DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

OMEGA 3 YAĞ ASİTLERİNİN DOKSORUBİSİN İLE İNDÜKLENEN KARDİYOTOKSİSİTE ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

DR.GÖZDE ERKUL

İZMİR 2022

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

OMEGA 3 YAĞ ASİTLERİNİN DOKSORUBİSİN İLE İNDÜKLENEN KARDİYOTOKSİSİTE ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

DR.GÖZDE ERKUL

Tez Danışmanı:

Prof.Dr.Ülker CANKURT

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık öğrencisi Gözde ERKUL'un**''Omega 3 Yağ Asitlerinin Doksorubisin İle İndüklenen Kardiyotoksisite Üzerine Etkisi''** konulu uzmanlık tezi 09.11.2022 tarihinde başarılı/başarısız olarak tamamlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL DİZİNİ ..... *iii*
GRAFİK DİZİNİ ..... *iv*
FİGÜR DİZİNİ ..... *v*
TABLO DİZİNİ ..... *vii*
TEŞEKKÜR ..... *viii*
ÖZET *1*
ABSTRACT *3*
1. GİRİŞ *5*
2. GENEL BİLGİLER *7*
2.1. Kalbin Histolojisi **7**
2.1.1. Endokardiyum 8
2.1.2. Miyokardiyum 8
2.1.3. Epikardiyum 10
2.2. Kalbin Embriyolojisi **10**
2.2.1. Primer Kalp Alanı ve Kalp Tüpünün Oluşması 10
2.2.2. Kalp Halkasının Oluşması 12
2.3. Doksorubisin **16**
2.3.1. Temel Moleküler ve Farmakolojik Özellikleri 16
2.3.2. Doksorubisin Kardiyotoksisitesi 17
2.4. Otofaji Ve Doksorubisinin İndüklediği Otofaji Mekanizması **18**
2.5. Piropitozis Ve Doksorubisin İle İndüklenen Piropitozis Mekanizması **21**
2.6. NF-Kappa B p65 ..... **24**
2.7. Omega 3 Yağ Asitlerinin Genel Özellikleri **24**
3. GEREÇ VE YÖNTEM *25*
3.1. Araştırmanın Tipi **25**
3.2. Araştırmanın Yeri Ve Zamanı **26**
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları **26**
3.4. Kan Örneklerinin Alınması **27**
3.5. Kalplerin Çıkarılması **27**
3.6. Çalışma Materyali **27**
3.7. Araştırmanın Değişkenleri **27**
3.8. Veri Toplama Araçları **27**
3.8.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler 27
3.8.2. Araştırmada Kullanılan Doksorubisin ve Omega 3 yağ asitinin Hazırlanması 28
3.8.3. Araştırmada Kullanılan Yöntemler 28
3.8.3.2.1. Rutin Doku Takibi 28
3.8.3.2.2. Hematoksilen–Eozin Boyama Yöntemi 29

3.8.3.2.3. Masson Trikrom Boyama Yöntemi 29
3.8.3.2.4. Kalp dokusunun histomorfolojisinin değerlendirilmesi: 29
3.8.3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler 30
3.8.3.3.1. İmmünohistokimya Boya Protokolü 30
3.8.3.3.2. İmmünohistokimya Değerlendirmesi 30
3.8.3.3.3. Semikantitatif İmmünohistokimyasal Analiz 30
3.8.3.4. Biyokimyasal İncelemeler 31
3.8.3.4.1. Biyokimyasal CK-MB,Troponin I,LDH Ölçümü: 31
3.9. Araştırma Planı ve Takvimi 31
3.10. Verilerin Değerlendirilmesi 32
4. BULGULAR 32
4.1. Vücut ağırlıklarının değerlendirmesi 32
4.2. Histopatolojik Bulgular 33
4.2.1. Hematoksilen-Eozin Boyama 33
4.2.2. Masson Trikrom Boyama 37
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular 40
4.3.1. Beclin 1 immünohistokimyasal boyama 40
4.3.2. LC3 II immünohistokimyasal boyama 42
4.3.3. NLRP3 immünohistokimyasal boyama 44
4.3.4. NF-Kappa B p65 immünohistokimyasal boyama 46
4.4. Biyokimyasal Bulgular 49
4.4.1. CK-MB seviyelerinin ölçümü 49
4.4.2. Troponin I seviyeleri 50
4.4.3. LDH seviyelerinin ölçümü 51
5. TARTIŞMA 52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 55
7. KAYNAKLAR 57

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Kalbin tabakalarının histolojik gösterimi……7

Şekil 2: 18 günlük embriyoda A-Primer Kalp Alanı hücreleri,B-splanknik mezoderm tabakası içindeki PKA hücrelerinin pozisyonu,C-Perikardiyal boşluğu ve PKA 'nı gösteren sefalokaudal boşluk……10

Şekil 3: Kardiyak Halkanın Oluşumu, A-22.gün , B- 23.gün ,C-24.gün, D-Perikard boşluğu içinde halkalaşmakta olan kalp tüpünün önden görünüşü……12

Şekil 4: A-C: 4. Ve 5. Haftalarda kalbin sagittal kesiti, D:Kalbin koronal kesiti……13

Şekil 5: Doksorubisinin moleküler yapısı……15

Şekil 6: Doksorubisinin kardiyotoksisite mekanizmaları……17

Şekil 7: Memeli hücrelerinde izlenen 3 otofaji tipi……18

Şekil 8: Makro-otofajinin 5 basamağı……19

Şekil 9: Doksorubisin ve otofaji……20

Şekil 10: Piropitozisin şematik gösterimi……21

Şekil 11: NLRP3 inflamozom yolağı tiplerinin şematik gösterimi……22

Şekil 12: Yağ asitlerinin sınıflandırılması……24

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 1: Denek ağırlık farklarının grafiksel gösterimi 33

Grafik 2: Sitoplazmik vakuolizasyon ve miyofibril kaybının gruplar arası dağılımının grafiksel gösterimi 36

Grafik 3: İntersitisyel fibrozisin gruplar arası dağılımının grafiksel gösterimi..... 38

Grafik 4: Beclin 1 immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun grafiksel gösterimi 41

Grafik 5 : LC3 II immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun grafiksel gösterimi.....43

Grafik 6: NLRP3 immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun grafiksel gösterimi.....45

Grafik 7 : NLRP3 immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun grafiksel gösterimi 48

Grafik 8: Serum CK-MB seviyelerinin grafiksel gösterimi 49

Grafik 9: Serum Troponin I seviyelerinin grafiksel gösterimi..... 50

Grafik 10 : Serum LDH seviyelerinin istatistiksel gösterimi 51

FİGÜR DİZİNİ

Figür 1:Kontrol(A) ve Omega 3 (B) gruplarına ait normal kalp dokusunun gösterilmesi 33

Figür 2: (A)Genişlemiş damar lümeni ve artmış duvar kalınlığı (siyah yıldız)(X10),hiyalen birikimine bağlı koyu renkli gözüken miyofibriller(siyah oklar);(B)hiyalen birikimine bağlı düzleşmiş ve koyu boyanmış miyofibril alanları (siyah oklar)(X40).....34

Figür 3: Vakuolizasyon (A);sitoplazması şişmiş ve soluk boyanan kardiyomiyositler(B) 34

Figür 4: Hemoraji ve konjesyon alanları (A ve B-siyah oklar);hiyalen birikimleri (A ve B-siyah yıldızlar) 35

Figür 5 : Miyofibril kaybı(siyah oklar),vakuolizasyon (kırmızı oklar),şişmiş hücreler (siyah ok başları) ve hemoraji (kırmızı ok başları) 35

Figür 6:DOX+Omega 3 grubunda azalmış hemoraji ve inflamasyon alanları, hücre şişmesinde ve vakuolizasyonda azalma,normale yakın nüklear morfoloji (A ve B)(A-X20;B-X40).....36

Figür 7 : Kontrol (A) ve Omega 3(B) grubu normal histolojik yapıda kalp dokusu(Masson Trikrom Boyaması) 37

Figür 8 :DOX grubunda Masson trikrom boyaması ile interstisyal alanda artmış fibrozisin(siyah yıldız-mavi ile boyanmış alanlar) ve parçalanmış miyofibrillerin(siyah oklar) gösterilmesi 37

Figür 9 : DOX+Omg3 grubunda Masson Trikrom boyama ile azalmış fibrozisin gösterilmesi....38

Figür 10: Kontrol (A) ve Omega 3 (B) gruplarına ait Beclin-1 immünohistokimyasal boyama...39

Figür 11: DOX grubu Beclin-1 immünohistokimyasal boyaması; A-x20, B-x40 39

Figür 12: DOX+Omega 3 grubunda Beclin-1 immünohistokimyasal boyama(x20) 40

Figür 13: DOX+Omega 3 grubunda Beclin-1 immünohistokimyasal boyama(x40) 40

Figür 14: Kontrol (A) ve Omega 3 (B) gruplarına ait LC3 II immünohistokimyasal boyama (x20).....41

Figür 15: DOX grubuna ait LC3 II immünohistokimyasal boyaması(x20) 42

Figür 16 : DOX+Omega 3 grubuna ait LC3 II immünohistokimyasal boyama(x20) 42

Figür 17 : Kontrol(A) ve Omega 3 (B) gruplarındaNLRP3 immünohistokimyasal boyama.....43

Figür 18 : DOX grubuna ait NLRP3 immünohistokimyasal boyama……44

Figür 19 : DOX+Omega 3 grubuna ait NLRP3 immünohistokimyasal boyama;(A-x20;B-x40)….44

Figür 20 : Kontrol(A) ve Omega 3 (B) gruplarına ait NF-kappa B p 65 immünohistokimyasal boyama…… 45

Figür 21 : DOX gruplarında NF-kappa B p65 immünohistokimyasal boyaması,(A)yaygın sitoplazmik boyanma ve nüklear tutulum(x20)(siyah oklar),(B) ve (C) sitoplazmik yoğun boyanma alanları ve pozitif boyanmış nükleuslar (siyah oklar),ısırılmış nükleus görünümü (kırmızı oklar)(x40) …… 46-47

Figür 22 : DOX+Omega 3 grubuna ait NF-kappa B p65 immünohistokimyasal boyama,Pozitif boyanmış nükleuslar (siyah oklar);(A)-x20 ve (B)-x40…… 47

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Semikantitatif İmmünohistokimyasal Skorlama 30
Tablo 2: Sıçan vücut ağırlıklarının grup ortalamaları 32

TEŞEKKÜR

Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum tıpta uzmanlık eğitimim boyunca tecrübe, bilgi birikimi ve şefkatini benden esirgemeyen,gerek tez çalışmalarımda gerek sosyal hayatımda bana destek olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Ülker CANKURT'a ,

uzmanlık eğitimi aldığım süre boyunca mesleki ve kişisel gelişimime eşsiz katkılarda bulunan değerli hocalarım Prof.Dr. Çetin PEKÇETİN , Prof. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK, Prof. Dr. Güven ERBİL, Doç. Dr. Seda ÖZBAL, Doç. Dr. Başak BAYKARA, Doç. Dr. Serap ÇİLAKER MIÇILI'ya ,

tez çalışmalarıma katkı ve destek sağlayan deneyim ve güler yüzünü esirgemeyen birlikte çalışmaktan onur duyduğum Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof.Dr.Zahide ÇAVDAR'a,

uzmanlık eğitimim boyunca bana her zaman destek olan ve yardımlarını,güler yüzlerini ve dostluklarını esirgemeyen çok değerli arkadaşlarım Dr.Fatma Sıla SOY HALAÇ, Dr.Tuba PERİ, Dr.Ali Rıza KARABULUT, Dr.Gizem AKIN, Dr.Özcan SARBAT,Dr.Meltem VARIŞ, Dr.Muhittin YERGİN'e, içten arkadaşlıklarının yanı sıra teknik ve bilimsel destekleriyle de her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım Nevin ERSOY, Gökçen BİLİCİ GÜLER, Şeyda DEMİR YÜKSEL ve Burcu BARAN'a,

Arkadaşlarım arasında ayrıca teşekkürü hakeden,canım dostum, tezimde çok büyük emeği geçen,dünyanın en iyi kalbine sahip insanı Selma AYDEMİR'e

Her çağırdığımda yanıma koşarak gelen ,maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiren canım annem Gülseren ÇALIŞIR ve canım babam Nevzat ÇALIŞIR'a,

Bir insanın sahip olabileceği en iyi kardeşler olan, en derinden sevgiyle bağlı olduğum, her gözyaşım ve her gülüşümde yanımda olan canım ablam Burcu ÇALIŞIR ve canım kardeşim Elçin Dilşat ÇALIŞIR'a

Bu uzun yolda bana sabırla eşlik eden sevgili eşim Barış ERKUL'a ve hayatımı adıyla aydınlatan ay ışığım, canım kızım Aylin ERKUL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Doksorubisin(DOX), yaklaşık 40 yıldır kullanılan güçlü bir anti-neoplastik etkiye sahip geniş spektrumlu bir antrasiklindir. Lösemi, lenfoma, tiroid kanseri, yumurtalık kanseri ve meme kanseri gibi çeşitli neoplazmaların tedavisinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, klinik uygulaması geri dönüşü olmayan yan etkilerin görülme sıklığı nedeniyle oldukça sınırlı durumdadır. Özellikle doza bağlı kardiyotoksisite DOX'in en tehlikeli komplikasyonudur ve sonunda ölümcül kalp yetmezliğine yol açabilir . Doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisitede yer alan mekanizma karmaşık ve çok faktörlüdür; bununla birlikte, yapılan çalışmalar oksidatif stres ve apoptozun önemli rol oynadığını göstermektedir[1]–[9].

Omega-3 yağ asitleri uzun zincirli poliansatüre lipitlerdir;bu nedenle PUFA olarak da adlandırılmaktadır.Omega-3 yağ asitleri α-linoleik asit (ALA), eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asittir (DHA). En sık kaynağı ise balık yağıdır. Omega-3 yağ asitleri, plazma trigliserit (TG) düzeyleri, istirahat kalp hızı, aritmi, aterosklerotik plak, kan basıncı (BP), trombosit agregasyonu ve aynı zamanda miyokard dolumu ve verimini artırabilir. Aynı zamanda inflamasyonu azalttıkları da bilinmektedir[4], [10], [11].

Doksorubisin ile indüklenmiş kalp hasarına karşı omega-3 yağ asidi etkisinin histolojik olarak incelenmesine ait çalışma literatürde sınırlı sayıdadır. Biz bu çalışmada amacımızı doksorubisin verilerek kardiyotoksisite oluşturulan sıçan kalp dokusunda, meydana gelen hasara karşı kuvvetli bir antioksidan olan omega-3 yağ asidi uygulamasının histokimyasal, immünohistokimyasal, ve biyokimyasal etkilerini incelemek olarak belirledik. Bu amaçla dört gruptan oluşan bir araştırma planı hazırladık. Buna göre çalışmamızda 20 adet 180-250 gr erkek Wistar Albino türü sıçan kullanıldı. Gruplar rastgele olarak ayrıldı; Grup 1 : kontrol grubu, serum fizyolojik verilecek grup, Grup 2: Omega-3 yağ asidi verilecek grup (14 gün), Grup 3: Doksorubisin (1,6,11. günler) verilecek olan grup, Grup 4: Doksorubisin(1,6,11.günler) +Omega-3 yağ asidi (14gün) verilecek olan grup şeklinde ayarlandı. Deneklerin vücut ağırlıkları deneyin başında ve sonunda tartıldı. Deney sonunda sıçanlar sakrifiye edildi,kan ve kalp doku örnekleri toplandı. Alınan kan örneklerinden serumda CK-MB, LDH ve Troponin I değerlerine bakıldı. Kalp dokuları %10'luk formaldehit içine alındı. Rutin doku takibi işlemlerinin ardından kesitleri alındı ve morfolojik değerlendirme için hematoksilen-eozin ve Masson Trikrom ile boyandı, immünohistokimyasal incelemeler için ise Beclin-1,LC3 II,NLRP3 ve NF-kappa B p65 antikoru ile immün boyama yapıldı ve semikantitatif olarak skorlandı. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Deney sonunda DOX grubu ve DOX +Omega 3 verilen grupta sıçanların vücut ağırlıklarının kontrol ve Omega 3 gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı görüldü. Morfolojik değerlendirmelerde, DOX+Omega 3 grubundaki kardiyomiyositlerde, DOX grubundaki kardiyomiyositlere kıyasla daha az dejeneratif değişikliğe rastlandı. Beclin-1,LC3 II, NLRP3 ve NF-kappa B p65, boyanma yoğunlukları karşılaştırıldığında, kontrol, Omega 3 ve DOX+Omega 3 gruplarındaki boyanma yoğunlukları, DOX grubuna göre anlamlı olarak daha

azdı. Sonuç olarak, DOX ile birlikte Omega 3 tedavisi verildiğinde, DOX ile indüklenen kardiyotoksisitede istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Doksorubisin, Omega 3 yağ asitleri, kardiyotoksisite, otofaji, piropitoz

Danışman: Prof.Dr.Ülker Cankurt-Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji A.D., İzmir

ABSTRACT

Doxorubicin (DOX) is a broad-spectrum anthracycline with a potent anti-neoplastic effect that has been used for nearly 40 years. It is used in the treatment of various neoplasms such as leukemia, lymphoma, thyroid cancer, ovarian cancer and breast cancer. However, its clinical application is quite limited due to the incidence of irreversible side effects. In particular, dose-related cardiotoxicity is the most dangerous complication of DOX and can eventually lead to fatal heart failure. The mechanism involved in doxorubicin-induced cardiotoxicity is complex and multifactorial; However, studies show that oxidative stress and apoptosis play important roles.

Omega-3 fatty acids are long chain polyunsaturated lipids, hence also called PUFA. Omega-3 fatty acids are α-linoleic acid (ALA), eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). The most common source is fish oil. Omega-3 fatty acids can increase plasma triglyceride (TG) levels, resting heart rate, arrhythmia, atherosclerotic plaque, blood pressure (BP), platelet aggregation, as well as myocardial filling and yield. They are also known to reduce inflammation.

The histological study of the effect of omega-3 fatty acids against doxorubicin-induced heart damage is limited in the literature. In this study, we determined our aim as to examine the histochemical, immunohistochemical, and biochemical effects of omega-3 fatty acid application, which is a strong antioxidant, against the damage in rat heart tissue, in which cardiotoxicity was induced by doxorubicin administration. For this purpose, we prepared a research plan consisting of four groups. Accordingly, 20 male Wistar Albino rats 180-250 gr were used in our study. Groups were randomly divided:

Group 1: the control group, the group to be given physiological saline, Group 2: the group to be given omega-3 fatty acids (14 days), Group 3: the group to be given doxorubicin (days 1, 6, 11), Group 4: the group to be given doxorubicin (1,6 ,11.days) + Omega-3 fatty acid (14days) was adjusted as the group to be given. The body weights of the subjects were weighed at the beginning and end of the experiment. At the end of the experiment, the rats were sacrificed, blood and heart tissue samples were collected. CK-MB, LDH and Troponin I values in serum were measured from blood samples. Heart tissues were fixed into 10% neutral buffered formalin.

Following routine tissue processing, sections were taken and stained with hematoxylin-eosin and Masson Trichrome for morphological evaluation, and immunostaining was performed with Beclin-1, LC3 II, NLRP3 and NF-kappa B p65 antibody for immunohistochemical examinations and the staining intensity scored semiquantitatively. Obtained data were evaluated statistically. At the end of the experiment, it was observed that the body weights of the rats in the DOX group and DOX + Omega 3 group were significantly reduced compared to the control and Omega 3 groups. Morphological evaluations revealed less degenerative changes in cardiomyocytes in the DOX+Omega 3 group compared to cardiomyocytes in the DOX group.

When the staining intensities of Beclin-1, LC3 II, NLRP3 and NF-kappa B p65 were compared, the staining intensities in the control, Omega 3 and DOX+Omega 3 groups were significantly lower than in the DOX group. As a result, when DOX and Omega 3 treatment were given, a statistically significant reduction in DOX-induced cardiotoxicity was demonstrated.

Key Words: Doxorubicin,Omega 3 fatty acids,cardiotoxicity,autophagy,pyroptosis

Danışman: Prof.Dr.Ülker Cankurt-Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji A.D.,İzmir

1. GİRİŞ

Doksorubisin(DOX) günümüzde birçok kanserin tedavisinde kullanılan sınıf I antrasiklin antibiyotik grubuna dahil potent bir kemoterapötik ajandır. Güçlü etki potansiyeline rağmen doksorubisinin kullanımı ciddi yan etkilerinden dolayı sınırlıdır. En belirgin ve bilinen yan etkisi ise akut olarak veya ilacın kesilmesinden yıllar sonra bile görülebilen kardiyotoksik yan etkilerdir[1], [5], [12]–[14]. DOX kardiyotoksisitesi; kardiyomiyosit hasarı, apoptotik ve nekrotik hücre ölümü hatta piroptotik hücre ölümü şeklinde kendini göstermektedir[1], [2], [5]. Kardiyotoksisitenin klinik bulguları ise sıklıkla sol ventrikül disfonksiyonu, dilate kardiyomiyopati ve kalp yetmezliğidir. DOX toksisitesi genellikle kümülatif doza bağımlı olarak görülmektedir. Toksisiteye bağlı kalp hastalıkları kümülatif doz olarak 400mg/m2 alan hastaların %3-5 'inde, 700mg/m2 alan hastalarınsa %18-48 inde ortaya çıkmıştır.(71mg/m2 alan farelerinse %100 ünde görülmüştür.)

Doksorubisin temelde bir mitokondrial toksindir ve DOX'un neden olduğu kardiyomiyosit hasarının temelinde mitokondri hasarı bulunmaktadır. Kardiyomiyositler kasılma fonsiyonuna sahip hücreler olduğundan yüksek ATP ihtiyaçları bulunmaktadır. Bu ATP ihtiyacını da çok sayıda mitokondri içeriği ile karşılamaktadırlar[1]. DOX varlığına cevaben üretilen aşırı miktardaki reaktif oksijen radikalleri ve nitrojen radikallerinin kardiyomiyosit mitokondrilerini hasarlamasının DOX bağımlı kardiyotoksisitedeki hücre ölümünün ana nedeni olduğu düşünülmektedir[1], [3]. DOX bağımlı kardiyotoksisitenin başka bir mekanizması da demir şelasyonu ve DOX içeriğindeki α-ketol grubudur[3].

Omega 3 yağ asitleri, fonksiyonel karboksilik asit grubunu içeren bir asit ucu ve omega ucu olarak da bilinen bir metil ucu olan çoklu doymamış yağ asitleridir(polyunsaturated fatty acid-PUFA)[15], [16]. Omega-3 yağ asitleri insan vücudunda üretilemeyen esansiyel yağlardır ve diyetle alınması zorunludur. Yiyeceklerden alınan üç ana tip omega-3 yağ asidi vardır: α-linolenik asit(ALA), eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA). EPA ve DHA, gen ekspresyonunu ve antienflamatuar süreçleri değiştiren en önemli omega-3 yağ asitleridir. EPA ve DHA ile besin takviyesi, membran fosfolipidlerinin değişimi ile kardiyak mitokondriyal fonksiyonu ve enerjiyi etkilemektedir[15], [17]. Hayvanlar ve kültür hücreleri dahil olmak üzere çeşitli deneysel modellerden elde edilen bulgular, omega-3 yağ asitlerinin anti-enflamatuar moleküller olduğunu göstermektedir. Hayvan modellerinde, omega-3 yağ asitleri, miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı ve doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisite dahil olmak üzere çeşitli kardiyovasküler hasar formlarına karşı koruma sağlar[18], [19].

PUFA'nın kardiyoprotektif etkilerinin altında yatan spesifik mekanizmalar tam olarak anlaşılmamıştır. Bu diyetsel yağ asitlerinin, hücrelerde ve dokularda pleiotropik etkiler gösterme yeteneğinin, temel olarak, hücresel zarların yapısal fosfolipitlerine dahil olmaları ve geçirgenlik, hasarlanma ve akışkanlık gibi fizikokimyasal özelliklerini değiştirme yeteneğiyle ilgili olduğuna inanılmaktadır.(5)Omega-3 aynı zamanda tümör nekrozis faktör (TNF) , interlökin-1 (IL-1)ve interlökin-6(IL-6) gibi sitokinleri de azaltmaktadır[17]–[19].

Doksorubisinin kardiyotoksik etkisinin en önemli nedenlerinden birisi reaktif oksijen radikalleri ve nitrojen radikalleri oluşturarak mitokondriyal hasar ve apoptotik, nekrotik, otofajik ve piroptotik hücre ölümü oluşturmasıdır[1]–[3], [20]–[23]. Omega-3 yağ asitleri ise membran fosfolipitlerinin değişimi ile mitokondriyal disfonksiyonu engellemektedir[11], [18], [24]–[26]. Bu nedenle çalışmamızda doksorubisinin neden olduğu kardiyotoksisiteyi ve omega-3 yağ asitlerinin doksorubisin ile indüklenen kardiyotoksisite üzeine etkisini histokimyasal, immunohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle göstermeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalbin Histolojisi

Kalp, ritmik kontraksiyonlar yaparak kanı pompalayan kalın, içi boş ve kas yapısında bir organdır[27].Kalp toraks boşluğunun yaklaşık 2/3 sol tarafında ,orta mediastende ve oblik şekilde yer alır[28], [29].Perikardiyum denilen sağlam fibröz bir kese ile çevrelenmiştir[27]–[29].Bu kese aracılığı ile diyafragma ve komşu organlara sıkıca tutunmaktadır.[29] Kalp, sağ ve sol atriumlar ve sağ ve sol ventriküller olmak üzere dört boşluk içermektedir. Atriyumları interatriyal septum, ventrikülleri ise interventriküler septum denilen yapılar sağ ve sol olarak ayırmaktadır[28], [29].

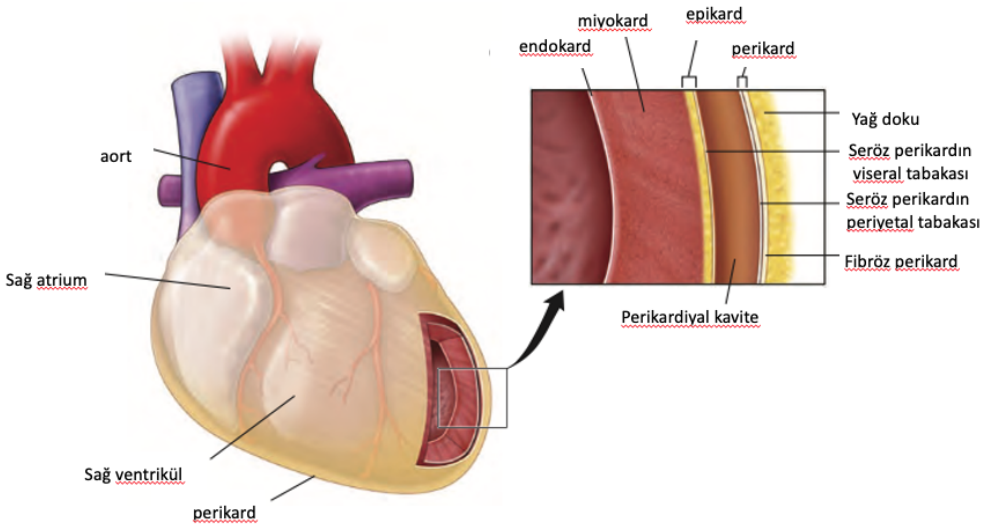
Atriyumları ve ventrikülleri oluşturan kalp kası hücreleri kalbin fibröz iskeletine tutunmaktadırlar [29]. Kalp kasına ve kapakçıklarına tutunma yüzeyi oluşturan, sıkı bağ dokusu özelliğindeki kalbin fibröz iskeletini oluşturan yapılar şunlardır [27]–[29]

- Kalp kapakçıklarını çevreleyen dört adet annuli fibrozi
- Annuli fibrozilerin arasında bulunan trigonum fibrozum dekstrum ve sinistrum
- Ventriküllerin arasında bulunan septumun üst kısmını oluşturan membranöz septum

(pars membranacea)

Kalbin fibröz iskeleti atriyum ve ventrikül miyokardiumu için bağımsız tutunma parçaları sağlamaktadır.Aynı zamanda , atriumlar ve ventriküller arasında serbest elektriksel impuls akımını önleyici bir elektrik izolatörü olarak da davranmaktadır[29] .

Kalp duvarı histolojik olarak içten dışa doğru, endokardiyum, miyokardiyum ve epikardiyum adı verilen üç temel tabakadan oluşur [27]–[29]



Şekil1: Kalbin tabakalarının histolojik gösterimi[29]

2.1.1. Endokardiyum

Atrium ve ventriküllerin içini döşeyen parlak,ince bir membrandır.Atriumlarda -özellikle sol atriumda-kalın,ventriküllerde ise daha incedir. Bu nedenle atrium içinde beyaz renkte, ventriküllerde ise alttaki kalp kasının rengini yansıttığından kırmızı renkte görünür.Kan damarlarının kalbe girip çıktığı yerlerde intima tabakası ile devamlılık gösterir[27]. Endotel ve subendotelial bağ dokusunu içeren bir iç tabaka, bağ dokusu ve düz kas hücreleri içeren bir orta tabaka ve subendokardiyal tabaka olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır[28], [29].

2.1.2. Miyokardiyum

Kalp kasından oluşmaktadır ve kalbin ana komponentidir[29]. Kalp kası hücrelerine kardiyomiyosit adı verilmektedir. Kalp kası iskelet kası ile aynı tipte ve düzenlenişte kontraktil filamentler içermektedir. Bu nedenle histolojik kesitlerde kalp kası lifleri belirgin enine çizgilenme göstermektedir. Aynı zamanda kalp kası lifleri interkalar disk adı verilen yoğun boyanan enine bantlar sergiler. Bu diskler lifleri doğrusal biçimde ve genellikle merdiven basamağına benzer şekilde çaprazlar. İnterkalar diskler bitişik hücreler arasındaki yüksek düzeyde özelleşmiş bağlantı bölgelerini temsil ederler ve uyarının tüm kalbe yayılımını sağlar. Böylece kalbin histolojik sinsityal yapısı olmamasına rağmen neden fonksiyonel sinsityum gibi davrandığı açıklanabilir. Bu doğrusal hücre-hücre bağlantıları değişken uzunluktaki liflerle sonuçlanır. Dolayısıyla kalp kası lifleri uç uca eklenmiş tek nükleuslu silindirik hücreler oluşurlar. Aynı zamanda interkalar diskler bir hücrenin birden fazla hücre ile bağlantı kurmasını sağlayarak dallı lif yapısının-kas ağı- oluşmasını da sağlamaktadır[27]–[29]. İnterkalar diskler transvers ve

lateral komponentlerinde 3 tip bağlantı içermektedir: fasiya adherhens, makula adherens ve oluklu bağlantılar[29].

Kardiyomiyositlerin nüklesu oval biçimli tek ve ortada yerleşik olarak bulunur. Transmission elektron mikroskobu(TEM) kalp kası miyofibrillerinin bu nükleusun etrafından geçebilmek için ayrıldığını böylece hücre organellerinin yoğunlaştığı bikonik jukstanüklear bir bölgenin oluştuğunu göstermiştir.Bu bölge özellikle mitokondriyon bakımından oldukça zengindir ve golgi aygıtı, lipofuskin pigment granülleri ve glikojen içermektedir[28], [29].

Kardiyomiyositler jukstanüklear mitokondriyonlara ek olarak miyofibrillerin arasında yoğun olarak paketlenmiş büyük mitokondriyonlar da bulundurmaktadır[29].

Kalp kası atriumlarda ince, sol ventrikülde ise en kalındır. Atriumun dış bölümündeki kaslar transvers ya da oblik seyirlidir ve her iki atriumu da dıştan sarar. İç bölümdeki atrium kasları ise her iki atriumda birbirinden bağımsız olarak dış tabaka kasları ile dik açı yapacak şekilde düzenlenir. En içteki kas bantları atriumun aurikula bölgesinde m.pectinatus adı verilen bir kabartı yapar. Kaslar dıştan içe doğru giderek yoğunlaşır.

Ventriküllerdeki kaslar değişik yönlerde seyrederek birden fazla tabaka oluşturur. Kas fibrilleri embriyoda süngerimsi bir ağ yapısında iken yetişkin dönemde kompakt bir kitle halini alır. Ventrikül duvarında embriyonik dönemden kalan tek tek yerleşimli kas fibrilleri görülebilir.Bu kas fibrilleri kendilerini kuşatan endokardla birlikte ***trabekula karnea*** olarak adlandırılmaktadır.

Ventriküllerdeki miyokard elastik fibril yönünden fakirdir bu karşın atriumlarda ise elastik fibriller kas fibrilleri arasında oldukça yaygın olarak bulunmaktadır. Bu elastik fibriller hem epikard ve endokardda bulunan elastik fibrillerle hem de büyük venlerin duvarlarında yer alan elastik fibrillerle devamlılık halindedir[27].

Atriyumları ve ventrikülleri oluşturan kalp kası hücrelerinin en iç tabakada yer alanları kalbin fibröz iskeletine tutunmaktadırlar[27],[29]. Kalp kasına ve kapakçıklarına tutunma yüzeyi oluşturan, sıkı bağ dokusu özelliğindeki kalbin fibröz iskeletini oluşturan yapılar şunlardır [27]–[29]

- Kalp kapakçıklarını çevreleyen dört adet annuli fibrozi
- Annuli fibrozilerin arasında bulunan trigonum fibrozum dekstrum ve sinistrum
- Ventriküllerin arasında bulunan septumun üst kısmını oluşturan membranöz septum

(pars membranacea)

Kalbin fibröz iskeleti atriyum ve ventrikül miyokardiumu için bağımsız tutunma parçaları sağlamaktadır. Aynı zamanda , atriumlar ve ventriküller arasında serbest elektriksel impuls akımını önleyici bir elektrik izolatörü olarak da davranmaktadır[29] .

2.1.3. Epikardiyum

Epikardiyum, perikardın visseral yaprağı olan seröz bir membrandır[27]. Kalbin dış yüzeyine yapışmıştır. Tek tabaka halinde mezotelyum hücrelerinden ve bunların altındaki bağ dokusu ve adipoz dokudan oluşmaktadır[27], [29]. Kalbi destekleyen kan damarları ve sinirler epikardiyumda adipoz doku ile çevrelenmiş şekilde uzanırlar[29].

Epikardiyum kalbe giren ve kalpten çıkan büyük damarlarda seröz perikardiyumun pariyetal parçası olarak geri döner. Seröz perikardiyumun visseral ve pariyetal yaprakları arasında az miktarda(15-50ml) seröz sıvı bulunan potansiyel bir boşluk-perkardiyal kavite- bulunur[27]–[29].

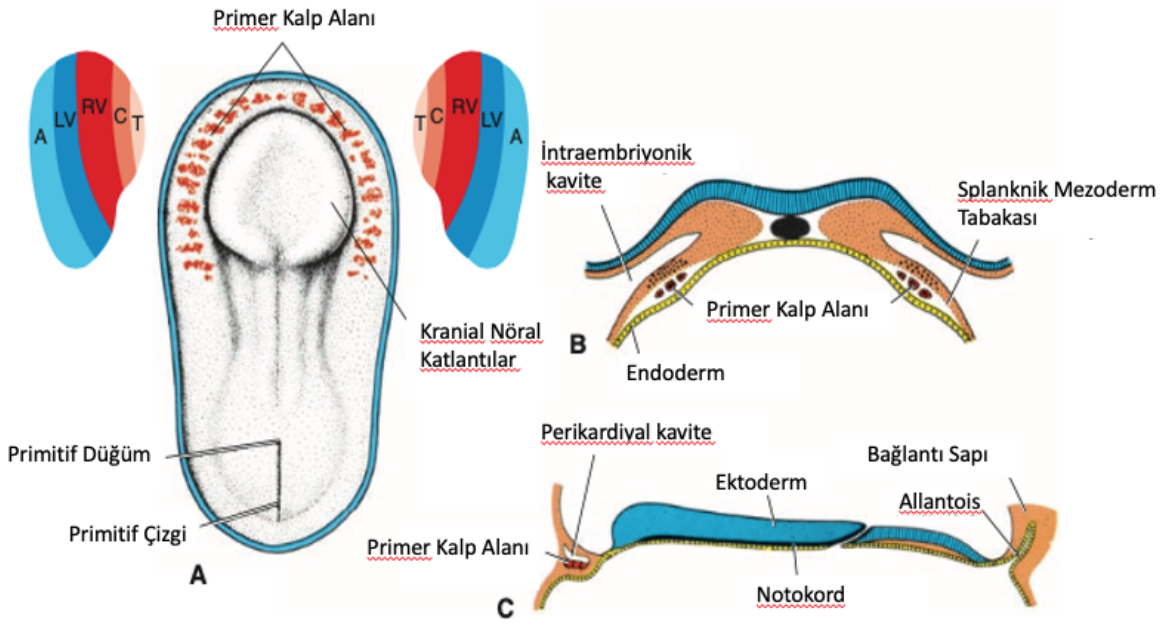
2.2. Kalbin Embriyolojisi

Kalp ve damar sistemi embriyoda işlev görmeye başlayan ilk sistemdir [30]. 3. haftanın ortasına kadar metabolik gereksinimlerini difüzyonla sağlayabilen embriyo bu tarihten sonra hızla büyümeye başladığından metabolik gereksinimlerini sağlayabilmek için yeni bir sisteme ihtiyaç duyar. Primordiyal kalp ve damar sistemi işte bu hızlı gelişim nedeniyle metabolik gereksinimlerin artmasının bir sonucu olarak 3. haftanın ortasında oluşmaya başlar [30], [31]. Kalp ve damar sistemi dört yapıdan gelişmektedir [30].

- Splanknik mezoderm
- Paraksiyal ve lateral mezoderm
- Faringeal mezoderm
- Nöral krista hücreleri

2.2.1. Primer Kalp Alanı ve Kalp Tüpünün Oluşması

Öncü kalp hücreleri,primitif çizginin kranial ucunun hemen lateralindeki epiblastta yer alırlar. Buradan çizgi boyunca ilerleyerek nötral katlantıların kranialinde, at nalı görünümlü bir hücre kümesi olan **primer kalp alanı**nı (PKA) oluşturmak üzere lateral plak mezoderminin splanknik tabakasına ulaşırlar[31]. Hücrelerden ilk göç edenler, kalbin kraniyal bölümlerini oluştururken daha sonrakiler sırasıyla sağ ventrikül, sol ventrikül ve sinüs venozus gibi daha kaudal kısımlarını oluşturur[30], [31]. Sağ ventrikülün bir kısmı,konus kordis ve trunkus arteriozus gibi kısımlar ise **sekonder kalp alanı**ndan (SKA) gelişir.[31]



Şekil 2: 18 günlük embriyoda A-Primer Kalp Alanı hücreleri,B-splanknik mezoderm tabakası içindeki PKA hücrelerinin pozisyonu,C-Perikardiyal boşluğu ve PKA 'nı gösteren sefalokaudal boşluk[31]

Öncü kalp hücreleri gestasyonun yaklaşık 16. Gününde primitif çizgi boyunca göç ederlerken, lateralden mediale doğru iki tarafta da kalbin değişik parçalarını oluşturacak şekilde özelleşirler. Hücreler primer kalp alanını oluşturduktan sonra, altlarındaki faringeal endodermin uyarısıyla kardiyak miyoblastlara ve kan adacıklarına dönüşürler. Zamanla bu hücre adacıkları birleşerek, at nalı şeklinde , iç yüzü endotelle döşeli,dışı miyoblastlarla çevrili bir tüp oluştururlar. Bu yapıya **kardiyojenik alan** denir. Bu alanın üzerindeki intraembriyonik boşluk, daha sonra **perikardiyal boşluk** haline gelecektir(Şekil 2). Ayrıca orta hattın yakınında ve her iki tarafında paralel yerleşimli başka kan adacıkları da belirir. Bunlar **dorsal aortalar** denilen uzunlamasına bir çift damar oluştururlar.

Embriyo büyürken ,hem sefalokaudal hem de lateral yönde bükülür. Böylece iki yanda bir .ift halinde bulunan kardiyak taslaklar en uçları dışında kaudal bölgelerinde birbirine yaklaşarak kaynaşırlar. Aynı anda at nalı şeklindeki bölgenin hilale benzeyen parçası genişler. Böylece kalp, kaudal kutuptan giren venöz kanı, kranial uçta birinci aortik arkusta dorsal aortaya pompalayan, iç yüzü endotelle döşeli dışı da miyokardiyal tabakadan oluşan kesintisiz ve geniş bir tüp halini alır. Gelişmekte olan kalp tüpü, zamanla perikardiyal boşluğa doğru bombeleşir. En başta perikardiyal boşluğa dorsal mezokardiyum ile asılı halde bulunurken daha sonra bu yapı ortadan kalkar ve kalp, kranial ve kaudal uçlarından kan damarlarıyla asılı hale gelir[31].

Bu olaylar sırasında miyokard kalınlaşır ve kendisini endotel tabakasından ayıran, hyalüronik asitten zengin ***kardiyak jel*** adı verilen kalın bir ekstraselüler matriks tabakası salgılar. Bu sırada dorsal mezokardiyumun kaudal sınırında bulunan mezenşimal hücreler proepikardial organı

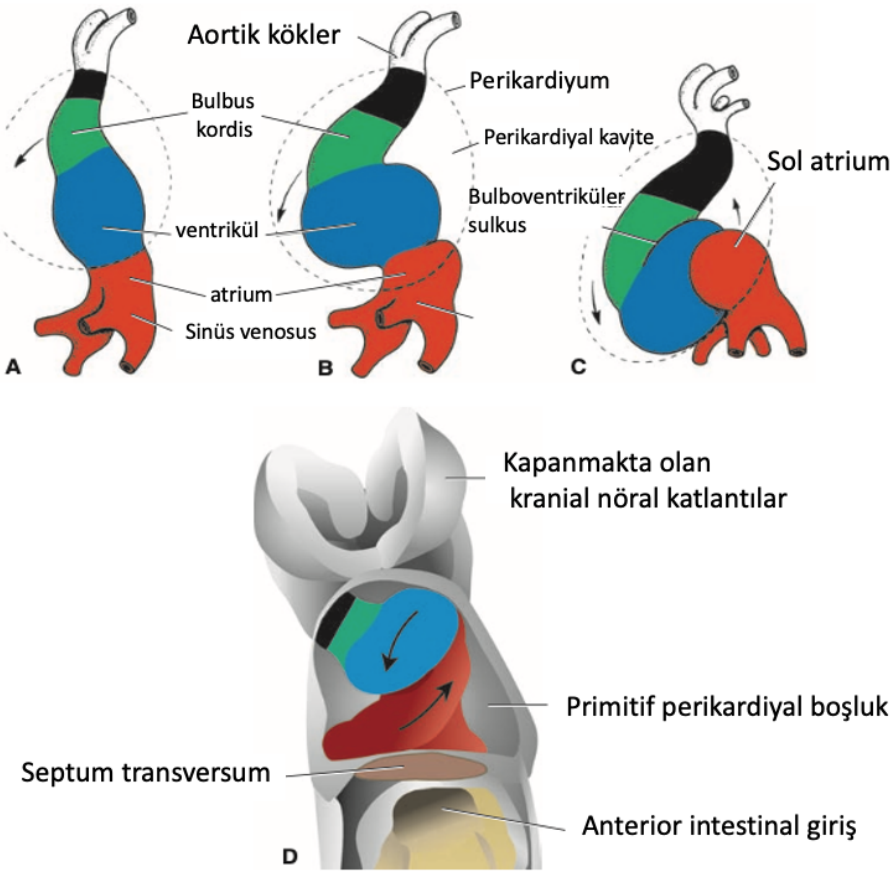
oluştururlar. Bu yapının hücreleri hızla prolife olur ve miyokard üzerinden göç ederek kalbin epikardial tabakasını oluşturur. Böylece kalp tüpü 3 tabakalı yapısına ulaşmış olur: içten dışa doğru endokard-miyokard ve epikard.

2.2.2. Kalp Halkasının Oluşması

Kalp tüpü 23.-28. günler arasında kıvrılıp bükülme süreci geçirerek kardiyak halkaya dönüşür [13, 14]. Bu dönüşüm sırasında kalp tüpünün kranial bölümü ventrale, kaudale ve sağa doğru kıvrılırken, kaudal bölümü de dorsale, kraniale ve sola doğru bükülür [31]. Tüm bu süreçle eş zamanlı olarak kalp tüpünde bölgesel genişlemeler oluşur [31]. Bu oluşumlar kaudalden kraniale doğru şu şekilde sıralanabilir[30], [31]:

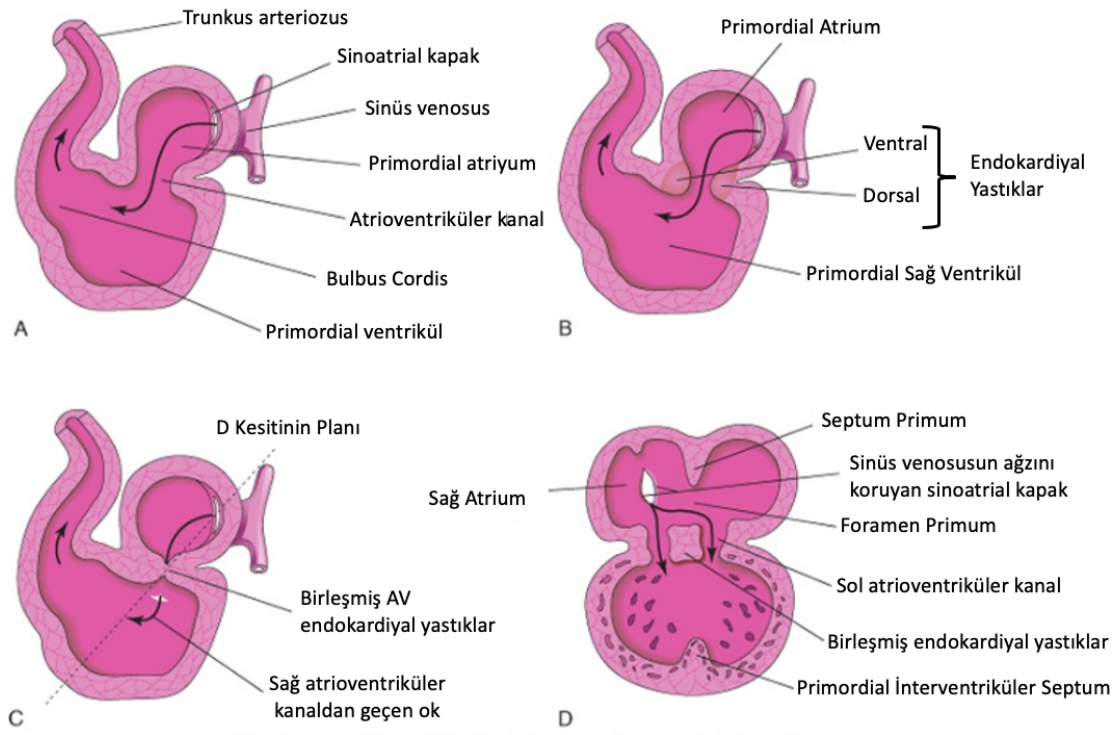
- Vitellin, umbilikal ve ortak kardinal venlerle gelen kanın toplandığı sinüs venozus
- Primordiyal atriyum
- Primordiyal ventrikül
- Bulbus kordis
- Konus kordis
- Trunkus arteriyozus.

Bu genişlemeler arasında da dar yapılar halinde kalan **atriyoventriküler bileşke** içte **atriyoventriküler kanalı** oluştururken, dışarıdan **bulboventriküler sulkus** olarak belli olan sınır da içte **primer interventriküler foramen**i oluşturur[31]. Primer interventriküler foramenin proksimal ve distal kısımlarından ilkel trabeküller geliştikten sonra, trabeküler bir yapı kazanan primordiyal ventrikül primitif sol ventriküle dönüşürken, **bulbus kordisin** trabeküle hale gelen üçte birlik proksimal kısmı da primitif sağ ventriküle dönüşür [30], [31]. Bulbus kordisin orta kısmı olan **konus kordis**, ventriküllerin akım çıkış kanallarını oluşturacak iken, uç kısmı olan **trunkus arteriyozus** ise aort ve pulmoner arterin köklerini ve ilk kısımlarını oluşturacaktır (Şekil 3) [31].



Şekil 3: Kardiyak Halkanın Oluşumu, A-22.gün , B- 23.gün ,C-24.gün, D-Perikard boşluğu içinde halkalaşmakta olan kalp tüpünün önden görünüşü[31]

Primordiyal kalpte bölümlere ayrılma 4. haftanın ortalarında başlayarak 8. haftanın sonlarında tamamlanır ve farklı bölümlerin gelişimi eş zamanlı olarak gerçekleşir [30]. Dördüncü haftanın sonlarına doğru atriyoventriküler (AV) kanalın ön ve arka duvarlarında mezenkim kökenli, kardiyak jöleden 2 adet endokardiyal yastık oluşur ve 5. hafta boyunca birbirine yaklaşan bu iki yapı birleşerek AV kanalı sağ ve sol olmak üzere ikiye böler[30]. Sağlı sollu bu iki kanal primordiyal atriyumu primordiyal ventrikülden kısmen ayırmakta ve endokardiyal yastıklar AV kapak işlevi görmektedir(Şekil 4) [30], [31].



Şekil4: A-C: 4. Ve 5. Haftalarda kalbin sagittal kesiti, D:Kalbin koronal kesiti[31]

AV endokardiyal yastıkların füzyonundan sonra, AV kanal açıklıklarının etrafı bölgesel mezenkim ile sarılırken kan akımının etkisiyle ventriküler taraftaki mezenkimal doku yer yer incelerek perfore olur ve sonuçta ventrikül duvarına kas uzantılarıyla bağlanan kapakçıklar ortaya çıkar (Şekil 4)[14]. Kas uzantılarının yerini zamanla bağ dokusu alır ve sol AV kanalda biküspid, sağ AV kanalda ise triküspid kapakçıklar, **korda tendinea** adı verilen bu bağ dokusu uzantılarla ventrikül duvarındaki kalın trabeküler yapılar olan papiller kaslara tutunur [31]

Dördüncü haftanın sonunda, primordiyal atriyumun tepe kısmından endokardiyal yastıklara doğru, **septum primum** adı verilen ince bir membran uzayarak primordiyal atriyumu kısmen sağ ve sol yarılara ayırır[30]. Septum primumun endokardiyal yastıklara doğru büyümeye devam etmesi sonucunda, bu iki yapı arasında kalan ve **foramen primum** (ostium primum) olarak adlandırılan açıklık da giderek küçülür ve bu iki yapının füzyonuyla kapanır[31]. Sağ atriyumdan sol atriyuma kan akışına izin veren foramen primum kapanmadan önce, apopitoz nedeniyle septum primumun orta kısmında oluşan doku kaybıyla ikinci bir açıklık olan **foramen sekundum** (ostium sekundum) şekillenir[30], [31].

Sağ atriyumun duvarında, septum primumun hemen yanında bu kez kalın müsküler bir katlantı belirir. Septum sekundum adı verilen bu yapı 5. ve 6. haftalar süresince uzayarak foramen sekundumun üzerini örter [30]. Septum sekundum da atriyumları tam olarak ayırmayıp, üst ve

alt uzantıları arasında foramen ovale adı verilen bir açıklık bulundurur [30], [31]. Septum primumun sol atriyum çatısına yapışık olan kısmı zamanla gerileyip ortadan kalkarken, endokardiyal yastıklara bitişik haldeki geri kalan kısmı da foramen ovalenin kapakçığı gibi işlev görmeye başlar[30], [31]. İntrauterin yaşamda bu kapakçık kanın sağ atriyumdan sol atriyuma doğru tek yönlü geçişine izin verirken, doğumu takiben akciğer solunumunun devreye girmesi sol atriyum basıncının sağa göre artmasına ve artan basınç da bu kapakçığın fonksiyonel olarak kapanmasına neden olur[30], [31]. Doğumdan yaklaşık 3 ay sonra da kapakçık septum sekundum ile kaynaşarak fossa ovaleyi oluşturur [30].

Primitif sol atriyumun arka duvarından başlangıçta tek bir pulmoner ven gelişirken, ilerleyen dönemde gelişmeye devam eden sol atriyuma giren pulmoner ven sayısı erişkinde olduğu gibi dörde ulaşır [31]. Pulmoner venlerin katılımıyla erişkinde sol atriyum duvarının büyük düz kısmı şekillenirken, trabeküler bir görünümü olan ve primordiyal atriyumdan köken alan atriyal appendiks ise sol atriyumun küçük bir kısmını oluşturur[30], [31]. Primordiyal kalp halka şeklini alırken, sinüs venozus da sağ ve sol sinüs boynuzları adı verilen lateral genişlemeler gösterir [30]. Soldan sağa şantların bir sonucu olarak sağ sinüs boynuzu genişleyerek 4. haftanın sonlarına doğru sol boynuzdan belirgin olarak daha büyük bir hale gelir[30], [31]. Bu şantlardan biri anterior kardinal venler anastomoz yaptığında oluşur. Soldakinden sağ anterior kardinal vene doğru oluşan bu şant sol brakiyosefalik veni oluştururken, sağ anterior kardinal ven ve sağ ortak kardinal ven, superiyor vena kava'ya (VKS) dönüşür[31]. Sinüs venozusun sağ boynuzu genişlemeye devam ederken, VKS ve inferiyor vena kava (VKİ) yoluyla tüm embriyo gövdesinden ve plasentadan gelen kanı toplamaktadır. Başlangıçta ayrı bir bölüm olan sinüs venozus, sol boynuzunun koroner sinüse dönüşmesi ve sağ boynuzunun da sağ atriyum duvar yapısına katılmasıyla sağ atriyumun düz parçası olan sinüs venaruma dönüşür [30]. Sağ atriyumun geri kalan trabeküler kısmı ile sinüs venarumu, iç yüzde krista terminalis dış yüzde ise sulkus terminalis birbirinden ayırır[30], [31].

Primordiyal ventrikülün bölünmesi, müsküler interventriküler septum adı verilen bir kabartının, ventrikül duvarının tabanında belirmesiyle başlar[30]. Genişleyen iki primitif ventrikülün iç duvarlarının birleşmesiyle oluşan bu yapı, daha sonra septumdaki miyoblastların aktif proliferasyonuyla uzamaya devam eder [30], [31]. Yedinci haftaya kadar, müsküler interventriküler septumun serbest ucu ile birleşmiş endokardiyal yastıklar arasında, interventriküler foramen adı verilen ve iki ventrikül arasında bağlantı sağlayan bir açıklık bulunur. Endokardiyal yastıktan uzayan doku, müsküler interventriküler septumla birleşir ve yedinci haftanın sonunda interventriküler forameni kapatarak septumun membranöz kısmını oluşturur [30]. Gelişen ventriküllerin iç yüzeyindeki kavitasyonlar sonucunda trabeküla karnea adı verilen müsküler gruplar ağı oluşur. Bu müsküler demetlerin bir kısmı da papiller kaslara ve korda tendinealara dönüşür [30].

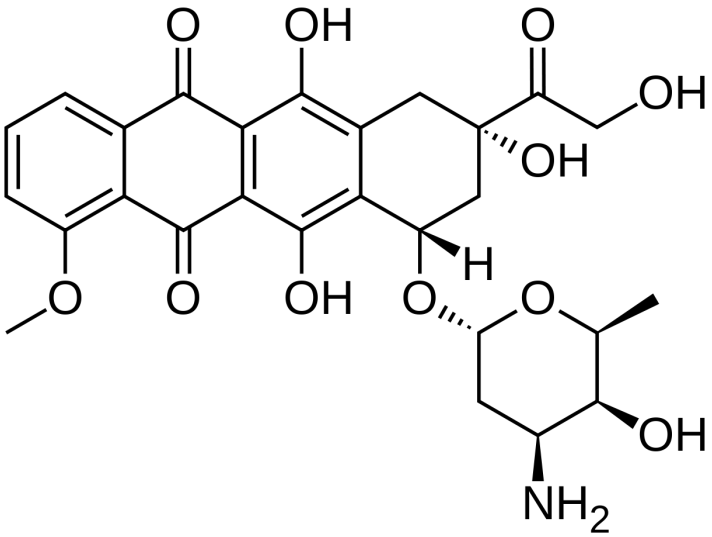
Bulbus kordis duvarındaki mezenkimal hücre proliferasyonu sonucu, beşinci haftada bir çift konus tümseği ve eş zamanlı olarak, bu tümseklerle devamlılık gösteren, bir çift de trunkus tümseği oluşur. Nöral kristadan göç eden hücreler bu tümsek bölgelerine yerleşerek konus

kordis ve trunkus arteriozusta endokardiyal yastıkların oluşumunda yer alırlar. Bu süreçte tümseklerin karşılıklı büyüyerek füzyona uğraması sonucunda, spiral seyirli bir **aortikopulmoner septum** oluşur. Bu septum konus kordis ve trunkus arteriyozusu, **çıkan aorta** ve **pulmoner trunkus** olarak adlandırılan iki arteryal kanala ayırır. Ventrikül duvarlarıyla kaynaşan bulbus kordis, sağ ventrikülde **konus arteriyozusa** dönüşürken, sol ventrikülde de **aortik vestibülü** oluşturur [30], [31]. Trunkus bölünmesi sonlanmak üzereyken aort ve pulmoner trunkus ağızlarının etrafındaki subendokardiyal dokudan semilunar kapakçıklar gelişmeye başlar [30].

2.3. Doksorubisin

2.3.1. Temel Moleküler ve Farmakolojik Özellikleri

Doksorubisin mutasyona uğramış *Streptomyces peucetius var. Caseius ailesinin sekonder metabolitidir*[14], [22], [32]–[34]. Ana metabolit doksorubisinoldür. Dox ve doksorubisinol plazma proteinlerine bağlanarak taşınırlar. Hücre içine pasif difüzyon ile girerek esas olarak nükleusta birikme eğilimindedir [21]. Dox aynı zamanda da antrasiklin grubu bir antibiyotiktir ve günümüzde çok sayıda kanserin tedavisinde antineoplastik olarak kullanılmaktadır. Pediatrik kanserler,lösemi,meme kanseri vb. birçok kanserin etkin tedavisinde kullanımı bulunmaktadır[35]–[37]. Ancak çoklu sistemik yan etkiler nedeniyle kullanımı son derece sınırlandırılmıştır[22]. Doksorubisinin dokulara penetrasyon yeteneği çok yüksektir[21] ve tedavi sırasında kalp, karaciğer ve böbrek gibi dokularda birikerek plazmadan 5-10 kat kadar yüksek konsantrasyonlara ulaşırken[38] kan beyin bariyerini geçme yeteneği ise yoktur[21]. Doksorubisin karaciğerde metabolize olur ve fekal yolla vücuttan atılır[21].



Şekil 5: Doksorubisinin moleküler yapısı[39]

DOX'un etki mekanizması hala tam anlaşılamamış olsa da interlokasyon yoluyla DNA'nın çift sarmal yapısı ile etkileşime girdiğini düşündüren çok sayıda çalışma mevcuttur [9], [40]. DOX interlokasyon ile DNA fonksiyonunu ve RNA polimerazın etkisini baskılayarak hücre bölünmesinin S fazındaki hücreler üzerinde sitotoksisite oluşturmaktadır. DOX'un ürettiği serbest radikaller ise DNA ve hücre zarı hasarına yol açan bir başka etki mekanizması olarak tanımlanmaktadır[41]. Ayrıca DOX hücre membran proteinlerine bağlanarak, membranın fiziksel özelliklerini değiştirir ve hücre membran fonksiyonunu bozar [42].

2.3.2. Doksorubisin Kardiyotoksisitesi

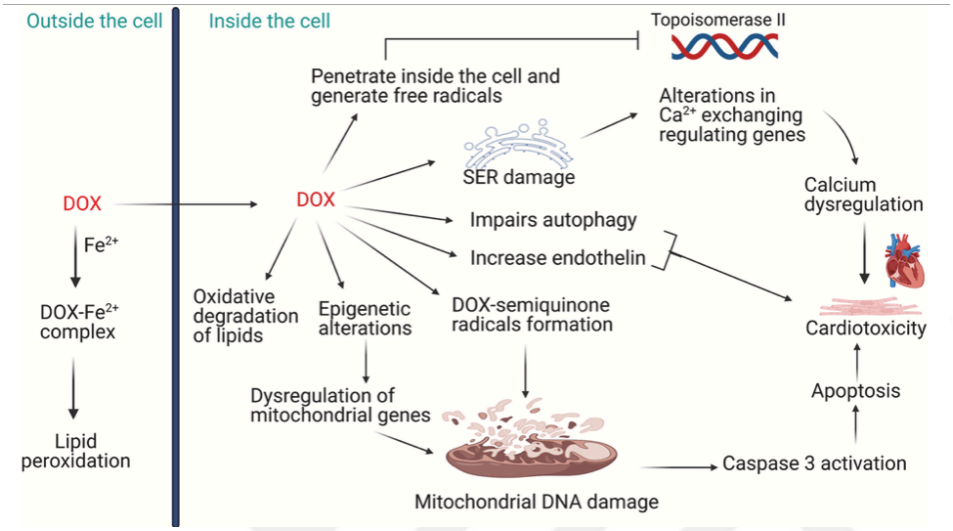
DOX kardiyotoksisitesinin temel nedeni olarak apopitoza bağlı kardiyomiyosit hasarı ve oksidatif stres gösterilmektedir[6], [22], [32]. Kardiyotoksisitenin klinik bulguları ise sıklıkla sol ventrikül disfonksiyonu, dilate kardiyomiyopati ve kalp yetmezliğidir[13], [14], [43]. DOX toksisitesi genellikle kümülatif doza bağımlı olarak görülmektedir. Kalp, büyük mitokondriyal içeriği nedeniyle DOX kaynaklı hasara karşı daha hassastır ve bu da onu oksidatif strese daha duyarlı hale getirir. Ayrıca kalp, diğer dokulara göre daha düşük rejeneratif yetenek sergiler. Oksidatif stres, inflamasyon, otofaji ve artan apoptoz gibi çok sayıda olumsuz faktör, DOX ile indüklenen kardiyotoksisite ile ilişkilendirilmiştir[9], [44], [45]. Toksisiteye bağlı kalp hastalıkları kümülatif doz olarak 400mg/m2 alan hastaların %3-5 'inde, 700mg/m2 alan hastalarınsa %18-48 inde ortaya çıkmıştır[32], [45].(71mg/m2 alan farelerinse %100 ünde görülmüştür.)

Doksorubisin temelde bir mitokondrial toksindir ve DOX'un neden olduğu kardiyomiyosit hasarının temelinde mitokondri hasarı bulunmaktadır[9]. Kardiyomiyositler kasılma fonsiyonuna sahip hücreler olduğundan yüksek ATP ihtiyaçları bulunmaktadır. Bu ATP ihtiyacını da çok sayıda mitokondri içeriği ile karşılamaktadırlar[1]. DOX varlığına cevaben üretilen aşırı miktardaki reaktif oksijen radikalleri (ROS) ve nitrojen radikallerinin kardiyomiyosit mitokondrilerini hasarlamasının DOX bağımlı kardiyotoksisitedeki hücre ölümünün ana nedeni olduğu düşünülmektedir[1], [3], [46], [47]. Nitrik oksit sentaz (NOS) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat-oksidaz (NOX) enzimleri, Dox kaynaklı ROS üretiminde önemli bir rol oynamaktadır [22]. DOX bağımlı kardiyotoksisitenin başka bir mekanizması da demir şelasyonu ve DOX içeriğindeki α-ketol grubudur[3].

DOX kaynaklı hücresel değişiklikler (hasarlanmış organel birikimi vb.) ayrıca ATP üretimi için mitokondriyal kapasitenin önemli ölçüde azaltılması otofajiyi tetiklemektedir[22]. Otofaji Bcl2/Beclin1 etkileşimini engelleyen Bcl2 fosforilasyonunun Dox tarafından artırılması sonucu başlar. Doksorubisinin, mitokondride NLRP3'ün ekspresyonunu artırarak piroptozu tetiklediği farklı bir yol da gösterilmiştir[23]. Bu çalışmada doksorubisinin otofajik ve piropitotik etkileri göz önüne alınacaktır; ancak doksorubisinin kardiyotoksisite mekanizması daha bir çok moleküler yolak içermektedir[22], [48]. Bunlardan bazıları:

-oksidatif stres
-AMPK sinyal yolağı
-Kreatin kinaz
-Endotelin-1
-Apoptoz

-Fibrosis(bu çalışmada incelenecek bir diğer etki)
-Epigenetik mekanizmalar[22]

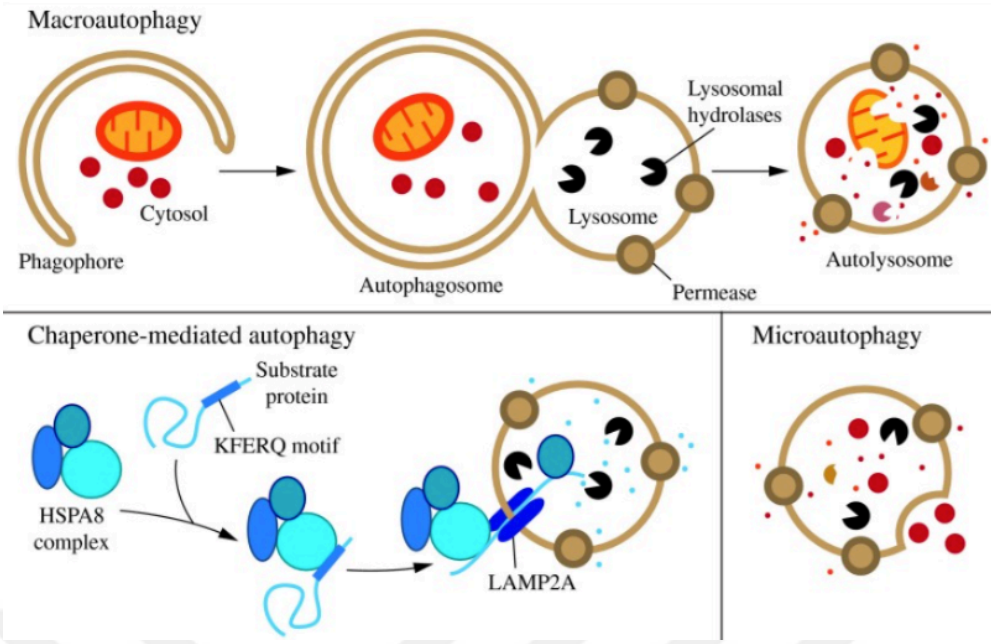


Şekil 6: Doksorubisinin kardiyotoksisite mekanizmaları[22]

2.4. Otofaji Ve Doksorubisinin İndüklediği Otofaji Mekanizması

Otofaji Yunanca ‘’kendini yeme’’ anlamına gelir ve yaklaşık 60 yıl önce, glukagon perfüzyonu yaptığı sıçanların karaciğerinde lizozomal ve mitokondrial bozulmalar tanımlayan Christian de Duve tarafından keşfedilmiştir. Otofajinin moleküler mekanizmasının tanımlanmasının çoğu Saccharomyces cerevisiae adlı maya üzerinde yapılmıştır. Günümüzde bu maya üzerinden tanımlanmış 32 farklı otofajik molekül bulunmaktadır[49].

Otofaji, hem fizyolojik hem de patolojik koşullarda homeostazın ve hayatta kalma durumunun sürdürülmesini sağlayan, ökaryotik hücrelerde koruyucu bir süreç olarak tanımlanmaktadır[1], [23], [50]. Otofaji, mikro-otofaji, şaperon aracılı otofaji ve makro-otofaji olarak üçe ayrılır[1], [49]–[53]. 3 tip de lizozomda sitozolik bileşenlerin proteolitik bozunmasını içermektedir[49], [54]. Bu çalışmada bahsi geçen tip olan makro-otofaji ise (bundan sonra otofaji olarak bahsedilecek), otofagozom olarak adlandırılan ve bir otolizozom oluşturmak üzere lizozomla birleşen, çift zara bağlı bir kesecik aracılığıyla lizozoma sitoplazmik kargo/paket iletimi olarak tanımlanır[1], [49]–[54].



Şekil 7: Memeli hücrelerinde izlenen 3 otofaji tipi[54]

Otofaji süreci birkaç adımdan oluşur. Otofaji, fagofor adı verilen ve daha sonra protein kümeleri veya hasarlı organelleri içine almak için genişleyerek çift membranlı otofagozomu oluşturan bir izolasyon zarı ile başlar. Oluşan otofagozomda kargo ya da paket izole edilir ve yüklenen otofagozom, lizozom ile füzyon yoluyla olgunlaşır. Bu olgunlaşma ile otofagosomal içeriklerin lizozomal asit proteazları tarafından bozulması tetiklenmiş olur. Lizozomal permeazlar ve taşıyıcılar,ortaya çıkan amino asitleri ve diğer yan ürünleri, makromoleküller oluşturmak ve metabolizma için yeniden kullanılabilmeleri için sitoplazmaya geri verirler.(geri dönüşüm fabrikası)[49].

Otofajinin moleküler düzenlenmesi ise 5 aşamada gerçekleşir[54]:

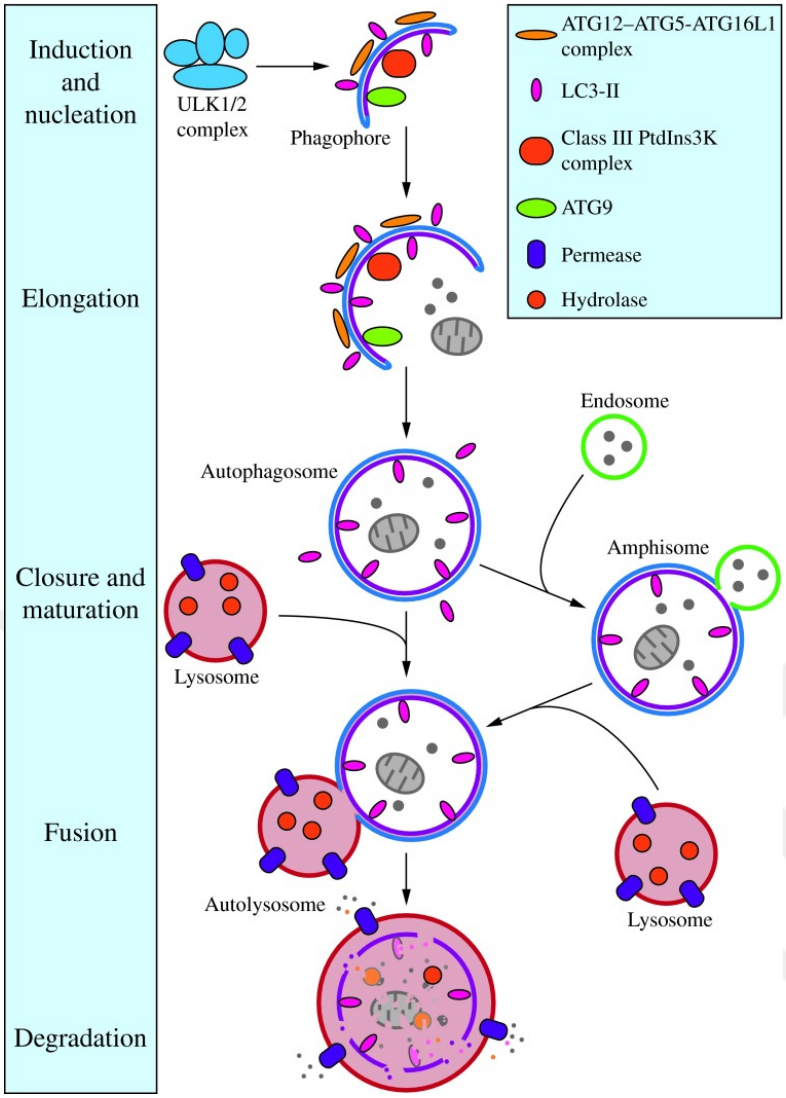
1-İndüksiyon ve Nükleasyon

2-Elongasyon(Atg5–Atg12 konjugasyonu, Atg16L ile etkileşim ve fagoforda multimerizasyon)

3-Kapanma ve maturasyon(Bozunma için rastgele veya seçici hedeflerin yakalanması ,LC3 işleme ve uzayan fagofor zarına yerleştirme)

4- Füzyon(Otofagozomun lizozomla füzyonu)

5- Degradasyon



Şekil 8: Makro-otofajinin 5 basamağı[54]

Fagofor oluşumu, Beclin-1 proteininin ULK-1 (aktive edilmiş unc-51-benzeri otofaji aktive edici kinaz 1) tarafından fosforilasyonunu Vsp34 'ün aktivasyounu gerektirir[1], [53]. Beclin-1'in Vps34 ile etkileşimi, katalitik aktivitesini artırmaktadır[49], [53]. Otofaji sürecinde, Beclin1, otofagozom zarının oluşumunu ve materyal taşıma sürecini düzenlemede önemli bir rol oynar. Beclin 1 esas olarak vücudun otofajisi, apoptoz, iltihaplanma ve diğer reaksiyonlarda yer alır hatta artık Beclin1'in ana koordinasyon molekülü ve bu yolların merkezi bağlantısı olduğuna inanılmaktadır[53].

2.aşamada çalışan 2 ubikuitin benzeri sistemi vardır: Atg5-Atg12 konjugasyonu ve LC3 işleme sistemi. Otofaji sırasında LC3'ün sentezi ve işlenmesi artar, bu da onu hücrelerdeki otofaji seviyelerinin önemli bir belirteci yapmaktadır[49], [53]. LC3, proteolitik bölünme sonucu önce LC3B-I'e ve otofagozom membranı ile birleşme sonrası LC3-II 'ye dönüşür[1], [49]. LC3-II ise LC3-II etkileşimli alana (LIR) sahip proteinleri yakalar ve otofagozoma çeker[1]. LC3-II nin bu

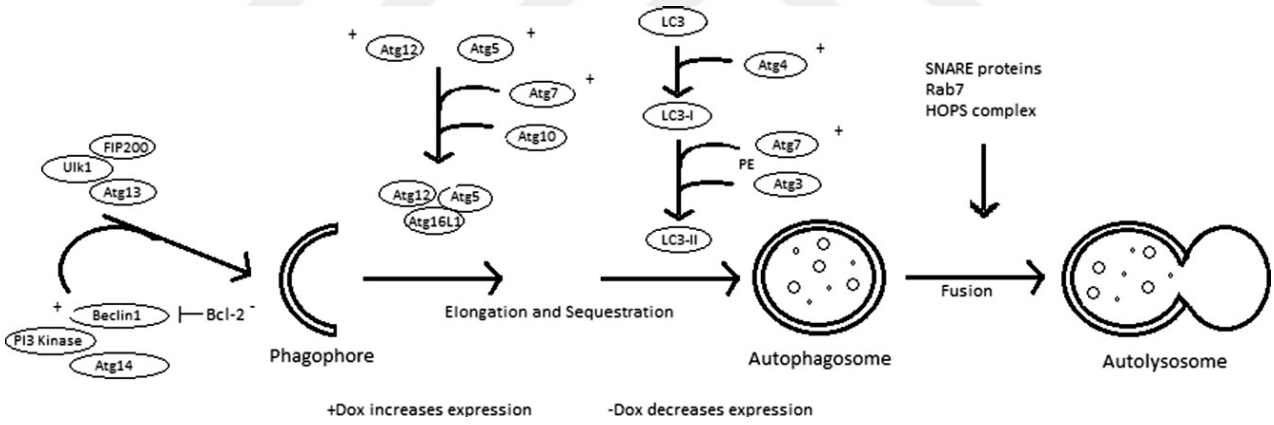
fonksiyonu dolayısıyla LC3B kardiyak hasara neden olan otofaji belirteci olarak kabul edilmektedir[1], [49].

Genel doksorubisin kaynaklı hücresel değişikliklerin yanı sıra ATP üretimi için azaltılmış mitokondriyal kapasitenin de otofajiyi tetiklemesi beklenir[1], [23].

Doksorubisin otofagozomların birikimini ve dolayısıyla ROS üretiminin artışını indükler. Aynı zamanda otofaji genlerinin hem up regülasyonuna hem de down regülasyonuna neden olur(Şekil 9). Dox tedavisi ile GATA-4'ün p53 aracılı baskılanması sonucu otofaji indüklenir ki bu da Bcl-2 'nin down regülasyonuna neden olur. Böylece Bcl2/Beclin1 etkileşimini engelleyen Bcl2 fosforilasyonu artar. Dox aynı zamanda Beclin1 proteinini up regüle eder(Şekil9)[8], [23], [55].

Otofaji her ne kadar ökaryotik hücrelerde koruyucu bir mekanizma olarak çalışsa da kalpte otofajik sürecin düzensiz olması ve bu nedenle kalpte fonksiyon bozukluğuna yol açabilecek olması nedeniyle önemlidir[23].

Bu çalışmada da DOX'un kardiyomiyositler üzerindeki otofajik etkileri Beclin1 ve LC3II üzerinden gösterilecektir.



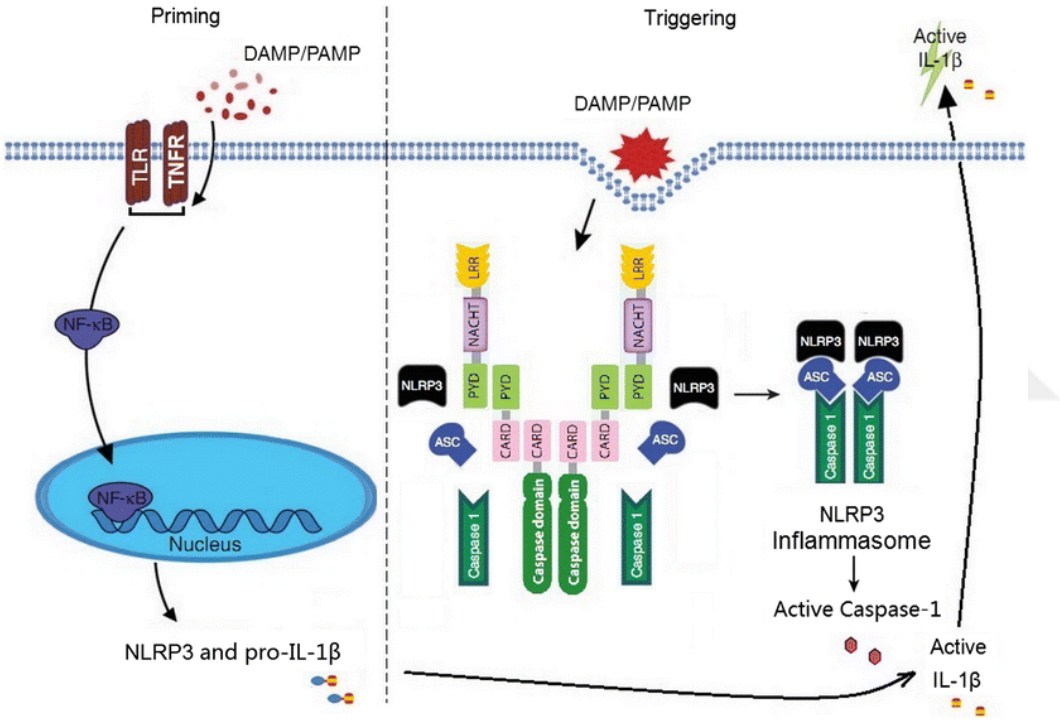
Şekil 9: Doksorubisin ve otofaji[55]

2.5. Piropitozis Ve Doksorubisin İle İndüklenen Piropitozis Mekanizması

Piropitoz proinflamasyon ile karakterize programlanmış hücre ölümünün inflamatuar bir şeklidir[56]. Piropitoz etkisi ilk kez 1992 de tanımlanmış[57] olsa da ancak 2001 yılında bakteri (özellikle Salmonella ve Shigella) ile enfekte makrofajların kaspaz-1 bağımlı hızlı litik ölümü gösterildiğinde Cookson tarafından adlandırılmıştır[21]. Piroptoz Yunanca kökenli bir kelime olup ''pyro=ateş'' ve ''ptosis=dökülme'' kelimelirinden türetilmiştir ve ''ateşle dökülme'' anlamına gelmektedir[58]. Gasdermin aracılı programlı nekroz olarak da bilinmektedir[59]–[62]. Morfolojik olarak, piroptotik hücre ölümü hem nekroz hem de apoptozun özelliklerini

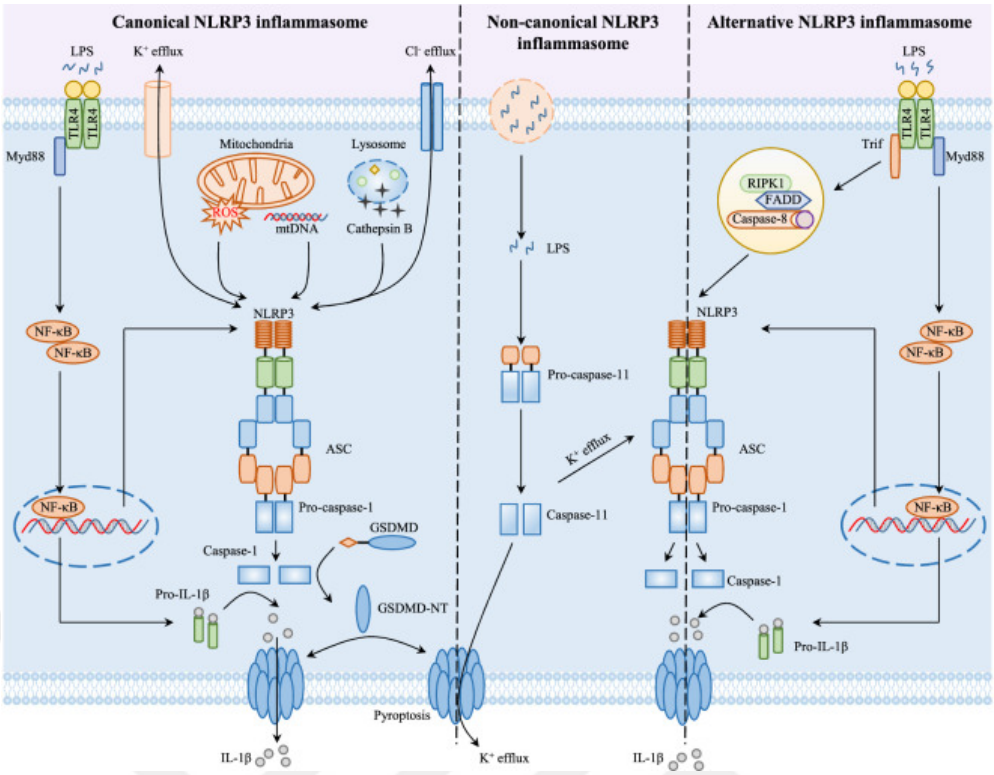
birlikte taşır. Klasik bulguları arasında nekroz benzeri hücre zarında por oluşumu, hücresel şişme ve zar yırtılması, ayrıca apoptoz benzeri nükleer yoğunlaşma ve DNA merdiveni olmaksızın DNA parçalanması da yer alır[59], [61]. Bunun yanı sıra apoptozdan farklı olarak piropitozda mitokondriyal bütünlük kaybı ve buna bağlı sitokrom c salınımı olmamaktadır. Yine apoptozda aktiflenen kaspaz-3/6/8 piroptoz sırasında aktiflenmez[57], [59], [63].

Piroptoz benzeri hücre ölümü, makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler, endotelyal hücreler, kardiyomiyositler vb. dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde yaygın olarak gösterilmiştir[59]. Piroptoz, kaspaz-1, -4, -5 ve -11 gibi piroptotik kaspazlar tarafından kontrol edilir[64]. Kaspaz-1 aktivasyonu, IL-1β, IL-18 ve gasdermin D (GSDMD) preformlarının aktif formlara dönüştürülmesiyle sonuçlanır[56], [61], [62], [65].(Şekil 10)



Şekil 10: Piropitozisin şematik gösterimi[66]

Temel olarak piropitoz için 3 yolun varlığından bahsedilir:kanonik-kaspaz-1 yolu , non-kanonik-kaspaz4-5-11 yolu ve alternatif yol(Şekil 11)[67]. Kanonik piroptoz sinyal yolunda, patojenle ilişkili moleküler modeller (PAMP) veya tehlikeyle ilişkili moleküler modeller (DAMP), nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı (NOD) benzeri reseptör (NLR) ailesinden oluşan farklı inflamazomlar tarafından tespit edilmektedir (NLRP3, NLRP1, NLRC4, NLRP9 ve NLRP6). Bu aktive edilmiş inflamazom kaspaz-1 aktivasyonunu tetikleyerek piroptoza yol açar[59], [67].



Şekil 11: NLRP3 inflamozom yolağı tiplerinin şematik gösterimi[67]

NLRP3, hem mikrobiyal hem de mikrobiyal olmayan tehlike sinyallerini tanıyan steril inflamazom yanıtları tetikleyen kritik NOD benzeri reseptör ailesi üyesi olarak tanımlanmıştır.

NLRP3, nükleik asitler, ürik asit kristalleri ve alüminyum hidroksit gibi DAMP'lerden türetilen çeşitli PAMP dizilerine yanıt olarak aktive edilir[68], [69]. Makrofajlarda NLRP3 aktivasyonu için iki sinyal gereksinimi bulunur:

1-Hazırlanma sinyali. Bu ilk sinyal, NF-κB (nükleer faktör-kappa B) aracılı NLRP3 ekspresyonudur ve TLR'ler ve TNF-α (Tümör Nekroz Faktör alfa) reseptörü gibi inflamatuar bir uyarı tarafından sağlanır. Bu uyarılar NLRP3'ün translasyon sonrası modifikasyonlarına yol açan uyarılardır[70]. NF-KB sinyali, inflamasom aktivasyonunun önemli efektörleri olan pro-IL-1β ve pro-IL-18 sitokinlerinin salınmasını indükler[44], [64], [71], [72].

IL-1β ve IL-18, kardiyak hasarı daha da artırmak için transmembran IL-1 tip I reseptörü (IL-1R1) aracılığıyla sinyal verir. IL-1R1'in IL-1 tarafından aktivasyonu, kardiyomiyosit apoptozisini tetikler, miyofibril kaybını artırır, β-adrenerjik reseptör duyarlılığını azaltır, miyokardiyal kontraktiliteyi baskılar ve sonunda kardiyak remodelling in bozulmasını ve kalp yetmezliğini indükler. Bu nedenle, kardiyak NLRP3 aktivasyonunun kalp yetmezliği patogenezine katkıda bulunabileceği ve bunun tersine NLRP3'ün inhibisyonunun kalp yetmezliğini azaltmak ve/veya tedavi etmek için bir yaklaşım olabileceği öne sürülmüştür[73].

2-Aktivasyon Sinyali: PAMP'ler veya DAMP'ler tarafından sağlanan bu sinyal ise, kaspaz-1 aracılı IL-1β ve IL-18 salınımını ve inflamazom birleşimini başlatır[71], [72]. NLRP3, tanıma sinyalini inflamatuar adaptör ASC'ye (apoptozla ilişkili benek benzeri proteinler) iletir .

Daha önce yapılan çalışmalarda da NLRP3 DOX kardiyotoksisitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiş [15], [56] ve yine başka bir raporda da DOX'un kardiyomiyosit piroptozunu indükleyebileceği belirtilmiştir[15], [74] .

2.6. NF-Kappa B p65

NF-κB, merkezi bir inflamatuar mediatördür ve bu nedenle temel olarak inflamasyon ve trombotik süreçler arasındaki moleküler bağlantılara katılmaktadır. İlk olarak 1986'da B hücrelerinde immun-immünoglobulin zincirinin ekspresyonunu tetikleyen transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır. Her ne kadar adı B hücrelerinde bulunduğunu belirtse de farklı varyasyonları hemen hemen tüm hücrelerde eksprese edilmektedir. Adı nükleer faktör olmasına rağmen de çoğunlukla inhibitörüne bağlı halde ve sitozolde yer almaktadır[75]. NF-κB sistemi sıkı bir şekilde düzenlenir ve NF-κB'nin düzenlenmesindeki hatalar, kanserlerden enflamatuar hastalıklara ve bağışıklık bozukluklarına kadar çok çeşitli hastalıklarda rol oynar[76]. Nükleer faktör kappa-B'nin (NF-kB) çeşitli proinflamatuar sitokinlerin transkripsiyonunun kontrolüne önemli ölçüde katkıda bulunduğuna inanılmaktadır[44], [64], [72]. Normal fizyolojik koşullar altında, NF-KB (IκB-α) inhibitörleri, inaktif bir NF-KB formu oluşturmak için sitoplazmada NF-KB'ye bağlanır. Bununla birlikte, stres koşulları altında ise, IκB kinaz (IKK), IκB-α'nın proteolitik bozunmasını indükleyebilir, bu da NF-KB'nin ve down stream hedeflerinin aktivasyonu ile sonuçlanır[72]

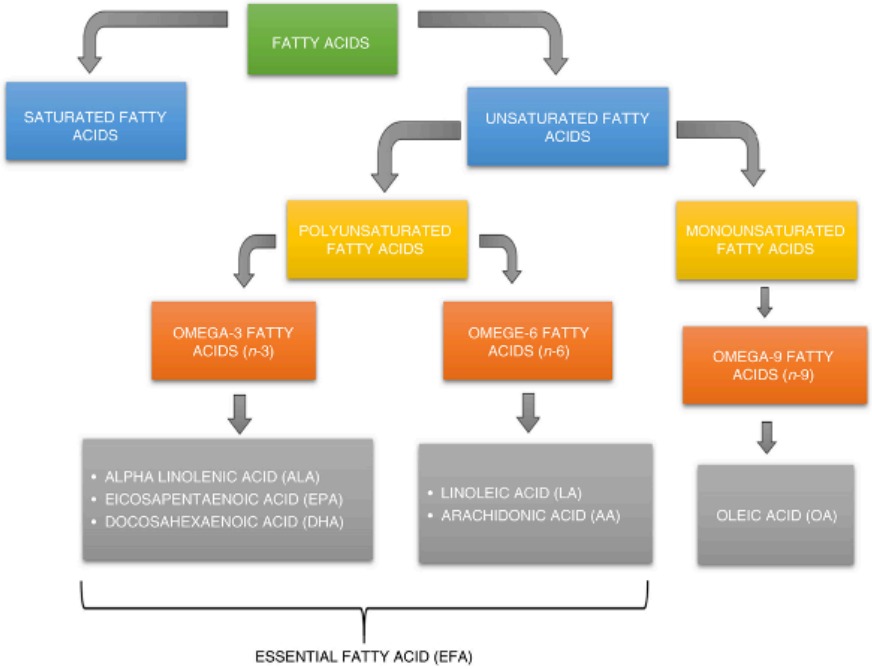
NF-κB aktivasyonu için en az iki ayrı yol olduğu gösterilmiştir: Kanonik yol ve alternatif yol. “Kanonik” yol, TNFα ve IL-1 gibi mikrobiyal ürünler ve proinflamatuar sitokinler tarafından tetiklenir ve genellikle RelA- veya cRel-içeren komplekslerin aktivasyonuna yol açarken "alternatif" NF-KB yolu, TNF-ailesi sitokinleri (TNF-α hariç) - lenfotoksin β (TNFSF3) ve CD40 ligandı (CD40L ve TNFSF5) tarafından aktive edilir[77].

NF-κB , Nrf2/ NF-κB -TLR4/ NF-κB ve MAPK/ NF-κB yolağı gibi farklı yolaklar ile inflamasyona katılabilir[72]

2.7. Omega 3 Yağ Asitlerinin Genel Özellikleri

Omega 3 yağ asitleri, fonksiyonel karboksilik asit grubunu içeren bir asit ucu ve omega ucu olarak da bilinen bir metil ucu olan çoklu doymamış yağ asitleridir (polyunsaturated fatty acid-PUFA)[16], [18]. Omega-3 yağ asitleri insan vücudunda üretilemeyen esansiyel yağlardır ve diyetle alınması zorunludur[11], [18], [78]. Yiyeceklerden alınan üç ana tip omega-3 yağ asidi vardır: α-linolenik asit(ALA), eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA). EPA ve DHA, gen ekspresyonunu ve anti-enflamatuar süreçleri değiştiren en önemli ve uzun zincirli omega-3 yağ asitleridir[16], [18], [78], [79](Şekil 11). EPA ve DHA ile besin takviyesi, membran fosfolipidlerinin değişimi ile kardiyak mitokondriyal fonksiyonu ve enerjiyi etkilemektedir[11], [18]. Hayvanlar ve kültür hücreleri dahil olmak üzere çeşitli deneysel modellerden elde edilen bulgular, omega-3 yağ asitlerinin anti-enflamatuar moleküller olduğunu göstermektedir. Hayvan modellerinde, omega-3 yağ asitleri, miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı ve

doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisite dahil olmak üzere çeşitli kardiyovasküler hasar formlarına karşı koruma sağlar[4], [10], [18].



Şekil 12: Yağ asitlerinin sınıflandırılması[80]

PUFA'nın kardiyoprotektif etkilerinin altında yatan spesifik mekanizmalar tam olarak anlaşılmamıştır. Bu diyetsel yağ asitlerinin, hücrelerde ve dokularda pleiotropik etkiler gösterme yeteneğinin, temel olarak, hücresel zarların yapısal fosfolipitlerine dahil olmaları ve geçirgenlik, hasarlanma ve akışkanlık gibi fizikokimyasal özelliklerini değiştirme yeteneğiyle ilgili olduğuna inanılmaktadır[4]. Omega-3 aynı zamanda tümör nekrozis faktör (TNF) , interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-6 (IL-6) gibi sitokinleri de azaltmaktadır[11], [18].
Genel olarak deneysel modellerdeki aşırı değişkenlik sonuçların analizini ve karşılaştırılmalarını zorlaştırıyor olsa da özellikle antrasiklin grubu antibiyotikler ile indüklenen kardiyotoksisiteye karşı korumayı belirleyen en önemli faktör PUFA alım miktarı olarak belirlenmiştir[4], [81].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Prospektif deneysel bir araştırma

3.2. Araştırmanın Yeri Ve Zamanı

Araştırma 2019 yılı nisan ayında literatür tarama ile başlamış olup; ardından yapılan ön çalışma sonuçları ile 18 Mayıs 2022 tarihinde etik kurul onayı alındıktan sonra, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında ilaç uygulama ve sakrifikasyon yapılmasını takiben, alınan kalp dokuları histolojik analizler için Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalına, kan dokuları ise biyokimyasal analizler için Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim dalına getirilerek gerekli işlemler yapılmıştır. 04/2019-11/2022 tarihleri arasında tez yazımı ile sonlanmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırmada 4 deney grubu olmak üzere toplam 20 deney hayvanı (sıçan) kullanıldı ve deney grupları aşağıdaki gibi düzenlendi.

1.Grup, Kontrol Grubu: Deneklere herhangi bir madde verilmedi. Denekler deney başlangıcında ve deney sonunda 24 saatlik metabolik kafeslerde bekletildi. 15 günün sonunda sakrifiye edildi (n=7). Sakrifikasyon öncesinde kaudal venden kan örnekleri alındı. Alınan kanda CK-MB,Troponin I ve LDH değerlerine bakıldı. Sakrifikasyon ile elde edilen doku örneklerine histokimyasal, immünohistokimyasal uygulamalar yapıldı.

2.Grup, Doksorubisin Verilen Grup: Denekler deney öncesinde 24 saat metabolik kafeslerde bekletildi. Deneklere 1.-6. Ve 11. günlerde i.p . olarak günde bir defa 3mg/kg. dozunda doksorubisin verildi. 15. gün sonunda sakrifiye edildi (n=7). Sakrifikasyon öncesinde kaudal venden kan örnekleri alındı. Alınan kanda CK-MB,Troponin I ve LDH değerlerine bakıldı. Sakrifikasyon ile elde edilen doku örneklerine histokimyasal, immünohistokimyasal uygulamalar yapıldı.

3.Grup, doksorubisin +Omega 3 yağ asidi Grubu: Denekler deney öncesinde 24 saat metabolik kafeslerde bekletildi. Deneklere 1.-6. Ve 11. günlerde i.p . olarak günde bir defa 3mg/kg . dozunda doksorubisin verildi. Deneklere 14 gün boyunca günde bir defa oral gavaj yoluyla 400mg/kg olacak şekilde sıvı formda omega 3 yağ asidi verildi. Deney sonunda denekler 24 saatlik metabolik kafeslerde bekletildi. 15. günün sonunda sakrifiye edildi (n=7). Sakrifikasyon öncesinde kaudal venden kan örnekleri alındı. Alınan kanda CK-MB, Troponin I ve LDH değerlerine bakıldı. Sakrifikasyon ile elde edilen doku örneklerine histokimyasal, immünohistokimyasal uygulamalar yapıldı.

4.Grup, Omega 3 yağ asidi Grubu: Denekler deney öncesinde 24 saat metabolik kafeslerde bekletildi. Deneklere 14 gün boyunca günde bir defa oral gavaj yoluyla 400 mg/kg omega 3 yağ asidi verildi. Deney sonunda denekler 24 saatlik metabolik kafeslerde bekletildi. 15. günün sonunda sakrifiye edildi (n=7). Sakrifikasyon öncesinde kaudal venden kan örnekleri alındı.

Alınan kanda CK-MB,Troponin I ve LDH değerlerine bakıldı. Sakrifikasyon ile elde edilen doku örneklerine histokimyasal, immünohistokimyasal uygulamalar yapıldı.

3.4. Kan Örneklerinin Alınması

Sıçanlar deneyin 15. günü i.p. ketamin 80 mg/kg + ksilazin 10 mg/kg ile anestezi yapılarak, orta hat insizyonuyla batınları açıldı. Vena cava caudalisden kan örnekleri toplandı. Alınan kan örnekleri aynı gün 1000xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Ayrılan serum örneklerinden aynı gün serum CK-MB,Troponin I,LDH ölçümleri çalışıldı.

3.5. Kalplerin Çıkarılması

Sıçanların kalpleri steril şartlarda çıkarıldı. Kalp dokuları yeteri kadar % 10'luk nötral formol eklenmiş ependorf tüplerine konarak histolojik değerlendirme yapılıncaya kadar oda ısısında muhafaza edildi.

3.6. Çalışma Materyali

Çalışmamızda Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı'ndan temin edilen, Wistar Albino toplam 20 erkek sıçan (180-250 gr) kullanılmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür seçilmiştir. Tüm denekler deney sonlanıncaya kadar 21°C±1 oda sıcaklığı, %50-60 nisbi nem ve 12 saat gündüz/12 saat gece aydınlatma periyotlarında bulunan standart hayvan oda ve kafeslerinde barındırılmıştır. Denekler adlibitum olarak dinlendirilmiş su ve standart pellet yem ile beslenmiştir. Hayvanlara uygulanan deneysel uygulamalar ve sakrifikasyon, DEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuarında gerçekleştirilmiştir.

3.7. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımsız değişken*:* Madde uygulamaları (Doksorubisin,Omega 3 yağ asidi) Bağımlı değişken*:* Ölçülen ürünler (CK-MB,Troponin I,LDH)

3.8. Veri Toplama Araçları

3.8.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Araştırmada deney başlangıcında ve deney sonunda denek ağırlıklarını ölçmek için hassas terazi, deneklerden elde edilen dokuların takibinde etüv , kesitlerin alınmasında mikrotom, boyamalarda kullanılması gerekli olan distile su ihtiyacı için distile su cihazı, immünohistokimyasal incelemeler için humidity chamber ve otomatik mikropipetler, biyokimyasal incelemeler için soğutmalı santrifrüj cihazı, vorteks cihazı, inkübatör, homojenizatör ve buzluk kullanılmıştır.

3.8.2. Araştırmada Kullanılan Doksorubisin ve Omega 3 yağ asitinin Hazırlanması

3.8.2.1. Doksorubisinin Hazırlanması

Doksorubisin (AD15377-1g,Carbosynth Ltd,UK) Alfagen, İzmir firmasından temin edilmiştir. Doksorubisin kırmızı renkli kuru toz formunda olup steril serum fizyolojik içinde çözdürülerek hazırlanmıştır. Doksorubisin 1.-6. Ve 11. günlerde günde bir defa olmak üzere 3 mg/kg intraperitoneal enjeksiyon şeklinde uygulanmıştır.

3.8.2.2. Omega 3 yağ asitinin hazırlanması

Omega 3 yağ asiti kullanıma hazır solüsyon formunda olup eczaneden satın alınmış ve kullanılmıştır. Omega 3 yağ asiti 14 gün boyunca günde bir defa olmak üzere 400 mg/kg oral gavaj yolu ile uygulanmıştır.

3.8.3. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Deney sonunda elde edilen kalp doku örneklerine rutin doku takibi prosedürü uygulanmış, ince kesitleri alınmış, çeşitli histokimyasal ve immünohistokimyasal boya uygulamalarına tabi tutulmuştur. Araştırmada histokimyasal değişiklikler için Hematoksilen-Eozin (H-E), Mason Trikrom boyamaları ve immunhistokimyasal değişiklikler için anti-NLRP3,LCII3,Beclin1,NF kappa B ve Connexin boyamaları yapılmıştır. Alınan kan örneklerinden ise CK-MB,Troponin I, LDH düzeyleri ölçülmüştür.

3.8.3.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deney başlangıcında ve deney sonunda deneklerin ağırlıkları ölçülmüştür. Veriler SPSS 25.0 programında, t testi ile değerlendirilmiş ve gruplar arası karşılaştırmada $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.8.3.2. Histokimyasal İncelemeler

Sakrifikasyon sonunda alınan kalp, histolojik incelemeler için %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edildi.

3.8.3.2.1. Rutin Doku Takibi

Alınan kalp dokusu %10'luk formaldehit solüsyonu ile 4 gün fikse edildi. Ardından fiksatifin dokulardan uzaklaştırılması için dokular kasetlenerek 1 gece akarsu altında yıkandı. Dehidratasyonu sağlamak için sırasıyla %70, %80, %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika bekletildi. Şeffaflandırma için 30'ar dakika iki farklı ksilende bekletildi. Takiben 1'er saat iki kez parafin içinde immersiyonu sağlandı. Tüm bu işlemler 60°C'lik etüv içerisinde gerçekleştirildi.

Daha sonra dokular parafin bloklara gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) kullanılarak bloklardan 5µm'lik parafin kesitler alındı. Kesitlerin bir kısmı normal lamlara, bir kısmı ise poly-L lysine kaplı lamlara alındı.

3.8.3.2.2. Hematoksilen–Eozin Boyama Yöntemi

Alınmış olan kesitlerden her gruptan 1'er adet seçildi. Deparafinizasyon için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletildi. Takiben ilki etüvde olmak üzere 20'şer dakika üç farklı ksilenden geçirildi. Dehidratasyon işlemi için 5 farklı azalan alkol serisinden geçirildikten sonra distile su ile çalkalandı ve hematoksilen boya (01562E. Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Böylece nükleusların boyanması sağlandı. Boyama sonrasında, 10 dakika akarsu altında kesitler yıkanarak boya fazlası uzaklaştırıldı. Ardından eozin boyası (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile 1 dakika boyandı. Böylece hücre sitoplazmasının boyanması sağlandı. Boyamanın ardından %70, %80, %96 şeklinde artan alkol serilerinden ve 2 kez absolü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma işlemi için 3 kez 20 dakika süreyle ksilenden geçirildi ve Entellan (UN 1886, Merck, Darmstadt, Germany) kullanılarak lamel ile kapatıldı.

3.8.3.2.3. Masson Trikrom Boyama Yöntemi

Kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletildi. Daha sonra ilki etüvde olmak üzere 20'şer dakikalık üç farklı ksilen serilerinden geçirildi. Ardından kesitler azalan alkol serilerinden geçirilerek (absolü alkol, %96, %80 ve %70'lik alkol) distile suya getirildi. Kesitler distile sudan çıkarıldıktan sonra Masson Trikrom boyama kitiyle (Bioss) boyandı. Dokular boyama kiti içindeki weigert's hematoksilen- solüsyon A (Reaktif A) ve solüsyon B (Reaktif B) içinde 10 dakika bekletildi. Daha sonra yıkanmadan pikrik asit alkolde (Reaktif C) 4 dakika bekletildi. Distile suda çalkalandı. Ardından ponceau-asit fuksin solüsyonunda (Reaktif D) 4 dakika boyandı. Distile suda yıkandı. Preparat on dakika fosfomolibdik asitte (Reaktif E) tutuldu. Ardından masson anilin mavisi solüsyonu (Reaktif F) dökülerek beş dakika bekletildi. Distile su ile yıkandı. Daha sonra absolü alkolü takip eden %95'lik alkolde dehidrate edildi ve yıkandı. Ksilen ile şeffaflaştırıldı ve entellan kullanılarak lamel ile kapama işlemi yapıldı.

3.8.3.2.4. Kalp dokusunun histomorfolojisinin değerlendirilmesi:

Elde edilen kesitler H&E ve Masson Tikrom ile boyandıktan sonra kalp dokusunu değerlendirmek için kesitlerde farklı büyütmelerde denek başına on birbiriyle örtüşmeyen kalp kesitinin bulunduğu en az 50 kalp alanı incelendi. Kalp dokusu kesitleri ışık mikroskobunda miyokardiyum ve kardiyomiyositlerdeki yapısal değişiklikler (dalgalı fiberler, sitoplazmik vakuolizasyon, miyofibril kaybı, interstisyal fibrozis) değerlendirildi. Kesitlerden elde edilen görüntüler semikantitatif olarak miyokardiyal hasar yönünden skorlandı ve aşağıdaki gibi puanlandı:

0-hasar yok

1-hafif hasarlı

2-orta derecede hasar

3-ciddi hasarlı

3.8.3.3.İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler

3.8.3.3.1. İmmünohistokimya Boya Protokolü

NLRP-3, Beclin 1 , LCII-3 ve NF-kappa B p65 , immun reaktivitelerinin gösterilmesi amacıyla NLRP-3, Beclin 1 ,LCII-3 ve NF-kappa B p65 antikorları kullanıldı. Alınan kesitler 60°C'de etüv içerisinde 1 gece bekletildi. Sonrasında deparafinizasyon amacıyla 30'ar dakika üç farklı ksilolden geçirildi. Azalan alkol serilerinden geçirildikten sonra distile suda çalkalandı. Dokuların etrafı pappen ile çizildi. NLRP3 ve LCII-3 boyaması için tripsin solüsyonu ve Beclin 1 ve NF-kappa B p65 için proteinaz K damlatıldı ve 37°C etüvde 15 dakika bekletildi. Tüm kesitler 3 kez PBS ile yıkandı. %3 H_2O_2 damlatılan kesitler oda ısısında 10 dakika bekletildi. Tekrar PBS ile 3 kez yıkama yapılan kesitlerin üzerine bloklama solüsyonu damlatıldı ve 30 dakika bloklama solüsyonu ile bekletildi. Primer antikor olarak rata spesifik NLRP3(1:200; Bioss) ve LCII3 (1:200,Bioss), Beclin 1 (1:200,Bioss) ve NF-kappa B p65 (1:200,Bioss) damlatılarak +4°C'de 1 gece bekletildi. Ertesi gün kesitler oda ısısına gelene kadar bekletildikten sonra PBS ile 3 defa yıkandıktan sonra biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz sekonder antikorunda (Histostain Plus Kit, 85-9043 San Francisco, USA) 30 dakika bekletildi. Yine PBS ile 3 defa kesitler yıkandıktan sonra immunohistokimyasal reaksiyonu görünür hale getirmek için DAB (Thermo, Darmstadt, Almanya) damlatıldı. Distile suda yıkanan kesitlere mayer's hematoksilen ile art alanda boyama sağlandıktan sonra akarsu ile mordantlanması sağlandı. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) yardımıyla kapatıldı.

3.8.3.3.2. İmmünohistokimya Değerlendirmesi

Kalpteki NLRP-3, Beclin 1 , LCII-3 ve NF-kappa B p65proteinlerinin dağılımını belirlemek için Anti-NLRP3 ,Anti-Beclin 1,Anti-LCII 3 ve Anti-NF-kappa B p65 antikor boyaması yapıldı.

3.8.3.3.3. Semikantitatif İmmünohistokimyasal Analiz

Deney gruplarında bulunan her bir denek için miyokardiyal hasar değerlendirmesinin standart olması için kalp dokusu kesitlerinde farklı bölgelerden 10 alan seçildi ve semikantitatif değerlendirme yapıldı. Semikantitatif skorlama aşağıdaki gibi tanımlandı(Tablo 1).

İmmünohistokimyasal Bulgular	Skor
Kuvvetli pozitif boyanma	3(+++)
Pozitif boyanma	2(++)
Zayıf pozitif boyanma	1(+)
Pozitif boyanma yok	0(-)

Tablo 1: Semikantitatif İmmünohistokimyasal Skorlama

3.8.3.4.Biyokimyasal İncelemeler

3.8.3.4.1. Biyokimyasal CK-MB,Troponin I,LDH Ölçümü:

3cc. kandan elde edilen serum örnekleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Spektrofotometrik olarak ölçümü yapılan parametreler CK-MB ve Troponin I kalp kasının yıkımı gösteren spesifik parametreler olduğu için, LDH ise kalp kası yıkımından etkilenen bir parametre olduğu için seçildi.

3.9. Araştırma Planı ve Takvimi

Tez Konusu Belirlenmesi ve Literatür Araştırması 04.2019-09.2019
Etik Kurul ve Yönetim Kurulu Onayı 18.05.2022
Deneysel Verilerin Toplanması 08.2022-09.2022
Laboratuvar Çalışmaları 09.2022-10.2022
Verilerin Değerlendirilmesi ve Tezin Yazımı 09.2022-10.2022

3.10. Verilerin Değerlendirilmesi

İstatistiksel analizler SPSS 25.0 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu analitik yöntemler (Kolmogorov- Smirnov/ShapiroWilk testleri) kullanılarak incelenmiştir. Tanımlayıcı analizler normal dağılan değişkenler için ortalama±standart hata kullanılarak verilmiştir. Bağımlı grupların (grup içi *ağırlık önce-sonra vb*.) karşılaştırmalarında (normal dağılım durumunda) bağımlı gruplarda t-testi (paired t test) kullanılmıştır. Gruplar arası farkın olup olmadığının tanımlanması için (Kontrol, Doksorubisin, Doksorubisin+Omega 3 yağ asidi, Omega 3 yağ asidi) gruplarının birbiriyle ilgili değişkenler açısından (ortalama *denek ağırlığı, NLRP3,Beclin 1,LCII 3,NF-kappa B p 65,miyofibril kaybı oranı ,fibrozis oranı,sitoplazmik vakuolizasyon oranı*) karşılaştırılmasında tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. Gruplar arasında anlamlı farklılık bulunan durumlarda, ikişerli karşılaştırmalar Mann Whithney U testi kullanılarak yapılmıştır. p-değerinin 0,05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlıdır.

4. BULGULAR

4.1. Vücut ağırlıklarının değerlendirmesi

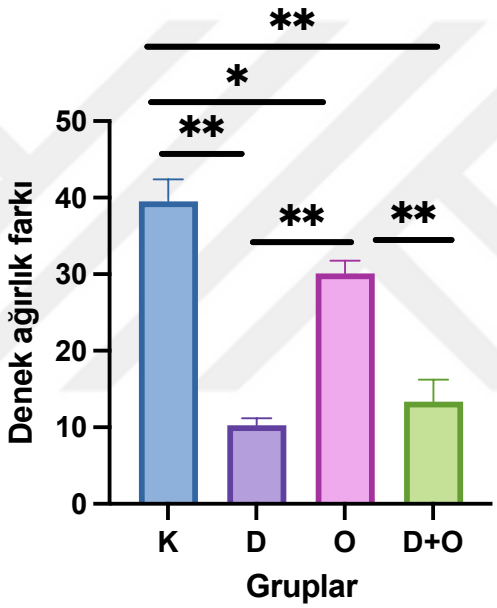
Tüm gruplardaki sıçanların deneyin başlangıcında ve sonunda ağırlık ölçümleri yapıldı ve istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Tüm gruplarda deney başlangıcındaki vücut ağırlıkları değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0,05$). Deney sonunda alınan ölçümlerden sonra ağırlık farkları karşılaştırıldığında ise doksorubisin uygulanan grubun vücut ağırlığında kontrol ve omega 3 yağ asidi gruplarına göre anlamlı bir azalma izlendi ($p<0.01$). Doksorubisin+Omega 3 yağ asidi grubunda ise doksorubisin grubuna göre anlamlı bir ağırlık artışı izlenmedi ($p>0.05$). Deneyin başlangıcında ve sonunda ölçülen sıçan vücut ağırlığı ortalama değerleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

	BAŞLANGIÇ	BİTİŞ
KONTROL	197.62	237.16

DOX	214.9	225.18
OMEGA 3	194.48	224.6
DOX+OMEGA 3	207.96	221.32

Tablo 2: Sıçan vücut ağırlıklarının grup ortalamaları



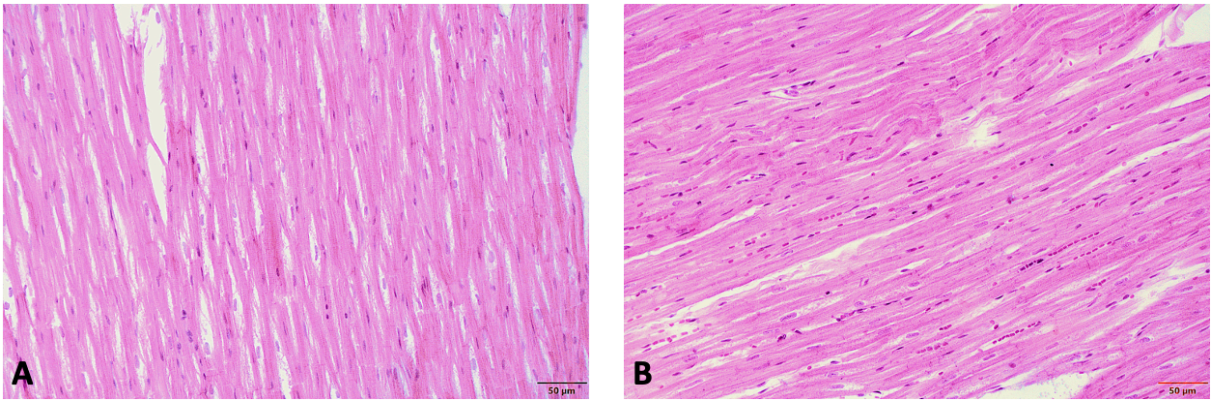
Grafik 1: Denek ağırlık farklarının grafiksel gösterimi

4.2. Histopatolojik Bulgular

4.2.1. Hematoksilen-Eozin Boyama

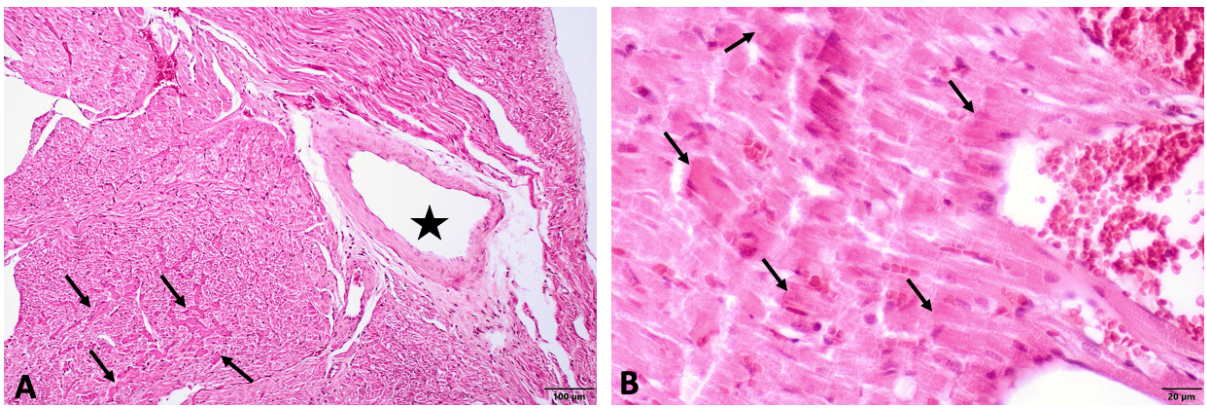
Kontrol ve Omega 3 yağ asidi grubundaki deneklere ait kalp dokuları incelendiğinde kalp kası hücrelerinde normal kardiyomiyosit morfolojisi izlendi. Kontrol grubu ve Omega 3 yağ asidi verilen grupta, hematoksilen-eozin ile boyanan kesitlerin incelemesinde kardiyomiyositlerin nükleuslarının koyu renkli ve merkezi yerleşimli olduğu görülürken sitoplazma ise daha soluk boyanmış olarak izlendi. Kardiyomiyositlerin sitoplazmasında bulunan miyofibrillerin düzenli bir

şekilde yerleşim gösterdiği görüldü. Kardiyomiyositler arasında bulunan damarlar da normal yapıda izlendi.

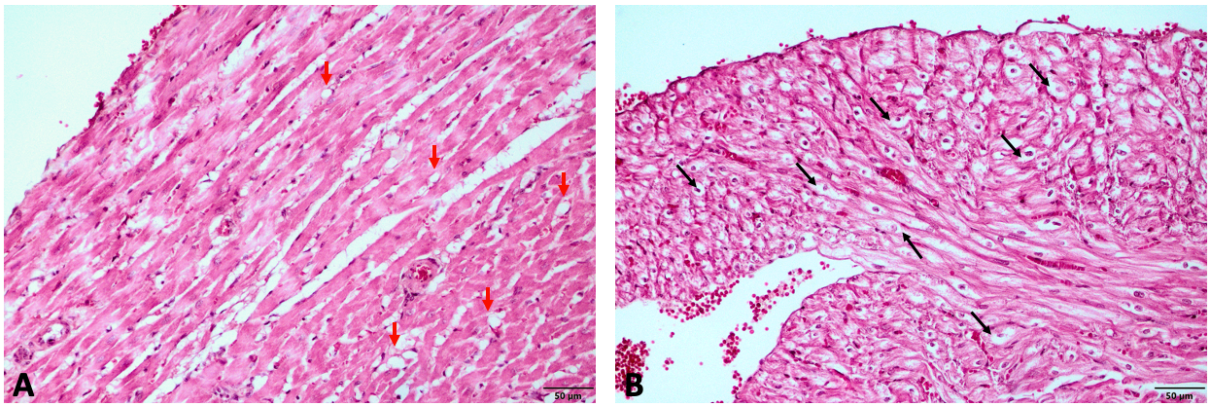


Figür 1:Kontrol(A) ve Omega 3 (B) gruplarına ait normal kalp dokusunun gösterilmesi

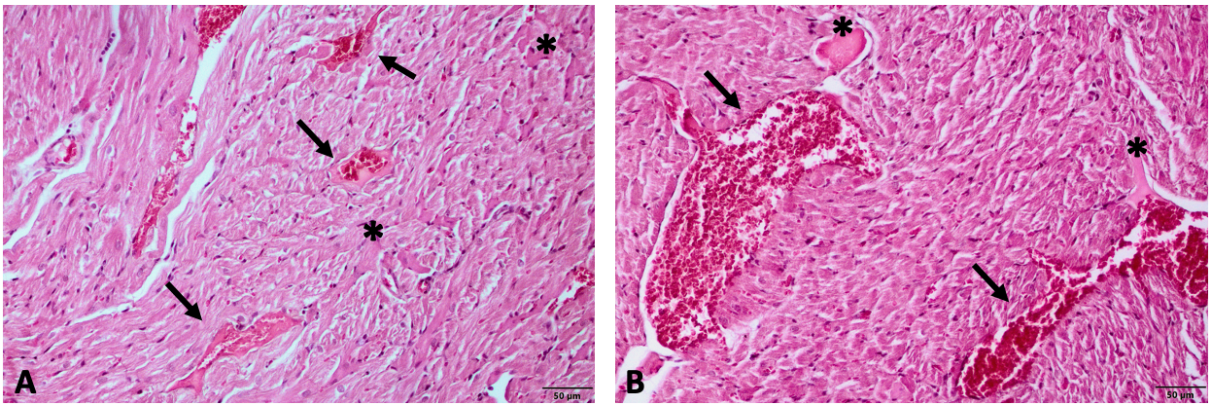
Doksorubisin grubunda bulunan deneklerin kalp dokularında, hematoksilen-eozin ile soluk olarak boyanan, sitoplazması genişlemiş, hücre sınırları belli olmayan,vakuolizasyon gösteren kardiyomiyosit alanları yaygın olarak izlendi. Bu alanlarda bulunan miyofibrillerin genişlediği ve daha gevşek olarak düzenlendiği ve yer yer dalgalalı miyofibril alanları görüldü. Miyokardiumda ara ara boşluklar ile karakterize hücre artıkları içeren hasarlı alanlar izlendi. Bu alanlarda apopitotik çekirdeğe sahip hücreler ise dikkat çekiciydi. Kardiyomiyositler arasındaki bazı kan damarlarının belirgin derecede geniş lümenli olduğu ,damar duvarının kalınlaştığı görüldü. Miyofibrillerin arasında yaygın hemoraji ve konjesyon alanları izlendi.Yine miyofirillerde hiyalen birikimine bağlı çizgilenme kaybı ve buna bağlı daha düz ve koyu renkli görünüm izlendi.



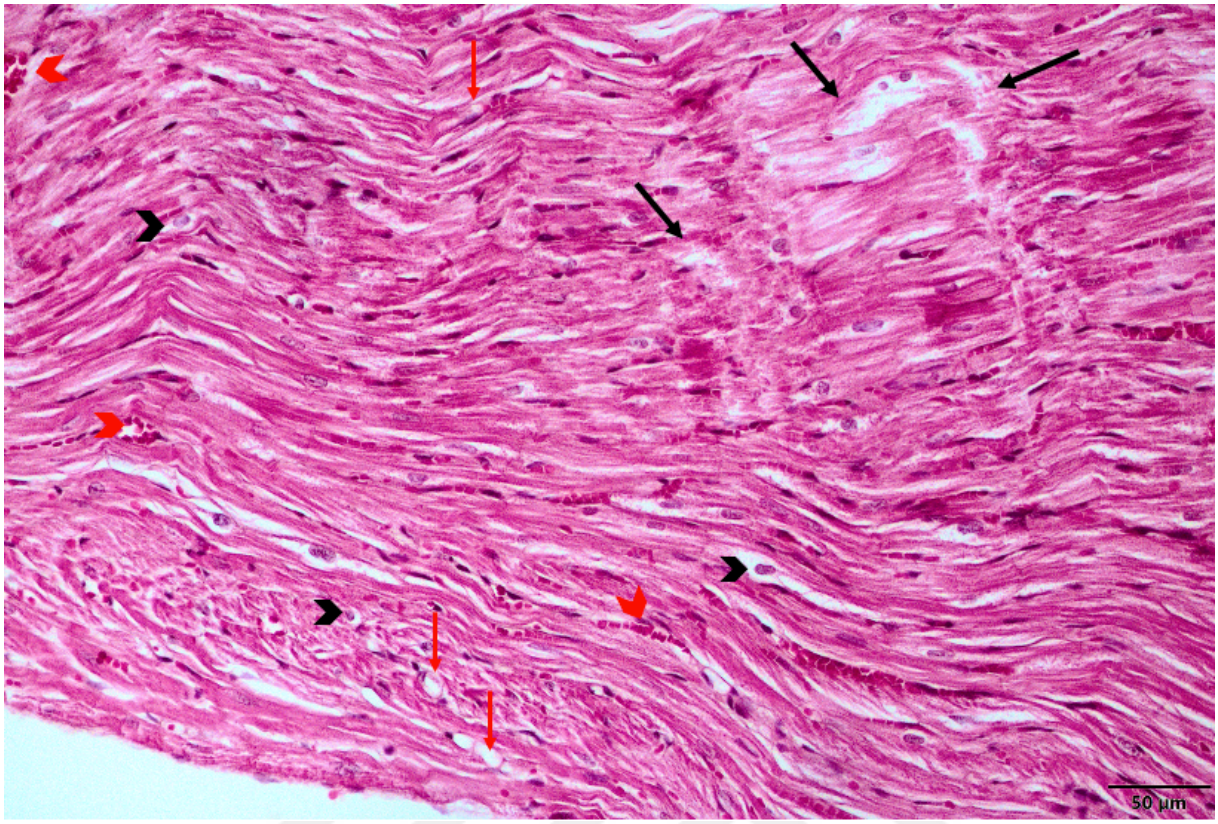
Figür 2: (A)Genişlemiş damar lümeni ve artmış duvar kalınlığı (siyah yıldız)(X10),hiyalen birikimine bağlı koyu renkli gözüken miyofibriller(siyah oklar);(B)hiyalen birikimine bağlı düzleşmiş ve koyu boyanmış miyofibril alanları (siyah oklar)(X40)



Figür 3: Vakuolizasyon (A);sitoplazması şişmiş ve soluk boyanan kardiyomiyositler(B)

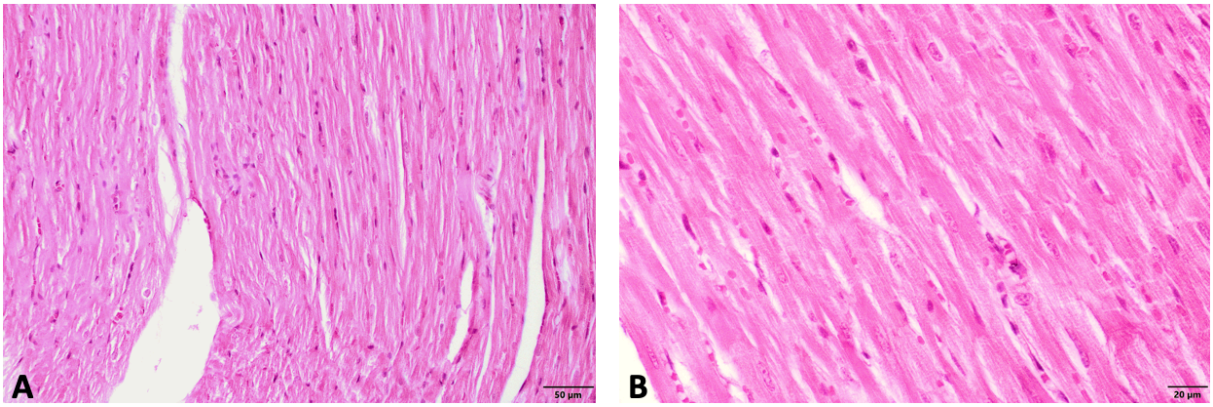


Figür 4: Hemoraji ve konjesyon alanları (A ve B-siyah oklar);hiyalen birikimleri (A ve B-siyah yıldızlar)

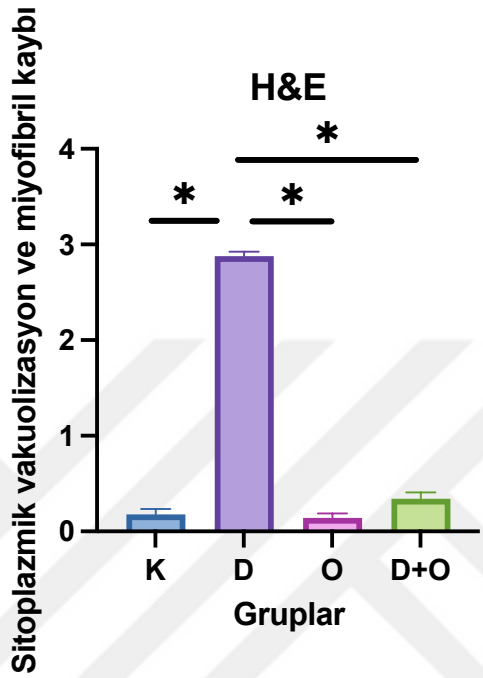


Figür 5 : Miyofibril kaybı(siyah oklar),vakuolizasyon (kırmızı oklar),şişmiş hücreler (siyah ok başları) ve hemoraji (kırmızı ok başları)

Doksorubisin+Omega 3 yağ asidi grubundaki deneklerin kalp dokuları incelendiğinde kontrol ve omega 3 yağ asidi grubuna benzer normal morfolojik özellikler ağırlıklı olarak izlendi. Hematoksilen-eozin ile boyanan kalp dokularının ışık mikroskobik incelemesinde, kardiyomiyositlerin doksorubisin grubuna göre daha fazla alanda sınırları belirgin, merkezi yerleşimli nükleusa sahip hücreler şeklinde olduğu ve miyofibrilerin daha düzenli bir dizilim gösterdiği görüldü. Yine miyokardiyum içinde bulunan kan damarları da normal histolojik yapıya sahipti.



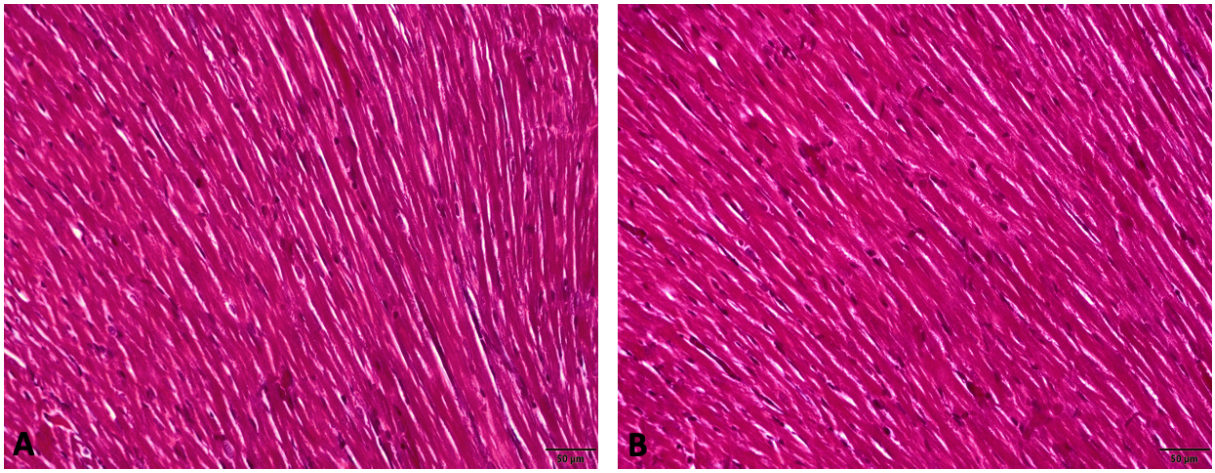
Figür 6:DOX+Omega 3 grubunda azalmış hemoraji ve inflamasyon alanları, hücre şişmesinde ve vakuolizasyonda azalma,normale yakın nüklear morfoloji (A ve B)(A-X20;B-X40)



Grafik 2: Sitoplazmik vakuolizasyon ve miyofibril kaybının gruplar arası dağılımının grafiksel gösterimi

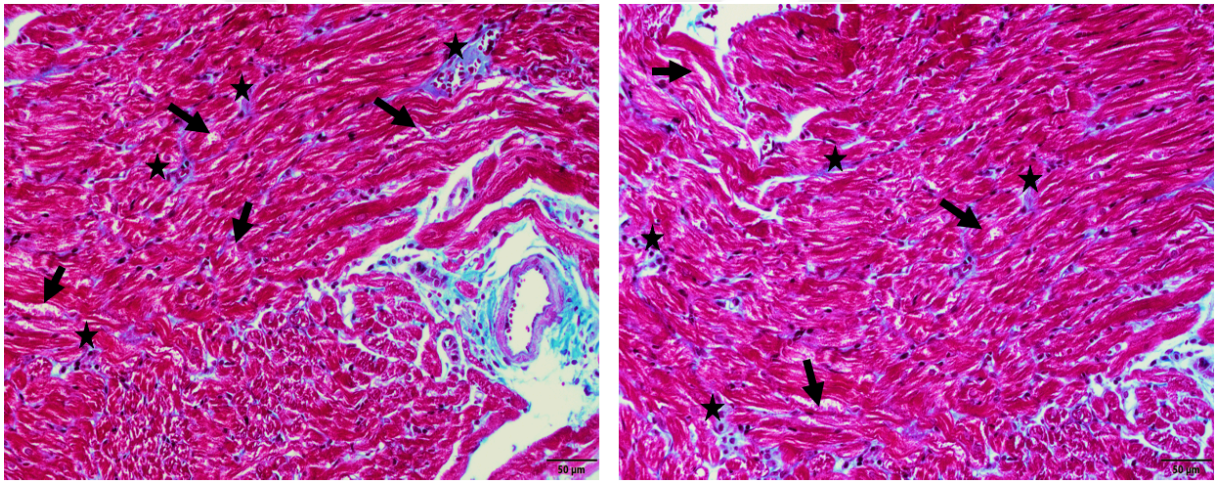
4.2.2. Masson Trikrom Boyama

Kontrol ve Omega 3 yağ asidi grubundaki deneklere ait kalp dokuları incelendiğinde kalp kası hücrelerinde normal kardiyomiyosit morfolojisi izlendi. Kontrol grubu ve Omega 3 yağ asidi verilen grupta, Masson Trikrom ile boyanan kesitlerin incelemesinde miyokardiyal kas fiberlerin dağılımı ve düzenlenişinin normal yapıda olduğu görüldü. Kardiyomiyositler arasında bulunan damarların çevresindeki bağ dokusu yapıları da normal olarak izlendi.



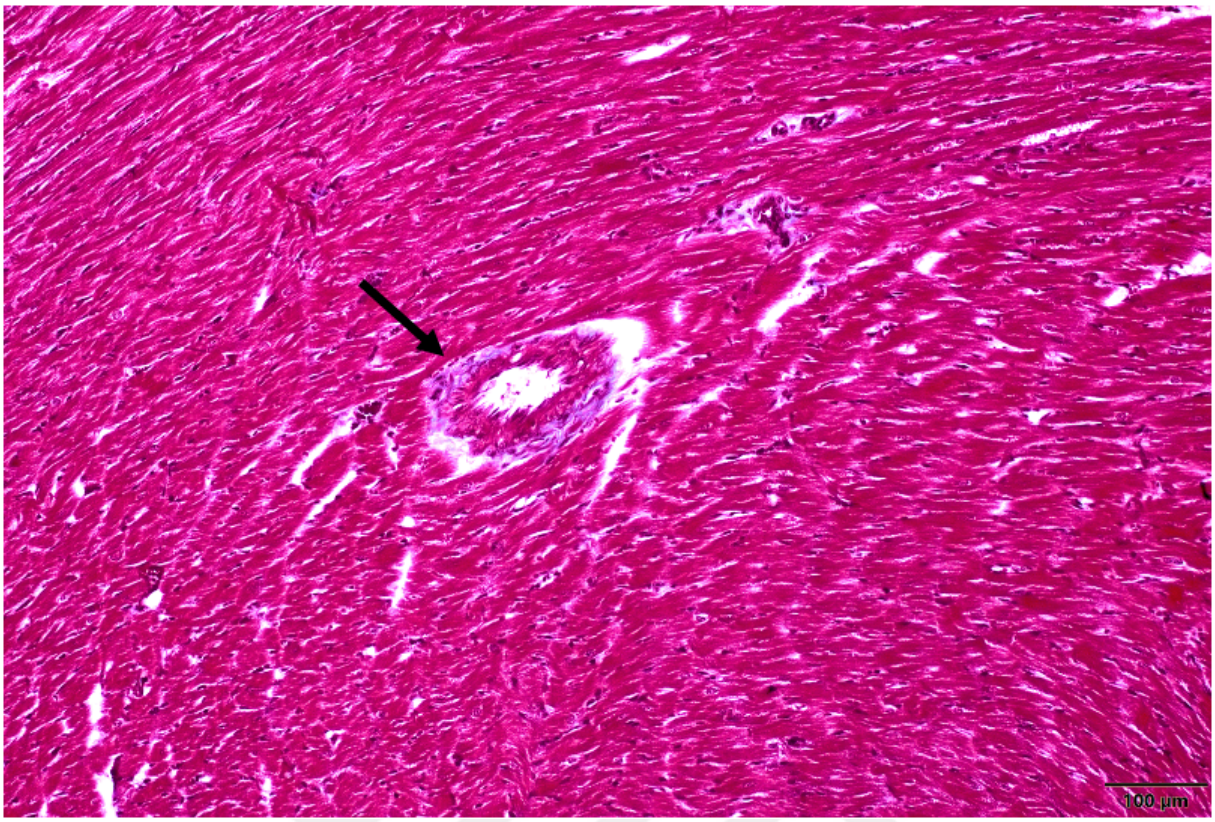
Figür 7 : Kontrol (A) ve Omega 3(B) grubu normal histolojik yapıda kalp dokusu(Masson Trikrom Boyaması)

Doksorubisin grubunda ise parçalanmış miyofibriller ve fibrozis artışı dikkat çekici düzeyde idi.

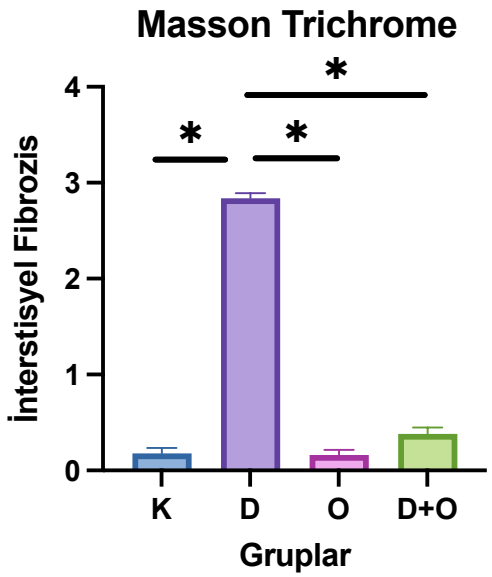


Figür 8 :DOX grubunda Masson trikrom boyaması ile interstisyal alanda artmış fibrozisin(siyah yıldız-mavi ile boyanmış alanlar) ve parçalanmış miyofibrillerin(siyah oklar) gösterilmesi

DOX+Omega 3 gruplarında ise DOX gruplarına göre belirgin azalmış fibrozis göze çarptı.



Figür 9 : DOX+Omg3 grubunda Masson Trikrom boyama ile azalmış fibrozisin gösterilmesi

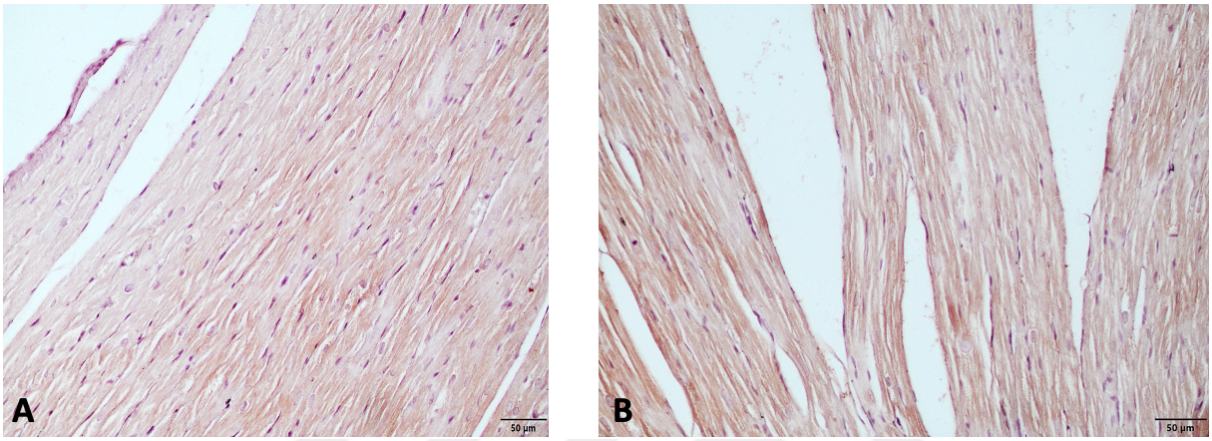


Grafik 3: İntersitisyel fibrozisin gruplar arası dağılımının grafiksel gösterimi

4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

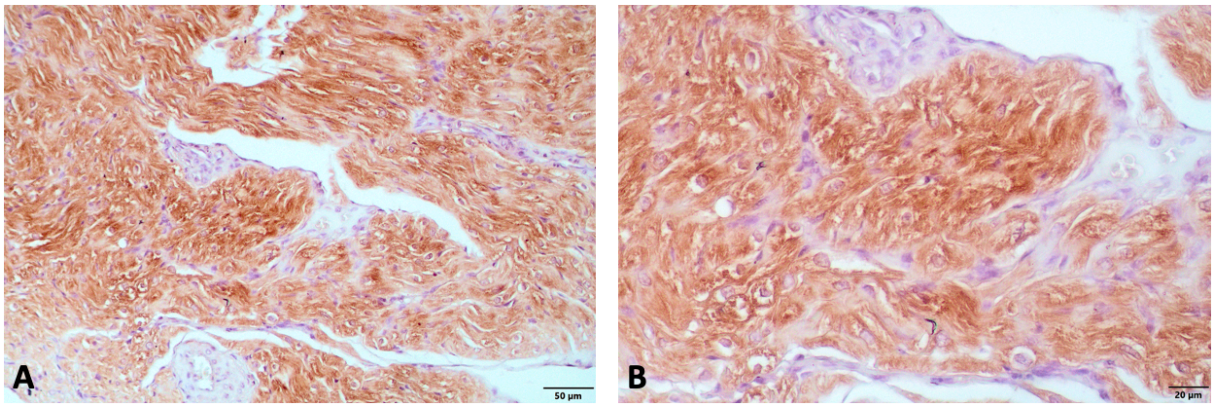
4.3.1. Beclin 1 immünohistokimyasal boyama

Kalp dokusu örneklerinde yapılan boyama sonucunda tüm gruplarda Beclin1 boyanma yoğunluğu kardiyomiyositlerin sarkoplazmik alanlarında izlendi. Kontrol ve Omega 3 gruplarında boyanma yoğunluğu zayıf olarak gözlendi. Bu iki grup istatistiksel olarak kıyaslandığında aralarında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0,05$).



Figür 10: Kontrol (A) ve Omega 3 (B) gruplarına ait Beclin-1 immünohistokimyasal boyama

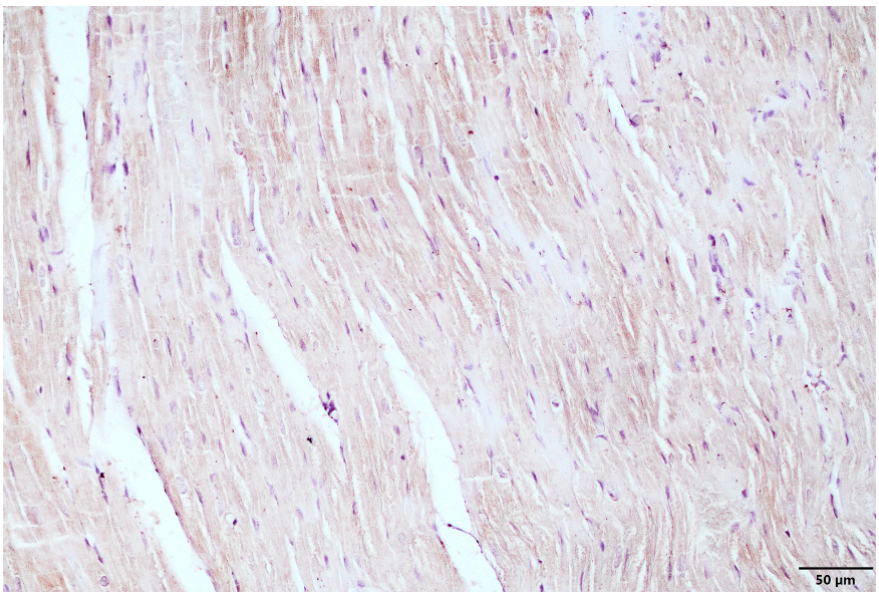
Doksorubisin grubuna bakıldığında ise Beclin 1 boyanma yoğunluğunun kontrol ve Omega 3 gruplarına göre artmıştı. DOX grubu ile kontrol ve Omega 3 gruplarının boyanmaları karşılaştırıldığında DOX grubundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil).



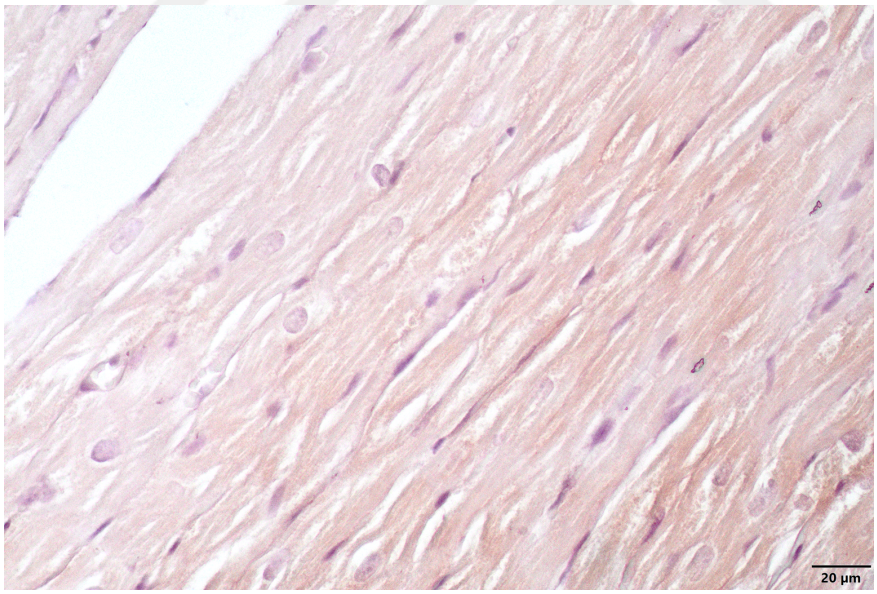
Figür 11: DOX grubu Beclin-1 immünohistokimyasal boyaması; A-x20, B-x40

DOX+Omega 3 grubuna bakıldığında boyanma yoğunluğunun kontrol ve Omega 3 grupları ile benzer olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0,05$), doksorubisin grubu ile

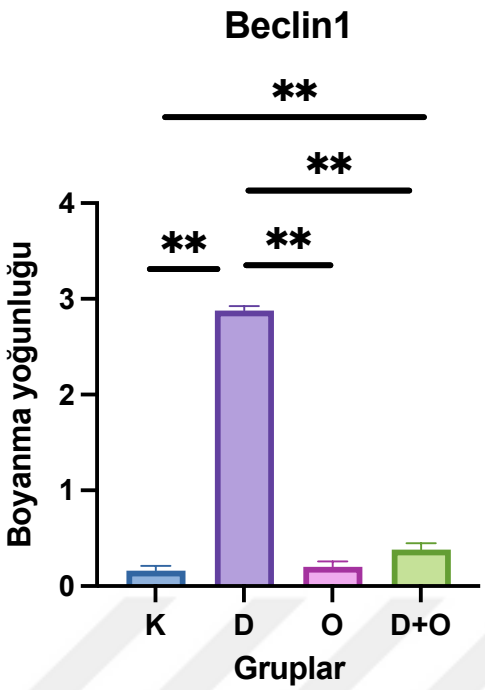
karşılaştırıldığında ise boyanmanın istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha az yoğunlukta olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil).



Figür 12: DOX+Omega 3 grubunda Beclin-1 immünohistokimyasal boyama(x20)



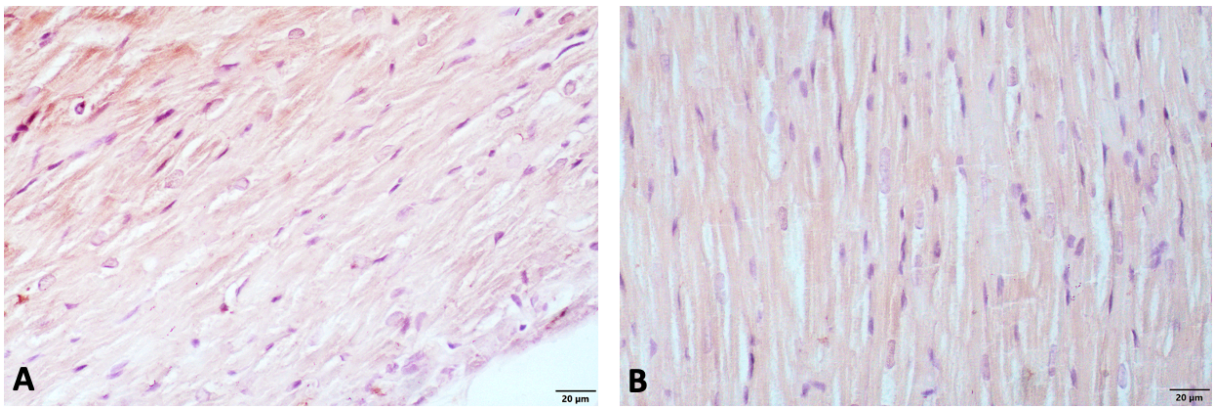
Figür 13: DOX+Omega 3 grubunda Beclin-1 immünohistokimyasal boyama(x40)



Grafik 4: Beclin 1 immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun grafiksel gösterimi

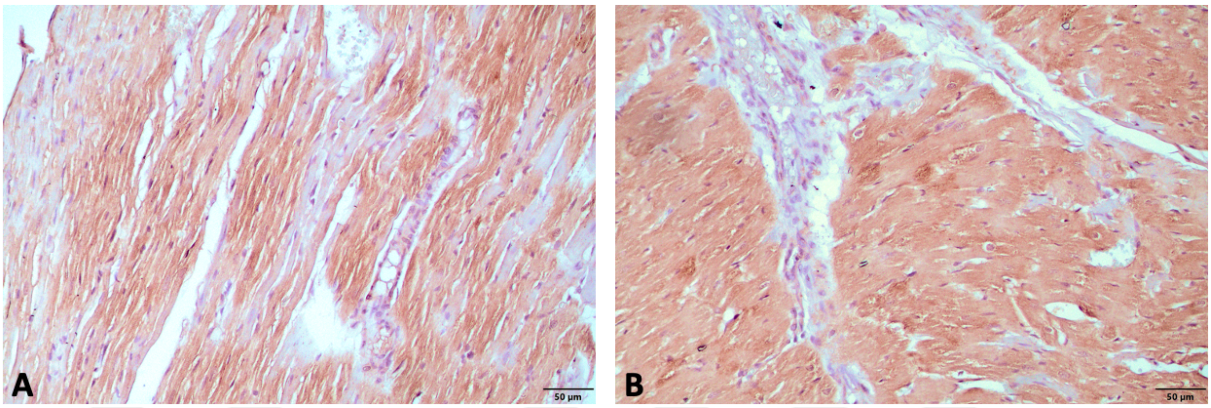
4.3.2. LC3 II immünohistokimyasal boyama

Kalp dokusu örneklerinde LC3 II ile yapılan boyama sonucunda tüm gruplarda hücrelerin sitoplazmasında boyanma yoğunluğu izlendi. Kontrol ve Omega 3 gruplarında boyanma yoğunluğu zayıf olarak gözlendi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü (p>0,05).



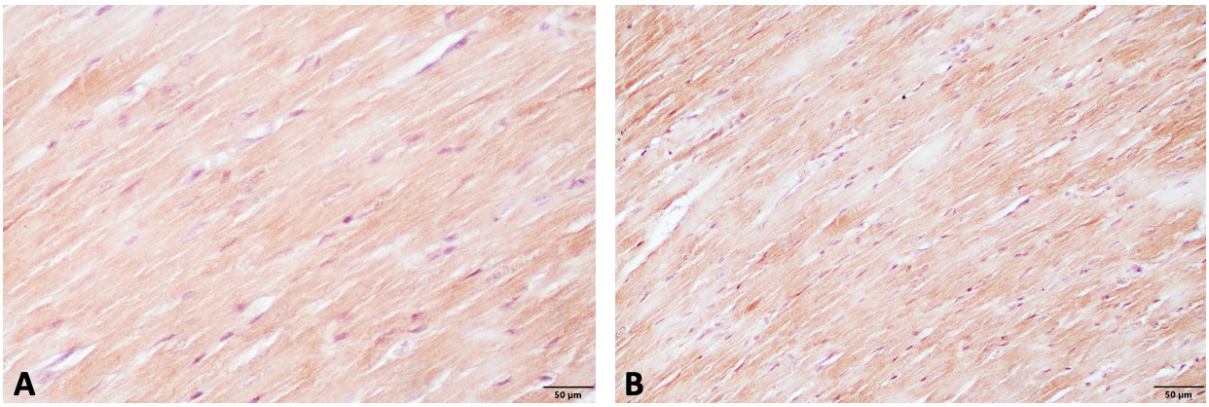
Figür 14: Kontrol (A) ve Omega 3 (B) gruplarına ait LC3 II immünohistokimyasal boyama (x20)

Doksorubisin grubuna bakıldığında ise Beclin 1 boyanma yoğunluğunun kontrol ve Omega 3 gruplarına göre artmıştı. DOX grubu ile kontrol ve Omega 3 gruplarının boyanmaları karşılaştırıldığında DOX grubundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil).

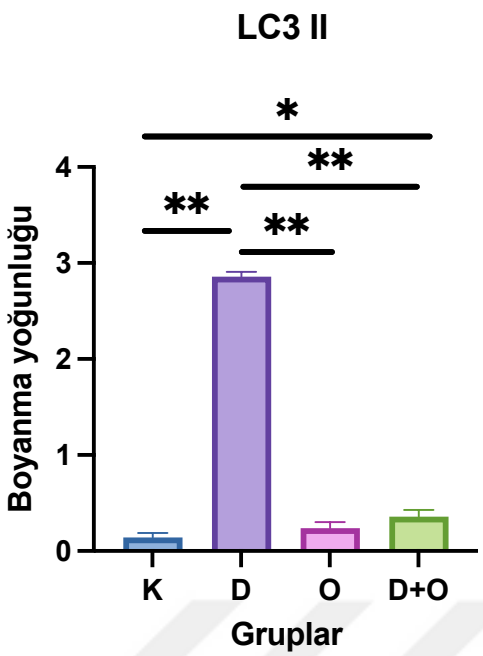


Figür 15: DOX grubuna ait LC3 II immünohistokimyasal boyaması(x20)

DOX+Omega 3 grubuna bakıldığında boyanma yoğunluğunun kontrol ve Omega 3 grupları ile benzer olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0,05$), doksorubisin grubu ile karşılaştırıldığında ise boyanmanın istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha az yoğunlukta olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil).



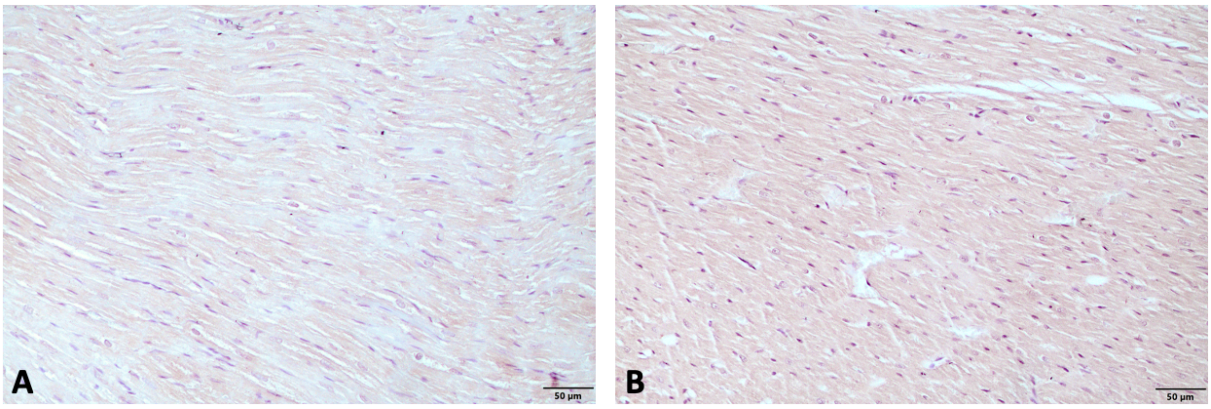
Figür 16 : DOX+Omega 3 grubuna ait LC3 II immünohistokimyasal boyama(x20)



Grafik 5 : LC3 II immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun grafiksel gösterimi

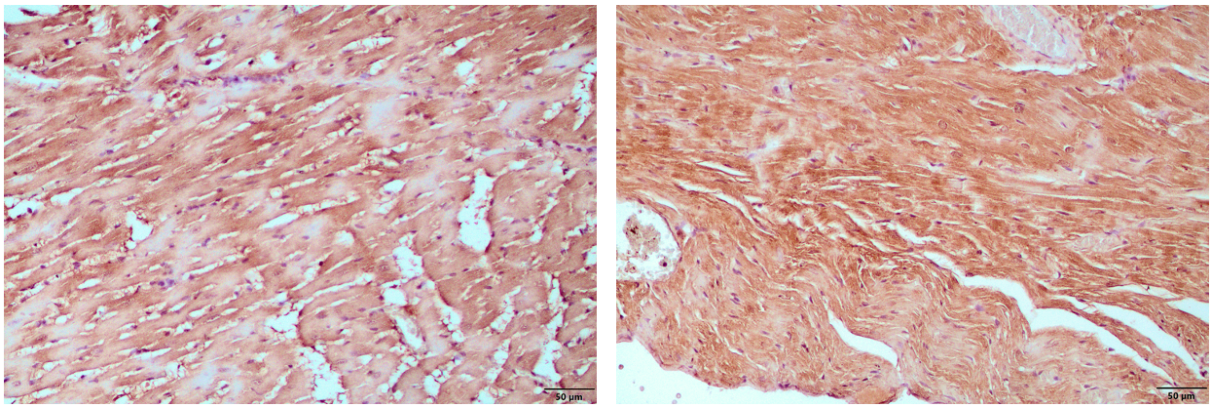
4.3.3. NLRP3 immünohistokimyasal boyama

Kalp dokusu örneklerinde NLRP3 ile yapılan boyama sonucunda tüm gruplarda hücrelerin sitoplazmasında boyanma yoğunluğu izlendi. Kontrol ve Omega 3 gruplarında boyanma yoğunluğu zayıf olarak gözlendi ve iki grup arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0,05$).



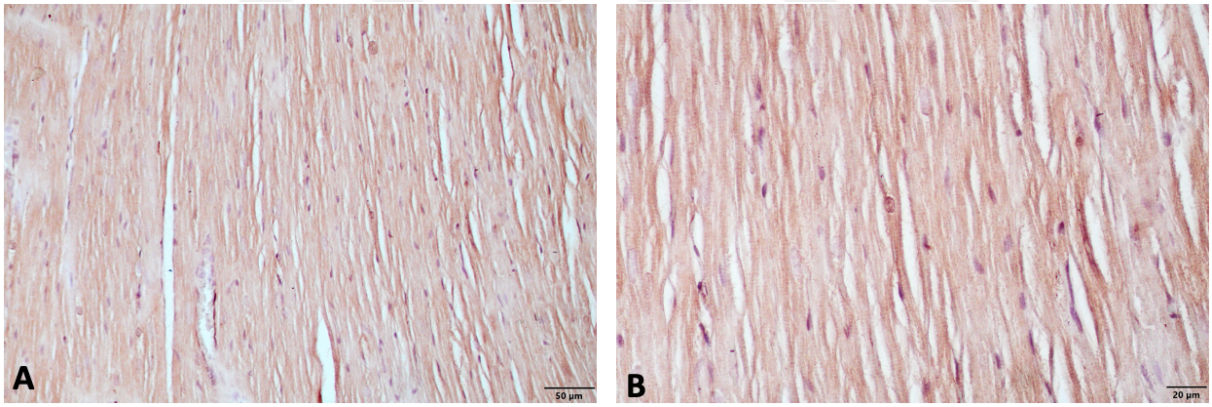
Figür 17 : Kontrol(A) ve Omega 3 (B) gruplarındaNLRP3 immünohistokimyasal boyama

Doksorubisin grubuna bakıldığında ise NLRP3 boyanma yoğunluğunun kontrol ve Omega 3 gruplarına göre artmıştı. DOX grubu ile kontrol ve Omega 3 gruplarının boyanmaları karşılaştırıldığında DOX grubundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil).

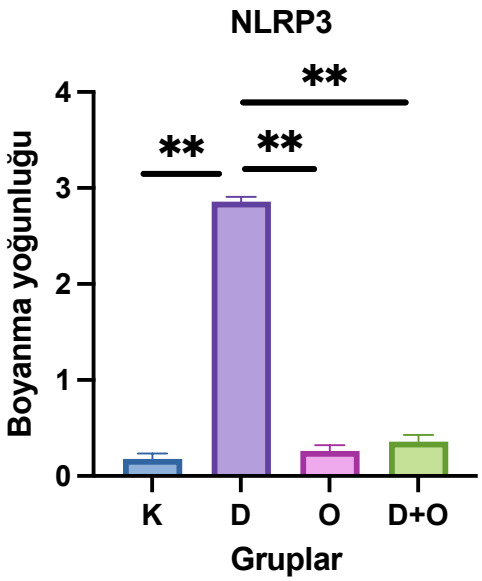


Figür 18 : DOX grubuna ait NLRP3 immünohistokimyasal boyama

DOX+Omega 3 grubuna bakıldığında boyanma yoğunluğunun kontrol ve Omega 3 grupları ile benzer olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0,05$), doksorubisin grubu ile karşılaştırıldığında ise boyanmanın istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha az yoğunlukta olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil).



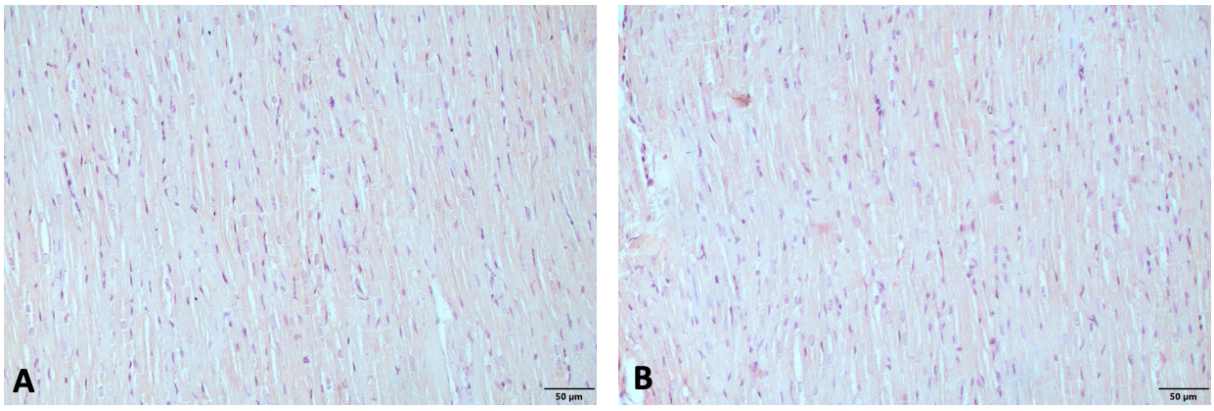
Figür 19 : DOX+Omega 3 grubuna ait NLRP3 immünohistokimyasal boyama;(A-x20;B-x40)



Grafik 6: NLRP3 immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun grafiksel gösterimi

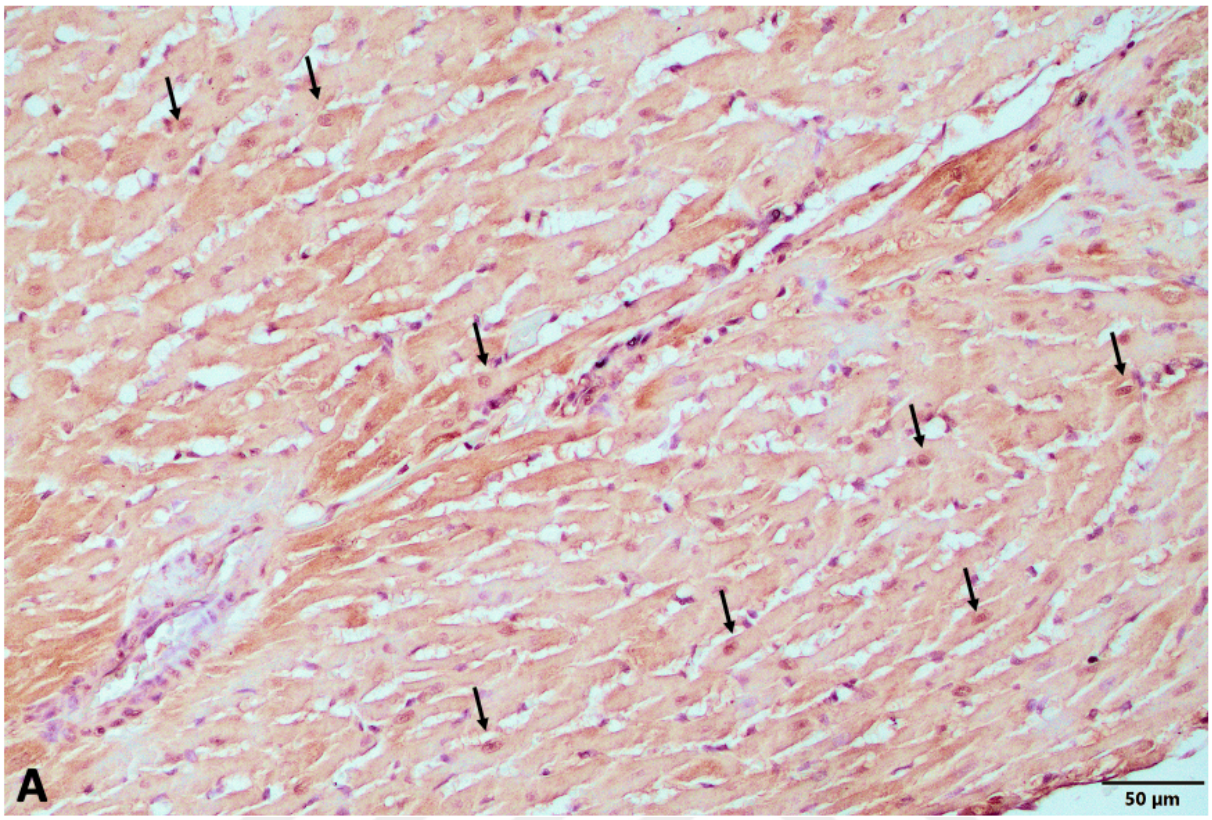
4.3.4. NF-Kappa B p65 immünohistokimyasal boyama

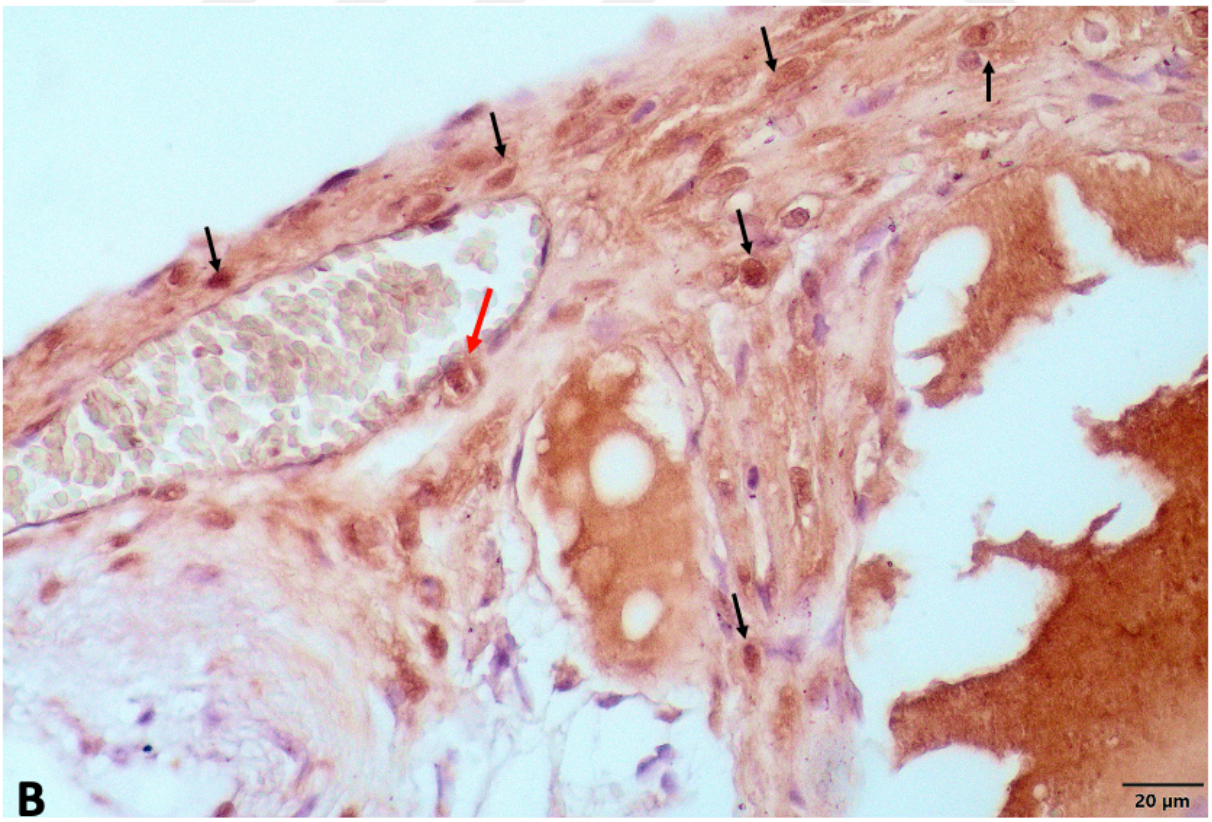
Kalp dokusu örneklerinde NF-kappa B p65 ile yapılan boyama sonucunda tüm gruplarda hücrelerin sitoplazmasında ve özellikle hasar gruplarında hem sitoplazma hem de nüklear boyanma yoğunluğu izlendi. Kontrol ve Omega 3 gruplarında sitoplazmik boyanma yoğunluğu zayıf olarak gözlenirken nüklear boyanma izlenmedi. İki grup arasında yapılan karşılaştırmada ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0,05$).

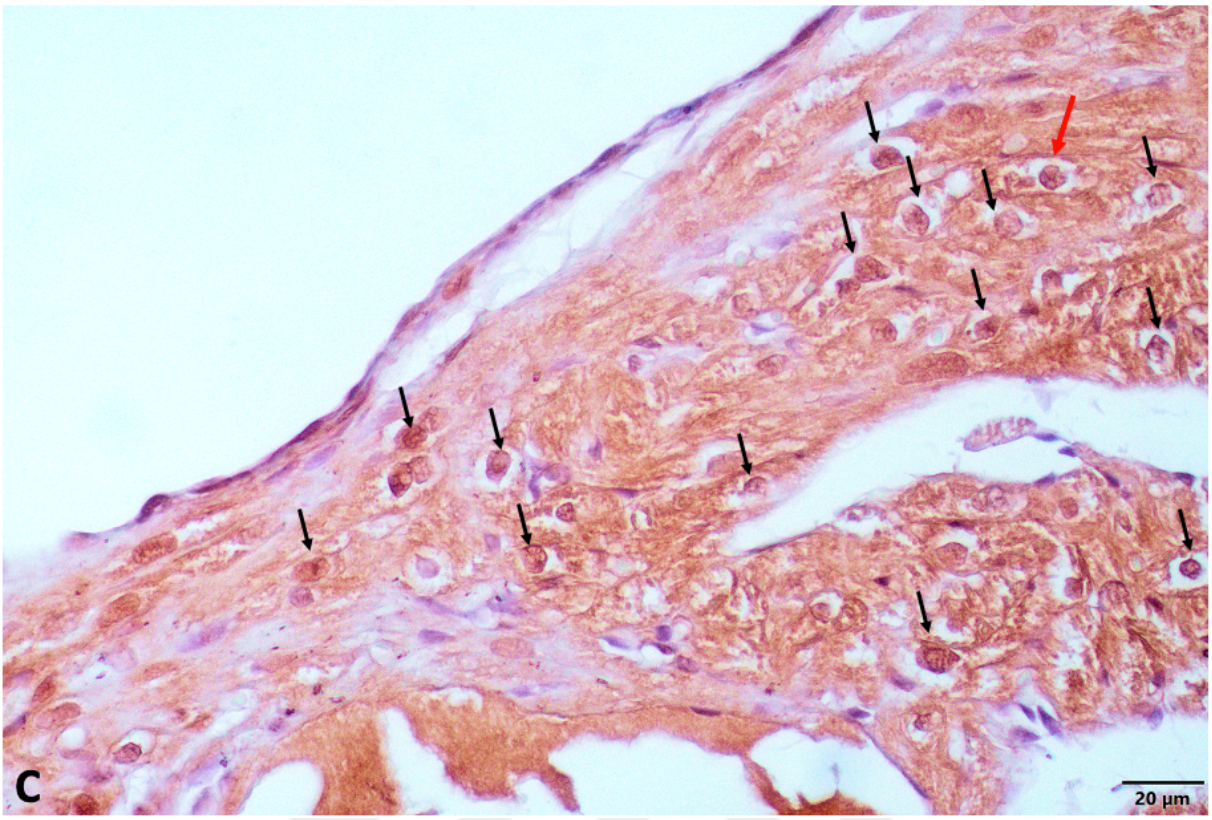


Figür 20 : Kontrol(A) ve Omega 3 (B) gruplarına ait NF-kappa B p 65 immünohistokimyasal boyama

Doksorubisin grubuna bakıldığında ise hem sitoplazma hem de nüklear NF-kappa B p65 boyanma yoğunluğu kontrol ve Omega 3 gruplarına göre artmıştı. DOX grubu ile kontrol ve Omega 3 gruplarının boyanmaları karşılaştırıldığında DOX grubundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil).

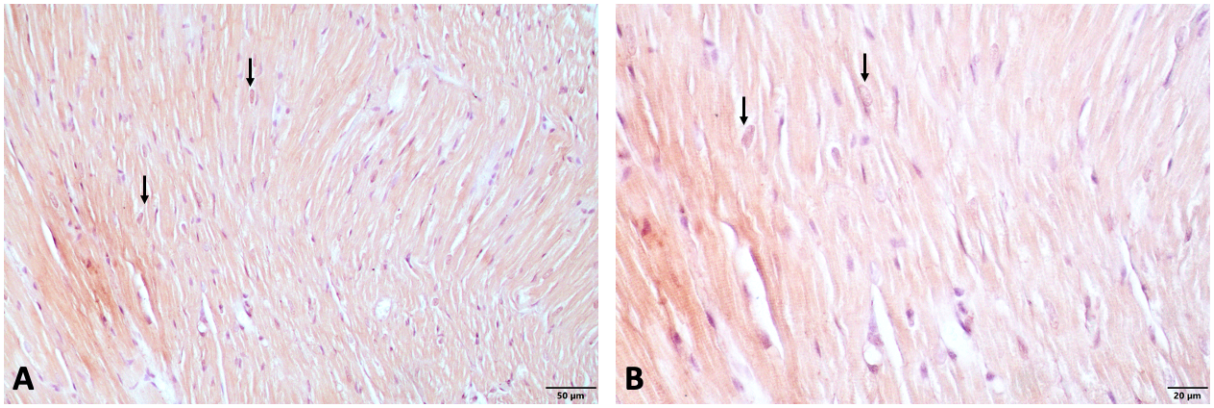

A
50 µm


B
20 µm

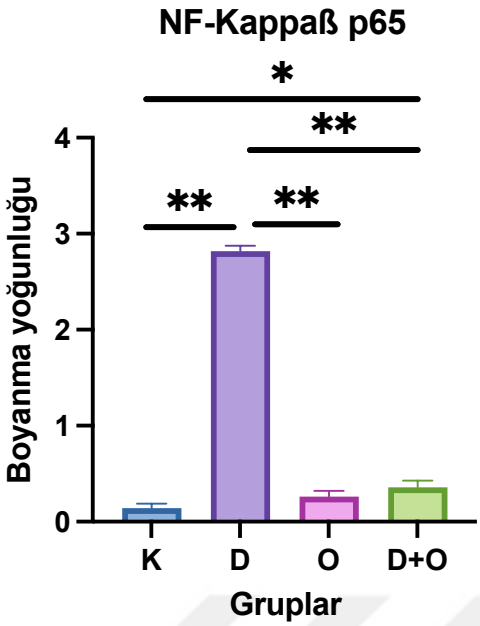


Figür 21 : DOX gruplarında NF-kappa B p65 immünohistokimyasal boyaması,(A)yaygın sitoplazmik boyanma ve nüklear tutulum(x20)(siyah oklar),(B) ve (C) sitoplazmik yoğun boyanma alanları ve pozitif boyanmış nükleuslar (siyah oklar),ısırılmış nükleus görünümü (kırmızı oklar)(x40)

DOX+Omega 3 grubuna bakıldığında boyanma yoğunluğunun kontrol ve Omega 3 grupları ile benzer olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0,05$), doksorubisin grubu ile karşılaştırıldığında ise boyanmanın istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha az yoğunlukta olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil).



Figür 22 : DOX+Omega 3 grubuna ait NF-kappa B p65 immünohistokimyasal boyama,Pozitif boyanmış nükleuslar (siyah oklar);(A)-x20 ve (B)-x40



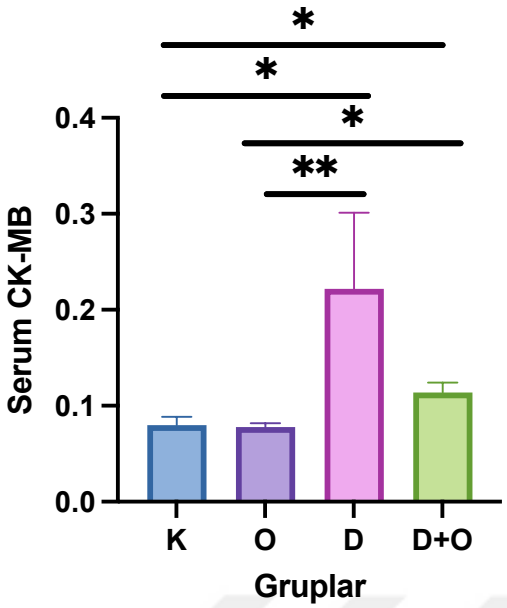
Grafik 7 : NLRP3 immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun grafiksel gösterimi

4.4. Biyokimyasal Bulgular

Sıçanlar deneyin 15. günü i.p. ketamin 80 mg/kg + ksilazin 10 mg/kg ile anestezi yapılarak, orta hat insizyonuyla batınları açıldı. Vena cava caudalisden kan örnekleri toplandı. Alınan kan örnekleri aynı gün 1000xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Ayrılan serum örneklerinden aynı gün serum CK-MB,Troponin I,LDH ölçümleri Dokuz Eylül Üniversitesi Merkez Laboratuvarında çalışıldı.

4.4.1. CK-MB seviyelerinin ölçümü

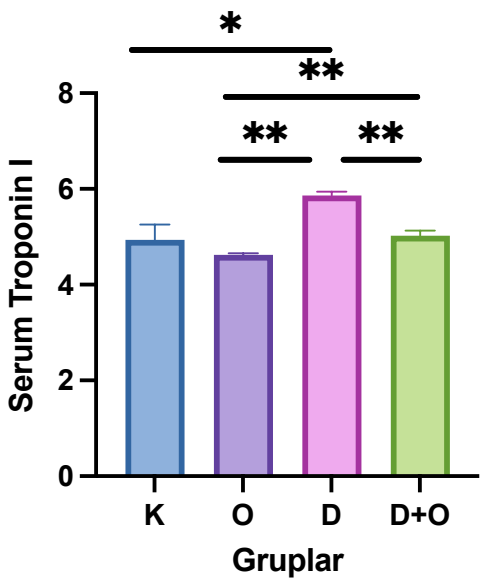
Elde edilen verilere göre CK-MB değerleri karşılaştırıldığında kontrol ve omega 3 yağ asidi grupları arasında anlamlı fark izlenmedi($p>0.05$). Doksorubisin grubuna ait serum CK-MB seviyeleri kontrol ve omega 3 yağ asidi gruplarına göre artmıştı ve bu gruplar arasında serum CK-MB seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü($p<0.05$ ve $p<0.01$). Doksorubisin+Omega 3 yağ asidi grubuna ait serum CK-MB seviyelerine bakıldığında yine kontrol ve omega 3 yağ asidi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülürken($p<0.05$); doksorubisin grubu ile kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi($p>0.05$)(Grafik 8).



Grafik 8: Serum CK-MB seviyelerinin grafiksel gösterimi

4.4.2. Troponin I seviyeleri

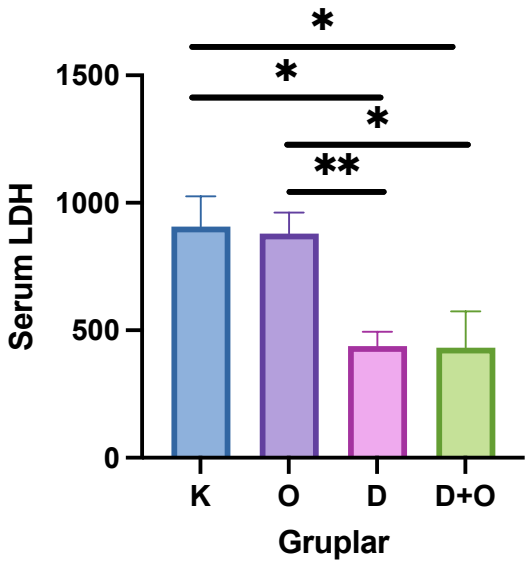
Merkez Laboratuvarından gelen Troponin I değerleri karşılaştırıldığında kontrol ve omega 3 yağ asidi grupları arasında anlamlı fark izlenmedi($p>0.05$). Doksorubisin grubuna ait serum Troponin I seviyeleri kontrol ve omega 3 yağ asidi gruplarına göre artmıştı ve bu gruplar arasında serum Troponin I seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü($p<0.05$ ve $p<0.01$). Doksorubisin+Omega 3 yağ asidi grubuna ait serum Troponin I seviyelerine bakıldığında doksorubisin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu görüldü ($p<0.01$). Doksorubisin+Omega 3 yağ asidi grubuna ait serum Troponin I seviyeleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken ($p>0.05$); omega 3 yağ asidi grubu ile kıyaslandığında ise fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0.01$)(Grafik 9).



Grafik 9: Serum Troponin I seviyelerinin grafiksel gösterimi

4.4.3. LDH seviyelerinin ölçümü

Merkez Laboratuvarından gelen LDH değerleri karşılaştırıldığında kontrol ve omega 3 yağ asidi grupları arasında anlamlı fark izlenmedi($p>0.05$). Doksorubisin grubuna ait serum LDH seviyeleri kontrol ve omega 3 yağ asidi gruplarına göre azalmıştı ve bu gruplar arasında serum LDH seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü($p<0.05$ ve $p<0.01$). Doksorubisin+Omega 3 yağ asidi grubuna ait serum LDH seviyelerine bakıldığında belirgin azalma olduğu görüldü. Bu azalma doksorubisin grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark görülmezken ($p>0.05$); kontrol ve omega3 yağ asidi gruplarına göre fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$) (Grafik 10).



Grafik 10 : Serum LDH seviyelerinin istatistiksel gösterimi

5. TARTIŞMA

Kanser, dünyanın her ülkesinde önde gelen ölüm nedeni ve artan yaşam beklentisinin önünde önemli bir engel olarak yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütünün 2020 yılında yayınlamış olduğu verilere göre dünyada 19 milyonun üzerinde kanser vakası bulunmaktadır.Kanser nedenli total ölüm sayısı ise yaklaşık 10 milyondur[82]. İstatistiklere göre kanserlerin insidansı ve prevalansı artmakta ve bu nedenle kanser tedavisinin önemi de artmaktadır[22], [41]. Antrasiklinler, özellikle doksorubisin, pediyatrik kanserler,hematolojik maligniteler, yumuşak doku sarkomları ve solid tümörlerin tedavisinde ilk seçenek olarak kullanılan ilaçlardır[3]. Ancak antrasiklinlerin kullanımı doza bağımlı ve kümülatif kardiyotoksisiteleri ile sınırlıdır. Bu nedenle antrasiklin ile indüklenen kardiyotoksisiteyi azaltmak çok önemlidir[22].

DOX toksisitesi genellikle kümülatif doza bağımlı olarak görülmektedir[9], [44], [45]. Yapılan çalışmalarda farklı dozların farklı kullanım süreleri ile kardiyotoksisite oluşturulabileceği gösterilmiştir[24], [83]–[85]. Doksorubisin ile indüklenen kardiyotoksisite oluşturmak için rat modellerde 2 yöntem bulunmaktadır:kısa süreli ve uzun süreli uygulama.[83], [86]Uzun süreli uygulama 1-5mg/kg/gün 2-12 hafta ve kümülatif doz 3-25mg/kg olacak şekilde yapılan uygulama tipidir[83], [86]–[91]. Yapılan çalışmalar düşük ve tekrarlayan dozlarda oluşturulan kardiyotokisiste modellerinde hayvan sağ kalım oranlarının daha yüksek olduğunu göstermiştir[86], [92]–[96]. ***Hayward ve arkadaşlarının*** yaptığı çalışmada özellikle tekrarlayan düşük doz aralıklı enjeksiyonların 14-21 gün aralığında en yüksek sağ kalım oranı gösterilmiştir[86] Biz de çalışmamızda sıçanlara 3mg/kg [84], [86], [91] 1.,6. ve 11.günlerde[83]

olacak şekilde 3 doz intraperitoneal enjeksiyon şeklinde uyguladık ve deney sonunda denek kaybı olmadı.

Doksorubisinin indüklediği kardiyotoksisitede kardiyomiyositlerde en sık görülen histolojik değişiklikler sitoplazmik vakuolizasyon,miyofibrillerde düzensizlik ve/veya kayıp ve hemoraji ve/veya ödem olarak yapılan çalışmalarla gösterilmiştir[6], [24], [97], [98]. ***Kang ve arkadaşları*** 2017 yılında yaptıkları çoklu doz çalışmasında uzun dönem doksorubisin uygulamasında sitoplazmik vakuolizasyon ve miyofibril kaybının oluştuğunu göstermiştir. Bizim çalışmamızda da hasar gruplarında sitoplazmik vakuolizasyon, miyofibril kaybı,hemoraji ve konjesyon histolojik olarak gösterilmiştir[99]. ***Chang ve arkadaşları***nın yapmış olduğu çalışmada doksorubisin verilen sıçanlarda miyokard dokusunda artmış fibrozis Mason Trikrom boyama ile gösterilmiştir. Fareler üzerinde yapılan bir çok çalışmada da doksorubisinin özellikle sol ventrikül ve interventriküler septumda ayrıca perivasküler alanda interstisyal fibrosis artışına neden olduğu gösterilmiştir[98], [100], [101]. Biz de benzer şekilde sıçan kalp dokuları üzerinde doksorubisine bağlı interstisyal fibrozis artışını gösterdik.

Literatürde doksorubisinin Troponin I, CK-MB ve LDH seviyelerini artırdığını gösteren yayınlar mevcuttur[102], [103]. Biz de çalışmamızda literatürle uyumlu olarak doksorubisin gruplarında artmış Troponin I ve CK-MB seviyelerini gösterdik. Ancak LDH seviyelerini değerlendirdiğimizde literatürden farklı olarak doksorubisin gruplarında azalmış LDH seviyeleri ile karşılaştık.

Omega 3 yağ asitlerinin kardiyovasküler hastalıklar üzerindeki etkileri yüzlerce çalışma ile değerlendirilmiştir. Amerikan Kalp Derneği, koroner kalp hastalığı olan hastalarda tekrarlayan kalp yetmezliği, tekrarlayan koroner kalp hastalığı ve ani kalp ölümünün önlenmesi için balık tüketimini veya omega-3 takviyelerinin kullanımını önermektedir[104]. Günlük 1 gr/gün omega 3 yağ asidi alımının kalp hastalıkları riskini azaltmada başarılı olduğu gösterilmiştir[10], [81], [105]. 1999 yılında omega 3 yağ asitlerinin kardiyovasküler sistem üzerine olumlu etkilerinin gösterilmesinden sonra benzer dozla yapılan çalışmalar aynı başarıyı gösteremediğinden; çalışmalar daha yüksek dozlar üzerinde devam etmiştir[81]. Daha yüksek dozlarda omega 3 yağ asidi takviyesinin kardiyovasküler sistem ve diğer sistemler üzerinde klinik faydaları gösterme olasılığının daha yüksek olduğuna dair artan kanıtlar mevcuttur[81]. Yapılan çalışmalar özellikle 4 gr/gün dozunda omega 3 yağ asidi alımının kardiyovasküler sistem üzerinde olumlu etkilerini göstermiştir[106], [107]. Biz de çalışmamızda yüksek doz omega 3 yağ asidi uygulamasını tercih ettik. Omega 3 yağ asidi ve doksorubisin kardiyotoksisitesi çalışmalarındaki en büyük sorun ise deney gruplarındaki farklılıkların çeşitliliği nedeniyle sonuçların karşılaştırılmasında yaşanan zorluktur[4], [81].
Yu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ; sıçanlar kontrol, ALA, DOX ve DOX+ALA olmak üzere 4 gruba ayrılmış. ALA dozu 500mg/kg iken DOX dozu 2.5mg/kg olarak belirlenmiş ve deney süresi 17 gün olarak belirtilmiş. Deney sonucunda DOX grubunda azalmış vücut ağırlığı, miyokardiyal nekroz bulguları ve artmış kardiyak troponin I ve CK-MB değerleri bizim çalışmamızla uyumludur. Yine deney sonucunda ALA+DOX grubunda azalmış apoptoza bağlı düzelmiş kardiyak fonksiyonlar da bizim çalışmamızla uyumlu olarak değerlendirildi. Bizim

çalışmamızdan farklı olarak ise bu deneyin sonunda DOX grubunda artmış LDH değerleri bulunmuştur[19].

Teng ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada ise 8 hafta boyunca haftada 1 kez 2 mg/kg DOX ile tedavi edilen sıçanlar 2 gruba ayrılarak; 1 gruba 8 hafta boyunca her gün 400mg/kg PUFA tedavisi veriliyor. Deney sonunda DOX grubunda bizim çalışmamızla benzer şekilde kardiyomiyositlerde nüklear şişme, subendokardiyal fibrozis ve miyofibrillerde düzensizlik saptanıyor. Yine bizim çalışmamıza benzer şekilde bu morfolojik değişiklikler omega 3 yağ asidi verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmış olarak bulunuyor[108].

Uygur ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir başka çalışmada da ratlar kontrol-DOX-Omega 3 yağ asitleri ve DOX+OMG3 olmak üzere 4 gruba ayrılmış. DOX tek doz 30mg/kg şeklinde uygulanırken omega 3 yağ asidi dozu bizim çalışmamızdakine benzer şekilde 400mg/kg olarak belirlenmiş. 30 gün boyunca omega 3 yağ asidi verilen hayvanlara 30mg/kg tek doz DOX enjeksiyonu yapıldıktan 48 saat sonra hayvanlar sakrifiye ediliyor. DOX grubuna ait histolojik incelemelerde bizim çalışmamıza benzer şekilde artmış sitoplazmik vakuolizasyon,miyofibril kaybı ve düzensizliği izleniyor. DOX+Omega 3 yağ asidi grubunda ise yine bizim sonuçlarımıza benzer şekilde bu bulgularda istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma saptanıyor[24].

Germain ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada 1 gruba balık yağı+9 mg/kg epirubicin 1 gruba %40 DHA içeren yağlı diyet+15 mg/kg epirubisin 1 gruba ise palm yağı+15 mg/kg epirubisin veriliyor. Deney sonunda yapılan karşılaştırmada gruplar arasında anlamlı fark izlenmiyor[109].

Matsui ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ratlar standart diyet ve balık yağlı diyet olarak ikiye ayrılıyor. 4 haftalık diyet sonrası kümülatif 15 mg/kg doksorubisin enjeksiyonu yapılıyor. Deney sonunda kardiyak fonksiyonlar değerlendirildiğinde balık yağlı diyetle beslenen grup ve doksorubisin grubu en düşük kardiyak fonksiyonlara sahip olarak izleniyor. Ayrıca en yüksek ölüm oranı da yine balık yağlı diyet grubu ve doksorubisin grubunda bulunuyor[110].

Saleh ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada da ratlar 5 gruba ayrılmış:I-II-III-IV ve V. III-IV ve V. gruplara 4 hafta boyunca sırasıyla 25/50/100 mg/kg/gün omega 3 yağ asidi verilmiş. Son omega 3 yağ asidi dozundan 24 saat sonra II-III-IV ve V. gruplara tek doz 200mg/kg doksorubisin enjeksiyonu yapılmış ve hayvanlar 48 saat sonra sakrifiye edilmiş.Hayvanların vücut ağırlıkları kıyaslandığında bizim çalışmamızdan farklı olarak gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamış. Yine bizim çalışmamızdan farklı olarak CK-MB seviyelerinde anlamlı düşüş bulunmuş. Histolojik değerlendirmelerine bakıldığında ise bizim çalışmamızla uyumlu olarak sitoplazmik vakuolizasyon ve miyofibrillerdeki çizgilenme kaybı özellikle 50mg/kg ve 100mg/kg dozlarında omega 3 alan gruplarda anlamlı şekilde azalmış olarak izlenmiş[111].

Doksorubisinin kardiyotoksisite mekanizması henüz tam olarak çözülememiş olsa da doksorubisinin otofaji ve piropitozisi indüklediğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır[8], [12], [23], [32], [44], [48], [55], [56], [73], [83], [112]–[117]. Literatürde doksorubisin kardiyotoksisitesi üzerine omega 3 yağ asitlerinin etkisinin incelendiği çalışmalarda otofajik belirteçler olan LC3 II ve Beclin-1, piropitotik belirteçler olan NLRP3 ve NF-kappa B p65 immünohistokimyasal boyamanın yapıldığı çalışma bulunmamaktadır. Doksorubisin kardiyotoksisitesinde kantitatif olarak artışlarının gösterildiği çalışmalar mevcuttur.

Zhang ve arkadaşları ratlarla doksorubisin kardiyotoksisitesi üzerine yapmış oldukları bir çalışmada doksorubisin grubunda LC3 II/LC3 I oranının artışını western blot yöntemiyle ve Beclin-1 artışını işe RT-qPCR ile göstermişlerdir. Otofajik hücrelerin görüntülemesini ise transmisyon elektron mikroskobu ile yapmışlardır[118].

Gao ve arkadaşlarının yapmış olduğu in-vitro çalışmada da yine doksorubisinin domuz kardiyomiyositlerindeki LC3 II/LC3 I oranını ve Beclin-1 seviyesini artırdığı western blot ile gösterilmiştir[119].

Yang ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yapmış olduğu çalışmada doksorubisin gruplarında artmış LC3 II/LC3 I oranı ve Beclin-1 seviyesi gösterilmiştir[120].

Sun ve arkadaşlarının yaptığı kombine çalışmada in-vitro olarak doksorubisinin kardiyomiyositlerde NLRP3 düzeyini artırdığı western blot ile gösterilmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda in-vivo olarak NLRP3 immünohistokimyasal boyamasıyla da doksorubisinin kalp dokuda NLRP3 ü artırdığı gösterilmiştir[113].

Quagliariello ve arkadaşları da fareler üzerinde ve in-vitro olarak yayınladığı çalışmalarında NLRP3 ve NF-kappaB p65 artışı artışını ELISA yöntemiyle ile göstermişlerdir[101].

Yine başka bir çalışmada ise Zhang ve arkadaşları hem fare kalp dokusunda immünohistokimyasal olarak hem de in-vitro olarak kardiyomiyositlerde western blot yöntemiyle NLRP3 düzeyindeki artışı göstermişlerdir[20].

Goda ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptığı bir çalışmada doksorubisinin kardiyomiyositlerde NF-kappaB p65'i artırdığı immünohistokimyasal boyama ile gösterilmiştir[112].

Biz de çalışmamızda bu çalışmalarla uyumlu olarak Beclin-1, LC3 II, NLRP3 ve NF-kappaB p65'in doksorubisin grubundaki deneklere ait kalp dokusu örneklerinde artış gösterdiğini immünohistokimyasal olarak gösterdik.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Omega 3 yağ asitlerinin doksorubisin ile indüklenen kardiyotoksisite üzerine etkileri araştırıldı. Çalışma sonucunda omega 3 yağ asitlerinin doksorubisin kardiyotoksisitesini belirgin olarak önlediği gösterildi. Çalışmamızda doksorubisinin sıçan vücut ağırlıklarında omega 3 yağ asidi verilen gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalmaya yol açtığı gösterildi.

Yapılan histolojik değerlendirmelerde, doksorubisinin kalp dokusunda yoğun şekilde sitoplazmik ve nüklear değişikliklere neden olduğu, doksorubisin ile birlikte omega 3 yağ asidi tedavisi verilen gruplarda bu sitoplazmik ve nüklear değişikliklerin belirgin olarak azaldığı gösterildi. Omega 3 yağ asitlerinin kardiyomiyositler üzerindeki olumlu etkilerini Beclin-1, LC3 II, NLRP3 ve NF-kappaB p65 düzeylerinde azalma ile otofajik ve piropitotik akışı azaltarak yapabileceğini düşündük ve bunu immünohistokimyasal boyamalar ile gösterdik.

Sonuç olarak klinikte antineoplastik ajan olarak yaygın kullanılan bir ilaç olan doksorubisinin en yaygın yan etkisi olan kardiyotoksisitenin azaltılması amacıyla omega 3 yağ asitlerinin kullanılması, hem doksorubisinin hem de omega 3 yağ asitlerinin etki mekanizlarının tam olarak anlaşılmasına bağlıdır. Bu etki mekanizmalarının anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmanın yapılması gerekliliği şüphesizdir.

7. KAYNAKLAR

[1] N. Koleini and E. Kardami, 'Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity.', *Oncotarget*, vol. 8, no. 28, pp. 46663–46680, Jul. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.16944.

[2] L. Meng *et al.*, 'Doxorubicin induces cardiomyocyte pyroptosis via the TINCR-mediated posttranscriptional stabilization of NLR family pyrin domain containing 3', *J Mol Cell Cardiol*, vol. 136, pp. 15–26, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.yjmcc.2019.08.009.

[3] M. Valcovici, F. Andrica, C. Serban, and S. Dragan, 'Cardiotoxicity of anthracycline therapy: current perspectives.', *Arch Med Sci*, vol. 12, no. 2, pp. 428–35, Apr. 2016, doi: 10.5114/aoms.2016.59270.

[4] S. Serini, R. Ottes Vasconcelos, R. Nascimento Gomes, and G. Calviello, 'Protective Effects of ω-3 PUFA in Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: A Critical Review', *Int J Mol Sci*, vol. 18, no. 12, p. 2689, Dec. 2017, doi: 10.3390/ijms18122689.

[5] N. Koleini, B. E. Nickel, A. L. Edel, R. R. Fandrich, A. Ravandi, and E. Kardami, 'Oxidized phospholipids in Doxorubicin-induced cardiotoxicity', *Chem Biol Interact*, vol. 303, pp. 35–39, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.cbi.2019.01.032.

[6] M. Songbo, H. Lang, C. Xinyong, X. Bin, Z. Ping, and S. Liang, 'Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity', *Toxicol Lett*, vol. 307, pp. 41–48, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.toxlet.2019.02.013.

[7] B. Kalyanaraman, 'Teaching the basics of the mechanism of doxorubicin-induced cardiotoxicity: Have we been barking up the wrong tree?', *Redox Biol*, vol. 29, p. 101394, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.redox.2019.101394.

[8] J. J. Bartlett, P. C. Trivedi, and T. Pulinilkunnil, 'Autophagic dysregulation in doxorubicin cardiomyopathy', *J Mol Cell Cardiol*, vol. 104, pp. 1–8, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.yjmcc.2017.01.007.

[9] N. Wenningmann, M. Knapp, A. Ande, T. R. Vaidya, and S. Ait-Oudhia, 'Insights into Doxorubicin-induced Cardiotoxicity: Molecular Mechanisms, Preventive Strategies, and Early Monitoring', *Mol Pharmacol*, vol. 96, no. 2, pp. 219–232, Aug. 2019, doi: 10.1124/mol.119.115725.

[10] A. Elagizi, C. J. Lavie, K. Marshall, J. J. DiNicolantonio, J. H. O'Keefe, and R. v. Milani, 'Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Health: A Comprehensive Review', *Prog Cardiovasc Dis*, vol. 61, no. 1, pp. 76–85, May 2018, doi: 10.1016/j.pcad.2018.03.006.

[11] E. Tortosa-Caparrós, D. Navas-Carrillo, F. Marín, and E. Orenes-Piñero, 'Anti-inflammatory effects of omega 3 and omega 6 polyunsaturated fatty acids in cardiovascular disease and metabolic syndrome', *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 57, no. 16, pp. 3421–3429, Nov. 2017, doi: 10.1080/10408398.2015.1126549.

[12] F. Yarmohammadi, R. Rezaee, and G. Karimi, 'Natural compounds against doxorubicin-induced cardiotoxicity: A review on the involvement of Nrf2/ <scp>ARE</scp> signaling pathway', *Phytotherapy Research*, vol. 35, no. 3, pp. 1163–1175, Mar. 2021, doi: 10.1002/ptr.6882.

[13] K. Razavi-Azarkhiavi, M. Iranshahy, A. Sahebkar, K. Shirani, and G. Karimi, 'The Protective Role of Phenolic Compounds Against Doxorubicin-induced Cardiotoxicity: A Comprehensive Review', *Nutr Cancer*, vol. 68, no. 6, pp. 892–917, Aug. 2016, doi: 10.1080/01635581.2016.1187280.

[14] N. Georgiadis *et al.*, 'What is considered cardiotoxicity of anthracyclines in animal studies Corrigendum in /10.3892/or.2020.7717', *Oncol Rep*, vol. 44, no. 3, pp. 798–818, Jul. 2020, doi: 10.3892/or.2020.7688.

[15] Y.-Y. Meng *et al.*, ‘Protection against Doxorubicin-Induced Cytotoxicity by Geniposide Involves AMPK *α* Signaling Pathway’, *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2019, pp. 1–12, Jun. 2019, doi: 10.1155/2019/7901735.
[16] M. Cholewski, M. Tomczykowa, and M. Tomczyk, ‘A Comprehensive Review of Chemistry, Sources and Bioavailability of Omega-3 Fatty Acids’, *Nutrients*, vol. 10, no. 11, p. 1662, Nov. 2018, doi: 10.3390/nu10111662.
[17] E. Tortosa-Caparrós, D. Navas-Carrillo, F. Marín, and E. Orenes-Piñero, ‘Anti-inflammatory effects of omega 3 and omega 6 polyunsaturated fatty acids in cardiovascular disease and metabolic syndrome’, *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 57, no. 16, pp. 3421–3429, Nov. 2017, doi: 10.1080/10408398.2015.1126549.
[18] Y. Li, Z. Jia, and H. Zhu, ‘Dietary Supplementation with Anti-Inflammatory Omega-3 Fatty Acids for Cardiovascular Protection: Help or Hoax?’, *Reactive Oxygen Species*, 2019, doi: 10.20455/ros.2019.817.
[19] X. Yu, L. Cui, Z. Zhang, Q. Zhao, and S. Li, ‘α-Linolenic acid attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats through suppression of oxidative stress and apoptosis’, *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, vol. 45, no. 10, pp. 817–826, Oct. 2013, doi: 10.1093/abbs/gmt082.
[20] L. Zhang *et al.*, ‘MCC950 attenuates doxorubicin-induced myocardial injury in vivo and in vitro by inhibiting NLRP3-mediated pyroptosis’, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 143, p. 112133, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.biopha.2021.112133.
[21] O. Tacar, P. Sriamornsak, and C. R. Dass, ‘Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems’, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 65, no. 2, pp. 157–170, Dec. 2012, doi: 10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x.
[22] P. S. Rawat, A. Jaiswal, A. Khurana, J. S. Bhatti, and U. Navik, ‘Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management’, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 139, p. 111708, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.biopha.2021.111708.
[23] E. Christidi and L. R. Brunham, ‘Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity.’, *Cell Death Dis*, vol. 12, no. 4, p. 339, 2021, doi: 10.1038/s41419-021-03614-x.
[24] R. Uygur, C. Aktas, F. Tulubas, S. Alpsoy, B. Topcu, and O. Ozen, ‘Cardioprotective effects of fish omega-3 fatty acids on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats’, *Hum Exp Toxicol*, vol. 33, no. 4, pp. 435–445, Apr. 2014, doi: 10.1177/0960327113493304.
[25] A. J. Nelson, S. Mirzaee, and S. J. Nicholls, ‘High-Dose Omega-3 Fatty Acids in Cardiovascular Prevention: Finally Living Up to Their Potential?’, *American Journal of Cardiovascular Drugs*, vol. 20, no. 1, pp. 11–18, Feb. 2020, doi: 10.1007/s40256-019-00363-3.
[26] Y. Watanabe and I. Tatsuno, ‘Prevention of Cardiovascular Events with Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and the Mechanism Involved’, *J Atheroscler Thromb*, vol. 27, no. 3, pp. 183–198, Mar. 2020, doi: 10.5551/jat.50658.
[27] Ş. Paker, *Histoloji*. 1990.
[28] A. L. Mescher, *Junqueira’s basic histology: text and atlas.*, 15th ed., vol. 11. New York: McGraw-Hill Medical education, 2018.
[29] W. Pawlina and M. H. Ross, *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology.* . 2018.
[30] K. L. , P. T. V. N. Moore, *The Developing Human,Clinically Oriented Embryology*. 2018.
[31] T. W. Sadler, *Langman Medikal Embriyoloji*. Ankara: Palme Yayıncılık, 2017.

[32] K. Renu, A. V.G., T. P. P.B., and S. Arunachalam, 'Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy – An update', *Eur J Pharmacol*, vol. 818, pp. 241–253, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.ejphar.2017.10.043.
[33] M. Iranshahi *et al.*, 'Drimane-type Sesquiterpene Coumarins from Ferula gummosa Fruits Enhance Doxorubicin Uptake in Doxorubicin-resistant Human Breast Cancer Cell Line', *J Tradit Complement Med*, vol. 4, no. 2, pp. 118–125, Apr. 2014, doi: 10.4103/2225-4110.126181.
[34] S. Gorini, A. de Angelis, L. Berrino, N. Malara, G. Rosano, and E. Ferraro, 'Chemotherapeutic Drugs and Mitochondrial Dysfunction: Focus on Doxorubicin, Trastuzumab, and Sunitinib', *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2018, pp. 1–15, 2018, doi: 10.1155/2018/7582730.
[35] A. Morabito *et al.*, 'Safety and Activity of the Combination of Pegylated Liposomal Doxorubicin and Weekly Docetaxel in Advanced Breast Cancer', *Breast Cancer Res Treat*, vol. 86, no. 3, pp. 249–258, Aug. 2004, doi: 10.1023/B:BREA.0000036898.45123.e9.
[36] M. Mohajeri and A. Sahebkar, 'Protective effects of curcumin against doxorubicin-induced toxicity and resistance: A review', *Crit Rev Oncol Hematol*, vol. 122, pp. 30–51, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.12.005.
[37] G. Bonadonna, S. Monfardini, M. de Lena, and F. Fossati-Bellani, 'Clinical Evaluation of Adriamycin, a New Antitumour Antibiotic', *BMJ*, vol. 3, no. 5669, pp. 503–506, Aug. 1969, doi: 10.1136/bmj.3.5669.503.
[38] Y. Wang, X. Mei, J. Yuan, W. Lu, B. Li, and D. Xu, 'Taurine zinc solid dispersions attenuate doxorubicin-induced hepatotoxicity and cardiotoxicity in rats', *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 289, no. 1, pp. 1–11, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.taap.2015.08.017.
[39] 'https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/d1515?gclid=EAIaIQobChMIhtyvt-3D-gIVqY9oCR1OIwwwEAAYASAAEgKO5PD_BwE&gclsrc=aw.ds'.
[40] F. A. Fornari, J. K. Randolph, J. C. Yalowich, M. K. Ritke, and D. A. Gewirtz, 'Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells.', *Mol Pharmacol*, vol. 45, no. 4, pp. 649–56, Apr. 1994.
[41] S. Rivankar, 'An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy', *J Cancer Res Ther*, vol. 10, no. 4, p. 853, 2014, doi: 10.4103/0973-1482.139267.
[42] A. C. Alves *et al.*, 'Influence of doxorubicin on model cell membrane properties: insights from in vitro and in silico studies', *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 6343, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-06445-z.
[43] F. Yarmohmmadi *et al.*, 'Protective effects of agmatine on doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity in rat', *Eur J Pharmacol*, vol. 796, pp. 39–44, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.ejphar.2016.12.022.
[44] K. M. Sadek, S. F. E. Mahmoud, M. F. Zeweil, and T. K. Abouzed, 'Proanthocyanidin alleviates doxorubicin-induced cardiac injury by inhibiting NF- <scp>k</scp> B pathway and modulating oxidative stress, cell cycle, and fibrogenesis', *J Biochem Mol Toxicol*, vol. 35, no. 4, Apr. 2021, doi: 10.1002/jbt.22716.
[45] L. Zhao, X. Tao, Y. Qi, L. Xu, L. Yin, and J. Peng, 'Protective effect of dioscin against doxorubicin-induced cardiotoxicity via adjusting microRNA-140-5p-mediated myocardial oxidative stress', *Redox Biol*, vol. 16, pp. 189–198, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.redox.2018.02.026.
[46] L. Hosseinzadeh, J. Behravan, F. Mosaffa, G. Bahrami, A. Bahrami, and G. Karimi, 'Curcumin potentiates doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells through generation of reactive oxygen species', *Food and Chemical Toxicology*, vol. 49, no. 5, pp. 1102–1109, May 2011, doi: 10.1016/j.fct.2011.01.021.

[47] A. Ajzashokouhi, H. Bostan, V. Jomezadeh, A. Hayes, and G. Karimi, 'A review on the cardioprotective mechanisms of metformin against doxorubicin', *Hum Exp Toxicol*, vol. 39, no. 3, pp. 237–248, Mar. 2020, doi: 10.1177/0960327119888277.
[48] J. Zhang *et al.*, 'Resolvin E1 protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting oxidative stress, autophagy and apoptosis by targeting AKT/mTOR signaling', *Biochem Pharmacol*, vol. 180, p. 114188, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.bcp.2020.114188.
[49] D. Glick, S. Barth, and K. F. Macleod, 'Autophagy: cellular and molecular mechanisms', *J Pathol*, vol. 221, no. 1, pp. 3–12, May 2010, doi: 10.1002/path.2697.
[50] B. Levine and G. Kroemer, 'Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective', *Cell*, vol. 176, no. 1–2, pp. 11–42, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.cell.2018.09.048.
[51] L. Galluzzi *et al.*, 'Molecular definitions of autophagy and related processes', *EMBO J*, vol. 36, no. 13, pp. 1811–1836, Jul. 2017, doi: 10.15252/embj.201796697.
[52] L. Galluzzi and D. R. Green, 'Autophagy-Independent Functions of the Autophagy Machinery', *Cell*, vol. 177, no. 7, pp. 1682–1699, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.cell.2019.05.026.
[53] W. Cao, J. Li, K. Yang, and D. Cao, 'An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress', *Bull Cancer*, vol. 108, no. 3, pp. 304–322, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.bulcan.2020.11.004.
[54] K. R. Parzych and D. J. Klionsky, 'An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation', *Antioxid Redox Signal*, vol. 20, no. 3, pp. 460–473, Jan. 2014, doi: 10.1089/ars.2013.5371.
[55] A. J. Dirks-Naylor, 'The role of autophagy in doxorubicin-induced cardiotoxicity', *Life Sci*, vol. 93, no. 24, pp. 913–916, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.lfs.2013.10.013.
[56] M. Kobayashi *et al.*, 'NLRP3 Deficiency Reduces Macrophage Interleukin-10 Production and Enhances the Susceptibility to Doxorubicin-induced Cardiotoxicity', *Sci Rep*, vol. 6, no. 1, p. 26489, May 2016, doi: 10.1038/srep26489.
[57] A. Zychlinsky, M. C. Prevost, and P. J. Sansonetti, 'Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages', *Nature*, vol. 358, no. 6382, pp. 167–169, Jul. 1992, doi: 10.1038/358167a0.
[58] B. T. Cookson and M. A. Brennan, 'Pro-inflammatory programmed cell death', *Trends Microbiol*, vol. 9, no. 3, pp. 113–114, Mar. 2001, doi: 10.1016/S0966-842X(00)01936-3.
[59] C. Jia *et al.*, 'Role of pyroptosis in cardiovascular diseases', *Int Immunopharmacol*, vol. 67, pp. 311–318, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.intimp.2018.12.028.
[60] A. al Mamun *et al.*, 'Role of pyroptosis in cancer and its therapeutic regulation', *Eur J Pharmacol*, vol. 910, p. 174444, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174444.
[61] Q. Wang *et al.*, 'Pyroptosis: A pro-inflammatory type of cell death in cardiovascular disease', *Clinica Chimica Acta*, vol. 510, pp. 62–72, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.cca.2020.06.044.
[62] D. Bertheloot, E. Latz, and B. S. Franklin, 'Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death', *Cell Mol Immunol*, vol. 18, no. 5, pp. 1106–1121, May 2021, doi: 10.1038/s41423-020-00630-3.
[63] S. W. G. Tait, G. Ichim, and D. R. Green, 'Die another way – non-apoptotic mechanisms of cell death', *J Cell Sci*, vol. 127, no. 10, pp. 2135–2144, May 2014, doi: 10.1242/jcs.093575.
[64] Q. Lei, T. Yi, and C. Chen, 'NF-κB-Gasdermin D (GSDMD) Axis Couples Oxidative Stress and NACHT, LRR and PYD Domains-Containing Protein 3 (NLRP3) Inflammasome-Mediated Cardiomyocyte Pyroptosis Following Myocardial Infarction',

Medical Science Monitor, vol. 24, pp. 6044–6052, Aug. 2018, doi: 10.12659/MSM.908529.
[65] Y. Fang *et al.*, 'Pyroptosis: A new frontier in cancer', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 121, p. 109595, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2019.109595.
[66] D. Liu, X. Zeng, X. Li, J. L. Mehta, and X. Wang, 'Role of NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of cardiovascular diseases', *Basic Res Cardiol*, vol. 113, no. 1, p. 5, Jan. 2018, doi: 10.1007/s00395-017-0663-9.
[67] Y. Huang, W. Xu, and R. Zhou, 'NLRP3 inflammasome activation and cell death', *Cell Mol Immunol*, vol. 18, no. 9, pp. 2114–2127, Sep. 2021, doi: 10.1038/s41423-021-00740-6.
[68] S. M. Man and T.-D. Kanneganti, 'Regulation of inflammasome activation', *Immunol Rev*, vol. 265, no. 1, pp. 6–21, May 2015, doi: 10.1111/imr.12296.
[69] M. Lamkanfi and T.-D. Kanneganti, 'Nlrp3: An immune sensor of cellular stress and infection', *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 42, no. 6, pp. 792–795, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.biocel.2010.01.008.
[70] F. G. Bauernfeind *et al.*, 'Cutting Edge: NF-κB Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression', *The Journal of Immunology*, vol. 183, no. 2, pp. 787–791, Jul. 2009, doi: 10.4049/jimmunol.0901363.
[71] M. G. Netea *et al.*, 'Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1β in monocytes and macrophages', *Blood*, vol. 113, no. 10, pp. 2324–2335, Mar. 2009, doi: 10.1182/blood-2008-03-146720.
[72] F. Yarmohammadi, H. Karbasforooshan, A. W. Hayes, and G. Karimi, 'Inflammation suppression in doxorubicin-induced cardiotoxicity: natural compounds as therapeutic options', *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, vol. 394, no. 10, pp. 2003–2011, Oct. 2021, doi: 10.1007/s00210-021-02132-z.
[73] Z. H. Maayah, S. Takahara, and J. R. B. Dyck, 'The beneficial effects of reducing NLRP3 inflammasome activation in the cardiotoxicity and the anti-cancer effects of doxorubicin', *Arch Toxicol*, vol. 95, no. 1, pp. 1–9, Jan. 2021, doi: 10.1007/s00204-020-02876-2.
[74] Z. Tavakoli Dargani, R. Singla, T. Johnson, R. Kukreja, and D. K. Singla, 'Exosomes derived from embryonic stem cells inhibit doxorubicin and inflammation-induced pyroptosis in muscle cells', *Can J Physiol Pharmacol*, vol. 96, no. 3, pp. 304–307, Mar. 2018, doi: 10.1139/cjpp-2017-0340.
[75] M. Mussbacher *et al.*, 'Cell Type-Specific Roles of NF-κB Linking Inflammation and Thrombosis', *Front Immunol*, vol. 10, Feb. 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.00085.
[76] S. Mitchell, J. Vargas, and A. Hoffmann, 'Signaling via the <scp>NFκB</scp> system', *WIREs Systems Biology and Medicine*, vol. 8, no. 3, pp. 227–241, May 2016, doi: 10.1002/wsbm.1331.
[77] T. Lawrence, 'The Nuclear Factor NF- B Pathway in Inflammation', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 1, no. 6, pp. a001651–a001651, Dec. 2009, doi: 10.1101/cshperspect.a001651.
[78] T. A. Mori, 'Marine OMEGA-3 fatty acids in the prevention of cardiovascular disease', *Fitoterapia*, vol. 123, pp. 51–58, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.fitote.2017.09.015.
[79] F. Shahidi and P. Ambigaipalan, 'Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits', *Annu Rev Food Sci Technol*, vol. 9, no. 1, pp. 345–381, Mar. 2018, doi: 10.1146/annurev-food-111317-095850.
[80] N. Kannan, A. S. Rao, and A. Nair, 'Microbial production of omega-3 fatty acids: an overview', *J Appl Microbiol*, vol. 131, no. 5, pp. 2114–2130, Nov. 2021, doi: 10.1111/jam.15034.

[81] A. Elagizi, C. J. Lavie, E. O'Keefe, K. Marshall, J. H. O'Keefe, and R. v. Milani, 'An Update on Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Health', *Nutrients*, vol. 13, no. 1, p. 204, Jan. 2021, doi: 10.3390/nu13010204.
[82] H. Sung *et al.*, 'Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries', *CA Cancer J Clin*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
[83] P. Wang *et al.*, 'SESN2 protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy via rescuing mitophagy and improving mitochondrial function', *J Mol Cell Cardiol*, vol. 133, pp. 125–137, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.yjmcc.2019.06.005.
[84] E. Y. Podyacheva, E. A. Kushnareva, A. A. Karpov, and Y. G. Toropova, 'Analysis of Models of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Rats and Mice. A Modern View From the Perspective of the Pathophysiologist and the Clinician', *Front Pharmacol*, vol. 12, Jun. 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.670479.
[85] D. S. El-Agamy *et al.*, 'Aspernolide F, as a new cardioprotective butyrolactone against doxorubicin-induced cardiotoxicity', *Int Immunopharmacol*, vol. 72, pp. 429–436, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.intimp.2019.04.045.
[86] H. D. Hayward R, 'Doxorubicin Cardiotoxicity in the Rat: An In Vivo Characterization', *J Am Assoc Lab Anim Sci*, vol. 46, no. 4, pp. 20–32, 2007.
[87] D. J. M. Medeiros-Lima, J. J. Carvalho, E. Tibirica, J. P. Borges, and C. Matsuura, 'Time course of cardiomyopathy induced by doxorubicin in rats', *Pharmacological Reports*, vol. 71, no. 4, pp. 583–590, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.pharep.2019.02.013.
[88] A. Sharma, M. Parikh, H. Shah, and T. Gandhi, 'Modulation of Nrf2 by quercetin in doxorubicin-treated rats', *Heliyon*, vol. 6, no. 4, p. e03803, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03803.
[89] N. Chakouri *et al.*, 'Screening for *in-vivo* regional contractile defaults to predict the delayed Doxorubicin Cardiotoxicity in Juvenile Rat', *Theranostics*, vol. 10, no. 18, pp. 8130–8142, 2020, doi: 10.7150/thno.47407.
[90] F. Villani *et al.*, 'Prevention of doxorubicin-induced cardiomyopathy by reduced glutathione', *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 28, no. 5, pp. 365–369, 1991, doi: 10.1007/BF00685691.
[91] Y.-Y. Zhang, M. Yi, and Y.-P. Huang, 'Oxymatrine Ameliorates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats', *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 43, no. 2, pp. 626–635, 2017, doi: 10.1159/000480471.
[92] T. Nakahara *et al.*, 'Molecular Imaging of Apoptosis in Cancer Therapy-Related Cardiac Dysfunction Before LVEF Reduction', *JACC Cardiovasc Imaging*, vol. 11, no. 8, pp. 1203–1205, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.jcmg.2017.12.012.
[93] S. Zhang, T. Meng, J. Liu, X. Zhang, and J. Zhang, 'Cardiac Protective Effects of Dexrazoxane on Animal Cardiotoxicity Model Induced by Anthracycline Combined With Trastuzumab Is Associated With Upregulation of Calpain-2', *Medicine*, vol. 94, no. 4, p. e445, Jan. 2015, doi: 10.1097/MD.0000000000000445.
[94] A. Fernandez-Fernandez, D. A. Carvajal, T. Lei, and A. J. McGoron, 'Chemotherapy-Induced Changes in Cardiac Capillary Permeability Measured by Fluorescent Multiple Indicator Dilution', *Ann Biomed Eng*, vol. 42, no. 12, pp. 2405–2415, Dec. 2014, doi: 10.1007/s10439-014-1110-9.
[95] I. Salouege *et al.*, 'Means of evaluation and protection from doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats', *J Cancer Res Ther*, vol. 10, no. 2, p. 274, 2014, doi: 10.4103/0973-1482.136557.
[96] N. Razmaraii, H. Babaei, A. Mohajjel Nayebi, G. Asadnasab, J. Ashrafi Helan, and Y. Azarmi, 'Cardioprotective Effect of Phenytoin on Doxorubicin-induced Cardiac

Toxicity in a Rat Model', *J Cardiovasc Pharmacol*, vol. 67, no. 3, pp. 237–245, Mar. 2016, doi: 10.1097/FJC.0000000000000339.
[97] V. J. Ferrans, J. R. Clark, J. Zhang, Z. X. Yu, and E. H. Herman, 'Pathogenesis and prevention of doxorubicin cardiomyopathy.', *Tsitologiia*, vol. 39, no. 10, pp. 928–37, 1997.
[98] T. Tadokoro *et al.*, 'Mitochondria-dependent ferroptosis plays a pivotal role in doxorubicin cardiotoxicity', *JCI Insight*, vol. 5, no. 9, May 2020, doi: 10.1172/jci.insight.132747.
[99] Y. Kang, W. Wang, H. Zhao, Z. Qiao, X. Shen, and B. He, 'Assessment of Subclinical Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in a Rat Model by Speckle-Tracking Imaging', *Arq Bras Cardiol*, 2017, doi: 10.5935/abc.20170097.
[100] J. Pan *et al.*, 'Irisin ameliorates doxorubicin-induced cardiac perivascular fibrosis through inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition by regulating ROS accumulation and autophagy disorder in endothelial cells', *Redox Biol*, vol. 46, p. 102120, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.redox.2021.102120.
[101] V. Quagliariello *et al.*, 'The SGLT-2 inhibitor empagliflozin improves myocardial strain, reduces cardiac fibrosis and pro-inflammatory cytokines in non-diabetic mice treated with doxorubicin', *Cardiovasc Diabetol*, vol. 20, no. 1, p. 150, Dec. 2021, doi: 10.1186/s12933-021-01346-y.
[102] J. P. Bertinchant *et al.*, 'Evaluation of cardiac troponin I and T levels as markers of myocardial damage in doxorubicin-induced cardiomyopathy rats, and their relationship with echocardiographic and histological findings', *Clinica Chimica Acta*, vol. 329, no. 1–2, pp. 39–51, Mar. 2003, doi: 10.1016/S0009-8981(03)00013-5.
[103] A. Rohilla, R. Khanam, and M. Khan, 'Cardioprotective potential of simvastatin in the hyperhomocysteinemic rat heart', *J Adv Pharm Technol Res*, vol. 3, no. 3, p. 193, 2012, doi: 10.4103/2231-4040.101018.
[104] T. S. Rogers and D. A. Seehusen, 'Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease.', *Am Fam Physician*, vol. 97, no. 9, pp. 562–564, 2018.
[105] 'Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial', *The Lancet*, vol. 354, no. 9177, pp. 447–455, Aug. 1999, doi: 10.1016/S0140-6736(99)07072-5.
[106] J. Goodfellow, M. F. Bellamy, M. W. Ramsey, C. J. H. Jones, and M. J. Lewis, 'Dietary supplementation with marine omega-3 fatty acids improve systemic large artery endothelial function in subjects with hypercholesterolemia', *J Am Coll Cardiol*, vol. 35, no. 2, pp. 265–270, Feb. 2000, doi: 10.1016/S0735-1097(99)00548-3.
[107] B. Heydari *et al.*, 'Effect of Omega-3 Acid Ethyl Esters on Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction', *Circulation*, vol. 134, no. 5, pp. 378–391, Aug. 2016, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.019949.
[108] L. Teng, L. Shao, Y. Zhao, X. Yu, D. Zhang, and H. Zhang, 'The Beneficial Effect of *n* -3 Polyunsaturated Fatty Acids on Doxorubicin-induced Chronic Heart Failure in Rats', *Journal of International Medical Research*, vol. 38, no. 3, pp. 940–948, Jun. 2010, doi: 10.1177/147323001003800320.
[109] E. Germain, 'Anthracycline-induced cardiac toxicity is not increased by dietary omega-3 fatty acids', *Pharmacol Res*, vol. 47, no. 2, pp. 111–117, Feb. 2003, doi: 10.1016/S1043-6618(02)00287-6.
[110] H. Matsui, I. Morishima, K. Hayashi, H. Kamiya, Y. Saburi, and K. Okumura, 'Dietary fish oil does not prevent doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats.', *Can J Cardiol*, vol. 18, no. 3, pp. 279–86, Mar. 2002.
[111] D. Saleh, M. Abdelbaset, A. Hassan, O. Sharaf, S. Mahmoud, and R. Hegazy, 'Omega-3 fatty acids ameliorate doxorubicin-induced cardiorenal toxicity: In-vivo regulation of

oxidative stress, apoptosis and renal Nox4, and in-vitro preservation of the cytotoxic efficacy', *PLoS One*, vol. 15, no. 11, p. e0242175, Nov. 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0242175.
[112] A. E. Goda, A. M. Elenany, and A. E. Elsisi, 'Novel in vivo potential of trifluoperazine to ameliorate doxorubicin-induced cardiotoxicity involves suppression of NF-κB and apoptosis', *Life Sci*, vol. 283, p. 119849, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.lfs.2021.119849.
[113] Z. Sun *et al.*, 'Dihydromyricetin alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting NLRP3 inflammasome through activation of SIRT1', *Biochem Pharmacol*, vol. 175, p. 113888, May 2020, doi: 10.1016/j.bcp.2020.113888.
[114] C. Marchetti *et al.*, 'A Novel Pharmacologic Inhibitor of the NLRP3 Inflammasome Limits Myocardial Injury After Ischemia–Reperfusion in the Mouse', *J Cardiovasc Pharmacol*, vol. 63, no. 4, pp. 316–322, Apr. 2014, doi: 10.1097/FJC.0000000000000053.
[115] X. Li *et al.*, 'Trimethylamine N-Oxide Exacerbates Cardiac Fibrosis via Activating the NLRP3 Inflammasome', *Front Physiol*, vol. 10, Jul. 2019, doi: 10.3389/fphys.2019.00866.
[116] M. Fukui, K. S. Kang, K. Okada, and B. T. Zhu, 'EPA, an omega-3 fatty acid, induces apoptosis in human pancreatic cancer cells: Role of ROS accumulation, caspase-8 activation, and autophagy induction', *J Cell Biochem*, vol. 114, no. 1, pp. 192–203, Jan. 2013, doi: 10.1002/jcb.24354.
[117] S. Jeong *et al.*, 'Docosahexaenoic acid-induced apoptosis is mediated by activation of mitogen-activated protein kinases in human cancer cells', *BMC Cancer*, vol. 14, no. 1, p. 481, Dec. 2014, doi: 10.1186/1471-2407-14-481.
[118] X. Zhang *et al.*, 'Shenmai injection improves doxorubicin cardiotoxicity via miR-30a/Beclin 1', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 139, p. 111582, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.biopha.2021.111582.
[119] H. Gao *et al.*, 'Alleviation of doxorubicin-induced cardiomyocyte death through miR-147-y-mediated mitophagy', *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 609, pp. 176–182, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.bbrc.2022.04.013.
[120] C.-C. Yang *et al.*, 'The therapeutic impact of entresto on protecting against cardiorenal syndrome-associated renal damage in rats on high protein diet', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 116, p. 108954, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2019.108954.