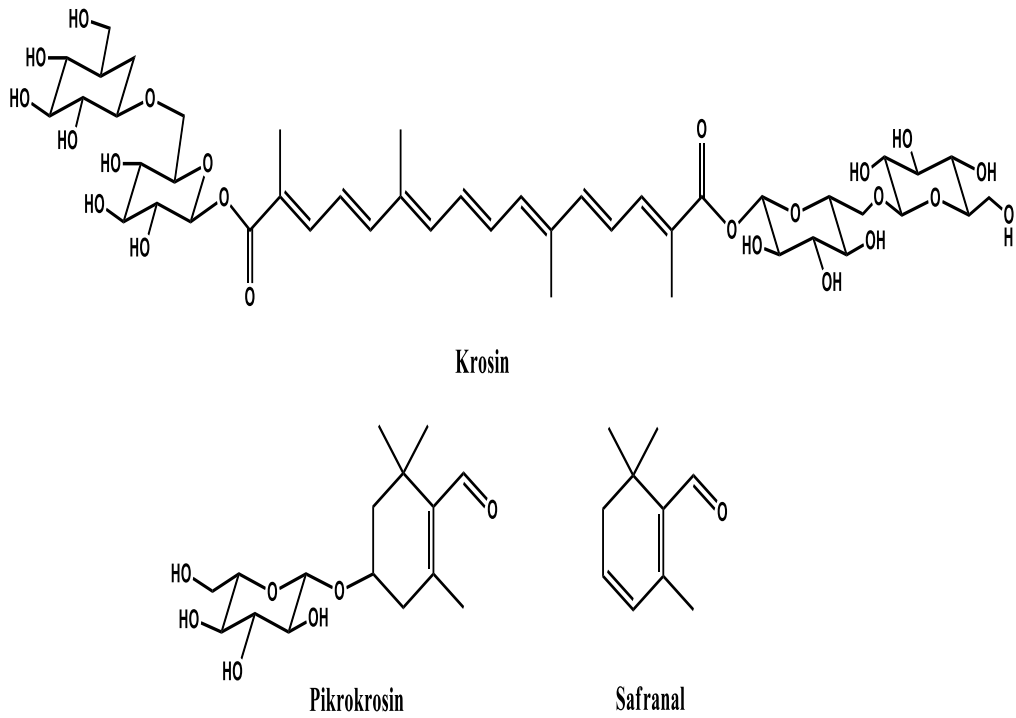


Şekil 3.1. *Crocus sativus* L. [89].

Safran (stigmalar) elle hasat edilir ve başlıca baharat olarak yemeklerde, boya veya ilaç yapımında kullanılır [90]. Ürünü gram bazında satılan tek bitkidir; ortalama 1

kilogram (kg) safran 2000 ABD dolarının üzerinde satılmaktadır. Ancak safranın bu yüksek fiyatı, yetiştirilmesinde, hasadında ve işlenmesindeki büyük işçilikten kaynaklanmaktadır [88]. 1 kg safran üretimi 150.000 ila 200.000 çiçek (yaklaşık 500.000 stigma) gerektirir ve hektar başına 6 kg safran gibi düşük verimlilik, dünya çapında safran bulunabilirliğini sınırlar [91].

Safran 150'den fazla uçucu ve aroma veren bileşik içerir ve safranın değeri bu karakteristik fitokimyasal bileşiklerden kaynaklanır [92, 93]. Safranın kimyası kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve safranın bileşenleri hakkında önemli bilgiler edinilmiştir [94]. Safranın eşsiz bileşenleri krosin, pikrokrosin ve safranaldır [95] (Şekil 3.2.). Krosin, safranın renginden sorumluyken, pikrokrosin acı ve nefis tadından sorumluyken, safran al koku ve aromadan sorumlu ana uçucu yağ bileşenidir [96, 97].



Şekil 3.2. Krosin, pikrokrosin ve safran alın kimyasal yapısı [95].

İyileştirici bir bitki olarak, en eski geleneksel ilaçlarda safrandan bahsedilmektedir [96, 98, 99]. Diğer kullanımların yanı sıra, Hipokrat ve Dioscorides oftalmik rahatsızlıkları tedavi etmek için safrandan bahsetmiştir [93]. İslam tarihinin en büyük filozof ve hekimlerinden biri olan İbn-i Sina (MS 980-1037), 760'tan fazla ilacı

tanımlayan "El-Kanuni fi't-Tıb" adlı kitabında safrandan antidepresan, hipnotik, antiinflamatuvar, hepatoprotektif, bronkodilatör, afrodisyak, doğum indükleyicisi ve emmenagog gibi birçok rahatsızlığın çaresi olarak bahsetmiştir [97].

Düşük safran dozları uyarıcı olarak işlev görür, ancak yüksek doz safranın toksik ve düşük yapıcı olduğu bildirilmektedir [94]. Safran geleneksel tıpta uykusuzluk, depresyon, bronkospazm, kardiyovasküler hastalıklar, gastrointestinal bozukluklar, menstrüel ağrı, menopoza sorunları, analjezik, panzehir, afrodisyak, gaz giderici, terletici, idrar söktürücü, ateş düşürücü, uyarıcı, yatıştırıcı, retina dejenerasyonu, immünomodülasyon ve hatta farklı tümör ve kanser türlerine karşı kullanılmaktadır [93, 96, 98-100].

Kanser, dünyadaki önemli ve en sık görülen ölüm nedenlerinden biridir. Birçok katı tümör; cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi yöntemlerinden biri veya birkaçının kombinasyonu ile tedavi edilebilmektedir ve son yıllarda birçok farklı kemoterapi ajanı keşfedilmiştir. Ancak kemoterapötik ajanların çoğunun ciddi yan etkileri vardır. Gelişmelere rağmen kanser terapisi için mevcut stratejiler tümör metastazı veya cerrahi/radyokemoterapi sonrası nüks, ilaç direnci, olumsuz yan etkiler gibi sebeplerden dolayı palyatif veya yetersiz kalmaktadır [4, 11].

Tarihsel olarak bitkilerden elde edilen doğal ürünler, kanser önleyici bileşikler olarak çok önemli bir rol oynamaktadır. Bitkiler, baharatlar ve diğer sebzeler, yeni koruyucu ve terapötikler için yeni bileşiklerin tasarımında önemlerini gösterdi [101].

Fitokimyasalların etkilerinin, kanser hücrelerindeki çoklu sinyal yolları ve ağları aracılığıyla hedef üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak etki ettiği geniş çapta kanıtlanmıştır. Dahası, bu yeni moleküller, toksik ve maliyetli olmamasına rağmen çok etki, insidansı ve invazivliği azaltma gibi büyük avantajlara sahiptir [102].

Kanserde en önemli risk faktörü yaş gibi görünmektedir ancak kanserle ilgili sayısız teori halen ileri sürülmektedir [103]. Bunlar arasında en alakalı teori "oksidatif stres teorisidir". Burada asıl rol, yaşa bağlı endokrin bozuklukları indükleyebilen ve kanserin ilerlemesini sürdüren endokrin sistem tarafından oynanır. Süperoksit anyon

radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve peroksil radikali dahil olmak üzere reaktif oksijen türlerinin (ROS) düzensiz üretiminin de karsinogenez sürecine katılabileceği iyi bilinmektedir [11].

ROS'un ortadan kaldırılması ve nötralizasyonundan sorumlu farklı enzimlerden oluşan hücrel antioksidan sistem, ROS oluşumunu ROS bozunması ile dengelemektedir. Artmış oksidatif stres durumu, kanser gelişiminde önemli bir özelliği temsil eder. Bu hücre yaşlanmasını, mitokondriyal disfonksiyonu ve mikroRNA deregülasyonunu ve ayrıca inflamasyonu desteklemektedir. Meyve ve sebzelerde bulunan farklı türdeki moleküller, kanser riskini azaltma ve dolayısıyla tümörün önlenmesi özelliklerine sahiptir. Bu büyük miktardaki doğal bileşikler arasında olan karotenoidler; LDL-oksidasyon direncini artırarak, DNA hasarlarını azaltarak ve daha yüksek DNA onarım aktivitesini indükleyerek koruyucu etkiler göstermiştir [11].

Safran ekstraktı, antioksidan enzimlerle etkileşime girebilen ve ROS bozunma işlevini destekleyen çok miktarda karotenoid içermektedir. Krosinin safranın en aktif antioksidan elementi olduğu kanıtlanmıştır [104, 105].

Bir dizi epidemiyolojik çalışma, diyetle alınan yüksek safran karotenoid alımı ile düşük kanser riski arasında yakın bir ilişki ile sonuçlandı. Bu yakın ilişki, büyüme faktörü sinyallemesinin aktivasyonu; hücre döngüsünde ilerleme; farklılaşmayla ilgili proteinlerin, retinoid benzeri reseptörlerin, antioksidan yanıt elementinin, nükleer reseptörlerin, AP-1 transkripsiyonel kompleksinin salgılanması ve inflamatuvar sitokinlerin salgılanması gibi birkaç işlevin deregülasyonunun bir sonucu gibi görünmektedir [105, 106].

3.1. KROSİN

Safranın ana bileşenleri; krosin, krosetin, pikrokrosin ve safranal ancak safran içinde 150'den fazla uçucu ve uçucu olmayan bileşiğin bulunduğu tahmin edilmektedir; ana bileşenler karotenoidler, glikozitler, aldehitler, monoterenler, flavonoidler, vitaminler, amino asit proteinleri, nişasta, minerallerdir [104].

Safranın sarı / turuncu renginden sorumlu olan krosin, ağızdan alınma avantajına sahip suda çözünebilen bir karotenoiddir. Kimyasal olarak, disakkarit gentiobioz ve dikarboksilik asit krosetin arasında oluşan iki ester bağlanmasından türemiştir. İzole edildiğinde kırmızımsı bir renge sahiptir ve erime noktası 186 °C olan kristaller oluşturur. Bununla birlikte, krosin tek bir bileşik değildir, ancak Krosin terimi, krosetinin monoglikosil veya diglikosil polien esterlerine ait bir dizi ilgili hidrofilik karotenoidin üyeleri için kullanılır [104, 107]: 4-trans-krosetin di (β -D-gentiobiosil) ester (transkrosin-4) ve 3-trans-krosetin (β -D-glukozil) (β -D-gentiobiosyl) ester (transkrosin-3) en bol form olarak kabul edilir; 2-trans-krosetin (P-D-gentiobiosyl) ester (transkrosin-2); 4-cis-krosetin di-(D-gentiobiosyl) ester (ciscrosetin-4); 2-trans-krosetin di- (β -D glukozil) ester (trans-2-) ve cis-krosetin (β -D-glukozil) - (β -D-gentiobiosyl) ester (ciscrococin-3) hem cis- hem de trans izomerik formda mevcuttur. Bu bileşenlerin karışımı, farklı yetiştirme koşullarına ve safranın yetiştirildiği ülkeye göre farklılık göstermektedir [108]. Krosetin, glikozile olmayan dikarboksilik asittir ve serbest krosetin (α -krosetin), metil krosetin (α -krosetin = β -krosetin monometil esteri) ve trans-dimetil krosetin (γ -krosetin) sadece safran içindeki eser miktarda bulunabilir [109].

Safran karotenoidleri krosin ve krosetin, gastrointestinal sistem boyunca farklı şekilde emilir [110]. Tek veya tekrarlanan dozların oral uygulamasından sonra krosin kan örneklerinde izlenmemiştir, bu da bu bileşiğin dolaşım sistemine ulaşmadığını düşündürmektedir. Nitekim krosinin ağızdan alındığında bu şekilde emilmediği, ancak ratlarda kana girmeden önce krosetine dönüştürüldüğü gösterilmiştir. Krosin intravenöz olarak verildiğinde plazma krosetin seviyesi düşüktür [111]. Bu krosini krosetine dönüştürmenin ana alanının gastrointestinal sistem olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, safranın biyoaktif formu olan krosetin oluşturmak için krosin gastrointestinal kanalda hidrolize edilmelidir [112]. Krosetin, uygulamadan yarım saat sonra maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşır ve bu da krosetinin hızlı emiliminin portal damar yoluyla kan dolaşımına taşınmasına bağlı olabileceğini düşündürür [111].

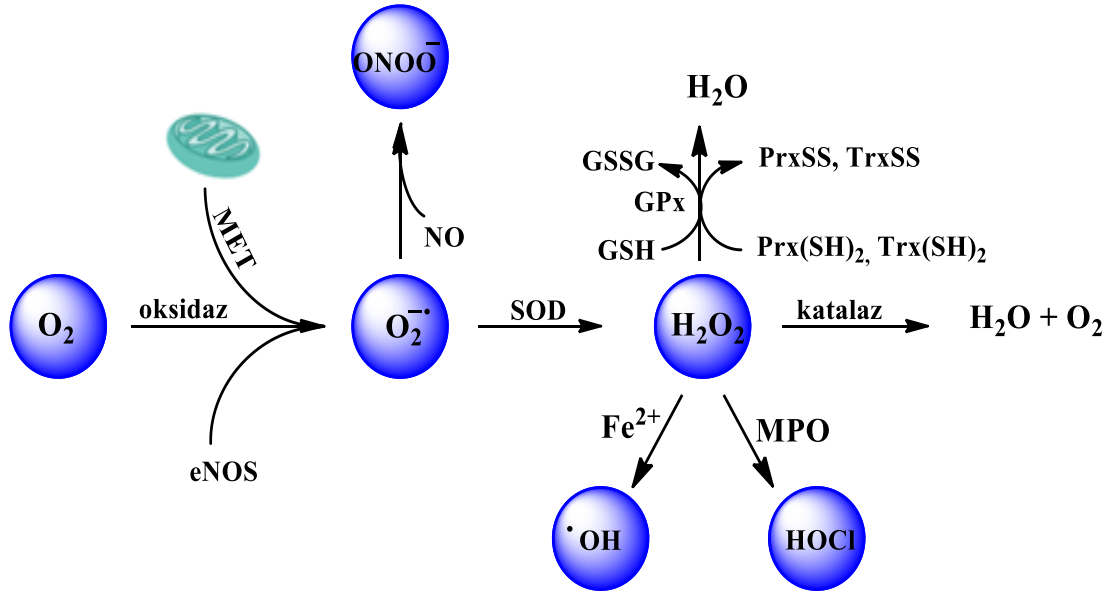
BÖLÜM 4

OKSİDATİF STRES VE ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

4.1. OKSİDATİF STRES VE REAKTİF OKSİJEN SEVİYELERİ

Oksijen yaşam için çok önemlidir; soluduğumuz hava vücudumuzdaki hücrelerin enerji taleplerinin karşılanmasını sağlar. Moleküler biçimindeyken oksijenin hayatta kalmadaki rolü, oksijenin mitokondriyal adenosin trifosfat (ATP) sentezi sırasında ve enzimatik reaksiyonlarda elektron alıcısı olarak hareket etmesine izin veren yüksek redoks potansiyeli ile ilişkilidir. Bu kontrollü fizyolojik redoks prosesleri sırasında, moleküler oksijen (O_2) esas olarak su molekülü (H_2O)'ne dönüştürülür. Bununla birlikte, moleküler oksijen kullanımı riskler taşır. O_2 elektronları kabul ederek, hidrojen peroksit (H_2O_2); süperoksit anyon radikali (O_2^-); hidroksil radikali (HO^\cdot); ve hipokloröz asit ($HOCl$) gibi oldukça reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturabilir (Şekil 4.1). Bu moleküllerin her biri benzersiz reaksiyon özelliklerine (yol, kinetik hız), ayırt edici uzamsal ve zamansal dağılıma ve ayrı ayrı düzenlenen üretim, difüzyon ve bozunma süreçlerine sahiptir [113].

Yüksek reaktivitelerine bağlı olarak ROS, DNA mutasyonlarını ve hasarını indüklerken, sinyal transdüksiyon basamaklarını aktive edebilir ve lipidler, proteinler ve transkripsiyon faktörlerinde değişiklikleri indükleyebilir. Sonuç olarak ROS, hücre farklılaşmasını, hücre proliferasyonunu ve inflamatuvar yanıtları düzenleyen 500'den fazla genin ekspresyonunu önemli ölçüde etkiler [114]. Bu nedenle, oksidatif stres ve artan ROS seviyeleri uzun zamandır yaşlanma ve kanser ve nörodejenerasyonlar dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların patogenezi ile ilişkilendirilmiştir [115].



Şekil 4.1. ROS'un oluşumu ve antioksidanlarla detoksifikasyonu [116]

$O_2^{\cdot-}$, moleküler oksijenin NADPH/ksantin oksidazlar, bağlanmamış endotelial nitrik oksid sentaz (eNOS) ve mitokondriyal elektron taşınması (MET) yoluyla indirgenmesiyle üretilir. $O_2^{\cdot-}$, süperoksit dismutaz (SOD) ile H_2O_2 'ye ayrıştırılabilir veya peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşturmak için nitrik oksit (NO) ile reaksiyona girebilir. H_2O_2 , katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx) veya tioredoksin (Trx) kullanan peroksiredoksin (Prx) antioksidan enzimler tarafından H_2O 'ya çevrilebilir. İnflamatuar bölgelerde H_2O_2 çoğunlukla miyeloperoksidazlar (MPO) tarafından $HOCl$ 'ye dönüştürülür. Fe^{2+} Fenton reaksiyonu varlığında OH oluşumuna yol açar (116).

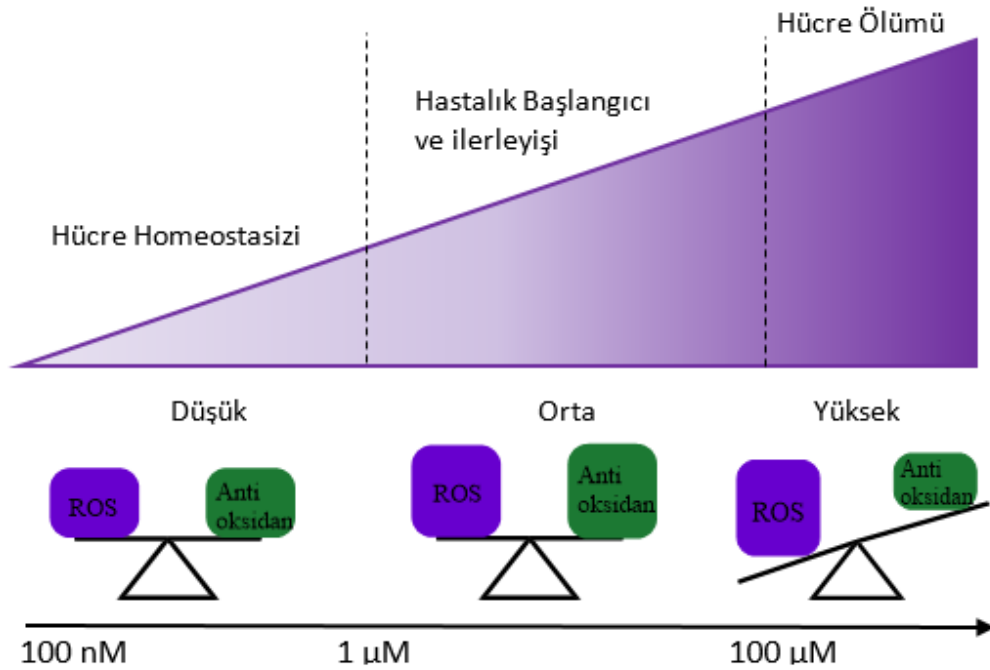
Düşük ROS seviyeleri, hücre sinyalleme, enzim aktivasyonu, gen ekspresyonu, apoptoz ve bağışıklık tepkisi gibi çok çeşitli önemli hücre altı süreçlerde düzenleyici moleküller olarak önemli rollere sahiptir [117].

Hüresel ROS'un ana kaynağı, ökaryotik hücrelerde çift membranlı organeller olan mitokondridir. Genel olarak mitokondri, glukoz, lipidler ve amino asitlerin oksidasyonu yoluyla enerji sağlar. Oksidasyon işleminden kaynaklanan elektronlar, terminal elektron alıcısı olarak oksijene kanalize edilir. Elektron taşıma zincirinde, az sayıda elektron amaçlanan yoldan kaçır ve O_2 ile hatalı etkileşim ROS oluşumuna yol açar. Ek olarak, diğer enzimatik (örneğin NADPH-, ksantin-, monoamin oksidaz,

sitokrom P450 sistemi) ve enzimatik olmayan reaksiyonlar (örneğin, oksijenin organik bileşiklerle reaksiyonları, iyonlaştırıcı radyasyonlar) ROS oluşumuna yol açabilir (Şekil 4.1). ROS ayrıca hücre dışı ortamdan alınan (örn. İnflamatuar hücreler tarafından salınan ROS) veya çevresel prooksidanlara (örn. Patojenler, toksik maddeler, stres) maruz kalmanın bir sonucu olarak üretilen eksojen kaynaklardan da kaynaklanabilir [118].

4.2. ANTIÖKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Hücrelerin ROS üretimi tarafından hasar görmesini önlemek için, hücreler farklı detoksifikasyon mekanizmaları geliştirmiştir (Şekil 4.1). Bu tür "antioksidanlar" enzimatik (ör., Glutasyon peroksidaz/ redüktaz, katalaz ve süperoksit dismutaz) olabileceği gibi enzimatik olmayan (ör., Redükte glutasyon (GSH), koenzim Q ve Vitamin A/ C/ D/ E) da olabilir. Hücreler antioksidanlar ve ROS arasında dengeli bir durum sağlamayı amaçlar; ROS üretimi ile bunların temizleyicileri arasındaki bir dengesizlik oksidatif stres olarak adlandırılır ve kanser ve dejeneratif nörolojik hastalıklar dahil olmak üzere birçok bozukluğun patogeneğinde altta yatan temel olaydır (Şekil 4.2) [116].



Şekil 4.2. Hücrel ROS seviyeleri ve hücreler üzerindeki etkileri [116].

Düşük, dengeli bir ROS seviyesi, hücre hayatta kalması ve homoeostaz için gereklidir; artan, ancak dengeli ROS seviyeleri, hastalığın başlamasını ve ilerlemesini destekleyen oksidatif modifikasyonları indükleyebilir; yüksek, dengesiz ROS seviyeleri hücre hasara ve hücre ölümüne neden olur [116].

4.2.1. Enzimatik antioksidanlar

Başlıca enzimatik antioksidanlar arasında SOD, katalaz, peroksiredoksin ve glutatyon peroksidaz bulunur. Üç SOD izoformu, $O_2^{\cdot-}$ 'nin H_2O_2 ve O_2 'ye parçalanmasını katalize eder ve mitokondri gibi ROS üretiminin hücre lokalizasyonları etrafında yüksek miktarlarda bulunur. Mitokondriyal SOD'ye ek olarak, diğer SOD izoformları, vasküler düz kas hücreleri tarafından üretilen ve salgılanan hücre dışı SOD'yi içerir ve hücreler arası redoks durumunu düzenlemek için hücre dışı matrisin bileşenlerine bağlanır [119].

Azaltılmış glutatyon, birçok hücre işlevi için potansiyel azaltma sağlayarak hücre içi redoks regülasyonunda önemli bir rol oynar. Glutatyon peroksidaz enziminin (GPx) birkaç izoformu sitoplazmada bol miktarda bulunur. GPx-1, H_2O_2 'yi azaltırken, oksitlenmiş lipitler GPx-4'ün tercih edilen substratıdır. GSH, glutatyon disülfide (GSSG) oksitlenir ve bu, glutatyon redüktaz enzimi tarafından GSH'ye geri dönüştürülebilir ve NADPH elektron vericisi olarak işlev görür [120].

Tiyoredoksinler, önemli hücre içi antioksidanlar olan, her yerde bulunan küçük ve her yerde bulunan protein gruplarıdır. Tiyoredoksinler, oksidatif bağlamda gelişen tiyol disülfid bağlarını azaltarak hücre proteinlerine oksidatif hasarın enzimatik onarımına izin veren indirgenmiş sistein kalıntıları içerir. Enzim tioredoksin redüktaz, tioredoksinleri, bu reaksiyonlara katılımları için geri dönüştürmek üzere azaltır [121]. Tiyoredoksinlerin aşırı ifadesi, transgenik farelerin ömrünü uzatır ve bir fare diyabet modelinde diyabetik nefropati gelişimini azaltır [122, 123].

4.2.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar genellikle oksidasyona uğrayarak ROS'u ortadan kaldıran düşük moleküler ağırlıklı proteinlerdir. Bunlar askorbik asit (C vitamini), E vitamini, glutatyon, bilirubin ve üratı içerir. Askorbik asit, bir dizi enzim için zorunlu bir kofaktör görevi gören altı karbonlu bir ketolaktondur. İnsanlar, tüm primatlar gibi askorbik asidi sentezleyemezler, öyle ki C vitamini eksikliğini önlemek için diyetle askorbik asit alımına güvenilir durumdadır. Şu anda önerilen günlük askorbik asit alımı, prototip C vitamini eksikliği sendromu olan iskorbüt hastalığının açık klinik özelliklerini önlemek için gereken miktara bağlı olarak, sigara içmeyen erkeklerde ve kadınlarda günde 90-100 mg'dır [124]. Askorbik asit, ROS'u temizlemek için bir indirgeyici ajan olarak işlev görür ve ayrıca BH₄'ü stabilize ederek bir antioksidan görevi görür ve NO oluşumu için bir yardımcı substrat olarak etkisini kolaylaştırır [125]. Tersine, askorbik asit de prooksidan özelliklere sahiptir ve demir ile reaksiyona girerek ROS üretir. Toplu olarak "E vitamini" olarak adlandırılan sekiz tokoferolden oluşan gruptan, α -tokoferol biyolojik olarak en aktif olanı iken, tokoferol tipik Batı diyetinde en yaygın olanıdır. E vitamini, özellikle hücre zarında yaygın olan lipofilik bir antioksidandır [126].

Glutatyon, sistein içeren bir peptiddir ve yüksek konsantrasyonda bulunduğu yerde tipik olarak hücre içi olarak uygulanan bir dizi antioksidan etkiye sahiptir. Sistein kalıntılarının aktif tiyol grubu, ROS'u temizlemek ve NADPH'yi indirgenmiş formunda sürdürmek için elektron salar. Ek olarak, indirgenmiş glutatyon, antioksidan etkisini kolaylaştırmak için askorbik asidi indirgenmiş formunda tutar. Okside glutatyon, glutatyon disülfid olarak adlandırılır ve glutatyon redüktaz ve NADPH ile indirgenir; Glutatyonun glutatyon disülfide oranı genellikle redoks durumunun bir belirteci olarak ölçülür [127].

BÖLÜM 5

GEREÇ VE YÖNTEMLER

5.1. GEREÇLER

5.1.1 Kimyasal Malzemeler ve Kullanılan Yöntemler

Tez çalışması sırasında kullanılan kimyasallar; disodyumhidrojen fosfat (Na_2HPO_4), tiyobarbitrik asit (TBA), fosforik asit, n-butanol, 5,5' dithiobis-2 nitrobenzoik asit (DTNB), hidrojen peroksit (H_2O_2), disodium etilendiamin tetraasetik asit (Na_2EDTA), potasyum sodyum tartarat, bakır (II) sülfat, sodyum hidroksit, ksantin oksidaz, bakır (II) klorür, bovine serum albumin (BSA), krosin, ksantin, sodyum karbonat, total antioksidan seviyesi (TAS) ve total oksidan seviyesi (TOS), Kardiyak Troponin-I (cTn-I), Kreatin Kinaz-MB (CK-MB), Anti-Tümör Nekrozis Faktör alfa ($\text{TNF-}\alpha$), Anti-Kaspaz-3 kitleri kullanıldı.

Çalışmada kullanılan aletler; manyetik karıştırıcı (Termal N11150M), otomatik pipetler (Brand), hassas terazi (RADWAG AS 220.R2), vorteks (Velp Scientifica), soğutmalı santrifüj (Nüve NF 1200R), mikrosantrifüj (Nüve NF 048), spektrofotometre (Thermo Fisher Multiskan Go 1510), UV/VIS Spektrofotometre (PG Instruments), pH metre (Adwa 1000), homejenizatör (Hangzhou Bioprep-24), sallayıcı su banyosu (Nüve ST 30), mikropilaka yıkayıcı (Thermo Fisher Wellwash 888).

5.2. YÖNTEMLER

5.2.1. Doksorubisin ve Krosin Hazırlanması

DOKS 10 mg I.V. ve infüzyon için liyofilize toz içeren flakon ve çözücü ampul ile çözüldükten sonra 2 mg/ kg uygulanacak şekilde intraperitoneal (i.p) enjeksiyona hazır hale getirildi. Krosin 40 mg/ kg olacak şekilde serum fizyolojik içerisinde çözüldükten sonra ip enjeksiyona hazır hale getirildi [128].

5.2.2. Ratların Temini ve Bakımı

Bu araştırmada, ağırlıkları ortalama 225–250 gram olan 40 adet erkek Wistar albino t¼r¼ rat Zonguldak B¼lent Ecevit Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi Deney Hayvanları retim ve Araştırma Merkezi (ZBEN-DEHAM) biriminden temin edildi. Çalışmaya Zonguldak B¼lent Ecevit Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu onayı (Protokol No:2020-08-07/05) alınarak başlandı ve t¼m uygulamalar bu protokole uygun olarak yapılmıştır. İçme suları g¼nl¼k olarak değiştirilirken kafes temizliği g¼n aşırı olarak yapıldı. Ratlar sıcaklığın 21°C, ortam neminin %55-60 olduğu, 12 saat ışık (08:00-20:00 saatleri) ve 12 saat karanlık uygulanan odalarda bakıldı. Ratlar alışma s¼resince standart pellet yemle ad libitum olarak beslendi.

5.2.3. Rat Deney Protokol¼

Deney hayvanları biriminden temin edilen 40 adet Wistar rat random olarak her grupta 10 hayvan olacak şekilde beş gruba ayrılmıştır. Bu gruplar;

Grup 1: Kontrol grubu (K); %0.9 serum fizyolojik (SF) intraperitoneal (i.p) olarak 15 g¼n boyunca uygulandı.

Grup 2: Doksorubisin grubu (DOKS); 12 g¼nl¼k s¼re boyunca 48 saat aralıklarla k¼m¼latif dozun 12 mg/kg olduğu ve 6 eşit dozda 2 mg/kg DOKS i.p yolla uygulandı [129].

Grup 3: Krosin grubu (Kr); SF içerisinde öz¼len krosin 40 mg/kg doz i.p yolla 15 g¼n boyunca uygulandı [128].

Grup 4: Doksorubisin+Krosin grubu (DOKS+Kr); İlk DOKS enjeksiyonundan 4 g¼n ¼nce 40 mg/kg dozda Krosin enjeksiyonunun i.p yolla başladığı ve çalışma

süresince Grup 2’de olduğu gibi DOKS uygulamalarının yapıldığı tedavi grubudur [128, 129].

Tüm ilaç uygulamaları her gün aynı saatler arasında uygulanmıştır. Son DOKS uygulamasının ertesi gününde yani 16. gün tüm ratlar ketamin/ksilazin anestezisi altında laparotomi yapılarak abdominal venden kan alındıktan sonra kalp ve kan dokusu örnekleri alınmıştır. Alınan kan ve kalp dokularında biyokimyasal analizler, kalp dokusunda ise histopatolojik incelemeler yapıldı.

5.2.4. Ratlardan Numune Alınması

Deney sonunda ratlar ksilazin-ketamin anestezisi altında laparotomi yapılarak kalp içinden 5 ml hacminde alınan kan numuneleri antikoagulantsız tüplere kondu. Daha sonra, tüm ratlar dekapite edilerek kalp doku örnekleri alındı. Doku örnekleri serum fizyolojikle yıkanarak fazlalık kanın uzaklaştırılması sağlandı. Dokuların bir parçası histopatolojik incelemeler için %10’luk formol içerisine kondu. Diğer parçası ise biyokimyasal analizler için çalışma gününe kadar -80 C°’de derin dondurucuda saklandı. Kan numuneleri koagülasyon için oda ısısında bir saat beklendikten sonra 4000 rpm’de 20 dakika santrifüj işlemi yapılarak serum kısmı ayrılarak Kardiyak Belirteçlerin belirlenmesi için ependorf tüplere konulduktan sonra analiz gününe kadar -80 C°’de derin dondurucuda saklandı.

5.2.5. Biyokimyasal Analizler

5.2.5.1. Numunelerin Hazırlanması

Çalışma günü karaciğer dokuları derin dondurucudan çıkarılarak tartıldı. %10’luk homojenat oluşacak şekilde 70 mM’lık fosfat tamponu (pH:7.5) ilave edilerek buz içinde 1-2 dakika süreyle otomatik homojenizatör ile 12000 devir/dakika homojenize edildi. Elde edilen homojenatlarda MDA düzeyleri ölçüldü. Doku homojenatları 5000 rpm’de, +4 °C’de, 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Elde edilen bu

süpernatantlarda; GSH, SOD, CAT, Total Antioksidan Seviyesi (TAS), Total Oksidan Seviyesi (TOS) ve protein düzeyleri ölçüldü. Çalışma günü derin dondurucudan çıkarılan serum örnekleri oda ısısına getirildikten sonra uygun Rat ELISA kitleri kullanılarak kardiyak belirteçler olan CK-MB ve troponin I değerleri belirlendi.

5.2.5.2. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Analizi

Malondialdehit (MDA) Analizi

Doku homojenatındaki MDA analizi Ohkawa vd [130] tarif ettiği yönteme bağlı kalınarak küçük modifikasyonlarla analiz edilmiştir. Temel prensip homojenattan alınan numuneki MDA'nın 95 °C'de tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan pembe renkli ürünün n-butanol fazından ekstrakte edilen süpernatant mikrolakaların kuyucuklarına deney gruplarına göre yerleştirilerek ELİSA okuyucuda 535 nm dalga boyunda okunarak ölçüldü. n-butanol kör olarak kullanılırken sonuçlar tetrametoksipropan'ın standart olarak kullanılmasıyla hesaplandı. Sonuçlar nanomol/g yaş doku olarak sunulmuştur.

Redükte-Glutatyon (GSH) Analizi

Doku süpernatantındaki GSH analizi Ellman'ın tarif ettiği yönteme bağlı kalınarak küçük modifikasyonlarla analiz edilmiştir [131]. Kimyasalların deney tüplerine eklenmesiyle numunelerde bulunan glutatyon konsantrasyonu ile orantılı olarak, 5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyon vermesi sonucunda sarı-yeşilimsi bir renk oluşmaktadır. Oluşan bu renkli bileşik mikrolakaların kuyucuklarına deney gruplarına göre yerleştirilerek ELİSA okuyucuda 410 nm dalga boyunda okunarak ölçüldü. Distile su kör olarak kullanılırken sonuçlar 5mM/L'lik stok GSH çözeltilisinden hazırlanan farklı dilüsyonlardaki GSH çözeltilisinin standart olarak kullanılmasıyla hesaplandı. Sonuçlar nanomol/g yaş doku olarak sunulmuştur.

Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi Analizi

Doku süpernatantındaki SOD enzim aktivite ölçümü Sun vd yöntemine göre yapıldı [132]. Bu yöntemde ksantin-ksantin oksidaz tarafından süperoksit radikalleri üretilir. Süperoksit radikali NBT'yi (nitro blue tetrazolium) indirgeyerek renk oluşturur. Bu indirgenme mavi renkli formazon oluşturur. Böylece oluşan formazon bileşiği mikropilaya kuyucuklarına deney gruplarına göre yerleştirilerek ELİSA okuyucuda 560 nm dalga boyunda okunarak ölçüldü. Distile su kör olarak kullanılırken enzim aktivitesi hazırlanan köre göre hesaplanmıştır. SOD aktivitesi U/g protein olarak sunulmuştur

Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi Analizi

Doku süpernatantındaki CAT enzim aktivite ölçümü Aebi vd yöntemine göre yapıldı [133]. Hidrojen peroksit (H_2O_2) ultraviyole spektrumunda absorpsiyon veren bir maddedir. Maksimal absorpsiyon 240 nm'de meydana gelmektedir. Deney ortamına ilave edilen H_2O_2 'in numune içerisindeki katalaz tarafından su ve oksijene parçalanması 240 nm'de absorpsiyon azalması ile kendini gösterir. Absorpsiyon azalması bu azalma spektrofotometrede (PG Instruments T80/T80+ spektrofotometre, UK) 240 nm'de 1 dakika boyunca kayıt altına alınarak enzimin aktivitesi ölçülmektedir. CAT aktivitesi K/g protein olarak sunulmuştur.

Protein Analizi

Doku örneklerinde enzim aktivitelerinin hesaplanabilmesi için protein düzeyleri ölçüldü. Protein ölçümü biüret yöntemine göre yapıldı. Sonuçlar ELİSA okuyucuda 540 nm'de köre karşı ölçüm yapılarak elde edildi. Sonuçlar mg protein/mL olarak verildi.

Total Oksidan Seviyesi (TOS) Analizi

Doku süpernatantındaki TOS düzeyleri Erel'in metoduna göre çalışıldı [134]. Total Oksidan Status kiti (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep Türkiye) kullanılarak çalışıldı.

Örnek içinde bulunan oksidanlar ferröz iyon şelatör komplekslerini ferrik iyonlara çevirir. Oluşan ferik iyonlar kromojen solusyonu ile renkli bir kompleks oluşturdu. Oluşan bu kompleks örneklerdeki oksidan miktarıyla doğru orantılı olarak artar. Kit talimatlarına göre reaktifler ve numunelerin mikropkaya kuyucuklarına eklenmesiyle oluşan bu renkli kompleksin 530 nm’de sıcaklığı 25 °C’ye ayarlanmış ELİSA okuyucuda absorbansı okunarak ölçüldü. Standart olarak 20 µmol/L’lik H₂O₂ solusyonu kullanıldı. TOS sonuçları µmol H₂O₂ equiv /L olarak sunulmuştur.

Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Analizi

Doku süpernatantındaki TAS düzeyleri Erel’in metoduna göre çalışıldı [135]. TAS düzeyi, Rel Assay brand kit (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Ölçüm yöntemi örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalın antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır. Kit talimatlarına göre reaktif 1 ve süpernatantın mikropkaya kuyucuklarına eklenmesinden sonra sıcaklığı 25 °C’ye ayarlanmış ELİSA okuyucuda 660 nm’de ilk okuma yapıldı. Daha sonra reaktif 2 ilave edilerek aynı dalga boyunda ikinci okuma yapıldı. Her bir numune için iki okuma arasındaki absorbans farkı belirlendi. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanıldı. TAS sonuçları mmol Trolox Equiv/L olarak sunulmuştur.

5.2.5.3. Kardiyak Belirteçlerinin Analizi

Kardiyak Troponin-I (cTn-I) Analizi

Serum Troponin I değerleri Rat TNNT3/cTn-I (Troponin I Type 3, Cardiac) ELİSA Kit (Elabscience, Houston, Texas 77079 ABD) kullanılarak belirlendi. Yöntemin prensibi, kit talimatlarına göre Rat spesifik TNNT3/cTn-I antikoru ile kaplı olan kuyucuklara standart ve numunelerin eklenmesi sonucunda antikor ile standart ve numune içinde bulunan antijenlerin bağlanması sağlandı. Daha sonra Avidin-Horseradish Peroksidaz (HRP) konjugatı ile rat spesifik TNNT3/cTn-I antikorun bağlanması sağlandıktan sonra kuyucukların yıkaması ELİSA yıkayıcı ile yapılarak kuyucuklara bağlanmayan

içeriklerin uzaklaştırılması sağlandı. Her kuyucuğa substrat solüsyonunun eklenmesi antikor HRP bağlanması gerçekleşen kuyucuklarda mavi renk oluşmasına neden oldu. Enzim aktivitesi ortama stop solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırıldı ve renk sarıya döndü. Oluşan bu renk sıcaklığı 25 °C'ye ayarlanmış ELİSA okuyucuda 450 nm'de okunarak standart absorbanlarına göre numunelerin Troponin I değerleri hesaplandı. Troponin I sonuçları pg/ml olarak sunuldu.

Kreatin Kinaz-MB (CK-MB) Analizi

Serum CK-MB değerleri Rat CKMB (Creatine Kinase MB Isoenzyme) ELİSA Kit (Elabscience, Houston, Texas 77079 ABD) kullanılarak belirlendi. Yöntemin prensibi, kit talimatlarına göre Rat spesifik CKMB antikoruna ile kaplı olan kuyucuklara standart ve numunelerin eklenmesi sonucunda antikor ile standart ve numune içinde bulunan antijenlerin bağlanması sağlandı. Daha sonra Avidin-Horseradish Peroksidaz (HRP) konjugatı ile rat spesifik CKMB antikorunun bağlanması sağlandıktan sonra kuyucukların yıkaması ELİSA yıkayıcı ile yapılarak kuyucuklara bağlanmayan içeriklerin uzaklaştırılması sağlandı. Her Kuyucuğa substrat solüsyonunun eklenmesi antikor HRP bağlanması gerçekleşen kuyucuklarda mavi renk oluşmasına neden oldu. Enzim aktivitesi ortama stop solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırıldı ve renk sarıya döndü. Oluşan bu renk sıcaklığı 25 °C'ye ayarlanmış ELİSA okuyucuda 450 nm'de okunarak standart absorbanlarına göre numunelerin CK-MB değerleri hesaplandı. CK-MB sonuçları pg/ml olarak sunuldu.

5.2.6. Histopatolojik Analiz

Dokular fikse olması için %10'luk nötral tamponlanmış formaline (NTF) (104003, Formaldehyde solution %37, Merck, ABD) konuldu. Örnekler daha sonra 3-4 mm'lik daha küçük parçalara ayrılıp, plastik doku takip kasetlerine konularak NTF'de 48 saat süre ile fikse edildi. Fiksasyon işleminin bitmesini takiben parçalar 24 saat boyunca akan çeşme suyunda yıkandılar. Dokuların trimleri gerçekleştirildikten sonra 2x45 dakika %70, % 80, %95 ve %96'lık artan alkol serilerinden geçirildi (Etanol, 1.00971.2500, Merck, ABD). Şeffaflama 2x30 dakika ksilol (108661, Merck, USA) ile gerçekleştirildi. Ardından 2x30 dakika parafin (Surgipath EM-400, Leica, GER)

içerisinde bekletildi. Doku takibi için Leica TP 1020 (Leica, GER) doku takibi cihazı kullanıldı (GER). Gömme işlemi sonrası bloklar soğumaya bırakıldı. Parafin bloklardan Leica FINESSE ME+ (Leica, GER) mikrotomu ile 5 µm'lik kesitler ışık mikroskopik ve immünohistokimyasal yöntemler için jelatin kaplı lamlara alındı. Hazırlanan bu lamlar dokunun lama adezyonunu artırmak için 37°C'lik etüvde 2 saat bekletildi. Kesitlere genel histolojik yapıyı gözlemek amacıyla Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama yöntemi kullanıldı. Kesitler deparafinizasyon aşaması için sırasıyla 60°C etüvde ve 60°C sıcaklıktaki ksilol içerisinde 1 saat bekletildi. Ardından H-E boyama protokolü uygulandı. Kardiyak hasar histopatolojik değişikliklerin derecesi ve yaygınlığına göre semikantitatif olarak belirlendi. Buna göre konjesyon, nekroz, infiltrasyon ve miyofibriler kayıp yönünden 10 farklı alanda incelendi. Hasarın şiddetine göre; 0 (değişiklik yok), 1 (hafif), 2 (orta) ve 3 (ağır) olarak skorlandı. Maksimum hasar skoru 12 idi. Preparatlar Nikon Eclipse 80i ışık mikroskobu ve Nikon görüntü analiz sistemi ile incelenerek skorlandı ve fotoğrafları çekildi. Hematoksilen & Eozin boyama protokolü Çizelge 5.1 deki gibi uygulandı.

Çizelge 5.1. Hematoksilen & Eozin boyama protokolü.

% 100 Alkol	2 dakika
% 96 Alkol	2 dakika
% 80 Alkol	2 dakika
% 80 Alkol	2 dakika
Distile suda yıkama	3 dakika
Hematoksilen (1.09253.2500, Papanicolaous Harris Hematoksilen, Merck, ABD)	3 dakika
Akarsu	5 dakika
Akarsuda yıkama	Daldır çıkar
Amonyaklı su	Doku mor renk alana kadar
Akarsu	Daldır çıkar
Distile suda yıkama	5 dakika
Eozin (05-10003/L, Bio-optica, ITA)	1.5 dakika
% 80 Alkol yıkama	Daldır çıkar
% 96 Alkol yıkama	Daldır çıkar
% 96 Alkol yıkama	Daldır çıkar
Ksilol	30 dakika
Boyalı preparatlar entellan damlatılarak kapatıldı	

5.2.7. İmmünohistokimyasal Analiz

Kesitler deparafinizasyon aşaması için sırasıyla 60°C etüvde ve 60°C sıcaklıktaki ksilol içerisinde 1 saat bekletildi. Ardından aşağıdaki IHC boyama protokolü uygulandı. Preparatlar entallen ile kapatılarak Nikon Eclipse 80i digital kamera takılı ışık mikroskobu (Nikon, JAP) ile fotoğraflandı. İmmünohistokimyasal değerlendirme, incelenen kesit başına 10 mikroskobik alan üzerinden 20X büyütmede yapıldı. Skorumlama şu şekilde yapıldı: 0-5% = skor +; 6-20% = skor (++); 21-40% = skor (+++); 41-60% = skor (++++); 61-80% = skor (+++++); ve 81-100% = skor (++++++). IHC boyama protokolü Çizelge 5.2 deki gibi uygulandı

Çizelge 5.2. IHC boyama protokolü.

Sodyum sitrat solüsyonu 800 Watt mikrodalga fırın (Profilo, TR)	10 dk
Soğuk su banyosu	20 dk
Distile su	5 dk
% 3' lük H ₂ O ₂ (H1009, Sigma, ABD) solüsyonu	10 dk
PBS içerisinde	2x3 dk
Dokuları etrafı pappen (Z377821, Sigma, ABD) ile çizilir ve Serum bloking solüsyonu (SHP 125, ScyTek Lab., ABD) damlatılır	10 dk
Serum bloking solüsyonu dokudan uzaklaştırılır. Anti-TNF α (bs-2081R, Bioss, China) ve Anti-Caspase 3 (bs-0081R, Bioss, China) primer antikorları 1/100 oranında seyreltilerek damlatılır nemli ortamda +4°C' de inkübe edildi	Gece boyu
PBS tamponu içerisinde	2x3 dk
Primer ile uyumlu biyotinlenmiş sekonder antikor (SHP 125, ScyTek Lab., ABD)	30 dk
PBS tamponu içerisinde	2x3 dk
Streptoavidin ile işaretli antikor (HRP) (SHP 125, ScyTek Lab., ABD)	30 dk
PBS tamponu içerisinde	2x3 dk
DAB (3,3-diaminobenzidine) (ACK 500, ScyTek Lab., ABD)	Gözle takip
Distile su ile yıkama	3 dk
Mayers Hematoksilen (M06002, Bio-optica, ITA)	1 dk
Çeşme suyu ile yıkama	5 dk
Distile su ile yıkama	2 dk

5.2.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS (SPSS for Windows version 14.0) istatistiksel yazılım programı ile yapıldı. Tüm sonuçlar aritmetik ortalama \pm standart hata (SE) olarak ifade edildi. Tüm gruplardaki ölçülebilir değişkenlerin Shapiro Wilk normallik testine göre normal dağılım göstermediği saptandı ($p > 0.05$). Bu nedenle istatistiksel değerlendirmede parametrik olmayan testlerden Kruskal Wallis varyans analizi tüm değişkenler yönünden grupların genel karşılaştırılmasında kullanılırken, grupların ikili karşılaştırılmasında ise Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BÖLÜM 6

DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

6.1. BİYOKİMYASAL BULGULAR

6.1.1 Oksidatif Stres Belirteçleri Düzeyleri

Krosin ve doksorubisin uygulaması yapılmış ratlarda ve SHAM grubunda kalp dokusunda oksidan-antioksidan (MDA, GSH, SOD ve CAT) düzeyleri çalışıldı. Kalp dokusuna ait sonuçlar Çizelge 6.1’de sunulmuştur

Çizelge 6.1. Ortalama doku oksidan-antioksidan parametrelerin karşılaştırılması.

Gruplar	MDA (nmol/g yaş doku)	GSH (nmol/g yaş doku)	SOD (U/g protein)	CAT (K/g protein)
Grup 1: Kontrol	395.36±26.88	483.50±1.99	80.79±3.06	8.46±0.45
Grup 2: Krosin	290.39±33.03	506.80±5.70	87.97±3.96	11.10±1.00
Grup 3: DOKS	1405.42±226.30 ^a	229.41±14.79 ^a	38.00±2.00 ^a	4.38±0.36 ^a
Grup 4: DOKS+Krosin	495.10±5.91 ^b	345.28±13.78 ^b	57.62±3.05 ^b	7.09±0.62 ^{c,d}

Veriler aritmetik ortalama±SE olarak ifade edildi (n=10).

^a p<0.001 Grup 3 vs Grup 1 ve Grup 2

^b p<0.001 Grup 4 vs Grup 2 ve Grup 3

^c p<0.005 Grup 4 vs Grup 2

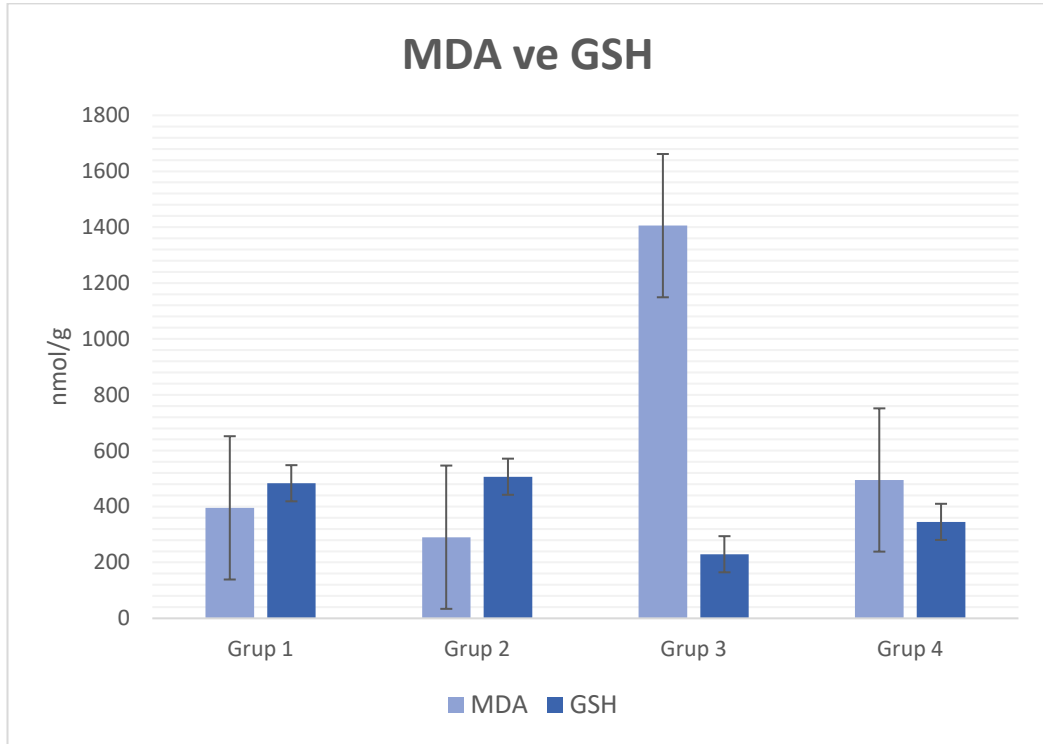
^d p<0.001 Grup 4 vs Grup 3

6.1.1.1. Kalp Dokusu MDA ve GSH Düzeyleri

DOKS uygulaması kalp dokusu MDA düzeylerinde kontrol ve krosin gruplarına göre ciddi derecede (p<0.05) artışa neden olurken, krosin ile DOKS’un birlikte uygulaması

MDA düzeylerinde DOKS grubuna göre anlamlı düşüşler ($p<0.05$) görüldü.

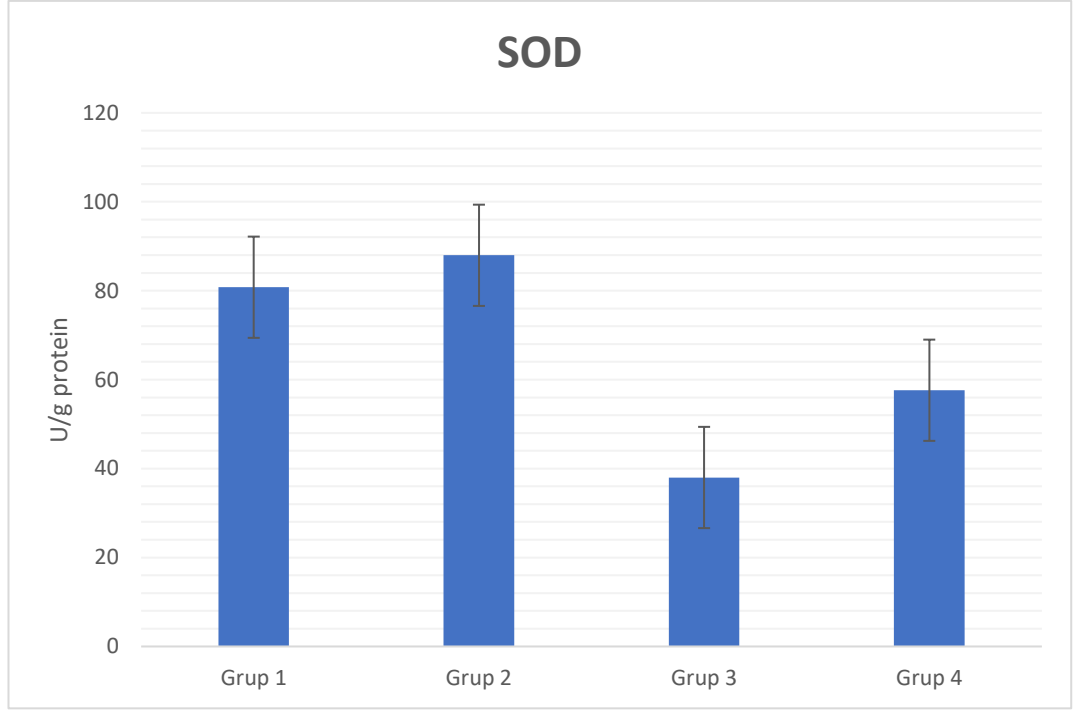
DOKS uygulaması kalp dokusu GSH seviyelerinde kontrol ve krosin gruplarına göre anlamlı düşüşe sebep olurken ($p<0.05$), krosin ile tedavi edilmesi DOKS grubuna göre anlamlı artışlar ($p<0.05$) ortaya koymuştur. Kalp dokusu ortalama MDA ve GSH düzeyleri Şekil 6.1’de sunulmuştur.



Şekil 6.1. Ortalama doku MDA ve GSH değerleri (nmol/g yaş doku).

6.1.1.2. Kalp Dokusu SOD Aktivite Düzeyleri

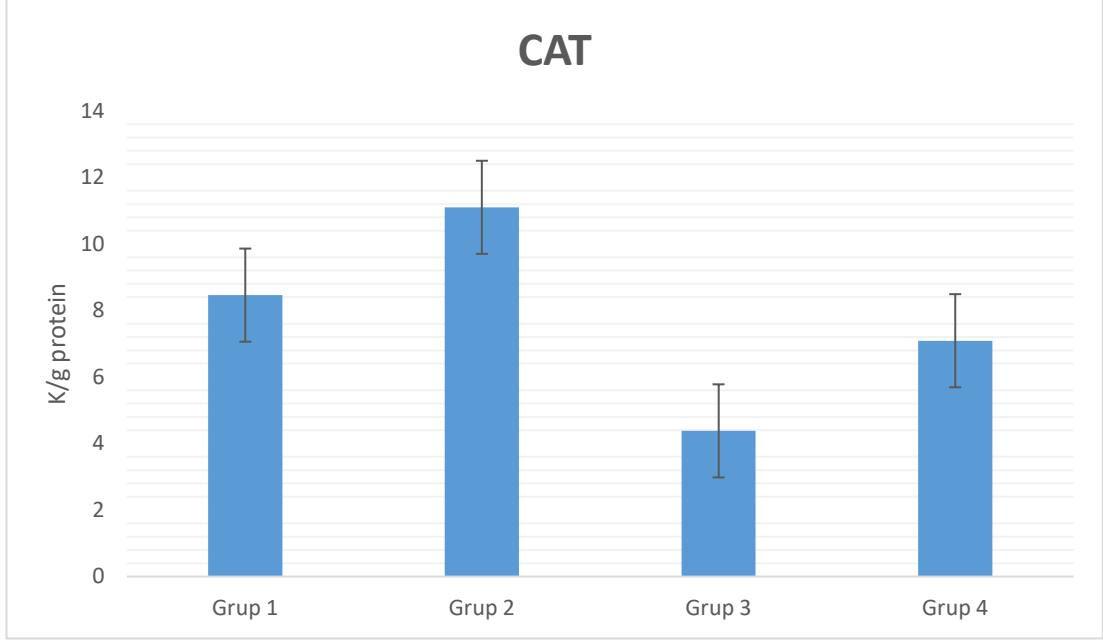
DOKS uygulaması kalp dokusu SOD aktivitelerinde kontrol ve krosin gruplarına göre ciddi düşüşlere ($p<0.05$) neden olurken krosin tedavisi SOD aktivitelerinde anlamlı iyileşmeler ($p<0.05$) gözlemlenmiştir. Kalp dokusu ortalama SOD değerleri Şekil 6.2’de sunulmuştur.



Şekil 6.2. Ortalama doku SOD değerleri (U/g protein).

6.1.1.3. Kalp Dokusu CAT Aktivite Düzeyleri

DOKS uygulaması kalp dokusu CAT aktivitelerinde kontrol ve krosin gruplarına göre anlamlı düşümlere ($p < 0.05$) neden olurken krosin tedavisi CAT aktivitelerinde anlamlı iyileşmelere ($p < 0.05$) neden olmuştur. Krosin ile DOKS'un birlikte uygulanması CAT enzim aktivite değerlerini neredeyse kontrol grubu değerlerine getirmiştir. Kalp dokusu ortalama CAT değerleri Şekil 6.3'de sunulmuştur.



Şekil 6.3. Ortalama doku CAT değerleri (K/g protein).

6.1.1.4. Kalp Dokusu TAS ve TOS Aktivite Düzeyleri

DOKS uygulanması kalp dokusu TAS değerlerinde kontrol ve krosin gruplarına göre ciddi düşümlere neden ($p<0.05$) neden olurken kalp dokusu TOS düzeylerinde ise ciddi artışlara ($p<0.05$) neden olmuştur. Krosin ile DOKS birlikte uygulandığında DOKS grubuna göre TAS düzeylerinde anlamlı artış ($p<0.05$) olurken TOS düzeylerinde ise ciddi düşümler gözlenmiştir. Ayrıca DOKS'un krosin ile uygulanması TAS ve TOS düzeylerini neredeyse kontrol grubu değerlerine getirdiği gözlenmiştir. Ortalama kalp dokusu TAS ve TOS değerlerinin karşılaştırılması Çizelge 6.2'de sunulmuştur. Ayrıca ortalama kalp dokusu TAS (mmol Trolox eqv/L) ve TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv. /L) değerleri Şekil 6.4'te sunulmuştur.

Çizelge 6.2. Ortalama doku TAS ve TOS değerlerinin karşılaştırılması.

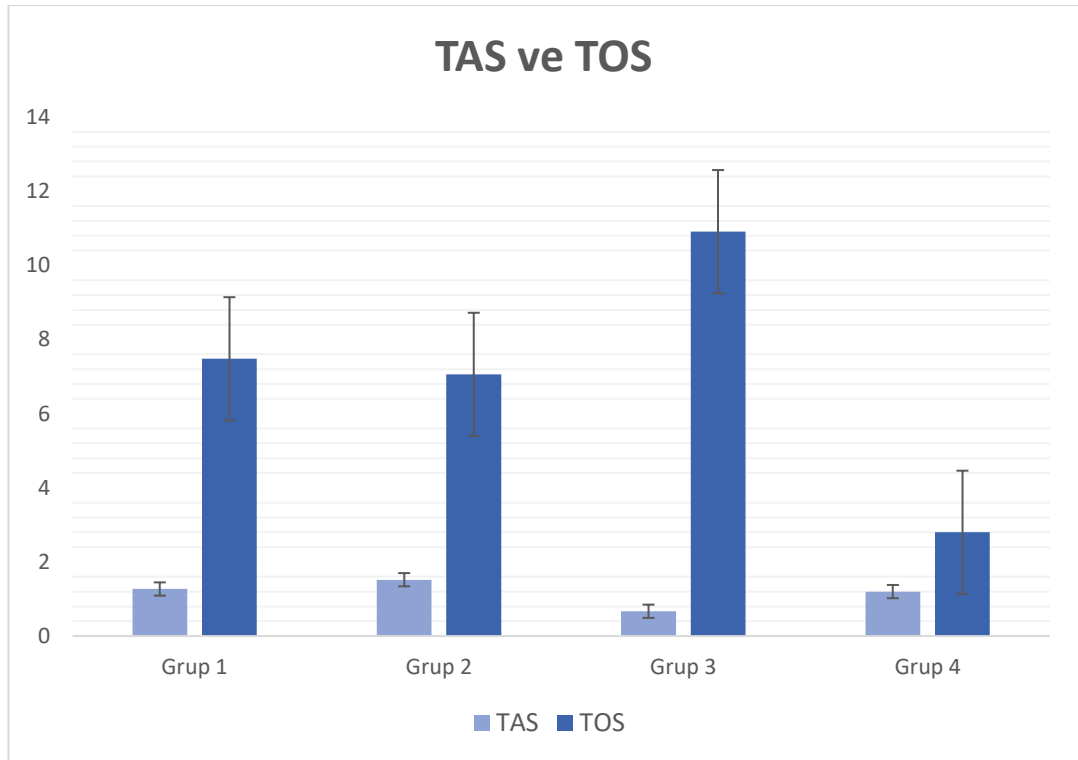
Gruplar	TAS (mmol Trolox eqv/L)	TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv. /L)
Grup 1: Kontrol	1.27 \pm 0.09	7.48 \pm 0.22
Grup 2: Krosin	1.52 \pm 0.09	7.06 \pm 0.14
Grup 3: DOKS	0.67 \pm 0.08 ^a	10.91 \pm 0.65 ^a
Grup 4: DOKS+Krosin	1.20 \pm 0.17 ^{b,c}	7.33 \pm 0.26 ^c

Veriler aritmetik ortalama \pm SE olarak ifade edildi (n=10).

^a p<0.001 Grup 3 vs Grup 1 ve Grup 2

^b p<0.05 Grup 4 vs Grup 2

^c p<0.001 Grup 4 vs Grup 3



Şekil 6.4. Ortalama Kalp dokusu TAS (mmol Trolox eqv/L) ve TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv. /L) değerleri.

6.1.2 Kardiyak Belirteçleri Düzeyleri

Serum Ortalama CK-MB ve Troponin I değerlerinin karşılaştırılması Çizelge 6.3'te sunulmuştur.

Çizelge 6.3. Ortalama kan CK-MB ve troponin I değerlerinin karşılaştırılması.

Gruplar	CK-MB (pg/ml)	Troponin I (pg/ml)
Grup 1: Kontrol	16.62±1.67	175.50±17.58
Grup 2: Krosin	15.76±1.32	186.16±12.02
Grup 3: DOKS	32.36±2.15 ^a	354.89±16.20 ^a
Grup 4: DOKS+Krosin	20.80±0.66 ^{b,c}	231.96±7.85 ^{b,c}

Veriler aritmetik ortalama±SE olarak ifade edildi (n=10).

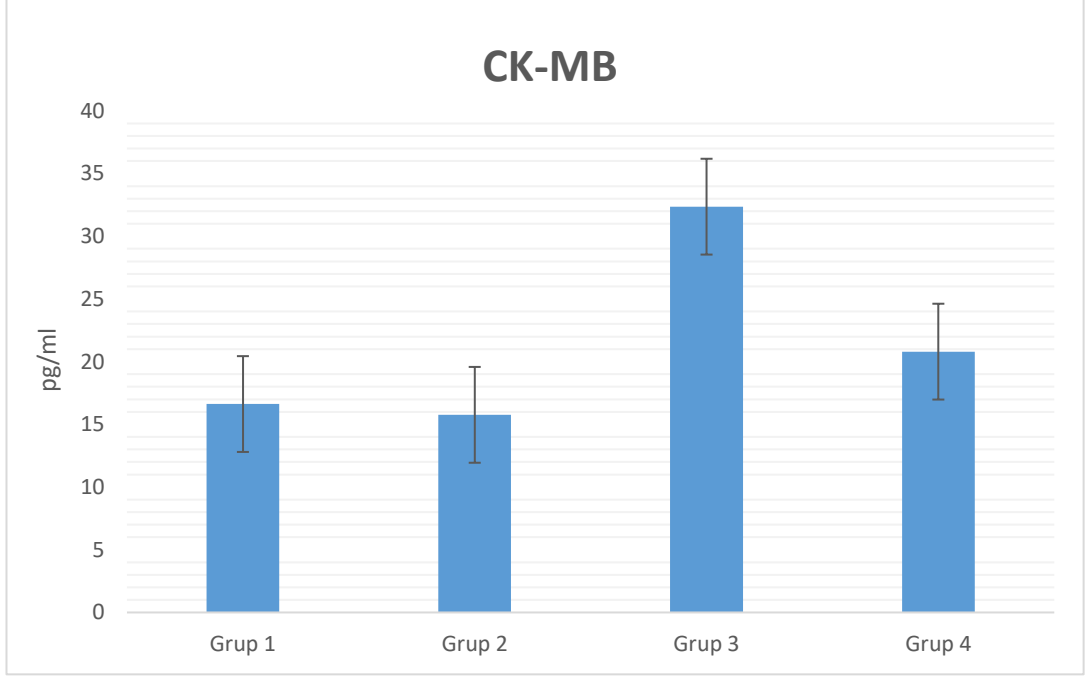
^a p<0.001 Grup 3 vs Grup 1 ve Grup 2

^b p<0.005 Grup 4 vs Grup 2

^c p<0.001 Grup 4 vs Grup 3

6.1.2.1. Serum CK-MB Düzeyleri

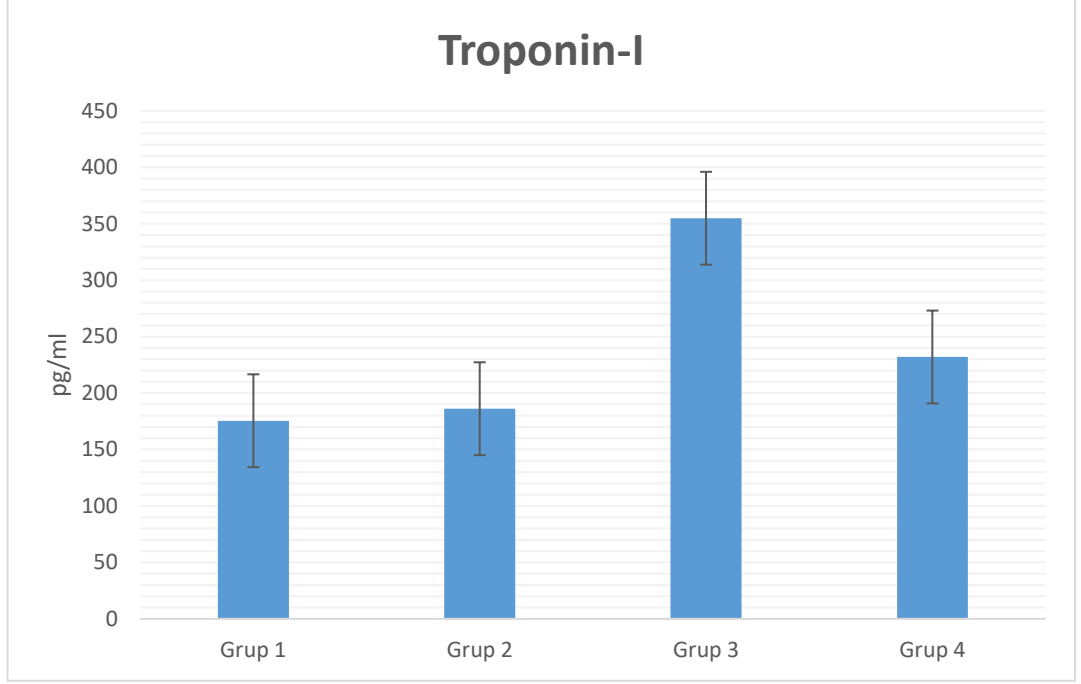
DOKS uygulaması myokarttaki hasara bağlı olarak serum CK-MB değerlerinde kontrol ve krosin gruplarına göre ciddi artışlara (p<0.05) neden olmuştur. Ancak DOKS ile birlikte krosin uygulaması yapıldığında DOKS gruplarına göre anlamlı düşüşler (p<0.05) tespit edilmiştir. İlave olarak krosin tedavisi CK-MB seviyelerinde kontrol grubu değerlerine yakın bir düşüşe neden olmuştur. Ortalama kan CK-MB (pg/ml) değerleri Şekil 6.5'te sunulmuştur.



Şekil 6.5 Ortalama kan CK-MB (pg/ml) değerleri.

6.1.2.2. Serum Troponin-I Düzeyleri

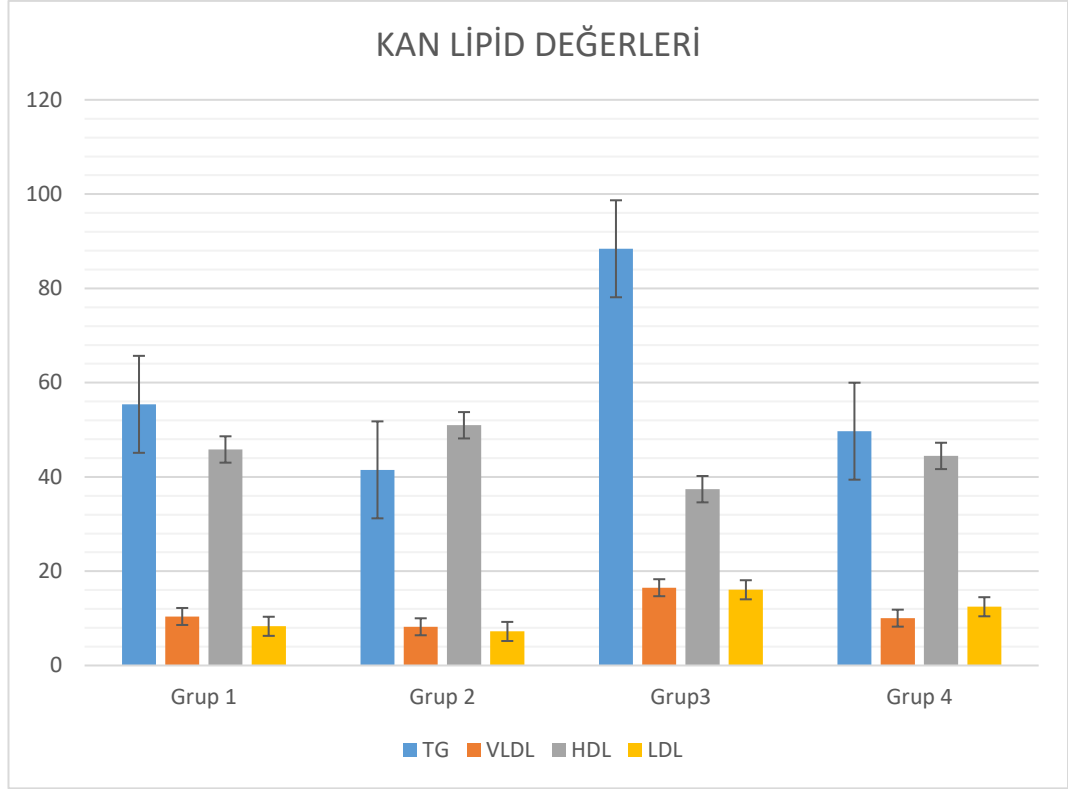
DOKS grubunda serum Troponin-I değerleri kontrol ve krosin gruplarına kıyasla ciddi artışlar ($p<0.05$) oluşurken krosin tedavisi DOKS grubuna göre ciddi düşüşler ($p<0.05$) tespit edilmiştir. Ayrıca krosin tedavisi Troponin-I değerlerini kontrol grubu değerlerine getirmiştir. Ortalama kan Troponin-I (pg/ml) değerleri Şekil 6.6'da sunulmuştur.



Şekil 6.6 Ortalama kan Troponin-I (pg/ml) değerleri.

6.1.3 Serum Lipid Parametreleri Düzeyleri

Ratlara DOKS uygulanması serum TG ile LDL düzeylerinde ($p < 0.001$) ve VLDL düzeylerinde ($p < 0.005$) kontrol grubuna göre anlamlı artışlar olurken HDL düzeylerinde ($p < 0.001$) kontrol grubuna göre ciddi düşüslere neden olmuştur. DOKS alan ratlar krosin ile tedavi edildiğinde serum TG ile VLDL düzeyleri ($p < 0.001$) ve LDL düzeylerinde ($p < 0.005$) DOKS grubuna kıyasla ciddi düşüslere gözlenirken serum HDL düzeyleri ise DOKS grubuna göre ($p < 0.005$) anlamlı iyileşmeler tespit edilmiştir (Şekil.6.7). Serum ortalama lipid parametrelerinin karşılaştırılması Çizelge 6.4'de sunulmuştur.



Şekil 6.7 Ortalama serum Lipid değerleri.

Çizelge 6.4. Ortalama serum lipid parametrelerin karşılaştırılması.

Gruplar	TG	VLDL	HDL	LDL
Grup 1: Kontrol	55.40±3.44	10.40±0.44	45.82±2.05	8.31±0.85
Grup 2: Krosin	41.50±1.98 ^a	8.21±0.33 ^a	50.96±2.68	7.22±0.67
Grup 3: DOKS	88.40±5.17 ^{b,c}	16.50±1.35 ^{e,c}	37.40±1.67 ^{f,c}	16.06±1.04 ^{b,c}
Grup 4: DOKS+Krosin	49.70±4.21 ^d	10.04±0.84 ^d	44.46±1.95 ^g	12.46±0.92 ^{h,j,g}

Veriler aritmetik ortalama±SE olarak ifade edildi (n=10).

^a p<0.005 Grup 2 vs Grup 1 ^b p<0.001 Grup 3 vs Grup 1 ^c p<0.001 Grup 3 vs Grup 2

^d p<0.001 Grup 4 vs Grup 3 ^e p<0.005 Grup 3 vs Grup 1 ^f p<0.01 Grup 3 vs Grup 1

^g p<0.05 Grup 4 vs Grup 3 ^h p<0.005 Grup 4 vs Grup 1 ^j p<0.001 Grup 4 vs Grup 2

6.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Kontrol ve krosin gruplarına ait kalp dokuları normal histolojik görünümdeydi (Şekil 6.8 1a, b). Ancak DOKS grubunda konjesyon, sitoplazmik vakuolizasyon, miyofibriler kayıp, yer yer nekroz alanları ve piknotik nukleus, inflamatuvar hücre infiltrasyonu saptandı (Şekil 6.8 c, d, e). DOKS grubunun ortalama histopatolojik hasar skoru 6.30 ± 0.42 idi. Kontrol ve Krosin grupları ile DOKS grubu karşılaştırıldığında hasar skorunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu ($p<0.001$, hepsi için). DOKS+Krosin grubunda histopatolojik değişikliklerin belirgin olarak azaldığı tespit edildi (Şekil 6.8 f). DOKS grubu ve DOKS+Krosin grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.001$). Her bir grup için histopatolojik hasar skoru Çizelge 6.5' de verildi.

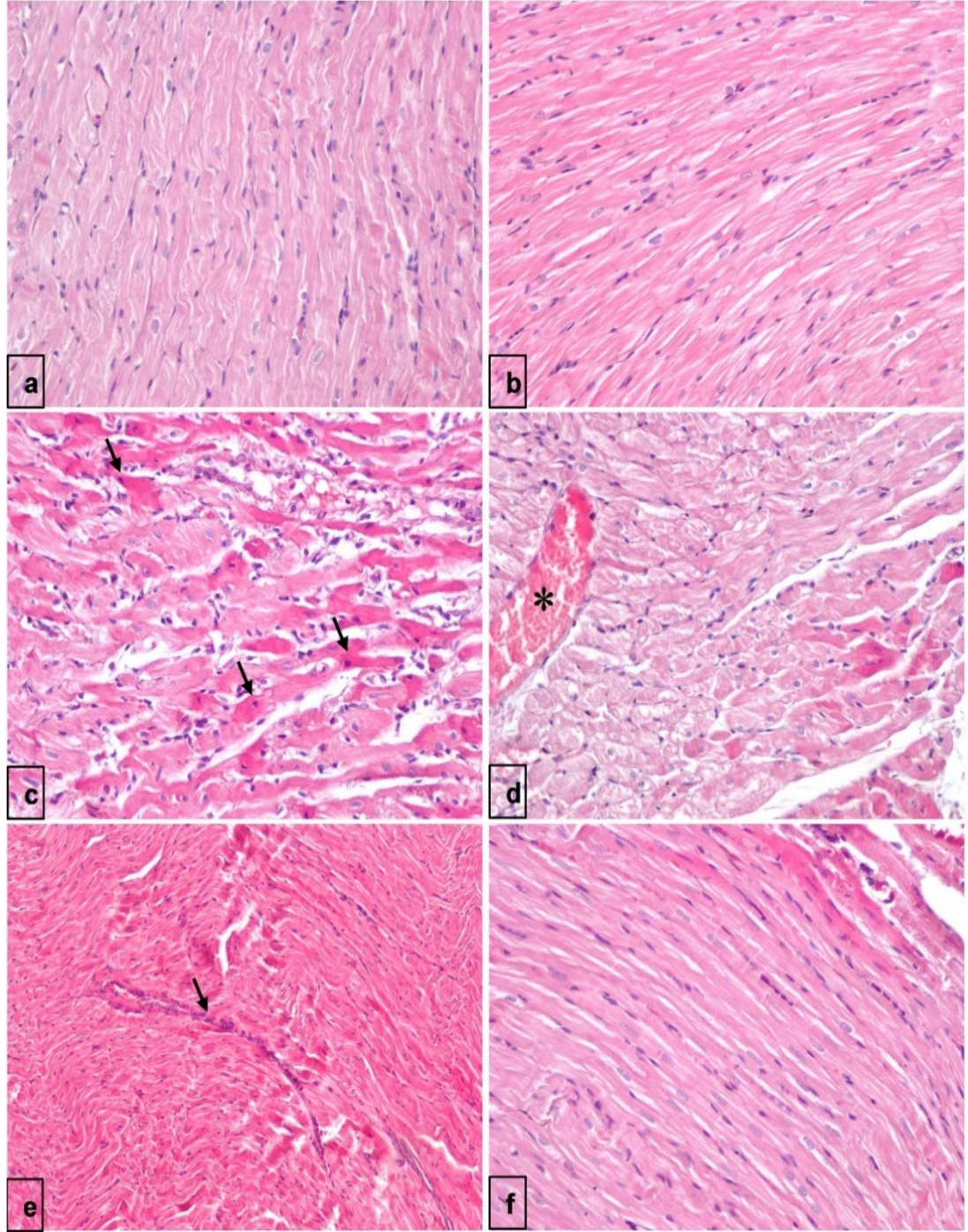
Çizelge 6.5. Ortalama histopatolojik hasar skoru.

Gruplar	Hasar Skoru
Grup 1: Kontrol	0.30 ± 0.15
Grup 2: Krosin	0.50 ± 0.16
Grup 3: DOKS	6.30 ± 0.42^a
Grup 4: DOKS+Krosin	$2.10\pm 0.27^{a,b}$

Veriler aritmetik ortalama \pm SE olarak ifade edildi (n=10).

^a $p<0.001$ vs grup 1 ve grup 2

^b $p<0.001$ vs grup 3

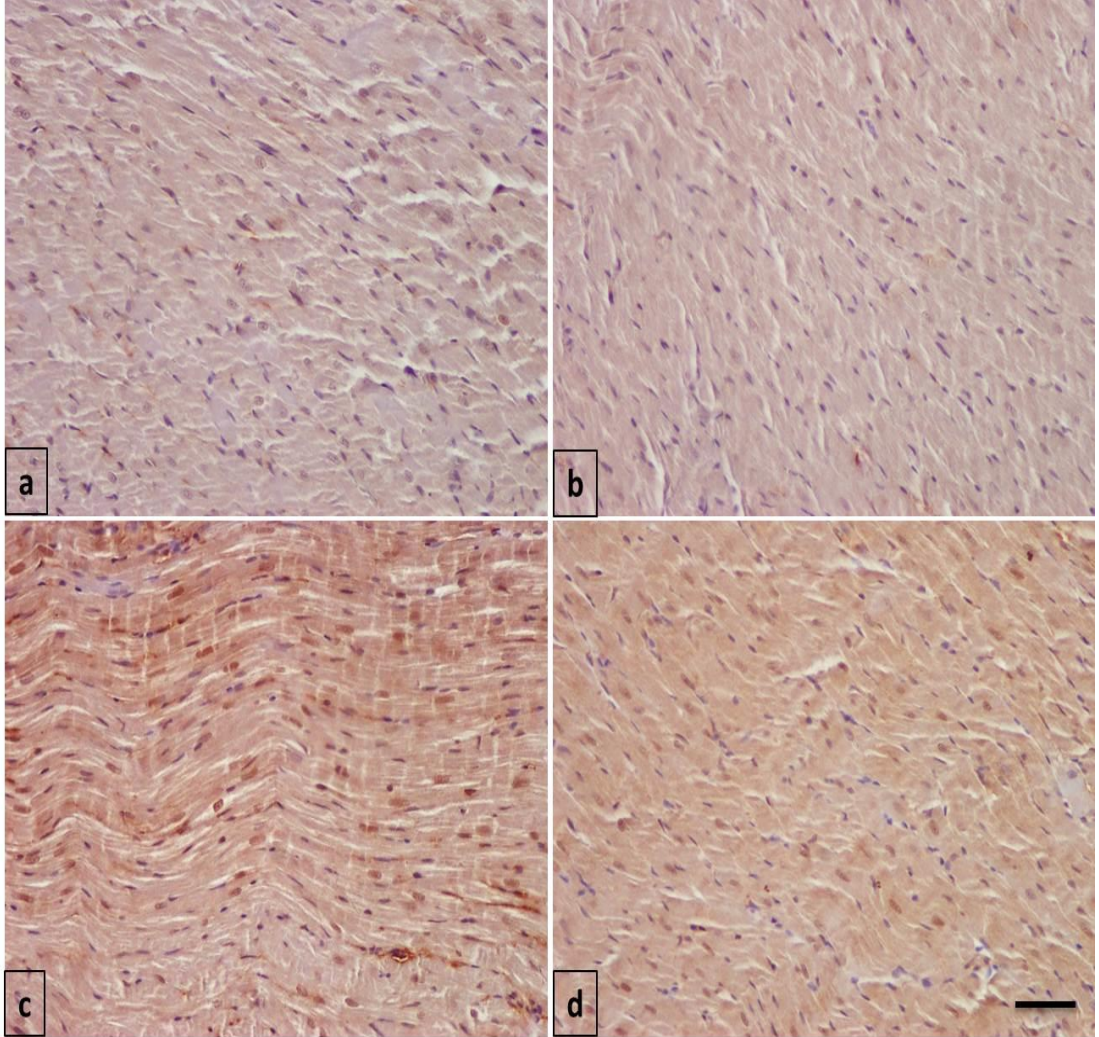


Şekil 6.8. Kalbin histopatolojisini gösteren fotomikrograf. a) Kontrol grubu, H-E; X20 b) Krosin grubu, H-E; X20 c) DOKS grubu piknotik nukleuslu nekrotik hücreler (oklar) içeren hasarlı alan, H-E; X20 d) DOKS grubu konjesyon (asterisk), miyofibriler kayıp ve sitoplazmik vakuolizasyon içeren hasarlı alan, H-E; X20 e) DOKS grubu inflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok) içeren hasarlı alanlar f) DOKS+Krosin grubu, H-E; X20.

6.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

6.3.1 TNF- α İmmünoreaktivitesi

Deney gruplarının kalp dokularındaki TNF- α ifadesi kardiyomiyositlerin sarkoplazması, nükleusları ve kapiller damarlarda gözlenmiştir. Şekil 6.9 da görüldüğü gibi Kontrol ve Krosin grubunda TNF- α ifadesi zayıftır (%0-5), DOKS grubunda TNF- α ifadesi oldukça yüksektir (%81-100), DOKS+Krosin grubunda ise ifadenin orta şiddette olduğu görülmektedir (%41-60).

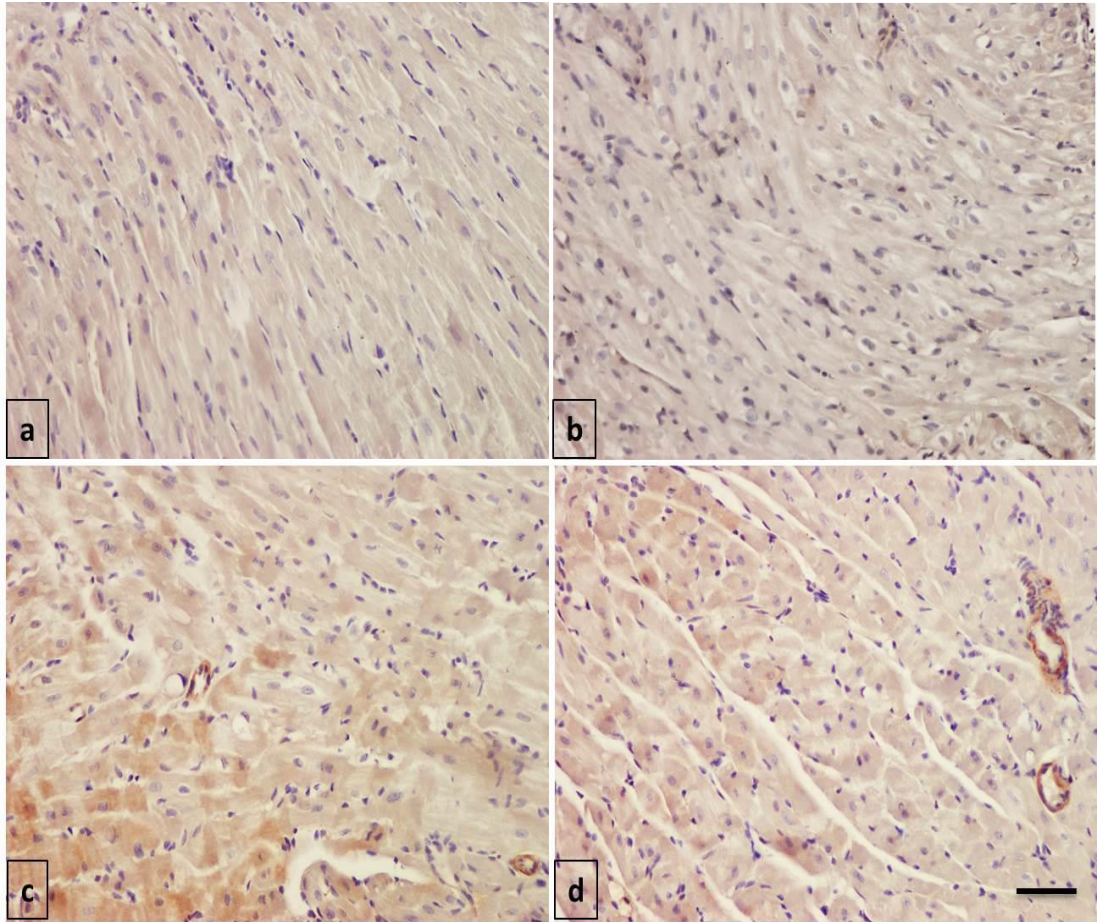


Şekil 6.9. Kalp dokusunda TNF- α immünohistokimyasal boyaması. a) Kontrol grubu b) Krosin grubu c) DOKS grubu d) DOKS+Krosin grubu; X20.

Kalp dokusunda TNF- α immünohistokimyasal boyamasında kontrol ve krosin grupları birbirine benzerdi ve az yoğunlukta boyanma vardı. DOKS grubunda ise boyanma en belirgindi. DOKS+Krosin grubunda boyanma yoğunluğu krosinin etkisi ile azalmıştı.

6.3.2 Kaspaz-3 İmmünoreaktivitesi

Deney gruplarının kalp dokularındaki Kaspaz-3 ifadesinin kardiyomiyositlerin sarkoplazması ve damarların tunika media tabakasında (düz kaslar) olduğu görülmüştür. Şekil 6.10 da görüldüğü gibi Kontrol ve Krosin grubunda kaspaz-3 ifadesi zayıftır (%0-5). DOKS grubunda Kaspaz-3 ifadesi orta şiddettedir (%41-60). DOKS+Krosin grubunda ise ifadenin orta-düşük şiddette olduğu görülmektedir (%21-40). TNF- α ve Kaspaz-3 immün boyamasına ait skor Çizelge 6 5'te gösterilmiştir.



Şekil 6.10. Kalp dokusunda Kaspaz-3 immünohistokimyasal boyaması. a) Kontrol grubu b) Krosin grubu c) DOKS grubu d) DOKS+Krosin grubu; X20.

Kalp dokusunda Kaspaz-3 immünohistokimyasal boyamasında Kontrol ve Krosin grupları birbirine benzerdi ve az yoğunlukta boyanma vardı. DOKS grubunda ise boyanma en belirgindi. DOKS+Krosin grubunda boyanma yoğunluğu krosinin etkisi ile azalmıştı.

Çizelge 6.6. TNF- α ve kaspaz 3 immünreaktivitesi.

İmmünoreaktivite	Grup 1: Kontrol	Grup 2: Krosin	Grup 3: DOKS	Grup 4: DOKS+Krosin
TNF- α	+	+	+++++	+++
Kaspaz 3	+	+	+++	++

0-5% = skor (+); 6-20% = skor (++); 21-40% = skor (+++); 41-60% = skor (++++); 61-80% = skor (+++++); ve 81-100% = skor (+++++).

6.4. TARTIŞMA

Çalışmamızda doksorubisin kaynaklı meydana gelen kardiyotoksisitenin azaltılmasında krosinin koruyucu etkisini inceledik. DOKS lösemi, akciğer, göğüs gibi birçok kanserin kemoterapi ile tedavisinde kullanılan bir antikanser ilaçtır. DOKS hücre içine girip DNA çift ipliklerinin arasına girer ve DNA topoizomerez II'yi inhibe ederek hücre ölümünü gerçekleştirir.

Antrasiklinler, çeşitli kanserleri tedavi etmek için kullanılır, ancak yaygın olarak geri dönüşü olmayan kardiyomiyopati ile ilişkilendirilir. Doksorubisin kaynaklı oksidatif stresin mekanizması, bir antrasiklin-demir (Fe^{2+}) serbest radikal kompleksinin oluşması ardından bu yapının hidroksil (OH^{\cdot}) radikali üretmek için hidrojen peroksit ile reaksiyona girmesiyle gerçekleşir. Demir kenetleyiciler ve serbest radikal temizleyiciler, aşırı derecede reaktif hidroksil radikalının oluşumunu önleyerek ve oluşan radikalleri temizleyerek kalp koruması sağlayabilir. Demir şelatör ICRF-187'nin deneyler sırasında DOKS kaynaklı kardiyotoksisiteye karşı koruma sağladığı

gösterilmiştir. Ancak kanser hastalarında hematotoksisiteyi arttırdığı için klinik başarısı sınırlıdır

Çalışmamızda, önceki çalışmalarla uyumlu olarak kardiyotoksisiteyi gözlemlemek için 2 hafta boyunca deney hayvanlarına kümülatif DOKS dozu (12 mg / kg) uyguladık [136, 137]. Uyguladığımız bu DOKS dozu, insan kanserlerinin tedavisinde kullanılanla aynıdır [138]. Önceki kanıtlar, DOKS kaynaklı kardiyotoksisitenin, DOKS'un doza bağlı ve uzun vadeli uygulamasıyla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur [139]. Bildiğimiz kadarıyla, DOKS uygulamasının neden olduğu kardiyotoksisitenin ana mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, doksorubisinin kardiyotoksik etkilerini inceleyen birçok araştırmacı, ROS'un aşırı üretiminin ve inflamasyonun uyarılmasının miyokardiyum üzerinde DOKS'un neden olduğu yan etkilerden sorumlu olduğunu bildirmiştir.

Miyokardiyumdaki düşük antioksidan kapasite nedeniyle, kalp dokusunun diğer dokulara göre DOKS kaynaklı oksidatif hasar için ana hedef doku olduğu düşünülmektedir [140-144]. Ayrıca miyokardiyum, DOKS için çekici olduğu düşünülen kardiyolipin içerir, bu da kalp mitokondrisinde DOKS birikimine, solunum zincirinin bozulmasına ve apoptotik yolların uyarılmasına neden olur [145]. Öner vd yaptıkları çalışmada DOKS alan Wistar ratlarda ROS oluşumunu ve kardiyak oksidatif stresi göstermişlerdir [146]. Ayrıca yapılan başka bir çalışmada DOKS uygulamasıyla ROS üretiminde artış olduğu, bu durumun ise oksidatif strese neden olduğu ve miyokardiyal hasarın ana nedenlerinden biri olduğu gösterilmiştir [141]. Bu gerçekler ışığında, araştırmacılar, DOKS kaynaklı toksisite üzerinde antioksidan tedavi üzerine denemeler önermişlerdir. Antioksidanlar, serbest radikalleri temizleyerek ve DOKS'un antikanser özelliklerini engellemeden antioksidan enzimlerin aktivitelerini düzenleyerek DOKS'un neden olduğu oksidatif hasarı iyileştirirler.

Son yıllarda fitokimyasalların tıpta kullanımı gittikçe artmaktadır. Özellikle fitokimyasalların tedavi tamamlayıcı olarak kullanımı yaygınlaşmaktadır. Fitokimyasalların ucuz ve doğal yapılarından dolayı güvenli olması tercih sebeplerindedir. Birçok çalışma fitokimyasalların antioksidan, antiapoptotik, kardiyoprotektif gibi özellikleri olduğunu göstermiştir. Bu amaçla çalışmamızda

safran etken maddelerinden biri olan krosinin kardiyoprotektif etkilerini incelemeyi amaçladık.

Tüm bu kanıtlara göre, krosinin kardiyoprotektif etkilerini incelemek için lipid profili, bazı oksidan ve antioksidan düzeyleri, total oksidan-antioksidan düzeyleri ve kardiyak belirteçlerinin düzeyleri ölçüldü. Ayrıca kalp dokusunda histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler yapıldı.

Önceki çalışmalar, koenzim Q, N-asetilsistein, E vitamini ve C vitamini gibi çeşitli antioksidanların, hayvanlarda antrasiklinlerin neden olduğu miyokardiyal hasarı önlemek için kardiyoprotektif aktivitelere sahip olduğunu bildirmiştir[147, 148]. Son zamanlarda, birkaç çalışma, krosinin antikanser ve antioksidan özellikleri nedeniyle yeni bir terapötik ilaç olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Safranın suda çözünür bir karotenoidi olan krosinin mekanizması henüz tam olarak belirlenmemişse de, krosinin yolaklar üzerindeki etkisinin iyi bilinen karotenoidlere benzer olabileceği kabul edilmiştir [149-153]. Bu nedenle, krosinin antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırarak hücre içi oksidatif stresi iyileştirebileceği kabul edilmiştir [154].

Lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresin bir göstergesidir. DOKS, ROS'un artmasına neden olarak membran fonksiyonunu bozar ve miyokardiyal apoptoz yoluyla kardiyak disfonksiyonu ortaya çıkarır. Bu çalışmada Çizelge 6.1. incelendiğinde DOX uygulamasını takiben MDA düzeylerini artırarak kalp dokusunun lipid peroksidasyon düzeylerinde yükselmeler belirlendi. Ek olarak, krosinin DOKS ile birlikte uygulanması, rat miyokardında DOKS ile indüklenen lipid peroksidasyonunda önemli bir iyileşme ile sonuçlandı. ROS oluşumunun neden olduğu DOKS kaynaklı kardiyak yaralanmaya karşı kardiyak antioksidan savunma sistemini güçlendirerek kalbin korunması, DOKS kaynaklı miyokard hasarına karşı korumada önemli bir rol oynamaktadır [70, 146].

Önceki çalışmalar, DOKS uygulamasının SOD, CAT ve GSH gibi antioksidan savunmada bozulmaya neden olduğunu bildirmişlerdir [155, 156]. Antioksidan enzimler olarak SOD ve CAT, süperoksit anyonu ve hidrojen peroksiti temizler.

Enzimatik olmayan bir antioksidan olan GSH ise, glutamat, sistein ve glisin kombinasyonundan oluşan bir tripeptittir. GSH hücrelerde serbest radikalleri, peroksitleri ve ağır metalleri temizleyen güçlü bir antioksidandır.

Verilerimiz, DOKS alan ratların kalp dokusunda kardiyak SOD ve CAT aktivitelerinin yanı sıra GSH seviyelerinin önemli ölçüde azaldığını gösterdi. Ayrıca, krosinin DOKS ile birlikte uygulanmasının SOD, CAT ve GSH dahil olmak üzere antioksidan savunmayı iyileştirdiğini ortaya koydu. Güçlü bir antioksidan olarak krosin, olası mekanizmasını doğrudan ROS'u temizleyerek ve antioksidan enzim genlerini yukarı düzenleyerek bulgularımız doğrultusunda, önceki çalışmalar krosinin, izoprenalin kaynaklı miyokardiyal fibroz ve arsenik trioksit kaynaklı kardiyotoksisite gibi farklı durumlarda kalp dokusunda antioksidan kapasiteyi yükselttiğini göstermiştir. Ayrıca Chu vd, krosinin H9C2 hücrelerinde DOKS tarafından indüklenen artan ROS seviyelerini iyileştirdiğini göstermiştir. Bu sonuçlar krosinin DOKS kaynaklı oluşan oksidanları azalttığı ve bu sayede kardiyoprotektif etki gösterdiğini kanıtlamaktadır [152, 157-159].

Çalışmamızda DOKS uygulanması antioksidan savunma sisteminde zayıflamaya neden olarak kalpte oksidan-antioksidan dengesinin oksidanlar lehine bozulmasına neden olmuştur. Artan bu oksidatif stres kalp dokusunda hasara neden olmaktadır. Krosin verilmesi antioksidan seviyelerini arttırarak kardiyotoksisiteyi önemli derecede düşürmüştür.

Ayrıca krosin ve DOKS'un birlikte verildiği grubu sadece krosin verilen grupla karşılaştırdığımızda oksidanlarda artma antioksidanlarda ise azalma görülmektedir. Bu durum krosinin kardiyoprotektif etki gösterdiğini ancak yine de DOKS kaynaklı kalp hasarının devam ettiğini göstermektedir. Sonuç olarak DOKS kullanımı oksidatif stresi arttırırken krosin bu oksidatif stresi önemli derecede azaltarak kalp dokusundaki hasarı minimuma indirmektedir.

Vücutta gerçekleşen metabolik yollar sonucunda sürekli olarak reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) oluşmaktadır. Dengeli bir şekilde vücudumuzda bulunan savunma mekanizmaları (antioksidan) bu oksidanları parçalayarak

uzaklaştırmaktadır. Vücudumuzda oksidan ve antioksidanlar denge içindedir. Çizelge 6.2 incelendiğinde DOKS verilen grupta krosin ve kontrol grubunda göre total antioksidanların azaldığı ve oksidanların ise arttığı görülmektedir. DOKS ile birlikte krosin verildiğinde ise DOKS verilen gruba göre TAS'da önemli düzeyde artma, TOS'da ise önemli düzeyde azalma görülmektedir. Bu sonuçlar bize doksorubisinin vücuttaki oksidatif stresi önemli derecede arttırdığını, krosinin ise doksorubisin kaynaklı oksidatif stresi önemli derece azaltarak kanser tedavisinde kullanılan bu ajanın vücuttaki yan etkilerini ve kardiyotoksisiteyi minimuma indirdiğini göstermektedir.

Normalde, CK-MB ve cTnI, kardiyomiyositlerin sitoplazmasında bulunur ve hücre zarı hasarını takiben kardiyomiyositlerden sistemik dolaşıma geçer [160]. Bu nedenle, CK-MB ve cTnI kardiyak belirteçlerdir ve kardiyak disfonksiyonları değerlendirmek için bir gösterge olarak kabul edilir. Kalp dokusuna özgünlüklerinin yüksek olması, kalp hasarından sonra en erken pik yapmaları ve uzun süre yüksek kalmaları kardiyak hasarı olan hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Bu çalışmamızda CK-MB ve Troponin I düzeylerini ölçerek DOKS kaynaklı kardiyak hasarını ve krosinin koruyucu etkisini inceledik. Çizelge 6.3. incelendiğinde DOKS verilmesiyle ROS oluşumunun neden olduğu miyokardiyal toksisite, bu kardiyak belirteçlerin yükselmesine neden olurken, krosinin DOKS ile birlikte uygulanması, yüksek kardiyak biyobelirteçlerde önemli bir iyileşme ile sonuçlandı.

Çalışmamızla uyumlu olarak literatürde, krosinin, serum kardiyak belirteçlerini azaltarak kardiyoprotektif etki sergilediğini gösteren kanıt bulunmaktadır [161]. Önceki çalışmalar, DOKS kaynaklı miyokardiyal toksisitenin oksidatif stres ile ilişkili olduğunu ve bunun sonucunda da kardiyak belirteçlerin serumda yükselmiş olabileceğini ortaya koymuştur [146]. Diğer yandan, krosinin ise apoptotik ve inflamatuvar yolların aşağı regülasyonu ve/veya serbest radikalleri süpürme yoluyla güçlü antioksidan ajanı olabileceği iyi bilinmektedir [161].

Miyokardiyal hasar sonrası kandaki CK-MB ve Troponin I aktivitelerinin büyüklüğünün kas sistemindeki hasarın boyutunu yansıttığı iyi bilinmektedir. DOKS ile indüklenen kardiyotoksisitenin mekanizmasının, süperoksit anyonlarının ve

bunların türevlerinin, özellikle hücre zarı lipidinin peroksidasyonunu indükleyen yüksek derecede reaktif ve zarar veren hidroksil radikallerinin oluşumu yoluyla olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda DOKS sonrası elde ettiğimiz CK-MB ve Troponin I sonuçları literatürde DOKS tedavisi sonrası kardiyotoksisite rapor edilen birçok çalışma ile uyum göstermektedir.

Kalp dokusuna ait histopatolojik hasar skorları incelendiğinde doksorubisinin kalp hasarını kontrol ve krosin grubuna göre önemli derecede arttırdığı, krosinin ise doksorubisin ile birlikte verilmesiyle bu hasarı azalttığı kalp de koruyucu etki gösterdiği görülmektedir.

DOKS uygulamasının serum lipid ve yağ asidi profilleri üzerinde dengesizliğe neden olduğu iyi bilinmektedir [162]. DOKS tarafından indüklenen hiperlipidemi, kalp fonksiyonu üzerinde zararlı etkilere neden olur ve DOKS kaynaklı kardiyotoksisitenin en bilinen nedenlerinden biridir. Bu nedenle, lipid düşürücü özelliklere sahip ajanlar, DOKS ile indüklenen kardiyak hasar üzerinde faydalı etkilere sahip olabilir [163]. Son araştırmalar, krosinin ateroskleroz, hiperlipidemi ve kardiyak disfonksiyon dahil olmak üzere kardiyovasküler ilişkili bozukluklara karşı koruyucu etkilere sahip olduğunu göstermiştir [164, 165].

Bu çalışmada DOKS uygulaması sonrası, trigliserid, LDL ve VLDL seviyelerinde artış ve HDL seviyelerinde düşüş gözlemledik. Öte yandan, krosinin DOKS ile birlikte uygulanması, serum lipid profillerinde önemli bir iyileşme ile sonuçlandı. Bu sonuçlara göre, DOKS indüksiyonunun neden olduğu kalp hasarı, serum lipid profilindeki artışlarla ilişkilidir ve krosin, anti-hiperlipidemik özelliklerinden dolayı bu biyokimyasal indeksleri iyileştirerek kardiyoprotektif etkisini meydana getirebilir. Bulgularımız doğrultusunda Li vd [165] koroner ateroskleroz rat modelinde krosinin toplam kolesterol, trigliserit ve LDL'yi düşürdüğünü ve HDL'yi artırdığını bildirdi. Ayrıca Haybar vd [166] DOKS uygulamasının toplam kolesterol, TG ve LDL'de artışa neden olduğunu ve HDL'de azalmaya neden olduğunu, gemfibrozilin ise DOKS ile tedavi edilen ratlarda lipid panelini iyileştirdiğini gösterdi.

Sonuçlarımız incelendiğinde, ratlarda DOKS ile birlikte krosin verilmesi, DOKS'un incelenen parametreler üzerindeki etkilerini önemli ölçüde tersine çevirdiği görülmektedir. Krosinin ateroskleroz, hiperlipidemi, hipertansiyon ve miyokardiyal hasar gibi kardiyovasküler ilişkili bozuklukların tedavisinde etkili olduğunu gösteren çalışma vardır [167]

Öte yandan, kanıtlar, oksidatif stres dışındaki DOKS kaynaklı kardiyotoksitenin patogenezindeki diğer mekanizmaların apoptoz ve inflamasyonu içerdiğini göstermektedir [168]. Önceki çalışmalarla uyumlu olarak, sonuçlarımız, DOKS enjeksiyonundan sonra miyokarda kaspaz-3 ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) reaktivitelerinde önemli artışlar olduğunu göstermiştir [169, 170]. Ayrıca Shaker vd [171], DOKS uygulamasının TNF- α ve İnterlökin-1 beta (IL-1 β) gibi inflamatuvar belirteçlerde ve Kaspaz-3 gibi apoptotik belirteçlerde artışa neden olduğunu bildirdi. Buna karşılık, sonuçlarımız, antiinflamatuvar ve anti-apoptotik etkinliği nedeniyle, DOKS indüksiyonu ile uyarılan artmış inflamatuvar sitokinler ve apoptotik belirteçlerin krosin tedavisi ile iyileştiğini ortaya koymuştur. Ayrıca bu veriler, krosin tedavisi yoluyla miyokardın histolojik yapısında iyileşme gösteren histopatolojik değerlendirmemiz tarafından desteklenmektedir. Bu çalışmanın sonuçlarıyla tutarlı olarak, Razavi vd [172], krosinin oksidatif stres ve hücre apoptozu ile ilişkili sinyal yollarını düzenleyerek diazinon kaynaklı kardiyotoksositeye karşı yararlı etkileri olabileceğini göstermiştir.

Bizim çalışmamızın sonuçları literatürdeki birçok çalışmayla uyum göstermektedir. Örneğin Du vd, intravenöz krosin uygulamasının miyokardiyal hasar alanlarını azalttığını göstermiştir [173]. Krosin tedavisinin enzimatik, histopatolojik ve ultrastrüktürel bulgularla desteklenen izoproterenolün neden olduğu miyokard enfarktüsü ve kardiyotoksositeye karşı koruyucu olduğu da gösterilmiştir [174]. Krosin tedavisi, ratlarda izoproterenolün neden olduğu sol ventriküler disfonksiyonu önemli ölçüde iyileştirmiştir [174]. Dahası, krosinin E vitamini ile karşılaştırıldığında antioksidan kapasite üzerindeki koruyucu rolü gözlenmiştir, bu da krosinin iskemik kalp hastalığı olan hastalarda kardiyak disfonksiyon ve miyokard enfarktüsünün önlenmesi ve tedavisinde faydalı olabileceğini düşündürmektedir [175].

Razavi vd, krosinin, kontrol grubuna kıyasla kanama, hipertrofi ve inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ile ilişkili kardiyak kası hücrelerinin koagülatif nekrozu dahil olmak üzere diazinon tarafından indüklenen kardiyak hasarı önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir [172].

Son farmakolojik çalışmalar, krosinin antitümör [173, 176], antioksidan ve serbest radikal temizleyici etkileri nedeniyle yeni bir terapötik ilaç olarak önerilebileceğine dair kanıtlar sağlamıştır [177, 178]. Soeda vd krosinin oksidatif stresin neden olduğu nörodejeneratif hasarı tedavi etme potansiyeline sahip olabileceğini öne sürdü [179]. Serbest radikallerin temizlenmesi için suda çözünür bir karotenoid olarak krosinin kesin mekanizması henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, mekanik yolların en bilinen karotenoidlere benzer olabileceği kabul edilmiştir [180]. Bu nedenle, krosin kan plazmasına absorbe edildiğinde, krosinin vücudun doğal antioksidan enzimlerini düzenleyerek hücre içi oksidatif stresi modüle edebileceğini tahmin etmek mantıklı görünmektedir [181].

Öte yandan, krosinin doza bağımlı bir şekilde hidrojen peroksit ile indüklenen endotel hücre hasarına karşı sitoprotektif etkiye sahip olduğu bulunmuştur [182]. Xu vd, krosin tedavisinin hücre apoptozunu önleyerek aterosklerozun inhibisyonu ve gerilemesiyle sonuçlandığını göstermiştir [183]. Ayrıca krosin uygulamasının endotel hücre apoptozunu azaltarak aterosklerozun bir hayvan modelinde kolesterol, trigliserit, LDL-C seviyelerinde önemli düşüslere ve aortik plak oluşumunda bir kısıtlamaya yol açtığını belirtilmiştir [184]. Krosinin ratlarda aort dokusunda kaspaz aracılı apoptozu inhibe ederek vasküler sistemde diazinon kaynaklı apoptoza karşı koruyucu etkisi yakın zamanda gösterilmiştir [185].

Bahsedilen antioksidan etkilerin yanı sıra, artan kanıtlar oksidatif stresin ve serbest radikal üretiminin kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıklarda başlıca apoptotik uyarıcılar olduğunu ve reaktif oksijen türlerinin apoptoz ve DNA hasarını indükleyebildiğini göstermektedir [172, 186] ve antioksidan ajanların bu süreci önemli ölçüde baskılayabileceğine inanılmaktadır [187]. Krosinin doza bağılı olarak metil metansülfonat (MMS) ile indüklenen DNA hasarını azalttığı gösterilmiştir [188].

Krosinin apoptotik yolu tümör nekroz faktörünün neden olduğu hücre ölümünü baskılayarak, Bax ve Bcl-2 ailesi proteinlerinin ekspresyonunun modülasyonu, sitokrom c tarafından indüklenen Kaspaz-3 aktivasyonunun bloke edilmesiyle ve sonunda DNA parçalanmasının inhibisyonu yoluyla etkilediği gösterilmiştir [183, 189, 190]. Bu veriler, antioksidan ajanların gen ekspresyonunu ve sinyal iletim yollarını düzenleyerek apoptoz oluşumunu önleyebildiğini gösteren bulgularla desteklenmektedir. Örneğin Razavi vd, krosinin, Bax / Bcl-2 oranını ve sitokrom c'yi ve Kaspaz-3 aktivasyonunun blokajını azaltarak lipid peroksidasyonunu, histopatolojik yaralanmaları ve apoptozu azaltarak diazinon kaynaklı kardiyotoksisiteye karşı koruyucu etkileri olduğunu göstermiştir [172]. Bir antiapoptotik protein olan Bcl-2 ve bir pro-apoptotik protein olan Bax, mitokondriyal membranı stabilize ederek ve sitokrom c'nin salınımını inhibe ederek içgüdüsel apoptotik yolun kontrolünde rol oynar [191, 192]. Bu nedenle, bu iki protein arasındaki denge bozuklukları apoptozun ilerlemesini son derece etkileyebilir.

Tüm çalışma verileri dikkate alındığında bu çalışmanın sonucu, krosinin daha ileri deneysel tasarımlarla araştırılması gereken çeşitli etki mekanizmaları ile DOKS kaynaklı kardiyotoksisiteyi inhibe edebileceğini göstermektedir.

İnsanlarda klinik çalışmaların halen az olması ve bu bulguları etkili bir klinik tedaviye dönüştürmek ve krosinin terapötik özelliklerine katkıda bulunan altta yatan mekanizmaları tanımlamak için DOKS tedavisi gören kanser hastalarında gelecekte derinlemesine araştırmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Rivankar S., "An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy", **Therapeutics**, 10 (4): 853 (2014).
2. Carvalho C., Santos R.X., Cardoso S., Correia S., Oliveira P.J., Santos M.S. and Moreira P.I., "Doxorubicin: The good, the bad and the ugly effect", **Current Medicinal Chemistry**, 16 (25): 3267-3285 (2009).
3. Ma, P., Dong, X., Swadley, C. L., Gupte, A., Leggas, M., Ledebur, H. C. and Mumper, R. J., "Development of idarubicin and doxorubicin solid lipid nanoparticles to overcome Pgp-mediated multiple drug resistance in leukemia" **Journal of Biomedical Nanotechnology**, 5 (2): 151-161 (2009).
4. Ma, P., and Mumper, R. J., "Anthracycline nano-delivery systems to overcome multiple drug resistance: A comprehensive review", **Nano Today**, 8 (3): 313-331 (2013).
5. Abushouk, A. I., Ismail, A., Salem, A. M. A., Afifi, A. M. and Abdel-Daim, M. M., "Cardioprotective mechanisms of phytochemicals against doxorubicin-induced cardiotoxicity", **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 90: 935-946. (2017).
6. Armstrong, J. and Dass, C. R.. "Doxorubicin action on mitochondria: relevance to osteosarcoma therapy?", **Current Drug Targets**, 19 (5): 432-438 (2018).
7. Alkreathy, H., Damanhour, Z. A., Ahmed, N., Slevin, M., Ali, S. S. and Osman, A. M. M., "Aged garlic extract protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats", **Food and Chemical Toxicology**, 48 (3): 951-956 (2010).
8. Koleini, N. and Kardami, E. "Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity", **Oncotarget**, 8 (28): 46663 (2017).
9. Zhang, Y. W., Shi, J., Li, Y. J. and Wei, L., "Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity" **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, 57 (6): 435-445 (2009).
10. Renu, K., Abilash, V. G., PB, T. P. and Arunachalam, S., "Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy—An update", **European Journal of Pharmacology**, 818: 241-253 (2018).

11. Colapietro, A., Mancini, A., D'Alessandro, A. M. and Festuccia, C., "Crocetin and crocin from saffron in cancer chemotherapy and chemoprevention", **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, 19 (1): 38-47 (2019).
12. Reddy, L., Odhav, B. and Bhoola, K. D., "Natural products for cancer prevention: a global perspective", **Pharmacology & Therapeutics**, 99 (1): 1-13 (2003).
13. Rameshrad, M., Razavi, B. M. and Hosseinzadeh, H., "Saffron and its derivatives, crocin, crocetin and safranal: a patent review", **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, 28 (2): 147-165 (2018).
14. Finley, J. W. and Gao, S., "A perspective on *Crocus sativus* L.(Saffron) constituent crocin: a potent water-soluble antioxidant and potential therapy for Alzheimer's disease", **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 65 (5): 1005-1020 (2017).
15. Farkhondeh, T., Samarghandian, S., Yazdi, H. S. and Samini, F., "The protective effects of crocin in the management of neurodegenerative diseases: A review", **American Journal of Neurodegenerative Disease**, 7 (1): 1 (2018).
16. Bolhassani, A., Khavari, A. and Bathaie, S. Z., "Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects", **Biochimica et Biophysica Acta (Bba)-reviews on cancer**, 1845 (1):20-30 (2014).
17. Das, I., Chakrabarty, R. N. and Das, S., "Saffron can prevent chemically induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice", **Asian Pac J Cancer Prev**, 5 (1): 70-76 (2004).
18. Bandegi, A. R., Rashidy-Pour, A., Vafaei, A. A. and Ghadrdoost, B., "Protective effects of *Crocus sativus* L. extract and crocin against chronic-stress induced oxidative damage of brain, liver and kidneys in rats", **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, 4 (Suppl 2): 493 (2014).
19. Altinoz, E., Ozmen, T., Oner, Z., Elbe, H., Erdemli, M. E. and Bag, H. G., "Saffron (its active constituent, crocin) supplementation attenuates lipid peroxidation and protects against tissue injury", **Bratisl Med J.**,117 (7):381-387 (2016).
20. Ochiai, T., Shimeno, H., Mishima, K. I., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Tanaka, H. and Soeda, S., "Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo", **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, 1770 (4):578-584 (2007).
21. Ochiai, T., Ohno, S., Soeda, S., Tanaka, H., Shoyama, Y. and Shimeno, H., "Crocetin prevents the death of rat pheochromyctoma (PC-12) cells by its antioxidant effects stronger than those of α -tocopherol". **Neuroscience Letters**, 362 (1): 61-64 (2004).

22. Tacar, O., Sriamornsak, P. and Dass, C. R., "Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems", **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 65 (2): 157-170 (2013).
23. Xiao, L., Hu, S. Q., Wang, L. Y., Liu, J. X. and Li, X. Y., "Losartan improves the distribution and efficacy of doxorubicin in CT26 tumor", **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 19 (19):3763-3769 (2015).
24. Chatterjee, K., Zhang, J., Honbo, N. and Karliner, J. S., "Doxorubicin cardiomyopathy", **Cardiology**, 115 (2): 155-162 (2010).
25. Kaczmarek, A., Brinkman, B. M., Heyndrickx, L., Vandenabeele, P. and Krysko, D. V., "Severity of doxorubicin-induced small intestinal mucositis is regulated by the TLR-2 and TLR-9 pathways", **The Journal of Pathology**, 226 (4): 598-608 (2012).
26. Lopez, A. M., Wallace, L., Dorr, R. T., Koff, M., Hersh, E. M. and Alberts, D. S. "Topical DMSO treatment for pegylated liposomal doxorubicin-induced palmar-plantar erythrodysesthesia", **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 44 (4): 303-306 (1999).
27. Kellogg, G. E., Scarsdale, J. N. and Fornari Jr, F. A., "Identification and hydrophobic characterization of structural features affecting sequence specificity for doxorubicin intercalation into DNA double-stranded polynucleotides", **Nucleic Acids Research**, 26:(20): 4721-4732 (1998).
28. Danesi, R., Fogli, S., Gennari, A., Conte, P., and Del Tacca, M., "Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs", **Clinical Pharmacokinetics**, 41 (6): 431-444 (2002).
29. Gruber, B. M., Anuszevska, E. L. and Priebe, W., "The effect of new anthracycline derivatives on the induction of apoptotic processes in human neoplastic cells", **Folia Histochemica et Cytobiologica**, 42 (2):127-130 (2004).
30. Box, V. G., "The intercalation of DNA double helices with doxorubicin and nagalomycin", **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 26 (1): 14-19 (2007).
31. Cutts, S. M., Parsons, P. G., Sturm, R. A. and Phillips, D. R. "Adriamycin-induced DNA adducts inhibit the DNA interactions of transcription factors and RNA polymerase", **Journal of Biological Chemistry**, 271 (10): 5422-5429 (1996).
32. Cutts, S. M., Swift, L. P., Rephaeli, A., Nudelman, A. and Phillips, D. R. "Recent advances in understanding and exploiting the activation of anthracyclines by formaldehyde" **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, 5 (5): 431-447 (2005).

33. Ashley, N. and Poulton, J., "Mitochondrial DNA is a direct target of anti-cancer anthracycline drugs", **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 378 (3): 450-455 (2009).
34. Swift, L. P., Rephaeli, A., Nudelman, A., "Phillips, D. R. and Cutts, S. M. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death", **Cancer Research**, 66 (9):4863-4871 (2006).
35. Liu, L. F., Rowe, T. C., Yang, L., Tewey, K. M. and Chen, G. L. "Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II", **Journal of Biological Chemistry**, 258 (24): 15365-15370 (1983).
36. Tewey, K. M., Rowe, T. C., Yang, L., Halligan, B. D. and Liu, L. F. "Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II", **Science**, 226 (4673): 466-468 (1984).
37. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. and Gianni, L. "Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity", **Pharmacological Reviews**, 56 (2): 185-229 (2004).
38. Kiyomiya, K. I., Matsuo, S. and Kurebe, M., "Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: The mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex", **Cancer Research**, 61 (6):2467-2471 (2001).
39. Adams, G. E. and Stratford, I. J., "Bioreductive drugs for cancer therapy: the search for tumor specificity". **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, 29 (2): 231-238. (1994).
40. Forkert, P. G., Lord, J. A. and Parkinson, A., "Alterations in expression of CYP1A1 and NADPH-cytochrome P450 reductase during lung tumor development in SWR/J mice". **Carcinogenesis**, 17 (1): 127-132. (1996).
41. Mordente, A., Meucci, E., Martorana, G. E., Giardina, B. and Minotti, G., "Human heart cytosolic reductases and anthracycline cardiotoxicity", **IUBMB Life**, 52 (1):83-88 (2001).
42. Pawłowska, J., Tarasiuk, J., Wolf, C. R., Paine, M. J. and Borowski, E., "Differential ability of cytostatics from anthraquinone group to generate free radicals in three enzymatic systems: NADH dehydrogenase, NADPH cytochrome P450 reductase, and xanthine oxidase", **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, 13 (5): 245-252 (2003).
43. Sinha, B. K., "Free radicals in anticancer drug pharmacology", **Chemico-Biological Interactions**, 69 (4): 293-317 (1989).

44. Begleiter, A. and Leith, M. K. "Activity of quinone alkylating agents in quinone-resistant cells", **Cancer Research**, 50 (10):2872-2876. (1990).
45. Sternberg, C. N., Petrylak, D. P., Sartor, O., Witjes, J. A., Demkow, T., Ferrero, J. M. and Rozenzweig, M., "Multinational, double-blind, phase III study of prednisone and either satraplatin or placebo in patients with castrate-refractory prostate cancer progressing after prior chemotherapy: the SPARC trial" **Journal of Clinical Oncology**, 27 (32): 5431 (2009).
46. Riddick, D. S., Lee, C., Ramji, S., Chinje, E. C., Cowen, R. L., Williams, K. J. and Waxman, D. J., "Cancer chemotherapy and drug metabolism", **Drug Metabolism and Disposition**, 33 (8):1083-1096 (2005).
47. Janeway, K. A. and Grier, H. E., "Sequelae of osteosarcoma medical therapy: a review of rare acute toxicities and late effects", **The Lancet Oncology**, 11 (7): 670-678 (2010).
48. Tacar, O. and Dass, C. R., "Doxorubicin-induced death in tumour cells and cardiomyocytes: is autophagy the key to improving future clinical outcomes?" **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 65 (11):1577-1589 (2013).
49. Gewirtz, D., "A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin", **Biochemical Pharmacology**, 57 (7): 727-741 (1999).
50. Menna, P., Salvatorelli, E. and Minotti, G., "Anthracycline degradation in cardiomyocytes: a journey to oxidative survival", **Chemical Research in Toxicology**, 23 (1): 6-10 (2010).
51. Carvalho, F. S., Burgeiro, A., Garcia, R., Moreno, A. J., Carvalho, R. A. and Oliveira, P. J., "Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy". **Medicinal Research Reviews**, 34 (1): 106-135 (2014).
52. Štěrbá, M., Popelová, O., Vávrová, A., Jirkovský, E., Kovaříková, P., Geršl, V. and Šimůnek, T., "Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection" **Antioxidants & Redox Signaling**, 18 (8): 899-929 (2013).
53. Kim, S. Y., Kim, S. J., Kim, B. J., Rah, S. Y., Chung, S. M., Im, M. J. and Kim, U. H., "Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca⁺² increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes" **Experimental & Molecular Medicine**, 38 (5): 535-545 (2006).
54. Deniaud, A., Maillier, E., Poncet, D., Kroemer, G., Lemaire, C. and Brenner, C., "Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis", **Oncogene**, 27 (3): 285-299 (2008).

55. Camello-Almaraz, C., Gomez-Pinilla, P. J., Pozo, M. J. and Camello, P. J. "Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling", **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 291 (5): C1082-C1088 (2006).
56. Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J. and Henikoff, S., "Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics", **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, 1845 (1):84-89 (2014).
57. Bodley, A., Liu, L. F., Israel, M., Seshadri, R., Koseki, Y., Giuliani, F. C. and Potmesil, M., "DNA topoisomerase II-mediated interaction of doxorubicin and daunorubicin congeners with DNA", **Cancer Research**, 49 (21): 5969-5978 (1989).
58. Troyano, A., Fernández, C., Sancho, P., de Blas, E. and Aller, P., "Effect of glutathione depletion on antitumor drug toxicity (apoptosis and necrosis) in U-937 human promonocytic cells: the role of intracellular oxidation", **Journal of Biological Chemistry**, 276 (50): 47107-47115 (2001).
59. Mimnaugh, E. G., Trush, M. A., Bhatnagar, M. and Gram, T. E., "Enhancement of reactive oxygen-dependent mitochondrial membrane lipid peroxidation by the anticancer drug adriamycin", **Biochemical Pharmacology**, 34 (6): 847-856 (1985).
60. Doroshow, J. H., "Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart", **Cancer Research**, 43 (2): 460-472 (1983).
61. Ishibashi, Y., Takahashi, N., Tokumaru, A., Karino, K., Sugamori, T., Sakane, T. and Shimada, T., "Activation of inducible NOS in peripheral vessels and outcomes in heart failure patients", **Journal of Cardiac Failure**, 14 (9): 724-731 (2008).
62. Schildknecht, S., Pape, R., Müller, N., Robotta, M., Marquardt, A., Bürkle, A. and Leist, M., "Neuroprotection by minocycline caused by direct and specific scavenging of peroxynitrite", **Journal of Biological Chemistry**, 286 (7): 4991-5002 (2011).
63. Barry, E., Alvarez, J. A., Scully, R. E., Miller, T. L. and Lipshultz, S. E., "Anthracycline-induced cardiotoxicity: Course, pathophysiology, prevention and management", **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, 8 (8): 1039-1058 (2007).
64. Alkreathy, H. M., Damanhoury, Z. A., Ahmed, N., Slevin, M. and Osman, A. M. M., "Mechanisms of cardioprotective effect of aged garlic extract against Doxorubicin-induced cardiotoxicity", **Integrative Cancer Therapies**, 11 (4): 364-370 (2012).
65. Chen B., Peng X., Pentassuglia L. and Lim C. C., "Molecular and cellular mechanisms of anthracycline cardiotoxicity", **Sawyer DBJC**, 7 (2):114-121 (2007).

66. Monti, E., Prosperi, E., Supino, R. and Bottiroli, G., "Free radical-dependent DNA lesions are involved in the delayed cardiotoxicity induced by adriamycin in the rat", **Anticancer research**, 15 (1): 193-197 (1995).
67. Papaiahgari, S., Zhang, Q., Kleeberger, S. R., Cho, H. Y. and Reddy, S. P., "Hyperoxia stimulates an Nrf2-ARE transcriptional response via ROS-EGFR-PI3K-Akt/ERK MAP kinase signaling in pulmonary epithelial cells", **Antioxidants & Redox Signaling**, 8 (1-2): 43-52. (2006).
68. Abou El Hassan M., Verheul H., Jorna A., Schalkwijk C., Van Bezu J. and Van der Vijgh W., "The new cardioprotector monohydroxyethylrutoside protects against doxorubicin-induced inflammatory effects in vitro", **Bast AJBjoc** 89 (2):357-362 (2003).
69. Mantawy, E. M., El-Bakly, W. M., Esmat, A., Badr, A. M. and El-Demerdash, E., "Chrysin alleviates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis", **European Journal of Pharmacology**, 728: 107-118 (2014).
70. Arafa, M. H., Mohammad, N. S., Atteia, H. H. and Abd-Elaziz, H. R., "Protective effect of resveratrol against doxorubicin-induced cardiac toxicity and fibrosis in male experimental rats", **Journal of Physiology and Biochemistry**, 70(3): 701-711 (2014).
71. Kang, Y. J., "Cardiac hypertrophy: a risk factor for QT-prolongation and cardiac sudden death", **Toxicologic Pathology**, 34 (1): 58-66 (2006).
72. Viero, R. M. and Soares, V. A., "The hemolytic uremic syndrome as a complication of adriamycin nephropathy", **Renal Failure**, 20 (4): 565-571 (1998).
73. Abdel-aleem, S., El-Merzabani, M. M., Sayed-Ahmed, M., Taylor, D. A. and Lowe, J. E., "Acute and chronic effects of adriamycin on fatty acid oxidation in isolated cardiac myocytes", **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 29 (2): 789-797 (1997).
74. Thayer, W. S., "Decreased cardiac lipoprotein lipase activity in rats treated chronically with adriamycin" **Life Sciences**, 36 (7): 635-641 (1985).
75. Seifert, C. F., Nesser, M. E. and Thompson, D. F., "Dexrazoxane in the prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity", **Annals of Pharmacotherapy**, 28 (9): 1063-1072 (1994).
76. Pavlova, V., Sainova, I., Alexieva, B., Valkova, I., Markova, T. and Nikolova, E., "Antioxidant effect of Aronia melanocarpa extract after doxorubicin Treatment", **Bulg. J. Agric. Sci**, 20: 188-192 (2014).

77. Ojha, S., Al Taei, H., Goyal, S., Mahajan, U. B., Patil, C. R., Arya, D. S. and Rajesh, M., "Cardioprotective potentials of plant-derived small molecules against doxorubicin associated cardiotoxicity". **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, (2016).
78. Kok, L. D. S., Wong, Y. P., Wu, T. W., Chan, H. C., Kwok, T. T. and Fung, K. P., "Morin hydrate: a potential antioxidant in minimizing the free-radicals-mediated damage to cardiovascular cells by anti-tumor drugs", **Life Sciences**, 67 (1): 91-99 (2000).
79. Choi, H. J., Seon, M. R., Lim, S. S., Kim, J. S., Chun, H. S. and Park, J. H. Y., "Hexane/ethanol extract of Glycyrrhiza uralensis licorice suppresses doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 rat cardiac myoblasts", **Experimental Biology and Medicine**, 233 (12): 1554-1560 (2008).
80. Chatterjee, K., Zhang, J., Tao, R., Honbo, N. and Karliner, J. S., "Vincristine attenuates doxorubicin cardiotoxicity", **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 373 (4): 555-560 (2008).
81. Choi, E. H., Lee, N., Kim, H. J., Kim, M. K., Chi, S. G., Kwon, D. Y. and Chun, H. S., "Schisandra fructus extract ameliorates doxorubicin-induced cytotoxicity in cardiomyocytes: altered gene expression for detoxification enzymes", **Genes & Nutrition**, 2 (4): 337-345 (2008).
82. Liu, L., Shi, R., Shi, Q., Cheng, Y. and Huo, Y., "Protective effect of saponins from Panax notoginseng against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice", **Planta Medica**, 74 (03): 203-209 (2008).
83. Wang, X., Chen, L., Wang, T., Jiang, X., Zhang, H., Li, P. and Gao, X., "Ginsenoside Rg3 antagonizes adriamycin-induced cardiotoxicity by improving endothelial dysfunction from oxidative stress via upregulating the Nrf2-ARE pathway through the activation of akt." **Phytomedicine**, 22 (10): 875-884 (2015).
84. Yi, S. Y., Nan, K. J. and Chen, S. J. "Effect of extract of Ginkgo biloba on doxorubicin-associated cardiotoxicity in patients with breast cancer", **Zhongguo Zhong xi yi jie he za zhi Zhongguo Zhongxiyi jiehe zazhi= Chinese journal of integrated traditional and Western medicine**, 28 (1): 68-70 (2008).
85. Petersen, G., Seberg, O., Thorsoe, S., Jorgensen, T. and Mathew, B., "A phylogeny of the genus Crocus (Iridaceae) based on sequence data from five plastid regions", **Taxon**, 57 (2): 487-499 (2008).
86. Fernández, J. A., Santana, O., Guardiola, J. L., Molina, R. V., Heslop-Harrison, P., Borbely, G. and De-Los-Mozos-Pascual, M., "The world saffron and Crocus collection: strategies for establishment, management, characterisation and utilisation", **Genetic Resources and Crop Evolution**, 58 (1): 125-137 (2011).

87. Caiola, M. G., Leonardi, D. and Canini, A., "Seed structure in *Crocus sativus* L., *C. cartwrightianus* Herb., *C. thomasii* Ten., and *C. hadriaticus* Herb. at SEM", **Plant Systematics and Evolution**, 285 (1): 111-120 (2010).
88. Aytekin, A. & Acikgoz, A. O., "Hormone and microorganism treatments in the cultivation of saffron (*Crocus sativus* L.) plants", **Molecules**, 13 (5): 1135-1147.(2008).
89. Gresta, F., Lombardo, G. M., Siracusa, L. and Ruberto, G., "Saffron, an alternative crop for sustainable agricultural systems", **A Review. Agronomy for Sustainable Development**, 28 (1): 95-112. (2008).
90. Gresta, F., Avola, G., Lombardo, G. M., Siracusa, L. & Ruberto, G., "Analysis of flowering, stigmas yield and qualitative traits of saffron (*Crocus sativus* L.) as affected by environmental conditions", **Scientia Horticulturae**, 119 (3): 320-324 (2009).
91. Sharaf-Eldin, M., Elkholy, S., Fernández, J. A., Junge, H., Cheetham, R., Guardiola, J. and Weathers, P., "Bacillus subtilis FZB24® affects flower quantity and quality of saffron (*Crocus sativus*)". **Planta Medica**, 74 (10): 1316. (2008).
92. Kumar, R., Singh, V., Devi, K., Sharma, M., Singh, M. K. and Ahuja, P. S., "State of art of saffron (*Crocus sativus* L.) agronomy: A comprehensive review", **Food Reviews International**, 25 (1): 44-85(2008).
93. Makri, O. E., Ferlemi, A. V., Lamari, F. N. and Georgakopoulos, C. D., "Saffron administration prevents selenite-induced cataractogenesis", **Molecular Vision**, 19: 1188 (2013).
94. Winterhalter, P. and Straubinger, M., "Saffron—renewed interest in an ancient spice", **Food Reviews International**, 16 (1): 39-59 (2000).
95. Srivastava, R., Ahmed, H. and Dixit, R. K., "Crocus sativus L.: A comprehensive review", **Pharmacognosy Reviews**, 4 (8): 200 (2010).
96. de Juan, J. A., Córcoles, H. L., Muñoz, R. M. and Picornell, M. R., "Yield and yield components of saffron under different cropping systems", **Industrial Crops and Products**, 30 (2): 212-219 (2009).
97. Hosseinzadeh, H. and Nassiri-Asl, M., "Avicenna's (Ibn Sina) the canon of medicine and saffron (*Crocus sativus*): a review", **Phytotherapy Research**, 27 (4): 475-483 (2013).
98. Abdullaev F., "Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials", **Espinosa-Aguirre JJCD**, 28 (6): 426-432 (2004).

99. Giaccio, M., "Crocetin from saffron: an active component of an ancient spice", **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 44 (3): 155-172 (2004).
100. Fernandez, J. A., "Genetic resources of saffron and allies (*Crocus* spp.)", **In II International Symposium on Saffron Biology and Technology**, 739: 167-185. (2006).
101. Sanders, K., Moran, Z., Shi, Z., Paul, R. and Greenlee, H., "Natural products for cancer prevention: clinical update", **In Seminars in Oncology Nursing**, 32 (3): 215-240 (2016).
102. Lee, B. M. and Park, K. K., "Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents", **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 523: 265-278 (2003).
103. Finkel, T., Serrano, M. and Blasco, M. A., "The common biology of cancer and ageing", **Nature**, 448 (7155): 767-774 (2007).
104. Bathaie, S. Z., Farajzade, A. and Hoshyar, R., "A review of the chemistry and uses of crocins and crocetin, the carotenoid natural dyes in saffron, with particular emphasis on applications as colorants including their use as biological stains", **Biotechnic & Histochemistry**, 89 (6): 401-411 (2014).
105. Milani, A., Basirnejad, M., Shahbazi, S. and Bolhassani, A., "Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment", **British Journal of Pharmacology**, 174 (11): 1290-1324 (2017).
106. Leja, K. B. and Czaczyk, K., "The industrial potential of herbs and spices a mini review", **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, 15 (4): 353-365 (2016).
107. Licón, C. C., Carmona, M., Molina, A. and Berruga, M. I., "Chemical, microbiological, textural, color, and sensory characteristics of pressed ewe milk cheeses with saffron (*Crocus sativus* L.) during ripening", **Journal of Dairy Science**, 95 (8): 4263-4274 (2012).
108. D'Archivio, A. A., Giannitto, A., Maggi, M. A. and Ruggieri, F., "Geographical classification of Italian saffron (*Crocus sativus* L.) based on chemical constituents determined by high-performance liquid-chromatography and by using linear discriminant analysis", **Food Chemistry**, 212: 110-116 (2016).
109. José Bagur, M., Alonso Salinas, G. L., Jiménez-Monreal, A. M., Chaouqi, S., Llorens, S., Martínez-Tomé, M. and Alonso, G. L., "Saffron: An old medicinal plant and a potential novel functional food", **Molecules**, 23 (1): 30 (2018).
110. Jin, Y. Y., Zhang, J. S., Zhang, Y. and Zhang, Y. H., "Studies on the intestinal absorption of crocin in rats and determination of the partition coefficient", **Journal-China Pharmaceutical University**, 35 (3): 283-284 (2004).

111. Asai, A., Nakano, T., Takahashi, M. and Nagao, A., "Orally administered crocetin and crocins are absorbed into blood plasma as crocetin and its glucuronide conjugates in mice", **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53 (18): 7302-7306 (2005).
112. Xi, L., Qian, Z., Du, P. and Fu, J., "Pharmacokinetic properties of crocin (crocetin digentiobiose ester) following oral administration in rats", **Phytomedicine**, 14 (9): 633-636 (2007).
113. Murphy, M. P., Holmgren, A., Larsson, N. G., Halliwell, B., Chang, C. J., Kalyanaraman, B. and Winterbourn, C. C., "Unraveling the biological roles of reactive oxygen species", **Cell Metabolism**, 13 (4): 361-366 (2011).
114. Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. and Aggarwal, B. B., "Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?", **Free Radical Biology and Medicine**, 49 (11): 1603-1616 (2010).
115. Bar-Or, D., Bar-Or, R., Rael, L. T. and Brody, E. N., "Oxidative stress in severe acute illness", **Redox Biology**, 4: 340-345 (2015).
116. Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P. and Malik, A. B., "Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury", **Antioxidants & Redox Signaling**, 20 (7): 1126-1167 (2014).
117. Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C., "Free radicals, antioxidants in disease and health", **International Journal of Biomedical Science: IJBS**, 4 (2): 89 (2008).
118. Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S. and Dhama, K., "Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay", **BioMed Research International**, (2014).
119. Wassmann, S., Wassmann, K. and Nickenig, G., "Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells", **Hypertension**, 44 (4): 381-386 (2004).
120. Sindhu, R. K., Ehdai, A., Farmand, F., Dhaliwal, K. K., Nguyen, T., Zhan, C. D. and Vaziri, N. D., "Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency", **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, 1743(1-2), 86-92 (2005).
121. Ebrahimian, T. and Touyz, R. M., "Thioredoxin in vascular biology: Role in hypertension", **Antioxidants & Redox Signaling**, 10 (6): 1127-1136 (2008).
122. Hamada, Y., Miyata, S., Nii-Kono, T., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Higo, S. and Kasuga, M., "Overexpression of thioredoxin1 in transgenic mice suppresses development of diabetic nephropathy", **Nephrology Dialysis Transplantation**, 22 (6): 1547-1557 (2007).

123. Yoshida, T., Nakamura, H., Masutani, H. and Yodoi, J., "The involvement of thioredoxin and thioredoxin binding protein-2 on cellular proliferation and aging process", **Annals-New York Academy of Sciences**, 1055 :1 (2005).
124. Carr, A. C., & Frei, B., "Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans", **The American Journal of Clinical Nutrition**, 69 (6): 1086-1107 (1999).
125. Abudu, N., Miller, J. J., Attaelmannan, M. and Levinson, S. S., "Vitamins in human arteriosclerosis with emphasis on vitamin C and vitamin E", **Clinica Chimica Acta**, 339 (1-2): 11-25 (2004).
126. Ando, M. and Tappel, A. L. "Effect of dietary vitamin E on methyl ethyl ketone peroxide damage to microsomal cytochrome P-450 peroxidase", **Chemico-Biological Interactions**, 55: 317-326 (1985).
127. Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C. and Giovannini, C., "Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes", **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 16 (10): 577-586 (2005).
128. Razmaraii, N., Babaei, H., Nayebi, A. M., Assadnassab, G., Helan, J. A. and Azarmi, Y., "Crocic treatment prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats", **Life sciences**, 157:145-151 (2016).
129. Razmaraii, N., Babaei, H., Nayebi, A. M., Asadnasab, G., Helan, J. A. and Azarmi, Y., "Cardioprotective effect of phenytoin on doxorubicin-induced cardiac toxicity in a rat model", **Journal of cardiovascular pharmacology**, 67(3): 237-245 (2016).
130. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K., "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction", **Analytical biochemistry**, 95 (2): 351-358 (1979).
131. Ellman, G. L., "Tissue sulfhydryl groups", **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 82 (1): 70-77 (1959).
132. Sun, Y. I., Oberley, L. W. and Li, Y., "A simple method for clinical assay of superoxide dismutase", **Clinical Chemistry**, 34 (3): 497-500 (1988).
133. Burnie, J. P., Coke, A. and Matthews, R. C., "Restriction endonuclease analysis of *Aspergillus fumigatus* DNA", **Journal of Clinical Pathology**, 45 (4): 324-327 (1992).
134. Erel, O., "A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status", **Clinical Biochemistry**, 38 (12): 1103-1111 (2005).

135. Erel, O., "A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation", **Clinical Biochemistry**, 37 (4): 277-285 (2004).
136. Babaei, H., Razmaraii, N., Assadnassab, G., Mohajjel Nayebi, A., Azarmi, Y., Mohammadnejad, D. and Azami, A., "Ultrastructural and echocardiographic assessment of chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats", **Archives of Razi Institute**, 75 (1): 55-62 (2020).
137. Razmaraii, N., Babaei, H., Nayebi, A. M., Assadnassab, G., Helan, J. A. and Azarmi, Y., "Cardioprotective effect of grape seed extract on chronic doxorubicin-induced cardiac toxicity in Wistar rats", **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, 6 (3): 423 (2016).
138. Tarr, A., Stoebe, S., Tuennemann, J., Baka, Z., Pfeiffer, D., Varga, A. and Hagendorff, A., "Early detection of cardiotoxicity by 2D and 3D deformation imaging in patients receiving chemotherapy", **Echo Research and Practice**, 2 (3): 81-88 (2015).
139. Takemura, G. and Fujiwara, H., "Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from the cardiotoxic mechanisms to management", **Progress in Cardiovascular Diseases**, 49 (5): 330-352 (2007).
140. Ahmed, H. H., Mannaa, F., Elmegeed, G. A. and Doss, S. H., "Cardioprotective activity of melatonin and its novel synthesized derivatives on doxorubicin-induced cardiotoxicity", **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 13 (5): 1847-1857 (2005).
141. Berthiaume, J. M. and Wallace, K. B., "Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity", **Cell Biology and Toxicology**, 23 (1): 15-25 (2007).
142. Deepa, P. R. and Varalakshmi, P., "Biochemical evaluation of the inflammatory changes in cardiac, hepatic and renal tissues of adriamycin-administered rats and the modulatory role of exogenous heparin-derivative treatment", **Chemico-biological Interactions**, 156 (2-3): 93-100 (2005).
143. De Beer, E. L., Bottone, A. E. and Voest, E. E., "Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review", **European Journal of Pharmacology**, 415 (1): 1-11 (2001).
144. Zhou, S., Starkov, A., Froberg, M. K., Leino, R. L. and Wallace, K. B., "Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin". **Cancer Research**, 61 (2): 771-777 (2001).
145. Ascensão, A., Magalhães, J., Soares, J. M., Ferreira, R., Neuparth, M. J., Marques, F. and Duarte, J. A., "Moderate endurance training prevents doxorubicin-induced in vivo mitochondriopathy and reduces the development

- of cardiac apoptosis", **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 289 (2): H722-H731 (2005).
146. Oner, Z., Altinoz, E., Elbe, H. and Ekinici, N., "The protective and therapeutic effects of linalool against doxorubicin-induced cardiotoxicity in Wistar albino rats" **Human & Experimental Toxicology**, 38 (7): 803-813 (2019).
 147. Songbo, M., Lang, H., Xinyong, C., Bin, X., Ping, Z. and Liang, S., "Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity", **Toxicology Letters**, 307: 41-48 (2019).
 148. Zamorano, J. L., Lancellotti, P., Rodriguez Muñoz, D., Aboyans, V., Asteggiano, R., Galderisi, M. and Suter, T. M., "ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC)", **European Heart Journal**, 37 (36): 2768-2801 (2016).
 149. Fernández, J. A., "Anticancer properties of saffron, *Crocus sativus* Linn" **Advances in Phytomedicine**, 2: 313-330 (2006).
 150. Konoshima, T., Takasaki, M., Tokuda, H., Morimoto, S., Tanaka, H., Kawata, E. and Shoyama, Y., "Crocic acid and crocetin derivatives inhibit skin tumour promotion in mice", **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, 12 (6): 400-404 (1998).
 151. Assimopoulou, A. N., Sinakos, Z. and Papageorgiou, V., "Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents" **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, 19 (11): 997-1000 (2005).
 152. Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H. R., Ziaee, T. and Danaee, A., "Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats". **J Pharm Pharm Sci**, 8 (3): 387-93 (2005).
 153. Pham, T. Q., Cormier, F., Farnworth, E., Tong, V. H. and Van Calsteren, M. R., "Antioxidant properties of crocin from *Gardenia jasminoides* Ellis and study of the reactions of crocin with linoleic acid and crocin with oxygen", **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48 (5): 1455-1461 (2000).
 154. Rahaiee, S., Moini, S., Hashemi, M. and Shojaosadati, S. A., "Evaluation of antioxidant activities of bioactive compounds and various extracts obtained from saffron (*Crocus sativus* L.): A review", **Journal of Food Science and Technology**, 52 (4): 1881-1888 (2015).

155. Qi, W., Boliang, W., Xiaoxi, T., Guoqiang, F., Jianbo, X. and Gang, W., "Cardamonin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice by restraining oxidative stress and inflammation associated with Nrf2 signaling", **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 122: 109547 (2020).
156. Sadek, K. M., Mahmoud, S. F., Zeweil, M. F. and Abouzed, T. K., "Proanthocyanidin alleviates doxorubicin-induced cardiac injury by inhibiting NF-kB pathway and modulating oxidative stress, cell cycle, and fibrogenesis", **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, 35 (4): 22716. (2021).
157. Deng, M., Li, D., Zhang, Y., Zhou, G., Liu, W., Cao, Y. and Zhang, W., "Protective effect of crocin on ultraviolet B-induced dermal fibroblast photoaging", **Molecular Medicine Reports**, 18 (2): 1439-1446 (2018).
158. Chu, X., Zhang, Y., Xue, Y., Li, Z., Shi, J., Wang, H. and Chu, L., "Crocine protects against cardiotoxicity induced by doxorubicin through TLR-2/NF- κ B signal pathway in vivo and vitro", **International Immunopharmacology**, 84: 106548 (2020).
159. Liang, Y., Zheng, B., Li, J., Shi, J., Chu, L., Han, X. and Zhang, J., "Crocine ameliorates arsenic trioxide-induced cardiotoxicity via Keap1-Nrf2/HO-1 pathway: Reducing oxidative stress, inflammation, and apoptosis", **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 131: 110713. (2020).
160. Goudarzi, M., Fatemi, I., Siahpoosh, A., Sezavar, S. H., Mansouri, E. and Mehrzadi, S., "Protective effect of ellagic acid against sodium arsenite-induced cardio-and hematotoxicity in rats", **Cardiovascular Toxicology**, 18 (4): 337-345 (2018).
161. Elsherbiny, N. M., Salama, M. F., Said, E., El-Sherbiny, M. and Al-Gayyar, M. M., "Crocine protects against doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats through down-regulation of inflammatory and apoptic pathways", **Chemico-biological Interactions**, 247: 39-48 (2016).
162. Hong, Y. M., Kim, H. S. and Yoon, H. R., "Serum lipid and fatty acid profiles in adriamycin-treated rats after administration of L-carnitine", **Pediatric Research**, 51 (2): 249-255 (2002).
163. Iliskovic, N. and Singal, P. K., "Lipid lowering: An important factor in preventing adriamycin-induced heart failure", **The American Journal of Pathology**, 150 (2): 727 (1997).
164. Alavizadeh, S. H. and Hosseinzadeh, H., "Bioactivity assessment and toxicity of crocin: A comprehensive review", **Food and Chemical Toxicology**, 64: 65-80 (2014).
165. Li, J., Lei, H. T., Cao, L., Mi, Y. N., Li, S. and Cao, Y. X., "Crocine alleviates coronary atherosclerosis via inhibiting lipid synthesis and inducing M2

- macrophage polarization", **International Immunopharmacology**, 55: 120-127 (2018).
166. Haybar, H., Goudarzi, M., Mehrzadi, S., Aminzadeh, A., Khodayar, M. J., Kalantar, M. and Fatemi, I., "Effect of gemfibrozil on cardiotoxicity induced by doxorubicin in male experimental rats", **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 109: 530-535 (2019).
 167. Alavizadeh, S. H. and Hosseinzadeh, H., "Bioactivity assessment and toxicity of crocin: A comprehensive review", **Food and Chemical Toxicology**, 64: 65-80 (2014).
 168. Sun, Z., Yan, B., Yu, W. Y., Yao, X., Ma, X., Sheng, G. and Ma, Q., "Vitexin attenuates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via the suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis and the activation of FOXO3a", **Experimental and Therapeutic Medicine**, 12 (3): 1879-1884 (2016).
 169. Dash, S. K., Chattopadhyay, S., Ghosh, T., Dash, S. S., Tripathy, S., Das, B. and Roy, S., "Self-assembled betulinic acid protects doxorubicin induced apoptosis followed by reduction of ROS–TNF- α –caspase-3 activity", **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 72: 144-157 (2015).
 170. Ma, T., Kandhare, A. D., Mukherjee-Kandhare, A. A. and Bodhankar, S. L., "Fisetin, a plant flavonoid ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity in experimental rats: The decisive role of caspase-3, COX-II, cTn-I, iNOs and TNF- α ", **Molecular Biology Reports**, 46 (1): 105-118 (2019).
 171. Shaker, R. A., Abboud, S. H., Assad, H. C. and Hadi, N., "Enoxaparin attenuates doxorubicin induced cardiotoxicity in rats via interfering with oxidative stress, inflammation and apoptosis", **BMC Pharmacology and Toxicology**, 19 (1): 1-10 (2018).
 172. Razavi, B. M., Hosseinzadeh, H., Movassaghi, A. R., Imenshahidi, M. and Abnous, K., "Protective effect of crocin on diazinon induced cardiotoxicity in rats in subchronic exposure", **Chemico-biological Interactions**, 203 (3): 547-555 (2013).
 173. Fernández, J. A., "Anticancer properties of saffron, *Crocus sativus* Linn." **Advances in Phytomedicine**, 2: 313-330 (2006).
 174. Goyal, S. N., Arora, S., Sharma, A. K., Joshi, S., Ray, R., Bhatia, J. and Arya, D. S., "Preventive effect of crocin of *Crocus sativus* on hemodynamic, biochemical, histopathological and ultrastructural alterations in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats", **Phytomedicine**, 17 (3-4): 227-232 (2010).
 175. Dianat, M., Esmailizadeh, M., Badavi, M., Samarbaaf-Zadeh, A. R. and Naghizadeh, B., "Protective effects of crocin on ischemia-reperfusion induced oxidative stress in comparison with vitamin E in isolated rat hearts",

Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, 9 (2): 150-156 (2014).

176. Konoshima, T., Takasaki, M., Tokuda, H., Morimoto, S., Tanaka, H., Kawata, E. and Shoyama, Y., "Crocic acid and crocetin derivatives inhibit skin tumour promotion in mice", **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, 12 (6): 400-404 (1998).
177. Assimopoulou, A. N., Sinakos, Z. and Papageorgiou, V., "Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents", **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, 19 (11): 997-1000 (2005).
178. Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H. R., Ziaee, T. and Danaee, A., "Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats", **J Pharm Pharm Sci**, 8 (3): 387-93 (2005).
179. Soeda, S., Ochiai, T., Shimeno, H., Saito, H., Abe, K., Tanaka, H. and Shoyama, Y., "Pharmacological activities of crocin in saffron", **Journal of Natural Medicines**, 61(2), 102-111 (2007).
180. Pham, T. Q., Cormier, F., Farnworth, E., Tong, V. H. and Van Calsteren, M. R., "Antioxidant properties of crocin from *Gardenia jasminoides* Ellis and study of the reactions of crocin with linoleic acid and crocin with oxygen". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48 (5): 1455-1461 (2000).
181. Rahaiee, S., Moini, S., Hashemi, M. and Shojaosadati, S. A., "Evaluation of antioxidant activities of bioactive compounds and various extracts obtained from saffron (*Crocus sativus* L.): A review", **Journal of Food Science and Technology**, 52 (4): 1881-1888 (2015).
182. Xu, G. L., Qian, Z. Y., Yu, S. Q., Gong, Z. N. and Shen, X. C., "Evidence of crocin against endothelial injury induced by hydrogen peroxide in vitro", **Journal of Asian Natural Products Research**, 8 (1-2): 79-85 (2006).
183. Xu, G., Gong, Z., Yu, W., Gao, L., He, S. and Qian, Z., "Increased expression ratio of Bcl-2/Bax is associated with crocin-mediated apoptosis in bovine aortic endothelial cells", **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 100 (1): 31-35 (2007).
184. He, S. Y., Qian, Z. Y., Tang, F. T., Wen, N., Xu, G. L. and Sheng, L., "Effect of crocin on experimental atherosclerosis in quails and its mechanisms", **Life Sciences**, 77 (8): 907-921 (2005).

185. Razavi, B. M., Hosseinzadeh, H., Abnous, K., Khoei, A. and Imenshahidi, M., "Protective effect of crocin against apoptosis induced by subchronic exposure of the rat vascular system to diazinon", **Toxicology and Industrial Health**, 32 (7): 1237-1245 (2016).
186. Cadenas, E. and Davies, K. J., "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging", **Free Radical Biology and Medicine**, 29 (3-4), 222-230 (2000).
187. Kumar, D. and Jugdutt, B. I., "Apoptosis and oxidants in the heart", **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, 142 (5): 288-297 (2003).
188. Hosseinzadeh, H., Abootorabi, A. and Sadeghnia, H. R., "Protective effect of *Crocus sativus* stigma extract and crocin (trans-crocin 4) on methyl methanesulfonate-induced DNA damage in mice organs", **DNA and Cell Biology**, 27 (12): 657-664 (2008).
189. Mehri, S., Abnous, K., Mousavi, S. H., Shariaty, V. M. and Hosseinzadeh, H., "Neuroprotective effect of crocin on acrylamide-induced cytotoxicity in PC12 cell", **Cellular and Molecular Neurobiology**, 32 (2): 227-235 (2012).
190. Soeda, S., Ochiai, T., Paopong, L., Tanaka, H., Shoyama, Y. and Shimeno, H., "Crocicn suppresses tumor necrosis factor- α -induced cell death of neuronally differentiated PC-12 cells", **Life Sciences**, 69 (24): 2887-2898 (2001).
191. Frenzel, A., Grespi, F., Chmielewski, W. and Villunger, A., "Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer", **Apoptosis**, 14 (4): 584-596 (2009).
192. Scorrano, L. and Korsmeyer, S. J., "Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members", **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 304 (3): 437-444 (2003).

EK AÇIKLAMALAR A.

ETİK KURUL İZİNİ



T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



TOPLANTI TARİHİ : 07/05/2020
TOPLANTI NO : 2020/04

- 1- Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2020-08-07/05 protokol no'lu "Wistar Ratlarda Doksorubisin ile İndüklenen Kardiyotoksisite Üzerine Krosin'in Koruyucu Etkilerinin Araştırılması" konulu çalışmasının Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

Prof. Dr. Emine YILMAZ CAN
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Sara Asaad Abdulkareem ALJUMAILI ilk ve orta öğrenimini Irak'ta tamamladı. Erbil- Zahra Lisesinden mezun oldu. 2016 yılında Hawler Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji bölümünden mezun oldu. 2021 yılında Karabük Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisans programını tamamladı.