

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

DOKSORUBİSİNİN KARDİYOTOKSİK ETKİSİNE KARŞI
KARVAKROL VE C VİTAMİNİNİN KARDİYOPROTEKTİF
ETKİLERİNİN İN VİTRO ORTAMDA DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ
DR. BEDİRHAN GÜNAYDIN

DANIŞMAN
DOÇ. DR. MÜNEVVER YILMAZ

DENİZLİ - 2025

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

DOKSORUBİSİNİN KARDİYOTOKSİK ETKİSİNE KARŞI
KARVAKROL VE C VİTAMİNİNİN KARDİYOPROTEKTİF
ETKİLERİNİN İN VİTRO ORTAMDA DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ
DR. BEDİRHAN GÜNAYDIN

DANIŞMAN
DOÇ. DR. MÜNEVVER YILMAZ

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 29.08.2024 tarih ve
2024TIPF015 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ – 2025

TEŞEKKÜRLER

Uzmanlık eğitimim süresince üstün tecrübe, bilgi ve becerilerini aktararak, önce iyi bir insan sonra iyi bir doktor olabilmem için büyük emek sarf eden, tez çalışmam süresince her türlü yardımı ve bilimsel desteğini esirgemeyen değerli tez danışmanım Doç. Dr. Münevver YILMAZ'a,

Asistanlık sürem boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi hocalarıma,

Tez hazırlık aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle büyük desteklerini benden esirgemeyen, saygıdeğer hocalarım Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Nazlı ÇİL ve Dr. Öğr. Üyesi Elif Önder'e,

Uzun ve zorlu bir süreç olan uzmanlık eğitimim süresince omuz omuza çalışmaktan büyük keyif aldığım tüm asistan doktor arkadaşlarıma ve yandal uzmanı büyüklerime,

Ekibimizde emeklerini göz ardı edemeyeceğim bütün hemşire, personel, tekniker çalışma arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan, hayatımın her anında sonsuz güven ve sevgileriyle bana güç veren sevgili annem Süreyya GÜNAYDIN'a ve sevgili babam Mehmet Tuncay GÜNAYDIN'a,

Doğduğum andan bugüne kadar hayat tecrübesini ve bilgisini bana sabırla aktaran, okumayı yazmayı öğreten ilk öğretmenim sevgili abim Yunus Emre GÜNAYDIN'a,

Asistanlığımın ve tez yazımımın zorlu sürecinde her türlü desteği ile her zaman yanımda olan, bana güvenen, yükümü hafifleten yol arkadaşım, kıymetli eşim Şükran ÖZEN GÜNAYDIN'a,

Ve son olarak tez yazım sürecinde hayatımıza katılan, neşe kaynağım, gözümün nuru canım oğlum Mert GÜNAYDIN'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜRLER	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ	XII
ÖZET.....	XIV
İNGİLİZCE ÖZET.....	XVI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. MİYOKARDİT	3
2.1.1. Miyokardit Epidemiyolojisi	3
2.1.2. Miyokardit Etiyolojisi	3
2.1.3. Miyokardit Patofizyolojisi	5
2.1.4. Miyokardit Klinik Bulguları	6
2.1.5. Miyokardit Tanısı	6
2.1.6. Miyokardit Ayırıcı Tanısı	9
2.1.7. Miyokardit Tedavisi	9
2.1.8. Miyokardit Prognozu	13
2.2. DOKSORUBİSİN	13
2.2.1. Doksorubisinin Tarihçesi	13
2.2.2. Doksorubisinin Biyokimyasal Yapısı	14
2.2.3. Doksorubisinin Farmakokinetik Özellikleri.....	14
2.2.4. Doksorubisin Etki Mekanizması.....	16
2.2.5. Doksorubisin Yan Etkileri	16
2.2.6. Doksorubisin Kardiyotoksitesitesi	17
2.2.6.1. Doksorubisin Kardiyotoksitesitesi Patogenezi.....	17
2.2.6.2. Doksorubisin Kardiyotoksitesitesinde Oksidatif Stres	18
2.2.6.3. Doksorubisin Kardiyotoksitesitesi Klinik Tipleri.....	21
2.2.6.4. Doksorubisin Kardiyotoksitesitesi Risk Faktörleri.....	21
2.2.6.5. Doksorubisin Kardiyotoksitesitesi Tanısı.....	22

2.2.6.6. Doksorubisin Kardiyotoksitesitesi Tedavisindeki Ajanlar	24
2.2.6.7. Doksorubisin Kardiyotoksitesitesinde Çalışılan Ürünler	25
2.3. KARVAKROL	27
2.3.1. Genel Bilgiler	27
2.3.2. Karvakrolün Antioksidan Etkinliği	28
2.3.3. Karvakrolün Antinosiseptif Etkinliği	28
2.3.4. Karvakrolün Antibakteriyel Etkinliği	28
2.3.5. Karvakrolün Antienflamatuvar Etkinliği	28
2.3.6. Karvakrolün Antitümör Etkinliği	28
2.3.7. Karvakrolün Hepatoprotektif Etkinliği	29
2.3.8. Karvakrolün Kardioprotektif Etkinliği	29
2.3.9. Karvakrolün Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkilerini Gösteren Çalışmalar	29
2.4. C VİTAMİNİ	30
2.4.1. C Vitamininin Tarihçesi	30
2.4.2. C Vitamininin Genel Özellikleri	31
2.4.3. C Vitamininin Antioksidan Etkinliği	32
2.4.4. C Vitamininin Kardioprotektif Etkinliği	32
2.4.5. C Vitamininin Antiapoptik Etkinliği	32
2.5. HÜCRE KÜLTÜRÜ	33
2.5.1. Hücre Kültürü Tarihçesi	33
2.5.2. Hücre Kültürü Vasatı Tarihçesi	34
2.5.3. Hücre Kültürü Ortam Şartları	34
2.5.4. H9C2 Hücre Hattı	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. KULLANILAN KİMYASALLAR VE SARF MALZEMELER	37
3.2. KULLANILAN CİHAZLAR	37
3.3. KULLANILAN KİTLER	37
3.4. H9C2 HÜCRE HATTININ TEMİNİ VE HÜCRE KÜLTÜRÜ	38
3.5. HÜCRE CANLILIĞI TESTİ (XTT)	39
3.6. WOUND HEALING (YARA İYİLEŞME) DENEYİ	40
3.7. İMMÜNOHİSTOKİMYA	40

3.8. TRİZOL REAGANT İLE TOTAL RNA İZOLASYONU	42
3.9. cDNA SENTEZİ	43
3.10. GERÇEK ZAMANLI PZR	44
3.11. TUNEL	46
3.12. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ	47
4. BULGULAR	48
4.1. XTT TESTİ SONUÇLARI	48
4.2. WOUND HEALING SONUÇLARI.....	56
4.3. İMMÜNOHİSTOKİMYA SONUÇLARI	60
4.3.1. TGF-beta	60
4.3.2. BAX	60
4.3.3. Kaspaz-3	61
4.3.4. BCL-2	62
4.3.5. TIMP-2.....	62
4.3.6. TIMP-1.....	63
4.4. GERÇEK ZAMANLI PZR SONUÇLARI.....	74
4.5. TUNEL SONUÇLARI.....	77
5. TARTIŞMA.....	81
6. SONUÇLAR	96
KAYNAKLAR.....	101

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACEİ: Anjiotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörü

ARB: Anjiotensin Reseptör Blokörü

ATRA: All Trans Retinoik Asit

AV: Atrioventriküler

BAX: BCL-2 associated x protein

BCL-2: B hücreli Lenfoma Gen-2

CAR: Koksakivirüs ve Adenovirüs Reseptörü

CK: Kreatin kinaz

CK-MB: Kreatin kinaz miyokard bandı

CMV: Sitomegalovirüs

CO₂: Karbondioksit

COX-2: Siklooksijenaz-2

CRP: C-reaktif protein

DAB: Diaminobenzidin

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik Asit

DOX: Doksorubisin

EBV: Epstein-Barr Virüsü

ECMO: Ekstrakorporal Membran Oksijenizasyonu

EKG: Elektrokardiyografi

EMEM: Eagle's Minimum Essential Medium

FBS: Fetal bovin serum

FDA: Food and Drug Administration

GSH: Glutatyon

HHV-6: Human Herpesvirüs-6

HIV: Human Immunodeficiency Virus

Hs-Troponin: Yüksek Duyarlılıklı Troponin
HSV: Herpes Simpleks Virüs
IC-50: Yarı maksimal inhibitör konsantrasyonu
ICD: İmplant Edilebilir Kardiyoverter Defibrilatör
IL-6: İnterlökin-6
IVIG: İntravenöz İmmunglobülin
KAR: Karvakrol
MAPK: Mitojen ile Etkinleşen Protein Kinaz
MDA: Malondialdehit
MMP: Matriks Metalloproteinaz
MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme
NADP: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NF-κB: Nükleer Faktör Kappa B
NLRP-3: Nod Like Receptor Pyrin Domain Containing- 3
NO: Nitrik Oksit
NRF-2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NSAİİ: Non-steroid Antiinflamatuvar İlaç
NT-proBNP: N-terminus pro-B-type natriuretic peptide
NYHA: New York Kalp Derneği
PBS: Phosphate Buffered Saline
PI3K: Fosfoinositid -3 Kinaz
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA: Ribonükleik asit
ROS: Serbest Oksijen Radikali
RSV: Respiratuar Sinsityal Virus
SOD: Süperoksit Dismutaz
TGF-beta: Transforme edici büyüme faktör- beta
TIMP: Metalloproteinaz doku inhibitörü
TLR: Toll Like Receptor

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1	Kardiyomiyopati fazları.....	5
Şekil 2	Miyokarditin manyetik rezonans görüntüleme bulguları	8
Şekil 3	Miyokarditin; histopatolojik, immünohistokimyasal, moleküler bulguları	9
Şekil 4	Doksorubisinin ve daunorubisinin biyokimyasal yapısı.....	14
Şekil 5	Doksorubisinin ve doksorubisinolün biyokimyasal yapısı	15
Şekil 6	Doksorubisinden doksorubisin-semikinon oluşumu	16
Şekil 7	Antrasiklin kardiyomiyopatisinde serbest radikallerin rolü	19
Şekil 8	Antrasiklinlerin nükleer ve mitokondriyal DNA üzerine etkileri	19
Şekil 9	Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu	20
Şekil 10	Doksorubisinin demir mekanizması üzerinden DNA hasarı ve lipid peroksidasyonuna etkisi	20
Şekil 11	Karvakrolün biyokimyasal yapısı	27
Şekil 12	Karvakrolün anti-inflamatuvar, antioksidan, antiapoptotik etkileri.....	30
Şekil 13	C vitamininin biyokimyasal yapısı	31
Şekil 14	DOX'un çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi	48
Şekil 15	C vitamininin çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi	49
Şekil 16	Karvakrolün çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi	49
Şekil 17	IC50 dozunda doksorubisin ile birlikte çeşitli dozlarda C vitamininin zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi	50
Şekil 18	IC50 dozunda doksorubisin ile birlikte çeşitli dozlarda karvakrolün zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi	51
Şekil 19	IC50 dozunda doksorubisin ile birlikte çeşitli dozlarda karvakrol ve C vitaminin hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi.....	52

Şekil 20 Wound healing testi kontrol grubu 0. 16. ve 24. saatler	56
Şekil 21 Wound healing testi 40 mM karvakrol verilen grup 0, 16 ve 24. saatler	56
Şekil 22 Wound healing testi 200 µM C vitamini verilen grup 0, 16 ve 24. saatler	56
Şekil 23 Wound healing testi IC50 dozunda doksorubisin verilen grup 0, 16 ve 24. saatler	57
Şekil 24 Wound healing testi IC50 dozunda doksorubisin ve 40 mM karvakrol verilen grup 0, 16 ve 24. saatler.....	57
Şekil 25 Wound healing testi IC50 dozunda doksorubisin ve 200 µM C vitamini verilen grup 0, 16 ve 24. saatler	57
Şekil 26 Wound healing testi IC 50 dozunda doksorubisin, 200 µM C vitamini ve 40 mM karvakrol verilen grup 0, 16 ve 24. saatler.....	57
Şekil 27 TGF- beta immünohistokimya boyaması	64
Şekil 28 BAX immünohistokimya boyaması	65
Şekil 29 Kaspaz-3 immünohistokimya boyaması.....	66
Şekil 30 BCL-2 immünohistokimya boyaması.....	67
Şekil 31 TIMP-2 immünohistokimya boyaması	68
Şekil 32 TIMP-1 immünohistokimya boyaması	69
Şekil 33 Kontrol, doksorubisin, karvakrol, c vitamini gruplarının DAPI ve TUNEL boyamaları	79
Şekil 34 Doksorubisin+karvakrol, doksorubisin+C vitamini, doksorubisin+karvakrol+C vitamini gruplarının DAPI ve TUNEL boyamaları.....	80

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1 Miyokardit etiyojisiindeki ajanlar	4
Tablo 2 Yaşa ve cinsiyete göre hs- Troponin-T (ng/L) persentil değeri	23
Tablo 3 Yaşa ve cinsiyete göre NT – proBNP(ng/L) persentil değeri	24
Tablo 4 Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu uygulanan genlerin primer tasarımı	45
Tablo 5 Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon karışımı	45
Tablo 6 C vitamininin farklı dozlarda kontrol grubu ile karşılaştırılmasını gösteren XTT deneyinin 24., 48. ve 72. saat p değeri	52
Tablo 7 Karvakrolün farklı dozlarda kontrol grubu ile karşılaştırılmasını gösteren XTT deneyinin 24., 48. ve 72.saat p değeri	53
Tablo 8 Doksorubisin IC50 dozu ile farklı dozlarda C vitamini ve IC50 dozunda doksorubin kombinasyonunun karşılaştırılmasını gösteren XTT deneyinin 24., 48. ve 72.saat p değeri.....	53
Tablo 9 Doksorubisin IC50 dozu ile farklı dozlarda karvakrol ve IC50 dozunda doksorubin kombinasyonunun karşılaştırılmasını gösteren XTT deneyinin 24., 48. ve 72.saat p değeri.....	54
Tablo 10 Doksorubisinin IC50 dozu ile farklı dozlarda karvakrol ve C vitamininin IC50 dozunda doksorubisin ile kombinasyonunun karşılaştırılmasını gösteren XTT deneyinin 24.saat p değeri	54
Tablo 11 Doksorubisin IC50 dozu ile C vitamini kombinasyonunun IC50 dozunda doksorubisin, çeşitli dozlarda karvakrol ve C vitamini kombinasyonunun karşılaştırılmasını gösteren XTT deneyinin 24.saat canlılık yüzdeleri ve p değeri.....	55
Tablo 12 H9C2 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında wound healing testi için oluşturduğumuz yara yüzey alanlarının yüzdeleri.....	59
Tablo 13 Wound healing deneyi 16.saat istatistiksel sonuçları	59
Tablo 14 Wound healing deneyi 24.saat istatistiksel sonuçları	59
Tablo 15 TGF-beta immünohistokimya p değeri	70
Tablo 16 BAX immünohistokimya p değeri	70

Tablo 17 Kaspaz-3 immünohistokimya p değerleri.....	71
Tablo 18 BCL-2 immünohistokimya p değerleri.....	72
Tablo 19 TIMP-2 immünohistokimya p değerleri	72
Tablo 20 TIMP-1 immünohistokimya p değerleri	73
Tablo 21 DOX, CAR ve C vit gruplarının RT-PZR sonuçları	74
Tablo 22 DOX+CAR, DOX+C vit ve DOX+CAR+C vit gruplarının RT-PZR sonuçları.....	74
Tablo 23 RT-PZR sonuçlarına göre her bir gen ifadesi için DOX, DOX+CAR, DOX+C vit ve DOX+CAR+C vit gruplarının istatistiksel sonuçları	75
Tablo 24 TUNEL sonuçlarına göre grupların apoptotik indeksi.....	77
Tablo 25 TUNEL sonuçlarına göre grupların apoptotik indekslerinin karşılaştırılması	77

ÖZET

Doksorubisinin kardiyotoksik etkisine karşı karvakrol ve C vitamininin kardiyoprotektif etkilerinin in vitro ortamda değerlendirilmesi

Dr. Bedirhan GÜNAYDIN

Doksorubisin (DOX), hematolojik maligniteler ve solid tümörlerin tedavisinde uzun yıllardır kullanılan antrasiklin türevi kemoterapötik ajanlardandır. Kardiyotoksik yan etkileri klinik kullanımını kısıtlamaktadır. Deneysel çalışmalarda C vitamini ve karvakrolün antioksidan etkileri gösterilmiştir. Çalışmamızda, patogenezinde oksidatif stresin rol oynadığı doksorubisin ilişkili kardiyotoksisiteyi H9C2 hücre hattı üzerinde modelleyerek C vitamini ve karvakrolün ayrı ayrı ve sinerjistik etkilerini araştırmayı amaçladık.

Karvakrol ve C vitamininin kardiyoprotektif etkilerinin, hem kontrol grubu ile hem de doksorubisine maruz kalan hücreler ile değerlendirebilmek amacıyla hücre hatları yedi gruba ayrıldı. Gruplar; kontrol, karvakrol, C vitamini, DOX, DOX+karvakrol, DOX+C vitamini, DOX+karvakrol+C vitamini şeklindeydi.

Doksorubisin dozları 1,25-2,5-5-10-20-40-50-60-75 μ M olarak belirlendi. Her alt grubun canlılık düzeyi 24., 48. ve 72. saatte ayrı ayrı ölçüldü. Böylece hücrelerin %50'sinin canlı kaldığı IC₅₀ dozları 24.saatte 14,71 μ M, 48.saatte 1,186 μ M, 72.saatte 0,272 μ M olarak hesaplandı. Artan DOX dozunun ve geçen zamanın hücre canlılığına olumsuz etkisi görüldü. (p<0,05).

Değişken dozlarda karvakrol ve C vitamini verilen gruplarda kontrol grubuna göre hücre canlılığı karşılaştırıldı. C vitamini verilen grupta 24.saatte, karvakrol verilen grupta hem 24. hem 72.saatte kontrol grubuna göre hücre canlılığının istatistiksel olarak arttığı saptandı. (p<0,05).

IC 50 dozunda DOX ile birlikte çeşitli dozlarda karvakrol ve C vitamini verilen hücreler sadece IC₅₀ dozunda DOX alan grup ile karşılaştırıldı. DOX+ C vitamini verilen grubun canlılık yüzdesi 24.saatte, DOX+ karvakrol verilen grubun canlılık yüzdesi 48. ve 72. saatte sadece DOX verilen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptandı (p<0,05).

Karvakrol ve C vitamininin etkileşimini değerlendirmek amacıyla IC50 dozunda doksorubisin, 100 µM C vitamini kombinasyonuna 20 mM ve 80 mM karvakrol eklemek; IC 50 dozunda doksorubisin 500 µM C vitamini kombinasyonuna 20 mM, 40 mM ve 80 mM karvakrol eklemek hücre canlılığını istatistiksel anlamli olarak azalttı ($p<0,05$).

Aynı gruplar üzerinde yapılan wound healing testinde karvakrol verilen grubun yara yeri yüzey alanı kontrol grubuna göre anlamli şekilde küçüldü. ($p=0,003$). 24.saat analizinde ise kontrol ile karvakrol, kontrol ile C vitamini, DOX ile DOX+karvakrol+C vitamini grupları arasında istatistiksel anlamli olarak fark saptandı ($p<0,05$).

Doksorubisin uygulanan gruba 40 mM karvakrol, 200 µM C vitamini ve karvakrol+C vitamini eklenmesinin BAX ekspresyonunda azalma ile birlikte kardiyomiyositlerin şeklinin de korunmuş olduğu ve C vitaminin kaspaz-3 ekspresyonunu azaltarak apoptotik aktiviteyi azalttığı bulundu.

C vitamini ve karvakrolün gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanarak BAX, MMP-2, TGF-beta faktörlerin gen ekspresyonlarını azalttığı bulundu.

Sonuçlarımız, karvakrol ve C vitamininin doksorubisin ilişkili kardiyotoksisite üzerine ayrı ayrı kullanımlarının kardiyoprotektif etki göstererek faydalı olabileceğini desteklemektedir.

Anahtar kelimeler: Doksorubisin, Kardiyotoksisite, Karvakrol, C vitamini, Hücre kültürü

SUMMARY

Evaluation of the cardioprotective effects of carvacrol and vitamin C against the cardiotoxic effect of doxorubicin.

Dr. Bedirhan GÜNAYDIN

Doxorubicin (DOX) is an anthracycline derivative chemotherapeutic agent used for many years in the treatment of haematological malignancies and solid tumours. Cardiotoxic side effects limit its clinical use. Antioxidant effects of vitamin C and carvacrol have been shown in experimental studies. In our study, we aimed to investigate the individual and synergistic effects of vitamin C and carvacrol by modelling doxorubicin-induced cardiotoxicity, in which oxidative stress plays a role in the pathogenesis, on H9C2 cell line.

The cell lines were divided into seven groups in order to evaluate the cardioprotective effects of carvacrol and vitamin C on both control and doxorubicin-exposed cells. The groups were as follows: control, carvacrol, vitamin C, DOX, DOX+carvacrol, DOX+vitamin C, DOX+carvacrol+vitamin C.

Doxorubicin doses were determined as 1.25-2.5-5-10-20-40-50-60-75 μM . The viability level of each subgroup was measured separately at 24, 48 and 72 hours. Thus, the IC₅₀ doses at which 50% of the cells remained viable were calculated as 14.71 μM at 24 h, 1.186 μM at 48 h and 0.272 μM at 72 h. Increasing DOX dose and time had a negative effect on cell viability ($p < 0.05$).

Cell viability was compared in the groups given varying doses of carvacrol and vitamin C compared to the control group. It was found that cell viability increased statistically at 24.hour in the vitamin C group and at both 24.and 72.hour in the carvacrol group compared to the control group ($p < 0,05$).

Cells treated with various doses of carvacrol and vitamin C together with DOX at IC₅₀ dose were compared with the group receiving only DOX at IC₅₀ dose. The percentage of viability of the DOX+ vitamin C group at 24th hour and the percentage

of viability of the DOX+ carvacrol group at 48th and 72nd hours were statistically significantly higher than the DOX alone group ($p<0.05$).

In order to evaluate the interaction between carvacrol and vitamin C, adding 20 mM and 80 mM carvacrol to doxorubicin, 100 μ M vitamin C combination at IC50 dose and adding 20 mM, 40 mM and 80 mM carvacrol to doxorubicin, 500 μ M vitamin C combination at IC50 dose decreased cell viability statistically significantly ($p<0.05$). In the wound healing test performed on the same groups, the wound surface area of the carvacrol group was significantly smaller than the control group ($p=0.003$). In the 24th hour analysis, there was a statistically significant difference between control and carvacrol, control and vitamin C, DOX and DOX+carvacrol+vitamin C groups ($p<0.05$).

It was found that the addition of 40 mM carvacrol, 200 μ M vitamin C and carvacrol + vitamin C to the doxorubicin treated group preserved the shape of cardiomyocytes with a decrease in BAX expression and vitamin C decreased apoptotic activity by decreasing caspase-3 expression.

Vitamin C and carvacrol were found to decrease gene expressions of BAX, MMP-2, TGF-beta factors using real-time PCR method.

Our results support that the separate use of carvacrol and vitamin C on doxorubicin-induced cardiotoxicity may be beneficial by showing cardioprotective effect.

Key words: Doxorubicin, Cardiotoxicity, Carvacrol, Vitamin C, Cell culture

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Miyokardit; çeşitli enfeksiyöz ajanlar ve non-enfeksiyöz nedenler aracılığı ile kardiyomiyositlerde nekroz ve dejeneratif değişiklikler ile karakterize enflamatuvar bir tablodur (1). Sağlıklı çocuklarda dilate kardiyomiyopatinin ve kalp yetmezliğinin en sık nedenidir (2). İnsidansı yaklaşık olarak 22:100000 olarak saptanmıştır (3). Etiyolojisinde başta viral etkenler olmak üzere birçok enfeksiyöz ajan ile birlikte; ilaçlar, bazı toksinler, otoimmün hastalıklar, hipersensitivite reaksiyonları, radyasyon gibi non-enfeksiyöz etmenler de rol oynayabilir (4). Yapılan araştırmalarda birçok ilacın kardiyotoksisiteye yol açarak miyokardite sebebiyet verdiği gösterilmiştir. Bu ilaçlar arasında antrasiklinler önemli yer tutmaktadır (5).

Antrasiklinler malignite tedavisinde sıklıkla kullanılan antineoplastik ajanlardır. Doksorubisin (DOX) antrasiklin türevi kemoterapötik ilaçların en sık kullanılanlarından bir tanesidir. Lösemi, lenfoma ve yumuşak doku karsinomları, meme ve akciğer kanserlerine karşı aktivite gösteren antineoplastik ajanlardır (6). Bununla birlikte klinik kullanımı doz bağımlı bir yan etkisi olan kardiyotoksisite nedeni ile kısıtlanmaktadır (7).

Doksorubisinin hangi mekanizma ile kardiyotoksisiteye neden olduğu tam olarak bilinmemektedir. Ortak fikir birliğine varılan görüş; serbest oksijen radikallerinin ve ortaya çıkan oksidatif stresin hücrel hasara yol açmasıdır. Doksorubisin antioksidatif yolların bozulmasına da yol açarak oksidatif stresi artırır. Aynı zamanda doksorubisin p53 proteini aracılığı ile kardiyomiyositlerde apoptozu indükleyerek kardiyotoksisiteye sebep olur. Yapılan çalışmalar neticesinde doksorubisin kullanımı sonrası oksidan/anti-oksidan dengesinin oksidatif tarafa kaydığı saptanması üzerine doksorubisine karşı anti-oksidan içeren birçok tedavi metodu araştırılmıştır. Ancak henüz tedavide kullanılan bir ajan bulunmamaktadır (8-12).

Karvakrol; kekiğin esansiyel yağında, karabiber yağında ve yabani bergamotta bulunan sentetik yollarla da çeşitli türevleri üretilebilen monoterpenoid fenoldür (13). Yapılan çalışmalarda oksijen radikallerini azalttığı, apoptozis yolaklarını inhibe ettiği, lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (14).

C vitamini; birçok meyve ve sebze de doğal olarak bulunan monosakkarit türevi bir bileşiktir. Yapılan çalışmalarda apoptozisi, inflamasyonu, oksidatif stresi azalttığı kalp fonksiyonlarını arttırdığı gösterilmiştir (15).

Literatürde karvakrol ve C vitaminin doksorubisinin kardiyotoksitesisi üzerine olumlu etkileri gösteren çalışmalar olmasına rağmen hücre kültürü ortamında beraber değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamızda karvakrol ve C vitamininin ayrı ayrı ve sinerjistik kardiyoprotektif etkilerini, doksorubisine maruz bırakılan sıçan kardiyomyosit hücre hattı üzerinde göstermeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 MİYOKARDİT

Önceden sağlıklı olduğu bilinen kişilerde, enfeksiyöz veya non-enfeksiyöz ajanlarla miyosit hasarı sonucu gelişen, bulguları subklinik seyirden fulminan seyre kadar değişken olabilen bir hastalık tablosudur (16).

Miyokardit ilk olarak kalbin iltihaplanması olarak 1749 yılında Jean Baptiste Senac tarafından tanımlanmış olsa da miyokardit terimi ilk defa 1837 yılında Joseph Freidrich Soberheim tarafından kullanılmıştır. İlk kez 1980 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından tanımı yapılmıştır. Güncel tanım ise 1995 yılında Uluslararası Kardiyoloji Derneği ve Uluslararası Kardiyoloji Federasyonu tarafından yapılmıştır. Kalp kasının enflamatuvar bir hastalığı olarak kabul edilmiş, histolojik, immünolojik ve immünohistokimyasal kriterleri bildirilmiştir (16).

2.1.1 Miyokardit Epidemiyolojisi

Miyokarditin klinik belirti yelpazesinin çok geniş olması, birçok miyokardit hastanın non-spesifik bulgularının olması ve bazı hastaların asemptomatik olması nedeniyle önemli ölçüdeki hastaya tanı koyulamadığı tahmin edilmektedir. Yakın tarihli bir çalışmada miyokardit insidansının 22:100000 olduğu saptanmıştır (17). Yine retrospektif bir çalışmada son 10 yıl içerisinde yapılan pediatrik otopsilerin yaklaşık %2'sinde miyokardit bulguları saptanmıştır (18). Non-travmatik ani çocuk ölümlerinin %27'sinin etiolojisinde miyokardit saptanmıştır (19). Hastalığın görülme sıklığı hasta popülasyonuna ve ek hastalık varlığına göre değişkenlik gösterebilir. HIV pozitif olan hastalarda yapılan otopsi serilerinde %50 oranında miyokardit görülmüştür (20).

2.1.2 Miyokardit Etiyolojisi

Etiyolojide en sık enfeksiyöz ajanlar, enfeksiyöz ajanlar içerisinde de en sık viral etkenler yer almaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu ve in situ hibridizasyon gibi yeni moleküler tekniklerin geliştirilmesiyle, endomiyokardiyal biyopsilerde en sık tespit edilen virüslerin spektrumu değişmiştir. Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda enterovirüs (koksakivirüs A ve B, Ekovirüs, Poliovirüs) ve Adenovirüs (serotip 2 ve 5) en sık viral etkenler arasında gösterilirken son yıllarda yapılan çalışmalarda en sık viral etken Parvovirüs B19 olarak bildirilmiştir (21-24). Miyokarditte farklı virüs

türlerinin dağılımına ilişkin coğrafi farklılıkların olup olmadığı halen araştırılmaktadır. Sık görülen viral enfeksiyon tipi yer ve zamana göre değişmekle birlikte farklı tanı prosedürlerinin uygulanması da dikkate değer bir diğer husustur. Bu virüslerin dışında influenza A, B, RSV, hepatit C, HIV gibi RNA virüsleri; CMV, HHV-6, EBV, VZV, HSV gibi DNA virüsleri diğer viral etkenlerdir. Ayrıca çeşitli bakteriler, spiroketler, mantarlar, protozoalar ve paraziter enfeksiyöz ajanlar da enfeksiyöz etkenler arasında yer alır. İlaça bağlı toksisite, alerjene bağlı hipersensitivite reaksiyonları, bazı otoimmün ve kollajen bağ doku hastalıkları, ağır metaller, radyasyon maruziyeti, böcek ısırması da miyokarditin non-enfeksiyöz nedenleri arasında sayılabilir. Miyokardit etiyolojisinde yer alan etkenler Tablo 1’de gösterilmiştir (25).

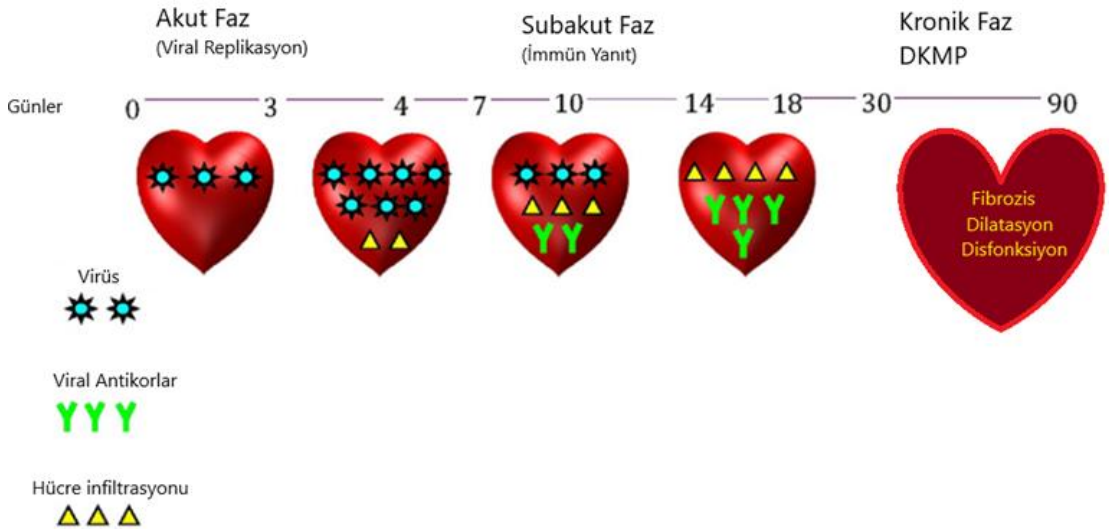
Tablo 1. Miyokardit etiyolojisindeki ajanlar (26)

Enfeksiyöz miyokardit: • Viral: RNA virüsleri: Koksaki A ve B, ekovirüs, poliovirüs, İnfluenza A ve B, RSV, Rubella, Kabakulak, Kızamık, Kabakulak, Hepatit C, Lassa Virüs, HIV DNA virüsleri: Adenovirüs, Parvovirüs B19, CMV, HHV-6, EBV, VZV, HSV • Bakteriyel: Stafilokok, Streptokok, Pnömonokok, Meningokok, Gonokok, Salmonella, Mycobacterium, Mycoplasma, Brucella • Fungal: Aspergillus, Actinomyces, Blastomyces, Candida, Cryptococcus, Nocardia • Spiroket: Borelia, Leptospira • Paraziter: Trichinella spiralis, Echinococcus granulosus, Tenia solium • Protozoal: Toxoplasma gondii, Entamoeba, Leishmania • Riketsia: Coxiella brunetti, R.rickettsii
İmmün sistem aracılı miyokardit: • Allerjen: Tetanoz toksini, aşılar, serum hastalığı, ilaçlar (penisilin, sefalosporin, furosemid) • Alloantijen: Kalp transplantasyon rejeksiyonu • Otoantijen: SLE, Romatoid artrit, Churg- Strauss, Kawasaki, İnflamatuvar Barsak Hastalığı, Skleroderma, Poliomyozit, Tirotoksikoz, Sarkoidoz
Toksik miyokardit • İlaçlar: Amfetamin, Kokain, Antrasiklinler, Lityum, Klorzapin • Ağır metaller: Bakır, Demir, Kurşun • Hormon: Feokromasitoma • Fiziksel Ajanlar: Radyasyon, Elektroşok

2.1.3 Miyokardit Patofizyolojisi

Miyokarditin patofizyolojisi tam olarak çözülememekle birlikte birtakım fikirler ortaya atılmıştır. Enteroviral miyokarditin fare modelleri, viral miyokarditin seyrinin üç evre ile karakterize olduğunu göstermektedir (27). Virüs, miyositlerin içine spesifik bir reseptör aracılığı ile girer. B grubu koksakivirüsler ve bazı adenovirüsler, viral genomun miyosit içine internalizasyonu için ortak bir transmembran reseptörü (koksakivirüs ve adenovirüs reseptörü (CAR)) kullanır (28). Kardiyak miyositler üzerine CAR ekspresyonu olmadığında viral enfeksiyon ve inflamasyon oluşamaz (29). Dilate kardiyomiyopati hastalarının explore edilmiş kalplerinde, sağlıklı kalpleri olan hastalara oranla daha fazla CAR ekspresyonu gösterilmiştir. Artmış insan CAR ekspresyonunun viral miyokarditi kolaylaştırmak için predispozan bir faktör olup olmadığı ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (30).

Hücre içine giriş sonrası virüs replikasyonu gelişir. Virüs replikasyonu; akut miyosit nekrozuna, bazı hücre içi antijenlerin açığa çıkmasına, önce NK ve makrofaj ardından T lenfositlerin istilasını ile konağın bağışıklık yanıtının aktivasyonuna yol açar.



Şekil 1. Kardiyomiyopati fazları (31)

Miyokarditin akut fazı sadece birkaç gün sürer. Akut fazda virüs kaynaklı hasar görülür ve sonrasında otoimmün reaksiyonların görüldüğü ikinci faza geçilir. Birkaç hafta ile ay arasında süren bu subakut fazda T lenfositler tarafından konak hedef alınır. Bu fazda TNF-alfa, IL-1 ve IL-6 gibi sitokinler aktive olur. Kardiyak proteinlere karşı

oluşan antikorlar kardiyak hasarın miktarını arttırabilir ve kalbin kasılma fonksiyonlarında bozulmaya neden olur. Miyokarditli hastaların virüsün ortadan kaldırılması ile genellikle bağışıklık yanıtı azalır ve sol ventrikül fonksiyonu bozulmadan iyileşir. Bununla birlikte yapılan bazı fare çalışmalarında otoimmün süreçlerin sonucunda dilate kardiyomiyopati gelişimi ile karakterize kronik faz oluşabilir (32).

2.1.4 Miyokardit Klinik Bulguları

Miyokardit klinik belirtileri; asemptomatik seyirden miyokard enfarktüsü, kardiyojenik şok ve hatta ölüme kadar uzanabilen geniş bir spektrumda görülebilir. Yenidoğan ve süt çocukluğu döneminde genellikle kusma, emmeme, huzursuzluk, ateş gibi non-spesifik bulgular görülür. Fizik muayenede ise kalp yetmezliği bulguları (hepatomegali, takipne, taşikardi) saptanır (33). Miyoperkardit tanısı alan çocuklar üzerinde yapılan bir çalışmada %66 oranında 1-2 hafta öncesinde solunum yolu veya gastrointestinal sistem enfeksiyonu geçirdiği görülmüştür (33). Prodromal semptomlar ateş ve miyalji ile başlar. Göğüs ağrısı, nefes darlığı, egzersiz intoleransı, takipne, kusma, yorgunluk görülebilir (34). Hastalığın seyrinin ilerlemesi ile dolaşım bozukluğuna bağlı presenkop, senkop, kardiyak kollaps, kardiyak arrest gelişebilir. Ventriküler/supraventriküler taşikardi, AV bloklar hastalığın seyri sırasında görülebilir (35).

2.1.5 Miyokardit Tanısı

Klinik yelpazenin geniş olması tanının koyulmasını zorlaştırır. Tanı klinik bulguların yanında yardımcı tetkiklerle desteklenerek koyulur.

EKG: Spesifik veya sensitif bir bulgu yoktur. Düşük duyarlılığa rağmen tarama testi amacıyla non-invaziv olması nedeniyle kullanılabilir. Non-spesifik T dalgası ve ST segment değişiklikleri görülebilir (36). Bazı hastalarda atriyal veya ventriküler ileti kusurları, supraventriküler ve ventriküler aritmiler görülebilir. EKG’de Q dalgası varlığı veya önceden olmayan ve hastalık sonrasında gelişen sol dal bloğunun daha yüksek kalp transplantasyonu ihtiyacı ve mortalite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (37). Miyokardit tanısı koymada EKG’nin rolü ile ilgili yapılan çalışmalarda $Q_{tc} > 440$ ms, anormal QRS aksı, ventriküler ektopik atım varlığı kötü klinik sonuçlarla

ilişkilendirilmiştir. QRS uzunluğunun 120 ms'den fazla olmasının kardiyak ölüm riskini arttırdığı saptanmıştır (38). Tüm bu sebeplerle EKG hem risk sınıflandırılmasının yapılması hem kolay ulaşılabilir, non-invaziv ve ucuz bir yöntem olması nedeniyle miyokardit tanısında birinci basamak tanı ve görüntüleme yöntemlerinden bir tanesidir.

Akciğer Grafisi: Hastaların yaklaşık yarısında grafi normal saptanır. Grafide kardiyomegali, pulmoner ödem bulguları, perikardiyal efüzyon görülebilir.

Laboratuvar: İnflamatuvar belirteçler non-spesifiktir. Hemogram, eritrosit sedimentasyon hızı, C-reaktif protein, viral antikorlar, kardiyak belirteçler sık kullanılan testlerdir. Akut miyokardit durumunda lökositler ve CRP gibi spesifik olmayan serum inflamasyon belirteçleri yükselebilir (39). Ancak normal değerler akut miyokarditi dışlamaz. Kardiyak biyobelirteçler özgüllükten yoksundur ancak tanıyı doğrulamak için kullanılabilir. Troponin T; oksidatif stres, inflamatuvar sitokinler, katekolamin artışı, miyokard duvar stresi, hücre hasarı, apoptozis nedeniyle çoğu hastada artmıştır. Troponin T<0,01 ng/mL ise miyokardit tanısı ekarte edilebilir. Hastalığın seyrinin takibi açısından belirli aralıklarla serum troponin T gönderilmelidir. Akut miyokardit hastalarında serum troponin düzeyleri kreatin kinazdan daha sık yükselir (40). Fizik muayene bulgularında kalp yetmezliğinin geliştiği düşünülen hastalardan NT-proBNP gönderilmelidir. Miyokardit şüphesi olan hastalarda viral serolojinin faydası kanıtlanamamıştır. Yapılan çalışmalarda kandan viral seroloji ile endomiyokardiyal biyopsi sonuçları karşılaştırılmıştır. Çalışmaya katılan 124 hastadan sadece beşinde biyopsi sonucu ortaya çıkan viral etken kanda da saptanabilmiştir (41). Bu sonuç, miyokardit şüphesi olan hastalarda tanıyı koyabilmek için viral serolojinin yaygın olarak kullanılmasının gerekmediğini göstermektedir. Ayrıca miyokardit patogeneğinde rol oynayan birçok virüsün toplumda oldukça yaygın olması nedeniyle her seroloji pozitifliği hastalık etkenine atfedilmemelidir. Almanya'da yapılan bir çalışmada çalışmaya katılan kişilerin %70'inde parvovirüs B19 IgG'nin pozitif olduğu saptanmıştır (42).

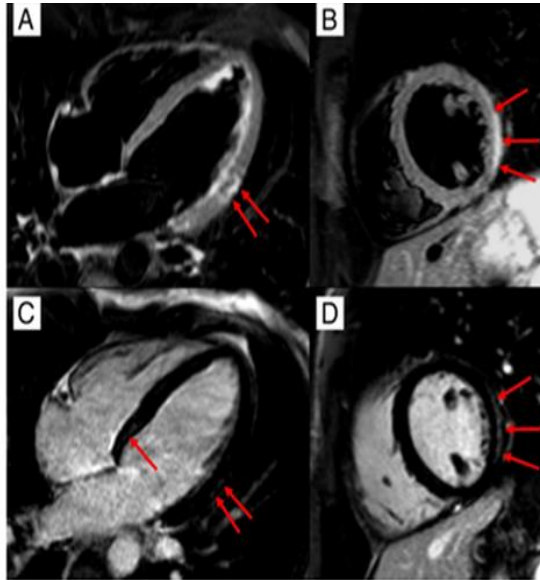
Ekokardiyografi: Miyokarditin tanı koydurucu bir ekokardiyografi bulgusu yoktur. Ancak miyokardit şüpheli hastalarda tanıyı doğrulamak açısından kalp odacıklarının boyutlarına, duvar kalınlıklarına, sistolik ve diyastolik fonksiyonlara bakmak önemlidir. Çeşitli kapak hastalıklarını, hipertrofik ve restriktif

kardiyomiyopati tanılarını dışlamak Ekokardiyografinin avantajlarından. Fulminan miyokarditli hastalar genellikle akut miyokard ödemine sekonder olarak artmış septal kalınlıkla birlikte normal kalp odacığı boyutlarına sahipken, akut miyokarditli hastalar genellikle belirgin sol ventrikül dilatasyonu ve normal duvar kalınlığına sahiptir (43).

Kardiyak MRG: Non-invaziv oluşu, inflamasyonun lokalizasyonu ve yaygınlığını göstermedeki başarısı nedeniyle son zamanlarda kullanımı yaygınlaşmıştır. MR'da artmış T2 sinyal yoğunluğu ödem varlığını gösterir. Erken miyokardiyal kontrast tutulumu hiperemi varlığının işaretidir. Skar ve nekroz şüpheli alanlarda geç gadolinyum tutulumu olur. Ödem, hiperemi, skar veya nekroz bulgularından ikisinin varlığı %80 oranında tanı doğruluğuna sahiptir (44).

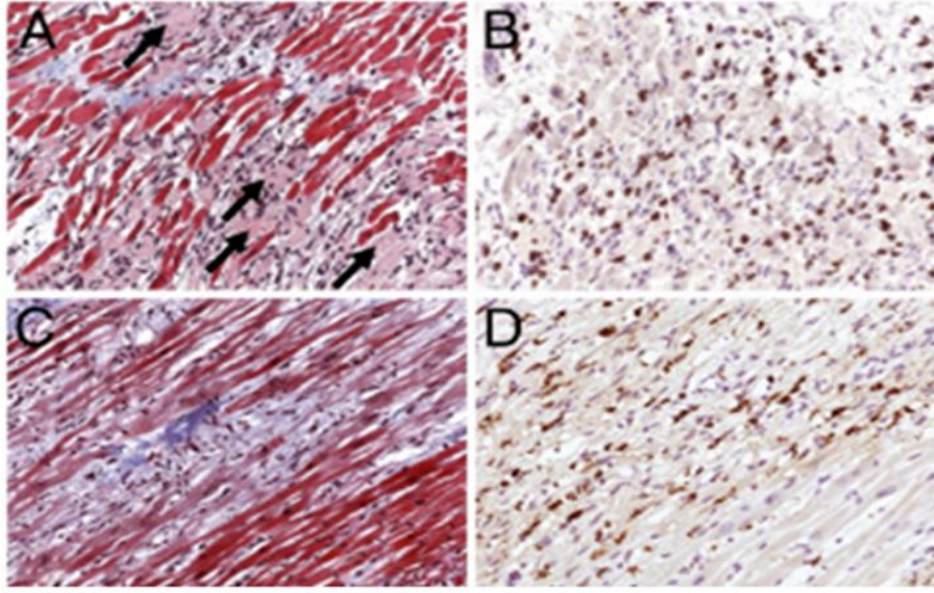
Endomiyokardiyal biyopsi: Anjiyografik olarak sağ ventrikülden punch biyopsi ile materyalin değerlendirilmesi tanıda altın standarttır. 1986 yılında yayınlanan Dallas kriterlerine göre lenfosit infiltrasyonu ve miyositolizis varlığı aktif miyokarditi gösterir. Kalpte yamalı patern tutulumu olabileceği ve yanlış negatiflik ihtimali unutulmamalıdır (45).

Koroner Anjiyografi: Akut koroner sendromdan tam olarak ayırıcı tanı yapılamıyorsa, hastanın akut koroner sendrom geçirme risk faktörleri varsa, uygun medikal tedaviye rağmen klinik kötüleşme mevcutsa hemodinamik durumu koronerleri değerlendirmek amacıyla koroner görüntüleme yapılabilir.



Akut göğüs ağrısı ile başvuran akut miyokardit teşhisi koyulan genç bir hastanın kardiyak manyetik rezonans görüntülemesi
Sol midventriküler lateral duvarın subepikardiyumunda fokal miyokardiyal ödemi gösteren uzun eksen (A) , kısa eksen (B) T2 ödem görüntüleri
Uzun eksen (C) ve kısa eksen (D) T1 görüntülemesinde midventriküler lateral duvarın subepikardiyumunda ve bazal septumda geç gadolinyum tutulumu

Şekil 2. Miyokarditin manyetik rezonans görüntüleme bulguları (46)



A ve B resimleri akut miyokarditin C ve D resimleri kronik miyokarditin histolojisini ve immünohistolojisini gösterir. A resmindeki oklar akut miyokarditteki nekrotik miyositleri gösterir. B resminde çok sayıda mononükleer hücre infiltratları görülür. C resmindeki oklar fibrozisli alanları gösterir. D resminde CD68+ makrofajlar mevcuttur.

Şekil 3. Miyokarditin; histopatolojik, immünohistokimyasal, moleküler bulguları (31)

2.1.6 Miyokardit Ayırıcı Tanısı

Göğüs ağrısı şikayeti olanlarda EKG’de ST değişikliği saptanan hastalarda koroner arter hastalığını ekarte etmek gerekir.

Fizik muayenede kalp yetmezliği olan görüntüleme yöntemlerinde kardiyomegali saptanan hastalarda hem ayırıcı tanıda hem de miyokarditin bir komplikasyonu olarak dilate kardiyomiyopati düşünülmelidir.

Sarkoidoz, amiloidoz, hemakromatozis, nöromüsküler hastalıklar, feokromasitoma gibi non-inflamatuvar kardiyomiyopatiler unutulmamalıdır.

2.1.7 Miyokardit Tedavisi

Viral miyokarditin patojene özgü tedavisinin kalp yetmezliği olmaksızın sağkalımı iyileştirdiği gösterilmediğinden, tedavi şimdilik semptomatiktir. Kalp yetmezliği bulguları olan hastalarda güncel kılavuzlara göre kalp yetmezliği tedavisi başlanmalıdır. Beta-blokörler, ACE inhibitörleri, ARB’ler tedavide değerlendirilmelidir.

ACE inhibitörleri ve ARB: Renin-anjiotensin blokajının erken başlatılmasıyla kardiyak remodelling zayıflatılabilir ve dilate kardiyomiyopatiye ilerleme yavaşlatılabilir. Yapılan fare çalışmalarında ACE inhibitörü (kaptopril) ve ARB (losartan) deneysel otoimmün ve viral miyokarditte; inflamasyonu, nekrozu ve fibrozu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (47-50). Otoimmün miyokarditin neden olduğu dilate kardiyomiyopati sığırlarda olmesartan tedavisi sol ventrikül fonksiyonlarını önemli ölçüde iyileştirmiş ve kardiyak remodellingi azalttığı gösterilmiştir (51).

Diüretikler: Aşırı sıvı yüklenmesini önlemek ve tedavi etmek adına kullanılabilir. Sığın inflamatuvar kardiyomiyopati modelinde yapılan bir çalışmada torsemid verilmesinin fibrozisi ve TGF beta miyokardiyal protein sentezini azalttığı ve böylece miyokarditin dilate kardiyomiyopatiye ilerlemesini yavaşlattığı görülmüştür (52).

Beta blokörler: Ventriküler fonksiyonları iyileştirmesi, kalp yetmezliği olan hastalarda hastaneye yatış oranını azaltması, sağkalımı arttırması yönünden tercih edilen ilaçlardandır. Deneysel veriler inflamatuvar kardiyomiyopatide de etkili olduğunu göstermiştir. Miyokarditli sığınlar üzerinde yapılan çalışmada özellikle karvedilolün inflamatuvar sitokinleri baskıladığı oksidan/antioksidan dengesini antioksidan tarafa doğru değiştirdiği ve böylece kardiyoprotektif olduğu saptanmıştır. Çalışmada kullanılan diğer beta blokör ajanlarda ise böyle bir etki saptanmamıştır (53). Ensefalomyokardit virüsü aşılınmış farelerde, propranolol tedavisi miyokardiyal nekrozu ve inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonunu azaltmış, ayrıca TNF-alfa, IL-6 ve IL-10'un baskılanmasını sağlamıştır. Sonuç olarak miyokarditin şiddetini azaltmış ve mortalite oranını düşürmüştür (54).

Aldosteron antagonisti: NYHA sınıf II, III ve IV semptomları olan sistolik kalp yetmezliğindeki hastalar için kullanımı önerilmektedir. Kalp yetmezliği gelişen hastalarda hastane yatışını azaltmış ve sağkalım oranını arttırmıştır (55). Eplerenon tedavisinin viral miyokardit üzerinde anti-inflamatuvar etkileri mast hücresi kaynaklı proteinazların inhibisyonu ile gösterilmiş ve fibrozisi baskıladığı saptanmıştır (56).

Kardiyak glikozidler: Sınıf II, III ve IV semptomları olan kalp yetmezliği hastalarında morbiditeyi azaltmıştır. Yüksek doz digoksinin ise pro-inflamatuvar sitokinleri arttırdığı ve enfekte farelerde miyokardiyal hasarı kötüleştirdiği görülmüştür. Digoksin bradikardi veya kalp bloğu yan etkileri nedeniyle beta-blokörün

tolere edilebilir maksimum sınırını düşürebilir. Bu nedenle kalp yetmezliği gelişen viral miyokarditli hastalarda digoksenden kaçınılmalıdır (57).

Kalsiyum kanal blokörleri: Akut kalp yetmezliği tedavisinde ön planda düşünülmesine de viral miyokardit tarafından indüklenen konjestif kalp yetmezliği olan fare modellerinde amlodipinin, nitrik oksitin aşırı üretimini inhibe ederek farelerde miyokardiyal hasara karşı koruyucu etkiye sahip olduğu görülmüştür (58). Aynı zamanda pranidipin ve amlodipinin otoimmün miyokardit ile indüklenen kalp yetmezlikli hastalarda sol ventrikül disfonksiyonunun ilerlemesini iyileştirdiği bulunmuştur (59).

Nonsteroid anti-inflamatuvar ve kolşisin: Perikardit tedavisinde nonsteroid anti-inflamatuvar tedavi ve kolşisin kullanılırken miyokardit tedavisinde bu ilaçların yeri yoktur (60). Akut viral miyokarditin sıçan modellerinde indometazin ve nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlar hem enflamasyonu hem de mortaliteyi arttırmıştır (61-62). Bu sebeple düşük dozda NSAİİ, sol ventrikül fonksiyonu normal olan perikarditte uygulanabilir.

Fiziksel aktiviteden kaçınma: Akut miyokarditte aerobik fiziksel aktiviteden kaçınmak gerekir (63-64). Yapılan hayvan çalışmalarında egzersizin mortaliteyi arttırdığı saptanmıştır (65). 2005 yılında yapılan 36.Bethesda Konferansı'nda olası veya kesin miyokardit tanısı alan profesyonel sporcuların en az 6 ay boyunca bütün rekabetçi sporlardan çekilmeleri sol ventrikül fonksiyonları ve kardiyak boyutları normal ise yarışmalara dönmeleri önerilmiştir (66).

Kalp pili ve implante edilebilir kardiyak defibrilatör: Semptomatik 2. ve 3. derece AV bloklar ile başvuran akut miyokardit hastalarında geçici kalp pili endikasyonu vardır. 3. derece kalıcı AV blok nadir olarak görülse de kalıcı kalp pili gerekmektedir. Lyme ve chagas hastalıklarının miyokarditlerinde hayatı tehdit eden ventriküler aritmiler yaygındır (67). İmplant edilebilir kardiyak defibrilatörler (ICD) ventriküler fibrilasyon veya semptomatik ventriküler taşikardi sonrasında endikedir. Bununla birlikte, inflamatuvar kardiyomiyopatisi olan hastalarda ICD veya kardiyak resenkronizasyon tedavisi sisteminin erken implantasyonundan kaçınılmalıdır. Çünkü sol ventrikül fonksiyonları kalp yetmezliği tedavisi ile önemli ölçüde iyileşebilir. Daha agresif seyri ve kötü prognozu nedeniyle; sarkoidozda veya dev hücreli miyokardit

hastalarında, ikinci veya üçüncü derece AV blok veya ventriküler aritmisi olan hastalarda kalp pili veya ICD implantasyonu erken dönemde düşünülebilir (68-69).

Mekanik dolaşım desteği ve kalp nakli: Optimal tedaviye rağmen kötüleşen akut fulminan seyirli miyokardite bağlı kardiyojenik şok tablosu gelişen hastaları, iyileşme döneminde veya transplantasyona gidene kadarki sürede ekstrakorporeal membran oksijenizasyonu (ECMO) ile takip etmek gerekebilir (70). Başlangıçtaki ciddi tabloya rağmen ECMO ile takip edilen hastaların %60-80'i hayatta kalır ve bu hastaların büyük oranda ventrikül fonksiyonları normale döner.

Miyokardit tedavisinde son yıllarda klinik çalışmalarla farklı yaklaşımlar değerlendirilmiştir. İmmüsupresif, immünmodülatör, anti-inflamatuvar mekanizmanın kullanıldığı yirmiden fazla tedavi çalışması bildirilmiştir.

1995 yılında yapılan randomize kontrollü çalışmada plaseboya kıyasla azatiopürin veya siklosporin ile 1 yıllık tedavi sonrasında ne mortalite ne de sol ventrikül fonksiyonlarında iyileşme açısından bir fark görülmemiştir (71).

İmmünglobülin (IVIG) tedavisi: Miyokarditli hastalarda antiviral ve immünmodülatör etkilerinden yararlanmak adına IVIG tedavisi uygulanabilir. Ancak miyokardit ve dilate kardiyomiyopatili hastalarda IVIG alanlar ile plasebo alanlar arasında sol ventrikül fonksiyonları arasında fark bulunamamıştır (72). Bununla birlikte, akut miyokarditli çocuklarda IVIG tedavisinden bir yıl sonra sol ventrikül fonksiyonlarında ve sağkalımında artış görülmüştür (73).

İmmünadsorbsiyon: Tedavide hedef çeşitli kardiyak hücre proteinlerine karşı oluşan antikardiyak antikorların ortadan kaldırılmasıdır (74). Antikorların ortadan kaldırılması ile kardiyak fonksiyonu, egzersiz kapasitesini, NT-pro-BNP düzeylerini, sistemik vasküler direnci iyileştirdiğine dair çalışmalar mevcuttur. Antikorların ortamdaki uzaklaşması miyokard inflamasyonunu da azaltır (75-77). İnflamatuvar kardiyomiyopatili hastalarda protein A'nın immünadsorbsiyonu sol ventrikül fonksiyonlarını iyileştirir (78).

Antiviral tedavi: Miyokardit etiyolojisinde en sık görülen etkenler virüsler olması nedeniyle miyokarditte antiviral tedavinin uygulandığı çok sayıda çalışma mevcuttur. Interferon beta ve interferon alfa-2 tedavisinin miyositleri hasara karşı korumuş ve inflamatuvar hücre infiltratlarını azaltmıştır. Ayrıca interferon-beta'nın kardiyak viral yükü ortadan kaldırdığına yönelik çalışmalar mevcuttur (79). Yapılan

başka bir çalışmada enteroviral ve adenoviral miyokardite bağlı sol ventrikül disfonksiyonu olan 22 hastanın dahil edildiği bir çalışmada, tüm hastalarda viral yükün ortadan kaldırıldığı 15 hastada ise sol ventrikül fonksiyonunun iyileştiği görülmüştür (80). Avrupa merkezli bir çalışmada inflamatuvar dilate kardiyomiyopatili miyokardiyal viral enfeksiyonu doğrulanmış 143 hastada plaseboya karşı interferon-beta-1B'nin etkili olduğu gösterilmiştir. Tedavide miyokarddaki enteroviral yük önemli ölçüde azalmıştır (81).

2.1.8 Miyokardit Prognozu

Hastaların prognozu klinik bulgulara, laboratuvar parametrelerine ve biyopsi sonuçlarına göre değişkenlik gösterir. Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu korunmuş akut miyokardit hastalarında sekel olmaksızın yüksek oranda spontan iyileşme görülür (82). Fulminant seyirli, başvuru sırasında hemodinamik stabilitesi olmayan hastaların klinik seyri daha kötü olsa da başlangıç anında farmakolojik/mekanik destek ve tedavi erken başlatılması prognozu iyileştirir (83). Kardiyak sarkoidoz veya dev hücreli miyokarditi olan hastalarda prognoz immünsupresif tedavi veya kalp naklinin hızlı bir şekilde yapılmasına bağlıdır. Ancak nakil sonrası hem sarkoidozun hem de dev hücreli miyokarditin tekrarlama riski mevcuttur (31, 84).

Genel anlamda çoğu hasta uzun dönemde kardiyak bozulma olmadan iyileşir. Tanısı koyulan hastaların çok az bir kesiminde dilate kardiyomiyopati gelişir. Non spesifik bulguları nedeniyle tanısı koyulamayan hastalar da düşünüldüğünde miyokarditin uzun dönemde persistan ventriküler disfonksiyon, kalp yetmezliği gibi komplikasyonlar düşük oranda görülür. Akut hastalık döneminde mortaliteyi %6-14 arasında gösteren çalışmalar mevcuttur (85). Fulminan seyir gösterenlerde, yapılan ekokardiyografik incelemelerde sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunun %30'un altında olan hastalarda, ekstrakorporeal membran oksijenasyonu ihtiyacı olanlarda, inotrop ihtiyacı olan hastalarda, taşırtimi gelişenlerde mortalite oranı daha yüksektir.

2.2 DOKSORUBİSİN

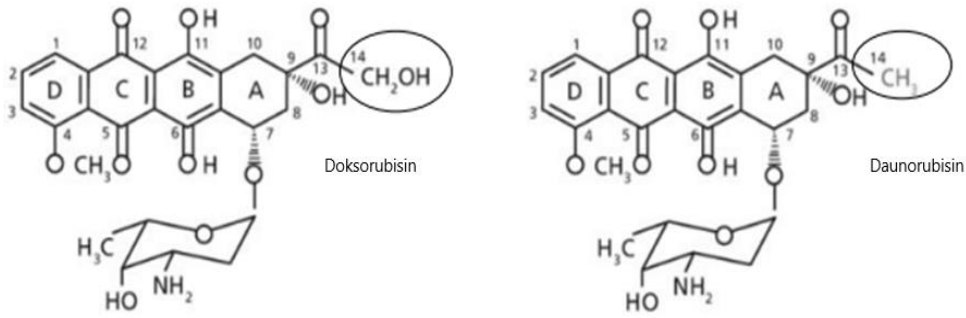
2.2.1 Doksorubisinin Tarihçesi

Toprakta yaşayan bakterilerden antikanser bileşiklerin üretilmesi için çalışmalar 1950'li yıllarda başlanmıştır. Streptomyces peucetius türü bakteriden fare türleri

üzerinde solid tümörlere karşı iyi bir aktiviteye sahip olduğu görülen daunorubisin akut lösemi ve lenfoma tedavilerinde kullanılmaya başlandı (86). Klinik kullanımı sırasında 1967 yılında ölümcül kardiyak toksisitesi fark edilmesi üzerine araştırmacılar streptomyces grubu bakteriler üzerinde genetik değişiklikler yaparak doksorubisini üretti. Daunorubisine göre daha yüksek bir kemoterapötik indeks yakalansa da kardiyotoksisite hala önemli bir sorun olmaya devam etti (87).

2.2.2 Doksorubisinin Biyokimyasal Yapısı

Antrasiklinler, tetrasiklik bir çekirdek ve ona bağlı olan bir amino şeker olmak üzere iki yapıdan oluşur. Tetrasiklin çekirdek yapısı antrasiklinlere kırmızı rengini verir. Antrasiklin grubuna üye tüm ilaçlarda tetrasiklik halkaya komşu kinon ve hidrokinon grupları bulunmaktadır. Kimyasal yapıdaki küçük değişiklikler ilacın farklı aktivitelere sahip formlarının oluşmasını sağlamıştır (88). Bulunan ilk antrasiklin bileşeni olan daunorubisin molekülündeki 14. karbonuna bir hidroksil grubunun eklenmesi sonrası doksorubisin oluşur. Antrasiklinler fizyolojik pH’da pozitif yüklü olması nedeniyle, DNA çift sarmalı arasına girer ve DNA’da yapısal değişikliklere sebep olur (89).



Doksorubisin ve Daunorubisinin biyokimyasal yapısı:

Daunorubisin molekülündeki 14.karbonun hidroksil grubu almasıyla doksorubisin meydana gelir.

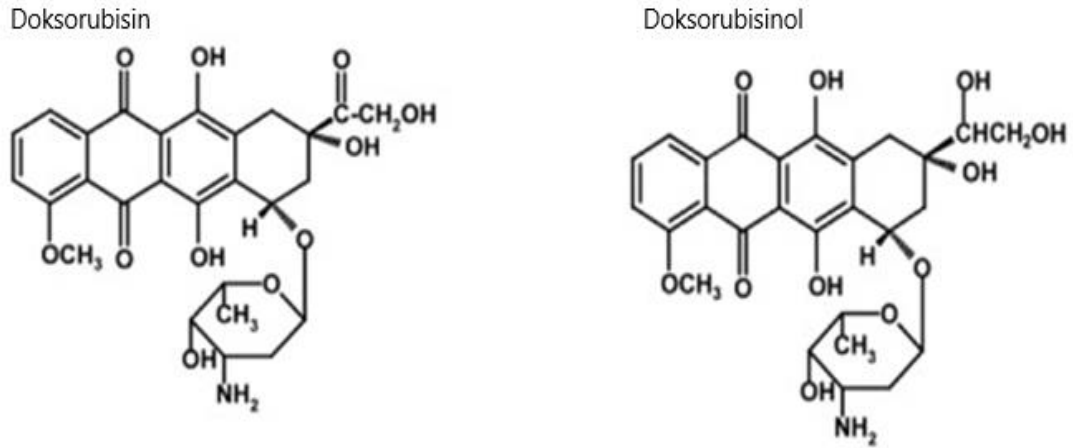
Şekil 4. Doksorubisinin ve daunorubisinin biyokimyasal yapısı

2.2.3 Doksorubisinin Farmakokinetik Özellikleri

Oral biyoyararlanımının sadece %50 seviyelerinde olması, intramusküler veya subkutan uygulamalarının doku nekrozuna yol açması ve absorpsiyonunun kısıtlı olması nedeniyle doksorubisinin intravenöz uygulanması önerilir. Yapılan

farmakokinetik çalışmalar; ilacın plazma seviyelerinin, idrar ile atılımının yavaş olmasına rağmen dokulara çabuk dağılımı nedeniyle hızlı bir düşüş gösterir. İntravenöz uygulamadan sonra karaciğerde ve miyokardda plazmaya oranla yaklaşık 10 kat kadar fazla tespit edilse de en yüksek konsantrasyona tümör dokusunda ulaşır. IV uygulamadan sonra ilacın plazmadaki yarılanma ömrü 10-15 dakika civarındadır. Doksorubisinin kan beyin bariyerinden geçişi iyi değildir. Bu yüzden intrakraniyal solid kitlelerde IV kullanımının etkinliği düşüktür (90).

Hem doksorubisinin hem metabolitlerinin sadece %25'i damar içinde serbest formda dolaşır. Kalan %75'lik kesimi plazma proteinlerine bağlanır. Doksorubisin en fazla karaciğer olmak üzere birçok dokuda metabolize olabilir (91). En önemli metaboliti antineoplastik aktiviteye sahip olan doksorubisinoldür. Doksorubisin ve metabolitlerinin plazma konsantrasyonları trifazik azalma gösterir. Karaciğerden ilk geçişin etkisiyle hızla metabolize olur. Önce aktif metaboliti olan doksorubisinol ardından aktif olmayan aglikonlar, konjuge sülfatlar ve glukuronidler oluşur. Doksorubisinin yarısına yakın miktarı safra yolu ile atılır iken sadece %5'lik kısmı idrar ile vücuttan uzaklaştırılır. İdrarla atılan doksorubisin idrar rengini kırmızıya çevirebilir (92).



Şekil 5. Doksorubisinin ve doksorubisinolün biyokimyasal yapısı

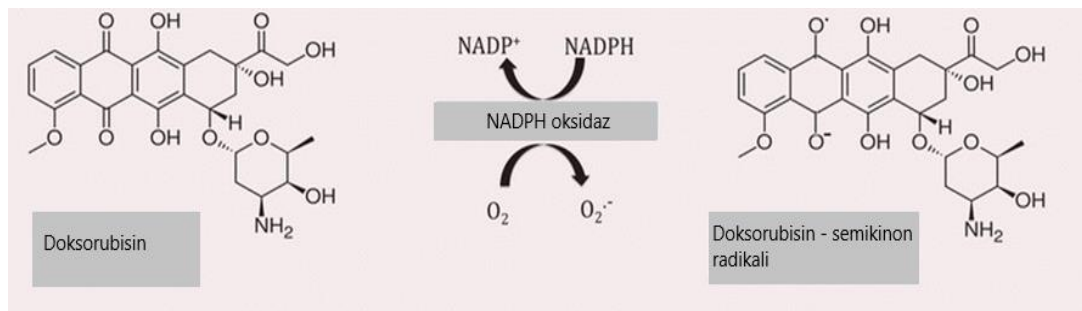
2.2.4 Doksorubisinin Etki Mekanizması

Doksorubisin birincil olarak DNA ile direkt etkileşime girerek etkisini gösterir. Topoizomeraz II enzimini inhibe eder. Böylece kopyalanmak için açılan DNA zincirleri stabilize olur ve çift sarmal yapı yeniden kapanamaz. Bunun sonucunda DNA sentezinde duraklama olur. DNA'nın replikasyonunun durması ile transkripsiyon ve translasyon engellenir. Doksorubisin bu etkileri hem mitokondriyal hem de nükleer DNA üzerinde gösterir (93).

Aynı zamanda topoizomeraz II enziminin inhibe olması birtakım apoptotik yolları indükler ve bunun sonucunda hücre ölümü gerçekleşir. Doksorubisin ayrıca, hücre bölünme siklusundaki G2/M fazına etki ederek hızla çoğalan tümör hücrelerinin replikasyonunu engelleyerek antitümör etki oluşturur (94).

Doksorubisinin yapısındaki kinon grubu NADPH oksidredüktaz ile tepkimeye girerek semikinon radikaline dönüşür. Semikinon radikallerinin oksijenle reaksiyona girmeleri sonucu süperoksit ve hidrojen peroksit radikalleri oluşur. Oluşan bu serbest oksijen radikalleri DNA hasarı oluşturur (95).

Aynı zamanda doksorubisin bir demir şelatörüdür. Oluşan doksorubisin-demir kompleksi, hidrojen peroksitin reaktif hidroksil radikallerine dönüşümünü katalize eder. Böylece oluşan serbest radikaller, hücre ölümüne yol açan oksidatif stres meydana getirir. Bu mekanizmalar aracılığı ile doksorubisin güçlü bir antineoplastik ajan olmasına rağmen ciddi yan etkilere de neden olur (96).



Şekil 6. Doksorubisinden doksorubisin-semikinon oluşumu

2.2.5. Doksorubisinin Yan Etkileri

Doksorubisine bağlı kısa ve uzun vadede birçok yan etki görülebilir. Doksorubisin kullanan hastalarda görülen en sık yan etki akut dönemde görülen

bulantı ve kusmadır. Uzun dönemde alopesi, bazı nörolojik problemler (baş dönmesi, halüsinasyon) ve kemik iliği aplazisi görülebilir. Doksorubisin kullanımı sonra kemik iliği baskılananlarda nötropeni, trombositopeni, anemi görülebilir. Bu etkilerin şiddeti kullanılan kümülatif doksorubisin dozu ile doğrudan ilişkilidir. Ateş, ürtiker, tırnaklarda hiperpigmentasyon görülebilen diğer yan etkilerdendir. İntravenöz uygulama sırasında oluşabilecek ekstremitasyon; nekroza, selülit veya tromboflebite yol açabilir. Toplam tedavi dozuna bağlı şiddeti değişken olan ve tedaviyi ciddi derecede kısıtlayan en önemli yan etki kardiyotoksisitedir (97-98).

2.2.6. Doksorubisin Kardiyotoksitesi

1960'lı yıllardan beri kanser tedavisinde önemli bir yeri olan doksorubisinin en önemli ve tedaviyi en çok kısıtlayan yan etkisi kardiyotoksisitedir. Doksorubisin tedavisi uygulanan pediatrik yaş grubundaki bir grup hastanın incelendiği çalışmada tedaviye bağlı kardiyovasküler komplikasyon oranı %4,5-7 arasında olduğu görülmüştür (99).

Doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisite kullanılan toplam doza bağlıdır ve yan etki kişiden kişiye farklılık gösterir. Kardiyak endotelial hücrelerde bulunan P-glikoproteinler ilacın kalpten dışarı pompalanmasını sağlarlar. Bu sebeple P-glikoprotein miktarının düşük olması daha az doksorubisin dozunda daha fazla yan etki oluşmasına sebebiyet verir (100-101). Yapılan bir çalışmada doksorubisin ile tedavi edilen hastaların tedavi boyunca aldıkları dozun 400 mg/m² olması %5, 500 mg/m² olması %16, 550 mg/m² olması %26, 700 mg/m² olması ise %48 oranında kardiyotoksisiteye yol açar. Genel kanı kardiyotoksisite riskini en aza indirmek için 18 yaşından küçük hastalarda kümülatif dozu 300 mg/m²'nin altında tutmaktır. Ancak yapılan çalışmalarda 210 mg/m² toplam dozda bile kardiyotoksisite gelişen hastaların olduğu gösterilmiştir (102-103).

2.2.6.1. Doksorubisin Kardiyotoksitesi Patogenezi

Doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisite tam olarak açıklanamayan farklı potansiyel yolları olan çok basamaklı bir süreçtir. Kardiyotoksisite patogenezinde sitoplazmik ve nükleer membranlar, mitokondri, sarkoplazmik retikulum ve hem nükleer hem mitokondriyal DNA hedefler arasında sayılabilir (104).

Mitokondriyal DNA'da bazı mutasyonlara sebep olarak enerji üretim basamaklarında defekte yol açar (105).

Sirtüin proteininin inhibe olması ile mitokondriyal lipid oksidasyonu bozulur. ATP ve fosfokreatin üretimi engellenir ve böylece miyokard kontraktilitesi azalır (106).

Yapısındaki kinon halkası semikinona dönüşürken açığa çıkan serbest oksijen radikalleri mitokondriyal membran hasarına yol açar. Böylece enzimatik yolak bozulur ve lipid peroksidasyonu artar (107).

Glutasyon peroksidaz, katalaz gibi anti-oksidan enzimlerin miktarı ve etkinliğini azaltarak oksidatif strese katkıda bulunur (108-109).

Sarkoplazmik retikulum üzerindeki kalsiyum kanal blokör sayısını azaltıp fonksiyonunu bozarak miyokardın kontraksiyon ve relaksasyonunu bozar (110).

Alfa aktin, miyozin, troponin I, desmin proteinlerin üretim basamaklarına etki ederek miyofibrillerin hem sayısını hem kontraktilitesini bozar (111-114).

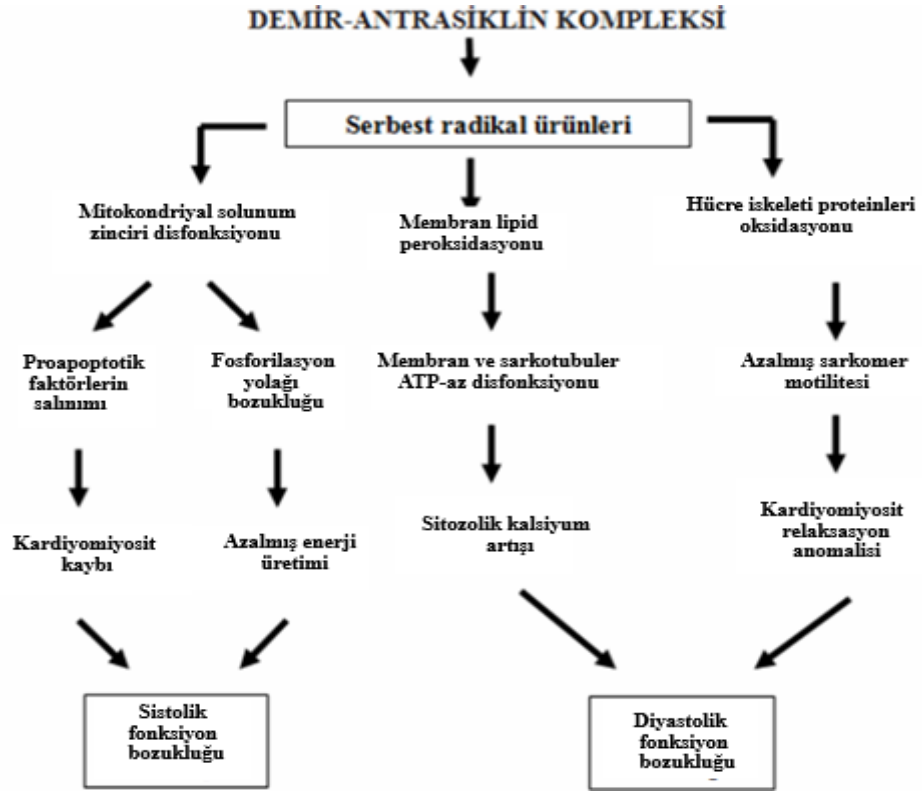
Hidrojen peroksit ve süperoksit dismutaz seviyelerini arttırarak p53 gen mutasyonu ile birlikte apoptozu indükler (115-116).

2.2.6.2. Doksorubisin Kardiyotoksisitesinde Oksidatif Stres

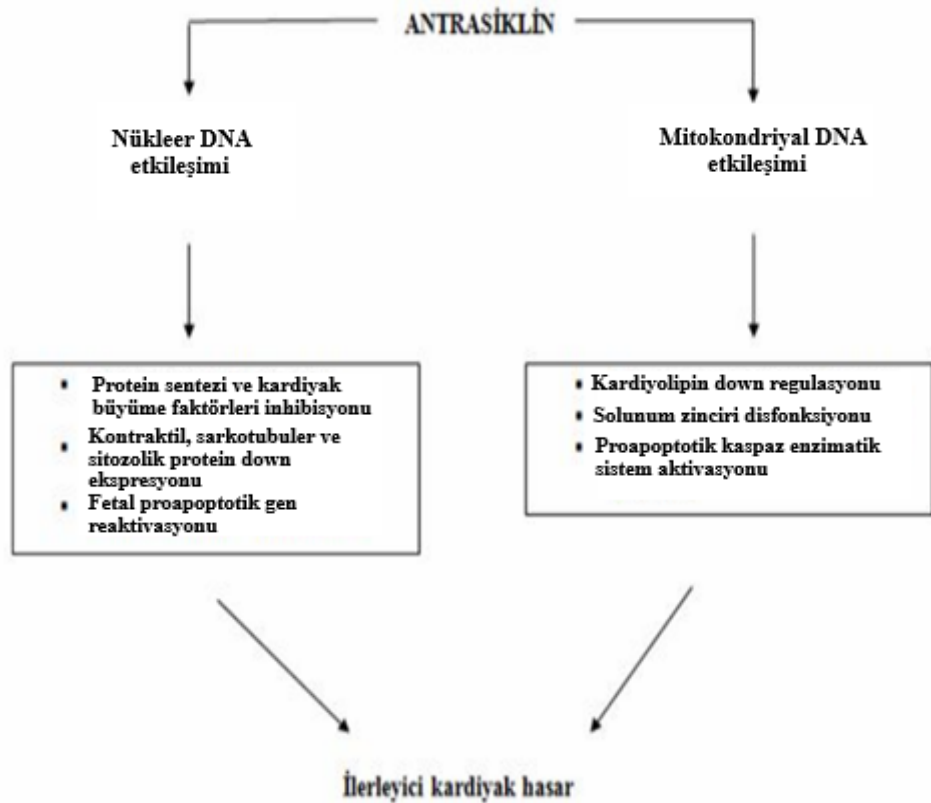
Kardiyotoksisite patogeneğinde pek çok görüş olmasına rağmen en kabul edilene oksidatif hasardır. Diğer hücrelere oranla kardiyomiyositlerin daha fazla mitokondri içermesi ve bunların oksijen ihtiyacının fazla olmasına rağmen serbest oksijen radikali eliminasyon yeteneklerinin düşük olması bunun başlıca nedenidir (117-118).

Doksorubisin kaynaklı oksidatif stres başlıca iki farklı yol ile oluşur.

Doksorubisin (DOX) ve ferrik demirin oluşturduğu $DOX + Fe^{+3}$ kompleksi bazı indirgeyici ajanlar (NADP, glutasyon, sitokrom) varlığında bir elektron alarak indirgenerek $DOX + Fe^{+2}$ 'ye dönüşür. İndirgenmiş $DOX + Fe^{+2}$ kompleksi aldığı elektronu oksijene aktararak eski haline döner. Bu sırada oksijen atomu O_2 'ye dönüşür. O_2 kendiliğinden veya süperoksit dismutaz enziminin aktivitesi ile hidrojen peroksit ve oksijen açığa çıkartır. H_2O_2 ve O_2 Heber- Weiss tepkimesine girer. Bu tepkime sonucunda OH^- (hidroksil radikali) açığa çıkar. Bu tepkimeler sürekli devam ederek çok fazla miktarda serbest oksijen radikali oluşur ve kardiyotoksisiteye sebep olur (119).

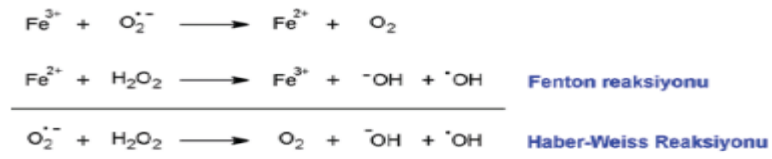


Şekil 7. Antrasiklin kardiyomiyopatisinde serbest radikallerin rolü

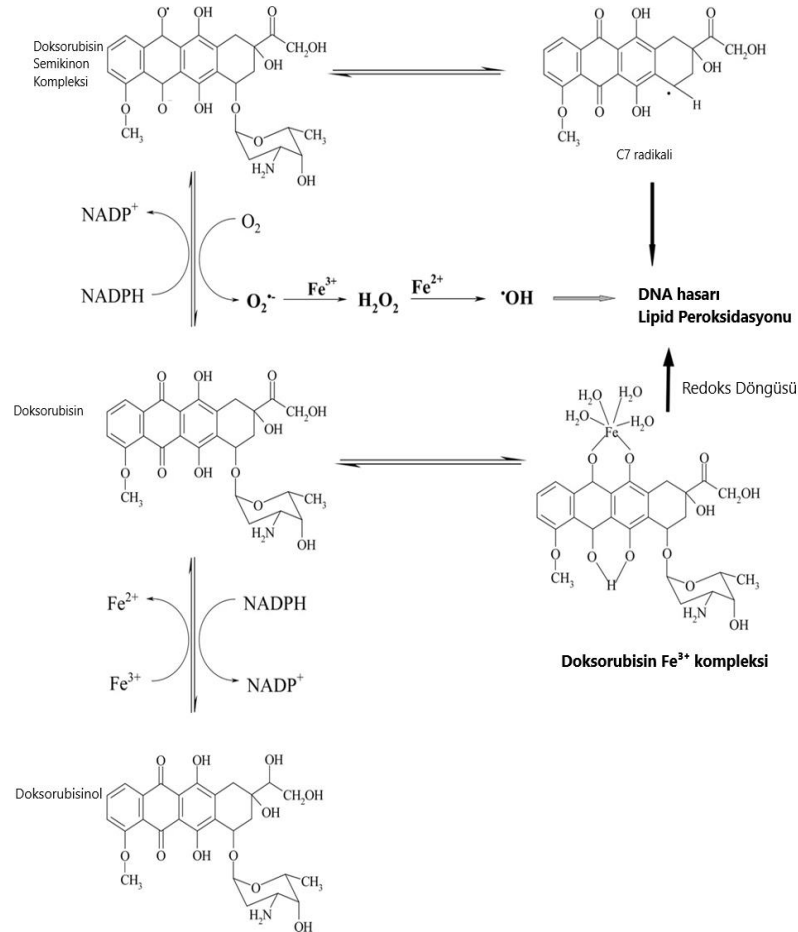


Şekil 8. Antrasiklinlerin nükleer ve mitokondriyal DNA üzerine etkileri

DOX'un yapısındaki kinonun mitokondriyal redüktazlardan elektron alarak indirgenmesiyle kararsız bir bileşik olan semikinin serbest radikali oluşur. Semikinin oksijene serbest elektronu vererek kendisini kinon haline geri çevirirken serbest oksijen radikali oluşmuş olur. Kararsız O_2^- , H_2O_2 ve oksijeni oluşturur. H_2O_2 ve O_2^- reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur. Artan serbest oksijen radikalleri kalp kası hücrelerinde lipid peroksidasyonuna neden olur. Böylece sarkomerlerde parçalanma, DNA hasarı, apoptotik hücre ölümü gerçekleşir (120).



Şekil 9. Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu



Şekil 10. Doksorubisinin demir mekanizması üzerinden DNA hasarı ve lipid peroksidasyonuna etkisi

2.2.6.3. Dokсорubisin Kardiyotoksisitesi Klinik Tipleri

Dokсорubisin kardiyotoksisitesi ilacın uygulanmasından sonra oluşum süresine göre dört alt tipte sınıflandırılır (121).

Akut Kardiyotoksisite: İlaç uygulandıktan sonraki ilk 24 saatte ortaya çıkan toksisite tipidir. Görölme sıklığını %0,4-41 arasında gösteren çalışmalar mevcuttur. Genelde asemptomatik seyrete de nadiren hiperkinetik aritmiler, miyokardit, perikardit görölabilir. Akut miyokard enfarktüsüne bağı ölümleer nadir de olsa bildirilmiştir. EKG’de QT aralığında uzama, ST-T değışikliği gibi non-spesifik bulgular görölabilir. Bu dönemdeki komplikasyonlar genellikle geri dönüşümlüdür. Ancak altta yatan kalp hastalığı olanlarda komplikasyonlar mortal seyredebilir (121-122).

Subakut Kardiyotoksisite: İlaç alımından günler/haftalar sonra ortaya çıkar. Daha nadir görölün bir formdur. Perikardit, miyokardit görölabilir. Hızla kalp yetmezliğine progrese olup mortal seyredebilir (121).

Kronik Kardiyotoksisite: Yaklaşık 4-20 yıl içinde, kümülatif doza bağı, progresif, geri dönüşsüz kardiyotoksisite tipidir. Görölme sıklığı %0,4-23 arasındadır. Kalp yetmezliği veya kardiyak şok kliniğı ile karşımıza çıkabilir. Genellikle sol ventrikölün tutulduğı görölür. 550 mg/m² kümülatif dozlarda toksisitenin arttığı gösterilmiştir (121).

Geç Kardiyotoksisite: Literatürde 20 yıl sonra ortaya çıkmış vakalar gösterilmiştir. Geri dönüşsüz, miyosit hasarı, ilerleyici fibrozis, kardiyak fonksiyon bozukluğu ile karakterizedir. Genellikle pediatrik dönemde onkolojik tedavi alan hastalarda uzun vadede ortaya çıkan tiptir (121).

2.2.6.4. Dokсорubisin Kardiyotoksisitesi Risk Faktörleri

Kardiyotoksisite gelişiminde potansiyel risk faktörleri şunlardır (123-126):

1. Özellikle 550 mg/m² kümülatif dozdan fazla alan hastalar
2. >2000 gray radyasyona maruziyet (özellikle mediasten bölgesine)
3. Diğler kardiyotoksik ajanlarla (siklofosomid, metotreksat vb.) birlikte dokсорubisin kullanımı
4. Komorbid hastalık öyküsü (özellikle kardiyovasküler)
5. <4 yaş

6. Kadın cinsiyet

7. İlacın bolus olarak uygulanması (Akut kardiyotoksisite)

2.2.6.5. Doksorubisin Kardiyotoksisitesi Tanısı

Tanıda geç kalınmaması için öncelikle doksorubisin tedavisi alan hastalar uzun süreli izlenmelidir. Özellikle risk faktörlerine sahip hastalara dikkat edilmelidir. Detaylı klinik öykü ve ayrıntılı bir fizik muayene tanı koymak için çok önemli iki basamaktır. Kanda kardiyak biyobelirteçlerin değerlendirilmesi ve görüntüleme yöntemleri, şüphelenilen hastalarda tanıyı desteklemek için başvuru yöntemleridir.

Hikayede her hastanın risk faktörlerini karşılayıp karşılamadığı değerlendirilmelidir. Tüm tedavisi boyunca toplam aldığı doksorubisin dozunun 550 mg/m²'den fazla olması anlamlıdır (121).

Doksorubisini ne zaman, ne kadar sürede aldığı sorgulanmalıdır. Fizik muayenede kardiyotoksisiteye spesifik bir bulgu olamamasına karşın; akciğerde rallerin duyulması, kardiyak oskültasyonda gallop ritminin varlığı, boyun venöz dolgunluğunun saptanması, hepatomegali, periferik ödem dikkat edilmesi gereken bulgulardır (127).

EKG bulguları non-spesifik olmakla birlikte anamnez ve fizik muayene ile birleştiği zaman tanı koyma yolunda anlam kazanır. ST-T değişiklikleri, QT uzunluğu, ileti kusurları, aritmiler görülebilir (128).

Ekokardiyografide ise kalp kapaklarının, duvar kontraktilesinin ve perikardiyumun, değerlendirilmesi; pulmoner basıncın ve ejeksiyon fraksiyonunun hesaplanması olası komplikasyonların değerlendirilebilmesi için önem arz eder. Antrasiklinlerin neden olduğu kardiyak bozukluk, ejeksiyon fraksiyonunun %50'nin altına düşmesi ya da tedavi öncesi bazal değere göre %10'luk bir azalma olarak tanımlanır (129-130).

Kardiyotoksisitenin değerlendirilmesinde kardiyak MR görüntülemesi kullanılabilir. Geç gadolinyum tutulumu, skar ve fibrozisi göstermek açısından anlamlıdır. Bu durum sol ventrikülün etkilendiğini gösterir (131).

Son zamanlarda “miyokardiyal global longitudinal strain” (GLS) sol ventrikül işlev bozukluğunun erken saptanmasında önemli bir parametre olarak

kullanılmaktadır. Başlangıç ölçümünde %15’lik bir düşüş sol ventrikül işlev bozukluğunun erken dönemde tanısının koyulmasında yardımcıdır (132).

Anamnez ve fizik muayenede kardiyak etkilenimden şüphelenilen hastalarda kanda kardiyak biyobelirteçlerin düzeyinin tespit edilmesi tanıyı desteklemek açısından önemlidir. Bu biyobelirteçlerden biri olan serum troponin I düzeyinin yaşa ve cinsiyete göre yüksek olması ileride oluşabilecek sol ventrikül işlev bozukluğu açısından önemlidir. Troponin I pozitifliği ve GLS’deki anlamlı düşüşün kombinasyonu %93 hassasiyete ve %91 negatif prediktif değere sahiptir (133). Önemli biyobelirteçlerden biri de natriüretik peptitlerdir. Özellikle kalp yetmezliğinin saptanmasında yaygın olarak kabul görmüştür. Çok düşük miktarlarda yükselme dahi riskli hastaları belirleyip, tedaviyi yönlendirebilecekleri bildirilmiştir (134).

Tablo 2. Yaşa ve cinsiyete göre hs- Troponin-T (ng/L) persentil değerleri

Yaş	Kişi Sayısı		5 persentil		50 persentil		75 persentil		95 persentil		97.5 persentil	
	Erkek	Kız	Erkek	Kız	Erkek	Kız	Erkek	Kız	Erkek	Kız	Erkek	Kız
1	88	107	2.56	2.05	5.32	5.04	6.58	6.26	9.63	8.58	11.43	9.64
2	77	83	1.73	1.50	3.59	3.45	4.37	4.21	6.52	5.75	8.02	6.50
3	74	76	1.39	1.44	2.90	3.15	3.49	3.80	5.33	5.19	6.83	5.93
4	74	73	1.39	1.37	2.91	2.93	3.47	3.50	5.41	4.81	7.18	5.56
5	93	102	1.36	1.42	2.81	2.99	3.31	3.55	5.20	4.94	7.05	5.80
6	111	111	1.28	1.48	2.58	3.12	3.02	3.69	4.70	5.21	6.36	6.24
7	118	127	1.36	1.40	2.64	2.96	3.08	3.49	4.67	5.04	6.20	6.16
8	130	155	1.51	1.28	2.81	2.75	3.25	3.24	4.79	4.78	6.18	5.98
9	142	173	1.53	1.28	2.74	2.81	3.16	3.33	4.52	5.02	5.65	6.41
10	149	174	1.62	1.22	2.80	2.74	3.22	3.26	4.49	5.04	5.47	6.54
11	152	155	1.66	1.30	2.81	3.01	3.23	3.60	4.42	5.66	5.27	7.45
12	157	172	1.66	1.25	2.77	3.00	3.19	3.61	4.31	5.78	5.07	7.67
13	158	154	1.62	1.25	2.71	3.12	3.13	3.80	4.21	6.16	4.91	8.18
14	156	168	1.71	1.23	2.88	3.25	3.34	4.01	4.51	6.55	5.26	8.66
15	123	105	1.72	1.30	2.97	3.67	3.47	4.59	4.75	7.54	5.57	9.88
16	122	94	1.61	1.38	2.93	4.22	3.45	5.38	4.83	8.87	5.77	11.48
17	74	48	1.45	1.37	2.84	4.64	3.39	6.04	4.97	10.00	6.14	12.77
18	36	21	1.18	1.56	2.63	5.98	3.18	8.00	5.07	13.31	6.71	16.76

Tablo 3. Yaşa ve cinsiyete göre NT – proBNP(ng/L) persentil değerleri

Yaş	Kişi Sayısı		5 persentil		50 persentil		75 persentil		95 persentil	
	Erkek	Kız	Erkek	Kız	Erkek	Kız	Erkek	Kız	Erkek	Kız
0.25	77	77	54.3	46.7	157.8	139.7	230.8	204.1	388.5	345.2
0.5	92	98	50.6	44.1	147.2	133.0	215.6	194.7	363.5	330.3
1	92	121	44.1	39.8	129.4	121.5	190.0	178.6	321.2	304.6
2	81	98	35.5	33.5	105.5	105.3	155.5	156.2	264.4	269.2
3	75	82	30.8	29.2	93.0	94.6	137.7	141.5	235.4	246.7
4	79	77	28.6	26.0	87.5	87.0	130.2	131.3	223.8	231.4
5	98	104	27.4	24.0	85.2	82.9	127.3	126.3	220.1	225.3
6	113	115	26.5	22.9	83.5	81.6	125.4	125.4	218.1	226.2
7	128	130	25.4	21.2	81.3	78.3	122.6	121.5	214.5	221.9
8	136	162	23.9	18.7	77.8	71.6	117.8	112.2	207.4	207.3
9	146	178	22.2	16.1	73.1	63.8	111.3	101.0	197.0	189.0
10	155	174	19.9	14.1	66.8	57.9	102.1	92.7	181.9	175.6
11	154	161	17.6	12.8	59.8	54.8	91.9	88.5	164.7	169.8
12	158	174	15.4	11.5	53.3	50.9	82.3	83.1	148.4	161.6
13	163	160	13.6	9.5	48.0	43.8	74.6	72.3	135.2	142.4
14	162	168	12.3	7.2	44.1	34.8	68.9	58.1	125.7	115.9
15	130	117	11.3	5.3	41.2	26.7	64.6	45.1	118.6	91.3
16	127	100	10.5	4.0	39.0	20.8	61.4	35.6	113.5	73.0
17	78	50	10.1	3.1	37.9	16.8	60.1	29.0	111.7	60.3

Dokсорubisine bağlı kardiyotoksisitenin değerlendirilmesinde en spesifik ve en sensitif yöntem endomiyokardiyal biyopsidir. Alınan örneğin histopatolojik olarak incelenmesi ile tanı koyulur. Histopatolojik değerlendirmede miyofibril kaybı, miyosit vakuolizasyonu, nükleus-kromatin disorganizasyonu görülebilmektedir. Ancak işlemin invaziv oluşu, uygulama ve değerlendirmedeki zorluklar, biyopsi bölgesinin işlem sonrasında etkilendiği görüşü nedeniyle kullanımı kısıtlıdır (135).

Dokсорubisin kardiyotoksisitesinde; miyofibriller kısmen veya tamamen kaybolabilir. Miyosit vakuolizasyonu, nükleus-kromatin disorganizasyonu görülebilir. Toplam alınan doz miktarı ile histolojik açıdan kardiyotoksisite değişiklikleri koreledir (136).

2.2.6.6. Dokсорubisin Kardiyotoksisitesinin Tedavisindeki Ajanlar

Günümüzde dokсорubisinin kardiyotoksik etkisini azaltmak için kullanılan klinik olarak onay almış tek ilaç deksrazoksan'dır. Bu ilaç hücre içerisindeki demir iyonlarını bağlayarak dokсорubisin-demir kompleksinin oluşumunu engeller (137). Yüksek risk grubunda tedavi gören akut lenfoblastik lösemi hastaları üzerinde yapılan çalışmalarda ilacın kardiyoprotektif etkileri doğrulanmıştır (138-139). Yapılan başka

bir çalışmada ise deksrazoksanın, doksorubisinin ilaç etkinliğini düşürdüğü ve tedavi başarısını azalttığı aynı zamanda ikincil malignitelere yol açabileceği gösterilmiştir (140).

Anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACEİ) kalp yetmezliği olanlarda ön ve ard yükü azaltmak birincil kullanım sebebi olsa da antihipertansif etkilerinin yanında antioksidan etkileri de mevcuttur (141). Bu özelliği ile kardiyotoksisitenin engellenmesine katkıda bulunabileceği gösteren çalışmalar mevcuttur. Bir ACEİ olan enalapril, DOX ile ilişkili serbest radikal oluşumunu engeller ve böylece kardiyak disfonksiyonu azaltır (142). Ancak hastaların uzun süre seyredilmesi ile, enalapril kaynaklı sol ventrikül fonksiyon iyileşmesinin ortalama 6-10 yıl sürdüğü sonrasında bu iyileşmenin kaybedildiği görülmüştür. Yapılan araştırmalarda saptanan olumsuz yan etkileri nedeniyle kanser tedavisi sırasında kardiyoprotektif etkisi için kullanılırken dikkatli olunması gerekir (143).

2.2.6.7. Doksorubisin Kardiyotoksisitesine Karşı Çalışılan Ürünler

Sinnamaldehit (Tarçın): H9C2 hücreleri üzerinde doksorubisinin hücre canlılığını inhibe edici özelliğini ortada kaldırdığı, artan serum CK ve LDH düzeylerini azalttığı, kardiyomiyosit hasarını belirgin düzeyde azalttığı, miyokardiyal fibrozisin ilerlemesini durdurduğu gösterilmiştir. Doksorubisin sonrası azalan SOD ve GSH düzeyleri ile dokularda artan MDA seviyeleri sinnamaldehit uygulaması sonrası doksorubisin öncesi düzeylere gelmiştir. Anti-oksidatif savunmada kritik bir rol oynayan Nrf-2'nin nükleer translokasyonunu hızlandırır. Ferropitozu baskılayarak kardiyomiyosit canlılığını arttırmıştır (144).

Alpha-mangostin (Mangostan Meyvesi): Doksorubisinin oluşturduğu kalp hızını azaltma, hipotansiyon, kalp ağırlığını azaltma, serum kreatin fosfokinaz ve LDH seviyeleri arttırma, kaspaz 3 ve kaspaz 9 düzeylerini arttırma, indirgenmiş glutatyon içeriğini azaltma etkilerinin tamamı 100 mg/kg alfa-mangostin uygulaması ile geri kazanılmıştır (145).

Vernonanthura polyanthes: Güney Yarımküre'de kış aylarının sonlarında açan beyaz çiçekler barındıran bir çalı türüdür. Dikey gövdesi, yeşil ve dikdörtgen şeklindeki yaprakları ile okaliptüsü andırır. Doksorubisinden hem önce ve sonra hem de doksorubisin ile birlikte kullanılması doksorubisinin sitotoksik, genotoksik ve mutajenik etkilerini azaltmıştır (146).

Melatonin: Doksorubisin ile indüklenen; kardiyak kontraktilite parametrelerindeki azalmalar, kan basıncındaki değişimler, EKG değişiklikleri melatonin ile hafiflemiştir. Miyofibrillerin kaybı ve düzensizliği, sitoplazmanın vakuolizasyonu, sarkotübüler sistemin genişlemesi de melatonin sonrası belirgin düzeyde azalmıştır (147).

N-asetilsistein (NAC): Doksorubisinden 1 saat önce NAC tedavisinin uygulanması hem kısa hem uzun vadede deney hayvanlarının hayatta kalmasını önemli ölçüde iyileştirmiş (148).

Amifostin: Kemoteraiden önce uygulandığında, antitümör yanıtını zayıflatmadan çeşitli dokuların korunmasını sağlayan bir sistemin tiyofosfat türevidir. Hücre içine girdikten sonra serbest radikalleri temizler. Doksorubisin sonrası oluşan hepatotoksisteyi ve nefrotoksisitenin doksorubisin ile birlikte amifostin uygulanması sonrası oluşmadığı gözlenmiştir (149).

Silymarin (Deve diken): Doksorubisin verilen sıçanlarda nitrik oksit (NO) düzeyleri belirgin artarken doksorubisin ile birlikte silymarin verilen sıçanlarda 7. ve 21.günlerde NO düzeylerinde sadece doksorubisin alanlara göre belirgin düşüş saptanmıştır. Sadece doksorubisin uygulanan sıçan kalplerinin histolojik incelemesinde sitoplazmik vakuol oluşumu ve interstisyel ödem tespit edilmişken, histolojik değişikliklerin şiddeti silymarin ile tedavi edilen hayvanlardan alınan kesitlerde önemli ölçüde azalmıştır. Sadece doksorubisin grubunda miyofibriller disorganizasyonu, sarkoplazmik retikulumun parçalanması, düzensiz nükleer membranlar görülür iken doksorubisin ile birlikte silymarin verilen grupta kardiyomiyositler normal morfolojilerini korumuşlardır (150).

Puerarin: Önemli bir izoflavonoid türevi olan puerarin, Güneydoğu Asya ve bazı Pasifik adalarına özgü tırmanıcı bir asma bitkisi olan ‘kudzu’nun kökünde bulunur. Doksorubisin ile birlikte puerarin uygulanan grupta sadece doksorubisin uygulanan gruba göre hücre canlılığı daha fazla, LDH düzeyleri daha düşük, caspaz-3 aktivitesi baskılanmış saptanmıştır. Doksorubisin öncesi puerarin ön tedavisi hücre içi oksijen radikali oluşumunu ve MDA içeriğini önemli ölçüde azaltır. Aynı zamanda süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz seviyelerini yükseltir. Doksorubisin ile indüklenmiş kardiyomiyopatide serum CK- MB ve LDH düzeyleri artarken EKO’da sol yapıların büyüdüğü ve sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunun ciddi şekilde azaldığı

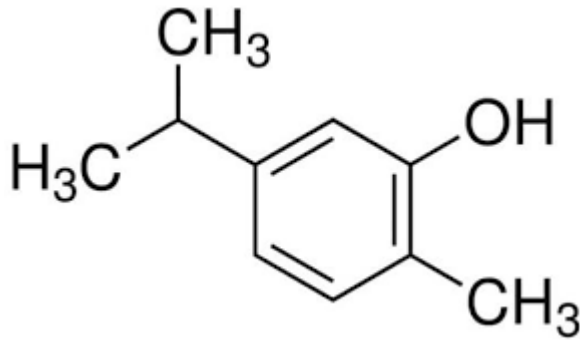
görülmüştür. Puerarin ön tedavisi, bu anormal fonksiyonel ve enzimatik değişiklikleri nötralize edebilmiştir (151).

Besinlerin doksorubisin ilişkili kardiyotoksisteki rollerini inceleyen bir çalışmada; E vitamininin oluşan EKG değişikliklerini nötralize ettiği, anti-oksidan defans mekanizmasını güçlendirdiği, serbest oksijen radikallerini ve bunun neticesinde oksidatif hasarı azalttığı tespit edilmiştir. All-trans retinoik asit (ATRA) tedavisi sonucunda, histopatolojik değişikliklerin gerilediği, hücre hasarını gösteren biyokimyasal değerlerin normale döndüğü, TNF-alfa ve IL-6 düzeylerinde düşüş yaşandığı, apoptozisin azaldığı, p53 seviyelerinin düştüğü görülmüştür. Beta karoten, Likopen ve selenyumun oksidatif hasarı azalttığı, anti-oksidatif savunmayı güçlendirdiği tespit edilmiştir (152).

2.3 KARVAKROL

2.3.1. Genel Bilgiler

Karvakrol (5-izopropil- 2- metilfenol) lipofilik özellikte, oda sıcaklığında (25 °C)'de 0,976 g/mL yoğunlukta, suda çözünmeyen, etanol, aseton ve dietil eter içerisinde yüksek çözünürlüğe sahip bir fenoldür (153). 2012 yılında Avrupa Komisyonu tarafından kimyasal aroma listesine dahil edilmiştir. 2017 yılında FDA tarafından toksikolojik olarak onay almıştır (154). 2018 yılında güvenli gıda katkısı olarak kategorize edilmiştir. Aynı zamanda ilaç, kozmetik ve parfüm endüstrisi de dahil olmak üzere geniş kullanım alanına sahiptir. Yapılan birçok çalışmada karvakrolün; anti-enflamatuvar, antioksidan, antimikrobiyal, analjezik etkileri gösterilmiştir (155-158).



Şekil 11. Karvakrolün biyokimyasal yapısı

2.3.2. Karvakrolün Antioksidan Etkinliği

Avrupa Birliği ölkelerinde yapılan çalışmalarda gıdaların raf ömürlerini uzatmak için kullanılan sülfitein çeşitli sağlık problemlerine yol açtığı tespit edilmesi üzerine hem anti-oksidan ve anti-mikrobiyal hem de gıda korumasını sağlayan bileşikler üzerinde çalışmalar yürütölmüş. Tiyobarbitürik asit testinde 300 ppm konsantrasyonda karvakrolün lipid peroksidasyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda uygulanan karvakrol konsantrasyonunun arttırılmasının lipid peroksidasyonunu daha da azalttığı ve böyle oksidatif streste belirgin düzeyde azalma gösterilmiştir (155).

2.3.3. Karvakrolün Antinosiseptif Etkinliği

2012 yılında yayımlanan bir çalışmada farelere hem intraperitoneal yoldan hem de intravenöz yoldan uygulanan karvakrolün hem periferik mekanizmalar (nitrik oksit/siklik guanozin monofosfat yolu) hem de santral mekanizmalar (opioid sistem) aracılığı ile antinosiseptif özelliği gösterilmiştir (156).

2.3.4. Karvakrolün Antibakteriyel Etkinliği

2008 yılında yapılan bir çalışmada elma bazlı yenilebilir filmler üzerine karvakrol ilave edilmesinin 49.gününde hem karvakrol hem de filmin kütlesinin değişmediği ve yapısını aynı şekilde koruduğu tespit edilmiş ve böylece karvakrolün Escherichia Coli O157:H7 suşuna karşı antibakteriyel etkinliği kanıtlanmıştır (157).

2.3.5. Karvakrolün Antienflamatuvar Etkinliği

2013 yılında yapılan bir hayvan çalışmasında 50 mg/kg dozda karvakrolün; oral olarak aldıktan sonra interlökin-10 salınımının indöklendiği, interlökin 1-beta (IL-1 β) ve prostanooidler gibi mediyatörlerin üretimini azaldığı ve böylece anti-inflamatuvar etkilere sebep olduğu kanıtlanmıştır. Yine aynı çalışmada 100 mg/kg dozda karvakrolün siklooksijenaz-2 (COX-2) ve IL-1 β mRNA ekspresyonunu düşürdüğu görölmüşür. Aynı zamanda freund adjuvanı kaynaklı fare pençesinde oluşturulan inflamasyonun da karvakrol aracılığı ile gerilediği saptanmıştır (158).

2.3.6. Karvakrolün Antitümör Etkinliği

2015 yılında insan kolon kanseri hücre hattı üzerine yapılan bir çalışmada karvakrolün matriks metalloproteinaz 2 ve 9'u baskılayarak, G2/M fazında hücre

siklusunu durdurarak, siklin B1 ekspresyonunu azaltarak, Bcl-2 ekspresyonunu down-regüle ederek, bax ve c-jun N-terminal kinaz ekspresyonunu up-regüle ederek, mitokondriyal apoptotik yolak ve MAPK ve PI3K/ Akt sinyal yolları aracılığı ile kolon kanseri hücrelerinde apoptozu indükleyerek anti-tümör etkinlik gösterir (159).

2.3.7. Karvakrolün Hepatoprotektif Etkinliği

2019 yılındaki bir hayvan çalışmasında karvakrol, karbon tetraklorür ile indüklenen karaciğer fibrozisini transforming growth factor beta sinyal yolağı üzerinden iyileştirmiştir. Aynı zamanda farelerin hem vücut hem karaciğer ağırlıklarını, serum biyokimyasal parametrelerini ve hepatik hidroksiprolini normalleştirildiği görüldü (160).

2.3.8. Karvakrolün Kardioprotektif Etkinliği

Kasım 2024 tarihli H9C2 fare kardiyomiyosit hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada lipopolisakkarit tarafından oluşturulan miyokard hasar modeli karvakrol kullanılarak gerilediği tespit edilmiştir. Karvakrolün kardioprotektif bu etkinliği, TLR4/MyD88/NF-κB yolu ve NLRP3 inflamazomuna atfedildi (161).

2.3.9. Karvakrolün Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkilerini Gösteren Çalışmalar

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada 25, 50 ve 75 mg/kg/gün uygulanan karvakrolün oluşturulmuş olan hipertrofik miyokard hücrelerinin boyutlarında azalmayı sağladığı ve kardiyak hipertrofiyi iyileştirdiği gözlenmiştir (162).

İnsan kardiyomiyositleri üzerine yapılan bir çalışmada 6.25-50 µM dozda uygulanan karvakrolün TLR4/NFκB/NALP3/IL-1β gibi inflamatuvar sinyal yollarını baskıladığı oksidatif stres ürünlerini azalttığı tespit edilmiştir (163).

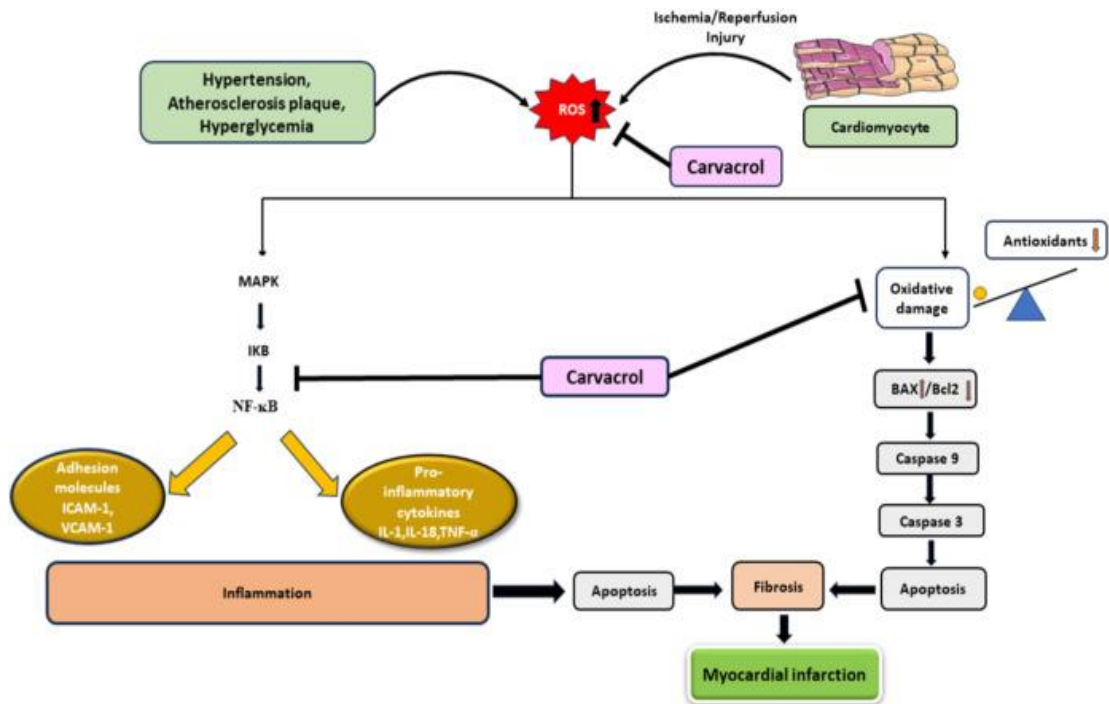
Diyabetik fare modelleri üzerindeki bir çalışmada 20 mg/kg dozda verilen karvakrolün PI3K/AKT sinyal yolağı aracılığı ile diyabetik kardiyomiyopati gelişme riskini azalttığı tespit edilmiştir (164).

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada 10, 25, ve 50 mg/kg dozda uygulanan karvakrolün antihipertansif ve antiapoptotik etkinliği kanıtlanmıştır (165).

Sıçanlar üzerindeki bir diğer çalışmada 5 ve 10 mg/kg dozda karvakrolün intraperitoneal uygulanması sonrasında inflamasyonun ve lipid peroksidasyonunun azaldığı glutatyon ve toplam antioksidan kapasitenin arttığı gösterilmiştir (166).

Sıçanlar ile yapılan bir çalışmada 50 ve 100 mg/kg karvakrolün intraperitoneal uygulanması sonrasında MAPK/ERK ve Akt/eNOS hücre içi sinyal yollarının aktive olduğu bunun sonucunda kalpteki infarkt alanında küçülme, süperoksit dismutaz ve katalaz düzeylerinde artış, kardiyomiyosit apoptozisinde azalma tespit edilmiştir (167).

Sıçanlar üzerine yapılan bir çalışmada 25, 50 ve 100 mg/kg uygulanan karvakrolün serum CK, LDH, troponin T seviyelerinde düşmeyi sağladığı, süperoksit dismutaz ve glutatyon seviyelerini arttırdığı tespit edilmiştir (168).



Şekil 12. Karvakrolün anti-inflamatuvar, antioksidan, antiapoptotik etkileri

2.4. C VİTAMİNİ

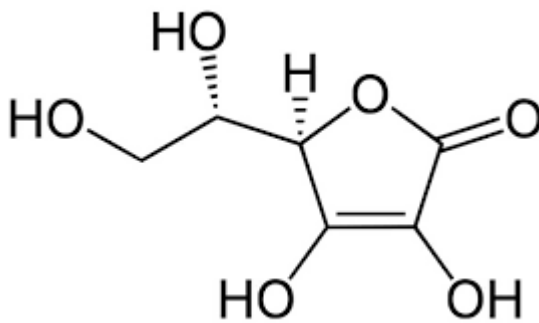
2.4.1. C Vitamininin Tarihçesi

C vitamini üzerine yapılan ilk çalışmalar 1900'lü yılların başlarına dayanır. Norveçli doktorlar Axel Holst ve Theodor Frolich gemi çalışanları üzerinde yaptığı

çalışmalarda uzun gemi yolculukları sonrasında gemicilerde ağız içi yaraların çok olduğunu ve bazı yeşil sebzelerin ve meyvelerin bu ağız yaralarını iyileştirdiğini fark etmişlerdir (169). 1910'lu yıllarda bu hastalığın adı skorbüt olarak koyulmuş ancak sebebi hala tam olarak anlaşılamamıştır. 1912 yılında Polonyalı biyokimyacı Casimir Funk besinlerde bulunan bir faktörün eksikliği sonucu skorbüt hastalığının olduğunu düşünmüş ve tam olarak ortaya koyamadığı bu maddeye antiskorbütik vitamin adını vermiştir (170). 1920'li yıllara geldiğimizde ise İngiliz Biyokimyacı Drummond antiskorbütik vitamin için vitamin C adını kullanmıştır. Zilva ve çalışma arkadaşları limondaki askorbik asidi izole ederek bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerini saptamışlardır. Zilva bu çalışmaları esnasında 2,6-diklorofenol-indofenolün (2,6-DCPIP), C vitamini çözeltisi tarafından indirgendiiğini bulmuştur. 1937 yılında Sir Walter Norman Haworth C vitaminin kimyasal yapısını açıklamış ve C vitamini üzerine yaptığı çalışmalarla Nobel Kimya Ödülü'nü kazanmıştır.

2.4.2. C Vitamininin Genel Özellikleri

C vitamini (Askorbik asit) bir monosakkarit türevidir. Altı karbonlu bir monosakkarit olması sebebiyle yapıca glukoza benzer. Renksiz bir yapısı, hafif bir kokusu, ekşi bir tadı vardır. Optike aktiftir ve polarize ışığı sağa çevirir. C vitamini suda özünür. Yağda, eterde, benzende çözünmez. Çoğu hayvanlar ve bitkiler kendi C vitaminlerini glukozdan üretebilirler. İnsanlar, ve bazı hayvanlar C vitaminini üretemedikleri için dışarıdan almak zorundadırlar. L-askorbik asit dışında üç tane daha stereoizomer vardır. Bunlar; D-askorbik asit, D-izoaskorbik asit, L-izoaskorbik asittir. Bu üç izomerin antiskorbütik aktiviteleri yoktur.



şekil 13. C vitamininin biyokimyasal yapısı

2.4.3. C vitamininin Antioksidan Etkinliği

Serbest radikal oluşumunu baskılar. NADPH oksidaz ve ksantin oksidaz seviyelerini azaltır (171).

Oluşan serbest radikallerin ortamdaki uzaklaşmasını sağlar. Süperoksit ve hidroksil radikallerini azaltır (172).

Lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkilidir. 4- hidroksinonenal, malondialdehit seviyelerini düşürür (173).

Eksojen antioksidanlar (Flavononlar, yeşil çay, curcumin) ile sinerjist etki gösterir. (174-176).

Pro- inflamatuvar faktörleri (İnterlökin 6-12, TNF- alfa) azaltır (177-179).

2.4.4. C vitamininin Kardiyoprotektif Etkinliği

2017 yılında sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada doksorubisin tedavisi verilen grup ile kıyaslandığında doksorubisin ile birlikte C vitamini verilen grupta ortalama vücut kütle kaybı daha az bulunmuştur. Kalp kütlelerinin vücut kütlelerine oranı da C vitamini verilen grupta daha fazla saptanmıştır. Doksorubisin kaynaklı taşiaritmiler C vitamini ile belirgin ölçüde gerilemiştir. C vitamini uygulaması doksorubisinin sebep olduğu sol ventrikül ejeksiyon fraksiyon düşüşünü azaltmıştır. C vitamini sistolik fonksiyonun yanında diyastolik fonksiyonlarda da iyileşme sağlamıştır. Doksorubisin ile tedavi edilen grupta kardiyomiyositlerde vakuol oluşumu, hücre yapısında düzensizlikler, miyobril sayısında azalma görölürken tedaviye C vitamini eklenen grupta bu değişiklikler minimal düzeyde görölmüştür. C vitamini doksorubisinin neden olduğu fibrozisi de büyük ölçüde azaltmıştır (180).

2.4.5. C vitamininin Antiapoptotik Etkinliği

Kalbin iskemiye uğraması sonucunda miyokardiyumda apoptozis meydana gelir. Yapılan çalışmalarda iskemiye uğramış kalplerde apoptozun en sık göröldüğu bölge enfarktöslü miyokard ile normal miyokardın sınır bölgesidir. Ortalama olarak bu sınır bölgesindeki hücre çekirdeklerinin %10'u ile %15'i apoptotik saptanır. C vitamini ile yapılan çalışmalarda sınır bölgesindeki apoptotik hücre çekirdeği miktarının %1'e kadar düştüğu saptanmıştır. Anti-apoptotik özelliklere sahip fosfoinositid-3 kinaz (PI3K) yolunun önemli bir bileşeni olan Serin/treonin kinaz Akt

(protein kinaz B) de iskemiden etkilenir. C vitamini verilen grupta bu yolak kontrol grubu ile benzer saptanmıştır. Koroner arter ligasyonu uygulanan sıçanlarda oluşan miyokardiyal iskeminin değerlendirilmesi ve c vitamininin buna etkisini araştıran bir çalışmada ligasyondan 40 dakika önce tek doz C vitamini uygulanan sıçanlarda enfarktüsün boyutu C vitamini uygulanmayanlara göre belirgin ölçüde daha az saptanmıştır. Aynı çalışmada C vitamini iskemiden sonra verilse bile yine de miyokardiyal korunmanın elde edildiği gözlenmiştir (181).

2.5. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hücre kültürü; hücrelerin ayarlanabilen şartlar altında, doğal ortamlarının dışında yetiştirilmesidir. Hücrelerin canlı kalmasını, büyümesini ve çoğalmasını sağlamak amacıyla ortamdaki aminoasit, karbonhidrat, mineral ve vitaminlerin varlığı çok önemlidir. Ayrıca hücrelerin optimal seviyede yaşamlarına devam edeceği karbondioksit, oksijen seviyeleri ortamın pH'ı ve sıcaklığı sürekli kontrol edilmesi gereken parametrelerdir.

2.5.1. Hücre Kültürü Tarihçesi

1900'lü yılların başlarında hücre kültürüyle ilgili çalışmalara başlayan Amerikalı histolog Ross Granville Harrison 1907 yılında kurbağa lenf sıvı içinde kurbağa sinir hücresi birkaç hafta boyunca yaşatmayı başarmış ve bu çalışma tarihteki ilk hücre kültürü denemesi olarak kayıtlara geçmiştir (182). 1912 yılında Fransız fizyolog ve cerrah Alexis Carrel embriyonik tavuk kalp dokularını kullanarak ilk hücre hattını oluşturmuştur (183). 1951 yılında Amerikalı biyolog George Otto Gey serviks kanseri olan bir hastasının dokusundan sonsuz çoğalma kapasitesine sahip HeLa hücrelerini meydana getirdi. Normal dokulardan oluşturulan hücre hatları sınırlı büyüme gösterirken, kanserli dokulardan elde edilen hücre hatlarının sonsuza kadar çoğalmayı başardığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu çalışma ilk insan hücre hattı çalışması olarak tarihe geçmiştir (184). Zaman ilerledikçe iki boyutlu hücre kültürleri tüm Dünya'da yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. İki boyutlu kültürler genellikle petri kapları kullanılarak yapılır. Hücreler buradaki yüzeye tek tabaka halinde tutunmuş durumdadır. Son yıllarda teknolojinin de ilerlemesi ile üç boyutlu kültür çalışmaları başlamıştır. Vericinin dokularından hücreler alınarak çok hücreli ve

üç boyutlu yapılarda kültürlenir. Üç boyutlu hücreler doku yapısını taklit ederek hücre-hücre ve hücre-çevre etkileşimlerini gözlemlemek amacıyla oluşturulur (185).

2.5.2. Hücre Kültürü Vasatı Tarihçesi

Hücre kültürü hazırlanması sırasında laboratuvar şartlarında hücrelerin normal metabolik işleyişini sürdürebilmesi için gerekli olan çevreyi sağlayan besleyici sıvıya vasat adı verilir. Aminoasit, glukoz, çeşitli vitamin ve mineralleri içerir. 1948 yılında Albert Fischer diyaliz edilmiş seruma bazı aminoasitleri ekleyerek hücrelerin metabolik olarak desteklendiği ilk hücre kültürü vasatını oluşturmuştur (186). 1955 yılında Amerikalı fizikçi ve patolog Harry Eagle, Fischer'in yönteminden esinlenerek; glukoz, galaktoz, aminoasitler, bazı vitaminler, yağ asitleri, çinko ve bakır gibi eser elementler içeren ilk kısmen kimyasal olarak tanımlanmış vasat olan Eagle's Modified Essential Medium (EMEM)'i geliştirdi (187). EMEM sonradan geliştirilen pek çok hücre kültürü vasatının temelini oluşturmaktadır. Örneğin günümüzde hala pek çok çalışmada kullanılan 1959 yılında Renato Dulbecco tarafından oluşturulan Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), EMEM'e göre dört kat fazla aminoasit ve vitamin konsantrasyonu içeren Eagle ortamının bir versiyonudur (188).

Ham serum yerine albümin ve fetuin kullanarak serumsuz koşullar altında F10 vasatını geliştirdi. F10'daki albümin ve fetuin yerine daha düşük ağırlıklı moleküller olan linoleik asit ve putrescine'yi kullanarak tamamen sentetik Ham's F12'yi geliştirdi. Bu, kimyasal olarak tanımlanmış ve tamamen sentetik ilk vasat olma özelliği taşır (189). 1979 yılında Mather ve Sato, Dulbecco ve Ham's F12'yi karıştırıp içine ek olarak bazı büyüme faktörlerini ilave ederek günümüzde de sıkça kullanılmaya devam eden DMEM/F12 adlı yeni bir formülasyon oluşturdular (190).

2.5.3. Hücre Kültürü Ortam Şartları

Hücre kültürü çalışmalarında başarının yakalanabilmesi için ortamın sıcaklığı, pH değeri, oksijen ve karbondioksit düzeyleri ortamdaki glukoz konsantrasyonunu optimal seviyelerde tutmak gerekir. Genel anlamda hücre kültürünün başarılı bir şekilde çalışıp hücrelerin yaşayıp çoğalabilmesi için ortamda; gerekli besinlerin, mineral ve vitaminlerin bulunması ortamın sterilitesi için antibiyotik eklenmesi gerekmektedir (191-192).

Osmotik dengenin sağlanabildiği bir ortam oluşturulmalıdır. Genellikle vücut sıvılarına yakın osmolaritede bir ortam oluşturulmaya çalışılır. Bu amaçla sodyum, potasyum, magnezyum, kalsiyum, çinko, selenyum, demir ve bakır değişik konsantrasyonlarda karıştırılır. Esas osmolarite belirleyiciler sodyum ve potasyum iken diğer elementler enzimatik reaksiyonlar için ko-faktör görevi görürler.

Ortama enzim kofaktörü olması, antioksidan etkinliklerinden yararlanmak veya hormon olarak görev yapmaları için vitaminlerin eklenmesi gerekmektedir. İn vivo olarak sentezlenemedikleri için hücresel ihtiyaçların karşılanması amacıyla dışarıdan eklenmelidir.

Enerji kaynağı olması, hücrelerde sinyal iletiminde, madde taşınmasında, biyosentezinde görev almaları, hücre membranı yapısında yer almaları nedeniyle ortama lipidlerin eklenmesi gerekmektedir.

Serum; hormon, transport proteinleri, büyüme faktörleri içermesi nedeniyle kullanılır. Bunun yanında bakteri, virüs, toksin, prion içirme ihtimalleri nedeniyle dezavantajları da vardır. Mikrobiyal komponent içerebilme ihtimallerine karşı işlenmiş ve olası mikropların inaktive edilmiş serumların kullanılması önerilmektedir. Hücre kültürü oluştururken, hücre büyümesini destekleyen madde içeriği daha fazla olması nedeniyle en sık fetal sıgır serumu (FBS) kullanılır. Daha az sıklıkla at ve domuz da kullanılabilir. Serum ışıktan korunmalı ve dondurulmuş olarak saklanmalıdır. Her ne kadar vasat oluşturmak için serum çok önemli bir parça da olsa birçok hücre hattı, serumsuz vasat kullanılarak özel olarak tasarlanmış ortamda büyütülebilir (193). Serumsuz vasat kullanımı birçok bulaşıcı materyalin ortama girmemesini sağlar. Genel anlamda serumsuz vasatlar; hidrolizatlar, aminoasitler, vitaminler ve inorganik tuzlardan oluşur.

İnsülin ve insülin analogları, serumsuz vasatta kullanılan en yaygın büyüme faktörleri arasındadır. Bununla birlikte hücre çoğalması üzerindeki etkilerinin hemen hemen her zaman serumdan daha düşük olduğu bulunmuştur.

İn vitro çalışmalar sırasında ortamın sterilitesini sağlamak, kontaminasyonu önlemek amacıyla vasat ortamı için antibiyotik önemli bir unsurdur. Standart hücre kültürü protokolünde önerilen penisilin (100U/mL) ve streptomisin (100µg/mL) kombinasyonu, en sık kullanılan antibiyotik takviyelerindendir (194). Bunun yanında

gentamisin ve amfoterisin B de sıklıkla kullanılır. (195). Eklenen antibiyotiklerin sitotoksositeye sebep olma ihtimalleri göz önünde bulundurulmalıdır.

2.5.4. H9C2 Hücre Hattı

Embriyonik sıçan kalp hücrelerinin H9C2 hattı, Kimes ve Brandt tarafından 1976 yılında embriyonik BDX1 sıçan kalp dokusundan türetilen orijinal klonal hücre hattının bir alt klonal hattıdır (196). Bu hat, hücrelerin morfolojik parametreleri olgunlaşmamış embriyonik kardiyomiyositlere benzediği için çok sayıda in vitro çalışmada yaygın olarak kullanılmaktadır (197-199). Bu hücreler olgun kalp kası hücrelerine farklılaşmak için gerekli olan sinyal yolu bileşenlerine sahiptir. H9C2 hücre hattı, doksorubisin gibi miyosit hasarına sebep olan antikanser ilaçların mekanizmalarını değerlendirmek için sıklıkla kullanılır. Embriyonik H9C2 kardiyomiyositleri in vitro koşullarda iyi çoğalır ve kültüre edilmesi nispeten kolaydır (192). Bununla birlikte, ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarının aksine kardiyomiyositler sınırlı sayıda pasaj için kültürlenebilir. Yaşlanma süreci sırasında hücre parametrelerinin değişkenliği, çalışmanın tekrar edilebilmesi açısından önemlidir (200). Bu hattın yaygın kullanılmasına rağmen, hücrelerin yaşlanma hızı ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır. Yapılan bir çalışmada hücrelerin onuncu pasajlanmasından sonra çekirdeklerinde genişleme hücre morfolojisinin iğsi şekilden ameboid şekle dönüşme eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Yapılan her pasajlama işlemi sonrasında çekirdeklerin daha da genişlediği, hücrelerin iğsi yapılarının bozulduğu, granüllerin sayısının arttığı görülmüştür (201).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. KULLANILAN KİMYASALLAR VE SARF MALZEMELER

DMEM (HG NutriCulture, Ecotech Bio, High Glucose), Fetal Bovin Serum (Capricorn-FBS-HI-11B), Phosphate buffered saline (PBS- Ecotech Bio), Trypsin-EDTA (25200056-Thermo), Doksorubisin (Targetmol-T1020), Carvacrol (Targetmol-T4S1990), L-Ascorbic acid (Mevchem-MVK.100220.0250), pipet ucu 1000 ul (VONDER), antibiyotik (Penisilin/streptomisin – Ecotechbio-PS100), Steril kültür kapları (Petri), 6 kuyucuklu hücre kültür kabı (Jetbiofil), 96 kuyucuklu hücre kültür kabı (Greiner), 96- Kuyucuklu PCR Array Plak (Thermo), T25 flask ve T75 Flask (LLG), DMSO (Carlo-Erba- CE.445106) Caspase 3 Peptide (Affinity Bio Cat:AF6311), Bcl-2 peptide (Affinity Bio Cat:AF6139), Bax peptide (Affinity Bio Cat:AF0120A), TGF- β peptide (Affinity Bio Cat:AF1027), TIMP1 peptide (Affinity Bio Cat:AF7007), TIMP2 peptide (Affinity Bio Cat:AF0264), MMP2 (Cat: FNab 05238, Lot:20210302, FineTest, Wuhan Fine Biotech Co., Ltd, China)

3.2. KULLANILAN CİHAZLAR

Biological Safety Cabinets Class II Laminar Flow (Nuaire), CO₂'li inkübatör (Nuaire), Otomatik mikropipetler (10, 20, 100, 200, 1000 μ l'lik) (Biohit), inverted Mikroskop (Olympus), Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 (Thermo), , -20 Derin Dondurucu (BEKO), -80°C Dondurucu (Nuaire), No Frost Buzdolabı (BEKO), Santrifüj (Hettich Zentrifugen), Mikro Santrifüj (Hettich Zentrifugen), Soğutmalı Santrifüj (Hettich Zentrifugen), Hassas Terazı (Denver Instrument), RT- PCR (Thermo Scientific PikoReal 96 Otoklav (Nuve), Vorteks (IKA Yellow Line), Güç Kaynağı(Bio-Rad).

3.3. KULLANILAN KİTLER

Cell Proliferation Kit (XTT) (Biotium, Cat: 30007), cDNA Synthesis (Applied Biological Materials Inc., Cat: G236), A.B.T.[™] 2X qPCR SYBR-Green MasterMix (with ROX) (A.B.T LOT: W2C0223-Q10), UltraVision LP Detection System HRP DAB (Thermo Cat: TL-060-HD), Anti-Polyvalent, HRP Sekonder Kit(Patolab, LOT:DB2406).

3.4. H9C2 HÜCRE HATTININ TEMİNİ VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

Çalışmamızda kullanılan hücreler daha önce ATCC'den alınan ve çoğaltılıp dondurularak saklanan kendi hücre stoklarımızdan kullanılmış olup deneyler Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvarında yapılmıştır.

H9C2 hücre hattının rutin kültür basamakları; hücrelerin flask içinde kültür ortamına ekilip çoğaltılması ve belirli bir yoğunluğa eriştikten sonra pasajlanması, ekim için sayım işleminin yapılması, kullanılacak uygun kültür plakalarına ekimin yapılması, dondurulma işlemi ve çözölmeyi kapsamaktadır.

Hücre için kullanılan besiyerleri; hücrelerin in vitro ortamda yaşama, büyüme ve çoğalma için gereksinim duydukları maddeleri içermelidir. Çalışmamızda kullanılan besiyeri, %10 FBS, penisilin+ streptomisin içeren DMEM besiyeridir. Pasajlama işlemi sırasında hücrelerin canlılığı ve çoğalması inverted mikroskop ile izlendi. Hücreler 37°C de %95 nem ve %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi, % 80-90 yoğunluğa eriştiklerinde deneylere başlandı.

İlk olarak hücreler T25 flaskta üretildi. Çoğaltılma ve pasajlama işleminde; RPMI 1640 besiyeri ile T75 flaska ekildi. 37°C de %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde iki günde bir besi ortamları değiştirilerek inkübe edildi. Tek katman halinde tutunarak üreyen hücrelerin pasajlanması için yapıştıkları yüzeyden kaldırılması gerekmektedir. %80-90 yoğunluğa ulaşan flasklar ölü hücrelerin ve hücre artıklarının ortamdan uzaklaşması için PBS ile yıkanıp aspire edildi. Ortama tripsin eklenerek hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlandı. Flask içindeki ortam-hücre karışımı 15 ml'lik falkonlara aktarıldı. 1500 G'de 4 dakika santrifüj edilip üzerindeki süpernatant alındı. Dipte pellet oluşturan hücreler 5 ml besiyerinde karıştırılarak uygun miktarda flasklara ekilerek yeniden yapışıp çoğalmanın sağlanması için inkübasyona bırakıldı. Tripan mavi boyası ile flaska ekilmeden önce hücre sayımı yapıldı. Ölü hücrelerin membranlarından geçebilen tripan mavisini boyası hücreleri maviye boyarken canlı hücreleri boyayamadığı için boya almamış hücreler beyaz renkte görülür. Ependorfta, 5 µl hücre süspansiyonunun içine 45 µl tripan mavisini eklenerek hücreler 10 kat dilüe edildi. Bu karışımdan 10 µl alınarak Neubauer lamına eklendi. Canlı hücrelerin sayılma işlemi hücre ekim işlemi yapılacak her deney için ayrı ayrı yapıldı.

Hücreler DMSO kullanılarak, kriyotüpler içinde dondurularak saklandı. Dondurulma işlemi için hücreler tripsin aracılığı ile flasktan kaldırıldı. Santrifüj işlemlerinden sonra 2 ml hacimli kriyotüplere besiyeri ile süspanse hücre karışımından 950 mikrolitre, DMSO'dan 50 mikrolitre konularak önce +4 C°de 10 dakika, daha sonra – 20 C°de 60 dakika bekletildi, daha sonraki çalışmalar için -80 C°de saklandı.

Dondurulmuş hücrelerin yeniden çözülüp ekilmesinde, kriyotüpteki hücreler hızlı bir şekilde 37°C de su banyosunda çözülüp biraz taze besi yeri eklenerek önce santrifüj edildi, DMSO içeren besi yeri uzaklaştırıldı. Ardından yeni besi yeri eklenip, kültür kaplarına ekilip, uygun kültür ortamında inkübe edildi.

3.5. HÜCRE CANLILIĞI TESTİ (XTT)

DOX'un değişen dozlarda H9C2 hücrelerine uygulanıp zamana ve doza bağımlı olarak hücre canlılığının tespiti ve hücrelerin yüzde ellisinin yaşadığı dozu (IC₅₀) saptamak için XTT hücre proliferasyonu testi kullanıldı.

XTT (2,3-bis (2-methoxy-4 nitro-5- sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) suda eriyebilen bir maddedir. Canlı hücrelerde formazon isimli metabolitlerine dönüşerek turuncu renk alır. Turuncu renk yoğunluğunun spektrometrede ölçülmesi ile canlı hücrelerinin sayısı belirlenir.

Kullandığımız maddenin sitotoksitesi ve doz ile zamana bağlı etkisi “BI (Biological Industries) Cell Proliferation Kit XTT based Colourimetric Assay” ile yapıldı. DOX çeşitli dozlarda %10 serumlu tam besi ortamında 1/1000 oranında DMSO içinde çözüldü ve konsantrasyonları ayarlanarak etkileri araştırıldı. Seçilen konsantrasyon aralığı literatür bilgileri dikkate alınarak belirlendi test kit protokolüne göre gerçekleştirildi.

Hücreler 96 kuyucuklu plak içine yerleştirildi ve RPMI içine ekildi. Hücreler 37°C de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. 24.saatın sonunda medyum aspire edildi. Ardından DOX için 1,25 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 50 µM, 60 µM, 75 µM çalışma konsantrasyonları %10 FBS içeren tam besi ortamı içinde hazırlandı. Hazırlanan dozlar 100 µl besiyeri ortamı içinde kuyucuklara uygulandı. Zamana bağlı etkiyi araştırmak için 24., 48. ve 72. saatler için aynı dozlar uygulandı. 24 saat sonunda her kuyucuk için 100 µl besi yeri, 50 µl XTT reagent solution A, 1 µl XTT activator solution (aktivatör) karışımı hazırlanıp kuyucuk başına 150 µl ilave

edildi (Kit kullanımına göre). Sonrasında hücreler 37°C de %5 CO₂ içeren inkübatörde 4 saat inkübe edildi. Absorbans değerleri ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okundu. Hücre canlılığı yüzdesi her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile hesaplanarak IC₅₀ oranı belirlendi.

Hücre canlılığı (%) = (Madde uygulanan grubun absorbans değeri /Kontrol grubunun absorbans değeri) x100

Deney Grupları:

Kontrol Grubu

Sadece doksorubisin uygulanacak grup

Sadece karvakrol uygulanacak grup

Sadece C vitamini uygulanacak grup

Doksorubisin ve karvakrolün beraber uygulanacağı grup

Doksorubisin ve C vitamininin beraber uygulanacağı grup

Doksorubisin ile C vitamini ve karvakrolün beraber uygulanacağı grup

3.6. WOUND HEALING (YARA İYİLEŞME) DENEYİ

Hücre migrasyonunu ve hücreler arası etkileşimini incelemek için yapılan bir deney olan yara iyileşme deneyi, miyosit hücrelerinde doksorobisine karşı kullandığımız karvakrol ve C vitamininin etkisini belirlemeyi amaçladı. Hücre migrasyonu deneyi için altı kuyucuklu plakaya %100 confluent olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Hücrelerin plak yüzeyine tutunması sonrası besi yeri kaldırılıp PBS ile üç kez yıkandı. 200 µl lik pipet ucu yardımı ile "+" şeklinde plak zeminine çizim yapılacak olup sonrasında PBS ile tekrar yıkanarak grupların belirlenen dozları besi yeri içinde uygulandı. 0, 16 ve 24 saatte 4X büyütme ile resimler çekilerek deney grupları için gerekli analiz yapıldı.

3.7. İMMÜNOHİSTOKİMYA

Miyosit hücreleri her bir chamber slide'da 40.000 hücre olmak üzere, sekiz kuyucuklu chamber slide' lara ekildi. Ekilen hücrelerin yapışması için 24 saat beklenildi. Hücreler yapıştıktan sonra besiyerleri çekilerek -20°C' de metil alkolle 5 dakika fikse edildi. Sonra oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan hücrelere

ışıktan koruyarak enzim blok için %2 hidrojen peroksit eklendi. Yarım saat bekletildikten sonra 3 kere Fosfat Buffer Saline (PBS) ile yıkandı. 10 dakika boyunca aldığımız kite göre uygun sürede protein blok solüsyonu uygulandı. Prosedürüne göre Caspas-3, Bax, Bcl-2, TGF-Beta, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 primer antikorları uygulanıp 1 gece 4°C'de inkübe edildi. 3 kere PBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikor solüsyonu kitle yazan süre boyunca uygulandı. Tekrardan 3 kere PBS ile yıkandı ve hücreler kitin önerdiği süre boyunca HRP enzimine maruz bırakıldı. Enzimden sonra 3,3 diaminobenzidine (DAB) solüsyonu kite göre hazırlandı ve her kuyucuğa 400 mikrolitre damlatıldı. Karşıt boyama olarak hematoksilin kullanıldı. Chamber slide forceps yardımıyla kaldırılıp lam üzeri lamelle entellan ile kapatılıp ışık mikroskop altında incelendi. TUNEL testi için hücreler, 8 Chamber well plate'e ekildi. Her bir odacığa içine 30x1000 hücre olacak şekilde hücreler eklendi. Her grup üçlü tekrar olacak şekilde etkili bulunan IC50 doz ve zaman aralığında inkübe edildi. Hücreler -20 °C'de 5 dk metil alkol ile fikse edildi ve hücre apoptozu, TUNEL kit protokolüne göre analiz edildi. 3 kere ikişer dakikalık aralıklarla PBS ile yıkama yapıldı. 0,2% Triton X-100, Tween-PBS Çözeltisi ile 30 dakika bekletildi. (%0,2 olacak şekilde Tween-PBS içerisinde seyreltildi) (0,5 ml Tween 20 ve 2 ml Triton X-100, 1 L PBS' ye ilave edilerek). Proteinaz-K 50 µl ilave edilip 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. PBS ile yıkama 3 kere 2 şer dakika yapıldı. Pre-incubation buffer solüsyonunda 10 dakika bekletildi. TdT reaction: TdT Reaction Mixture 2 saat 37 °C de nemli ortamda (5µl TdT Enzyme reagent-45µl TdT Label Reagent karıştırılarak) 1 saate inkübe edildi. PBS ile 3 kere 2 şer dakika yıkama yapıldı. 50 µl Background reducing buffer solüsyonunda oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. PBS ile 3 kere 2 şer dakika yıkama yapıldı. Staining buffer solüsyonunda 1 saat 37 °C nemli ortamda inkübe edildi. PBS ile 3 kere 2 şer dakika yapıldı. Hematoksilinde 30 saniye bekletildi. Akar suda yıkama yapıldı. Ksilen beşer dakika iki kere bekletildi. Entellan ile kapama işlemi uygulandı. Sonrasında ışık mikroskobu ile görüntüler değerlendirildi. Boyama sonrası lamlarda hücre değerlendirmesi yapıldı. Sayım alanları rastlantısal olarak seçildi.

3.8. TRİZOL REAGENT İLE TOTAL RNA İZOLASYONU

Gen düzeyinde ekspresyon değerlendirmek için kontrol ve doz gruplarında RNA izolasyonu uygulandı.

1. Her kuyucuk başına 3×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plaklara hücre ekimi uygulandı. XTT ile tespit edilen IC_{50} dozları ve kontrol gruplarına madde uygulaması sonrası belirlenen IC_{50} süresi kadar inkübe edildi.

2. Hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarından, bir kuyucuk başına 500 μ l olacak şekilde Trizol ilavesiyle scraper kazıyıcı kullanılarak tamamen kaldırılıp ependorf tüplere (1 ml'lik) alındı.

3. Her ependorf tüpe 200 μ l kloroform eklenip ve iyice pipetlenip, vortex yapıldıktan sonra tekrar oda sıcaklığında 15 dakika süreyle inkübe edildi.

4. Soğutmalı santrifüj ile $+4^{\circ}C$ ' de 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilip renksiz olan üst faz toplandı, ependorf tüplere aktarıldı.

5. Toplanan üst fazın üzerine 250 μ l izopropanol eklenip pipetlendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyonu yapıldı.

6. Soğutmalı santrifüjde $+4^{\circ}C$ 'de 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüje edildi.

7. Peletin üzerine 500 μ l moleküler biyolojik grade %70'lik ethanol eklendi.

8. Soğutmalı santrifüjde $+4^{\circ}C$ 'de 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüje edildi.

9. Süpernatant atılıp pelet kısa bir süre hava ile kurutuldu.

10. Pellet 40 μ l RNase-DNase free water aracılığı ile çözüldü.

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazı (Thermo) yardımı ile tespit edildi.

Nanodrop cihazı RNA konsantrasyonlarını otomatik olarak hesaplamaktadır. Hesaplama işlemini $260 \text{ nm Abs} \times 40$ formülasyonuna göre yapmaktadır. İzole edilen RNA'ların saflıkları spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm ile yapılan ölçümlerin karşılaştırılması ile hesaplanır. 260/280 oranı, örneklerin saflığı ile ilgili tahmini bir karşılaştırma yapar. Doğru örnek kalitesini değerlendirmek için 260/280 oranları, genel spektral kalite ile birlikte analizlenir. Elde edilen RNA'lar ependorf içerisinde $-20^{\circ}C$ 'de saklandı.

3.9. cDNA SENTEZİ

İzole edilen RNA'lardan, cDNA sentezi cDNA Synthesis Kit with Rnase Inhibitor (High Capacity) ile oligo d(T) primeri ve Revers Transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak yapıldı. Üretici firmanın protokolüne göre işlem basamakları uygulandı.

Kit içeriği:

1. RTase (200U/μl)
 2. 10X Reaction Buffer
 3. RNase Inhibitor (40U/μl)
 4. 20X dNTP mix (2.5mM each)
 5. Random hexamer (50pM)
 6. RNase free water
- Total RNA: 10ng-5μg
- Poly(A)+ RNA: 1ng-500ng

Protokol:

1. 2X RT master mix hazırlanışı: hacim toplamı 10 μl olmalı

Without RNase inhibitor		With RNase inhibitor
10X Reaction Buffer	2 μl	2 μl
20X dNTP mix	1 μl	1 μl
Random hexamer	2 μl	2 μl
WizScript™ RTase	1 μl	1 μl
RNase Inhibitor	-	0,5 μl
RNase free water	4 μl	3,5 μl

(İşlemlerin hepsi buz üstünde yapıldı)

2. 10 μl 2X RT master mix'den mikrosantrifüj tüpe alındı.

3. 10 μl RNA örneği eklendi ve pipetlendi.

4. Mini santrifüj ile baloncuklar elimine edildi.

5.Termal cycle'a yerleştirildi. Termal cycle programı:

25 °C → 10 dakika

37 °C → 120 dakika

85 °C → 5 dakika

+4 °C de → bir süre kalabiliyor

Termal cycle sonrası ependorflar RT-PCR yapmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

3.10. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Gen ekspresyon ürününün kantitasyonu için kullanılan hassas moleküler bir metottur. Bu yöntem ile RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilir ve çok sayıda örnek çalışılabilir. Gerçek zamanlı PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon esnasında yapılır. Çalışmamızda 96 kuyucuklu mikropłaka okuyabilen RT-PCR sisteminden yararlandık. DOX, CAR, C vit muamelesi sonrasında ilgili hücre dizini kullanılarak, apoptozda rol alan genlerin (Caspaz-3, Bax, Bcl-2, TGF-beta, MMP-2, TIMP1, TIMP2) RNA düzeyindeki ekspresyonları belirlendi. Hücre dizininden total RNA izolasyonu yapıldı, ardından elde edilen RNA'ların miktar ve kalitesi değerlendirildi. Sonrasında, total RNA'lardan cDNA Synthesis Kit (High Capacity) with Rnase Inhibitor ile cDNA sentezi yapıldı. Bu yöntemle aynı anda ve kantitatif olarak RT-PCR (Thermo Scientific PikoReal 96) ile analiz yapılabilir. Her panelde referans-housekeeping genler PCR kontrol grubunda yer alarak hedef genlerdeki rölatif değışikliğı analiz etme fırsatı sağlamaktadır. PCR sırasında oluşturulan amplikonlar, doğrudan logaritmik artışa geçtikleri döngü sayısına göre değerlendirildi. Önce konsantrasyonları bilinen beta aktin ve diğer housekeeping genlerin bir standart amplifikasyon eğrisi oluşturuldu ardından çalışılan örnekteki geçiş noktasına göre cDNA'nın rölatif miktarı kantitasyon software tarafından belirlendi. Elde edilen veriler Cq olarak kaydedildi. Analizi gerçekleştirilen apoptoz ile ilişkili genlerin ve referans gen olarak normalizasyonda kullanılan housekeeping genin (GAPDH) primer dizileri Tablo 4'te gösterilmiştir.

Gerçek zamanlı PCR ile kontrol grubu ve deney grupları arasındaki hücre döngüsünde rol alan genlerin ekspresyonlarının nasıl değıştiğı custom olarak dizayn edilen plaka ile belirlendi (Sentebiolab).

Tablo 4. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu uygulanan genlerin primer tasarımı

Gen Adı	Primer Sekans	Ürün Boyutu	Katılım Numarası
GAPDH	F:5'-TCTTGTGCAGTGCCAGCCTC-3' R:5'- CAAGAGAAGGCAGCCCTGGT-3'	102	NM_017008.4
Bax	F:5'- CTGACATGTTTGCAGACGGC -3' R:5'- TGGTAAGCCTCTTGAGACCC -3'	222	XM_063281064.1
Bcl-2	F:5'- GAGGGGCTACGAGTGGGATA -3' R:5'- CGGTAGCGACGAGAGAAGTC -3'	243	NM_016993.2
Caspase-3	F:5'-GGAGCTTGGAACGCGAAGAA-3' R:5'-ACACAAGCCCATTTCAGGGT-3'	169	NM_012922.2
TGF-Beta1	F:5'-TTGGAGCCTGGACACACAGT-3' R:5'-GGCTTGCGACCCACGTAGTA-3'	135	NM_021578.2
MMP-2	F:5'-GGTACTGGACCCACGCCTAC-3' R:5'-AAGGGACCTGTGGGCTTGTC-3'	161	NM_031054.2
MMP-9	F:5'- ATCCCCAGAGCGTTACTCGC-3' R:5'- TGGTTCACCCGGTTGTGGAA-3'	142	NM_031055.2
TIMP-1	F:5'-CGGACTCCTAGAGACACGCT-3' R:5'-GAGGATGCCAGAGGCCAGAG-3'	113	XM_039099407.2
TIMP-2	F:5'-CTCGGCCTCCTGCTGCTG-3' R:5'-ACCTCCTTCTCGTCACTGC-3'	131	NM_021989.3

Tablo 5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon karışımı

Gerçek Zamanlı PZR Reaksiyon Karışımı (96 kuyucuklu plaka için; bir reaksiyon)	
Master Mix	5 µl
cDNA	1 µl
Nükleaz Free Water	3,4 µl
F-R mix den	0,6 µl
Son Hacim	10 µl
(Bir kuyucuk için 10 µl koyuyoruz)	

Firmanın belirtmiş olduğu (Sentebiolab) sulandırma katsayıları doğrultusunda 100 pmol'luk reverse ve forward ana stoklar elde edildi. Sonrasında 10 pmol'luk PCR stokları oluşturuldu. Bunun için; 10 µl Forward, 10 µl Reverse, 80 µl Nükleaz Free Water“dan alınıp 100 µl lik 10 pmol'luk PCR için hazırlanmış stok oluşturuldu. Hepsi deney zamanına kadar -20 °C de saklandı.

3.11. TUNEL TESTİ

Doksorubisin sitotoksitesine karşı karvakrol ve C vitamininin H9c2(2-1) hücrelerine etkisini değerlendirmek için, 8 well chamber slide'a her bir kuyucuğa 30.000 hücre olacak şekilde ekilip, hücrelerin yapışması beklendi. Her grup üçlü tekrar olacak şekilde etkili bulunan IC50 doz ve zaman aralığında inkübe edildi. Hücreler - 20 C'de 5 dk methanol ile fikse edildi. Fikse edilen hücreler Elabsience (FITC) kit protokolüne uygun olarak boyandı. Kit protokolü şu şekildedir:

1. Fikse edilmiş chamber 3x5dk 1x pbs ile yıkanır.
2. %0,2 triton x (1x pbs ile hazırlanmış) ile 37°C de 10 dk permeabilize edilir.
3. 3x5dk 1x pbs ile yıkanır.

Pozitif kontrol	Negatif kontrol/test grubu
100µl 1x dnaase buffer 5dk oda ısısında	100µl 1x dnaase buffer 5dk oda ısısında
100µl dnaase 1 working solution (200u/ml) 37°de 30dk	100µl 1x dnaase buffer 5dk 37°de 30dk
3x5dk pbs ile yıkama	3x5dk pbs ile yıkama

4. Labeling protokol: 100µl tdt equilibrium buffer 37°de 30dk (bu aşamadan sonra örneği sakın kurutma.)
5. Labeling working solution hazırlanır.

Test/pozitif kontrol	Negatif kontrol
Tdt eq.buffer 35µl	40µl
Labeling solution 10µl	10µl
Tdt enzim 5µl	-

50µl labeling working solution 37°C de 120dk karanlık ve nemli ortamda

6. 3x5dk 1x pbs ile yıkanır.
7. Dapı solusyonu ile inkübe edilir (oda sıcaklığında 5 dk karanlıkta).
8. 4x5 dk PBS ile yıkanır.
9. Lamel ile boyamanın üstü kapatılır.

Boyamalar immunofloresan mikroskop altında incelendi. Mikroskopta 20x büyütmede 10 rastgele alan sayılarak apoptotik indeks (AI) hesaplandı. Apoptotik indeks ise istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

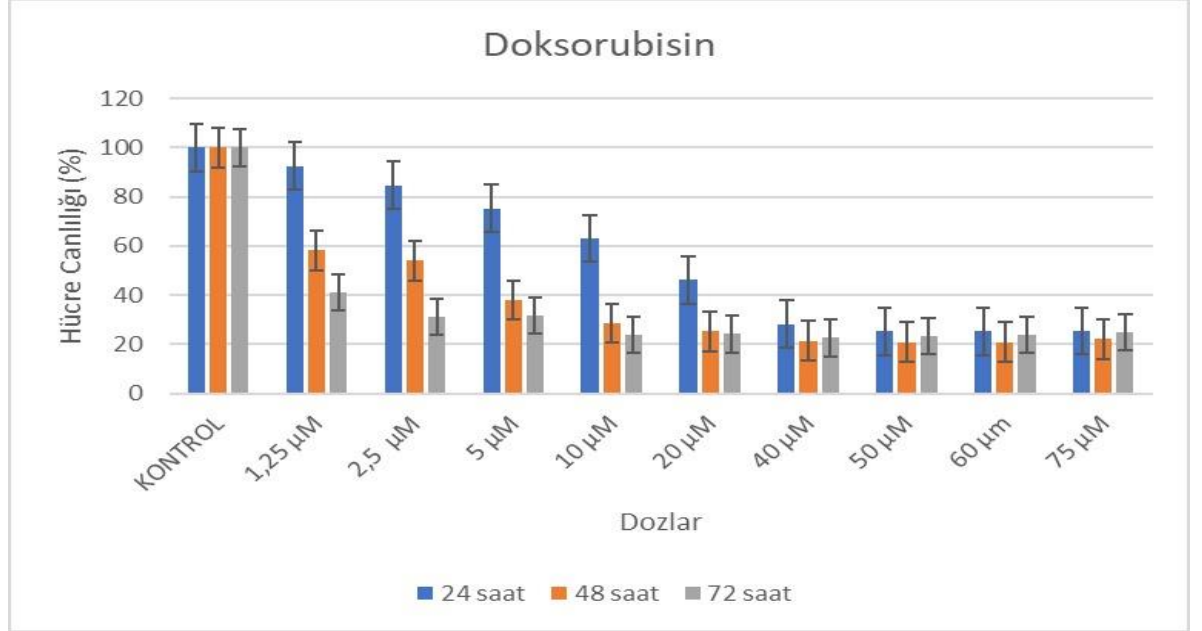
3.12. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Tüm deneyler her tedavi grubu için üç kez tekrarlandı (n=3). Veriler SPSS 24.0 paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma, ortanca (en küçük -- en büyük değerler) ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında tek yönlü ve çift yönlü Varyans Analizi (ANOVA, F), Post-hoc olarak Tukey kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. XTT TESTİ SONUÇLARI

H9C2 hücre hattında farklı dozlarda DOX verilerek yapılan XTT testinde, DOX'un değişen doz aralıkları ve zamana göre etkisi Şekil 14'te görülmektedir.

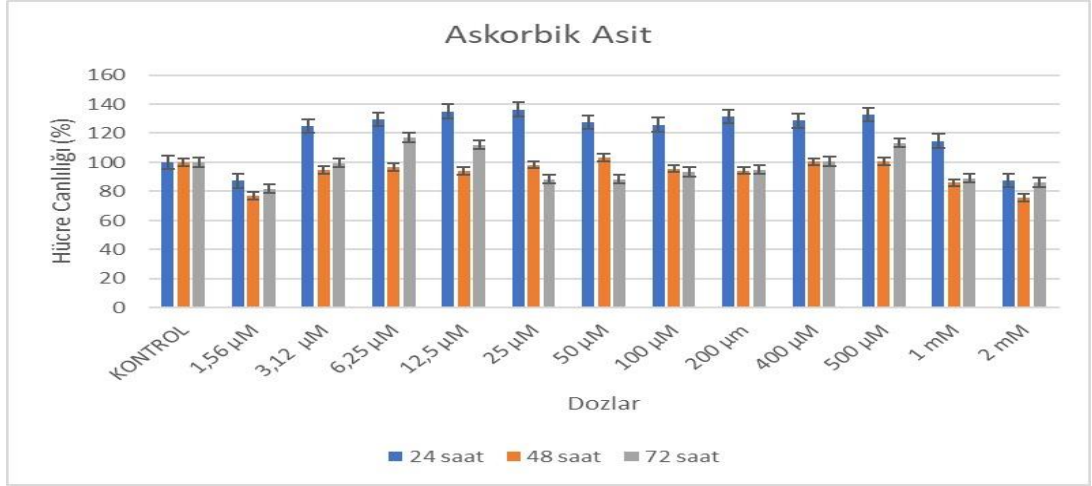


Şekil 14. DOX'un çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi

DOX'un uygulanan en düşük doz olan 1,25 µM'den itibaren hücre canlılığı azaldı ve DOX'un artan dozlarında hücre canlılığına olan etkisi arttı. Hücrelerin %50'sinin öldüğü DOX dozu (IC50 değeri) 24. saatte 14,71 µM, 48.saatte 1,18 µM, 72.saatte ise 0,272 µM olarak saptandı. Artan dozlarda sitotoksite artmasına rağmen 40 µM ve sonraki dozlarda hücre canlılık yüzdesinin plato çizdiği görüldü.

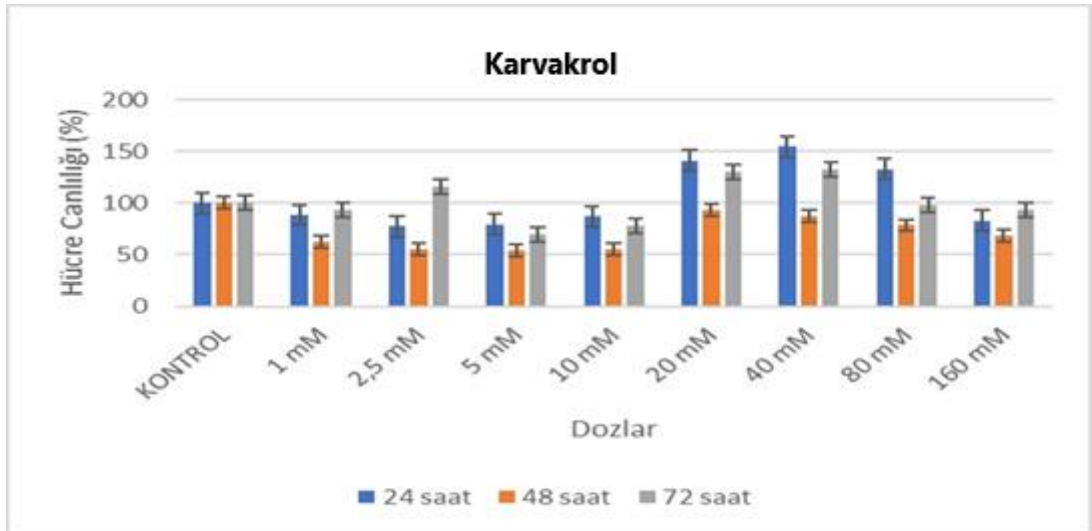
Aynı doz DOX'un 24., 48., ve 72. saatlerde hücre canlılığına etkisi incelendiğinde sitotoksik etkinin zamanla arttığı saptandı.

H9C2 hücre hattında farklı dozlarda C vitamini ve karvakrol ayrı ayrı verilerek bu iki maddenin değişen doz aralıkları ve zamana göre etkisi değerlendirildi. Sonuçlar şekil 15 ve şekil 16'da gösterilmiştir.



Şekil 15. C vitamininin çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi

C vitamininin hücre canlılığı üzerine olumlu etkisi 3,12 µM dozundan itibaren görülmeye başlandı. 25 µM dozuna kadar artan hücre canlılığı 25-500 µM dozları arasında plato çizdikten sonra daha yüksek dozlarda düşüşe geçti. 48. ve 72.saatlerde C vitamininin hücre canlılığı üzerine olumlu etkisi görülmedi. 24.saatte 3,12 µM- 500 µM arası dozlar hücre canlılığını arttırdı. 48. saatte 2 mM dozu ile hücre canlılığının azalması istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p<0,05$), (Tablo 6).

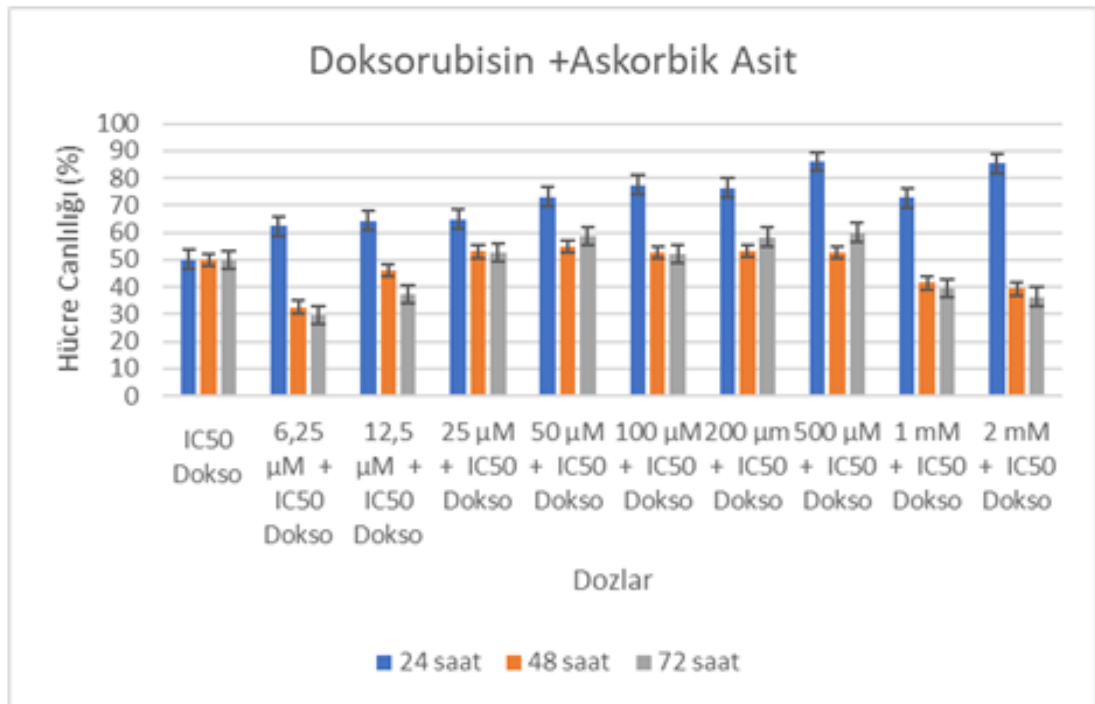


Şekil 16. Karvakrolün çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi

24.saat verileri incelendiğinde verilen düşük dozlarda (1, 2,5, 5, 10 mM) karvakrolün hücre canlılığına olumsuz etkisi görüldü. 2,5 mM dozunda bu etki istatistiksel olarak anlamlı iken ($p=0,031$) diğer dozlarda bu etki anlamlı değildi ($p>0,05$). Ancak orta dozlarda (20, 40, 80 mM) hücre canlılığı arttı ($p<0,001$). Doz daha fazla arttırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sitotoksik etki tekrar ortaya çıktı ($p>0,05$), (Tablo 7).

Hücre canlılığına olan etkinin zamana göre değişimi değerlendirildiğinde; 24. saatteki olumlu etkinin 48. saatte gerilediği görüldü. 72.saatte ise hücre canlılığında tekrar artış saptandı.

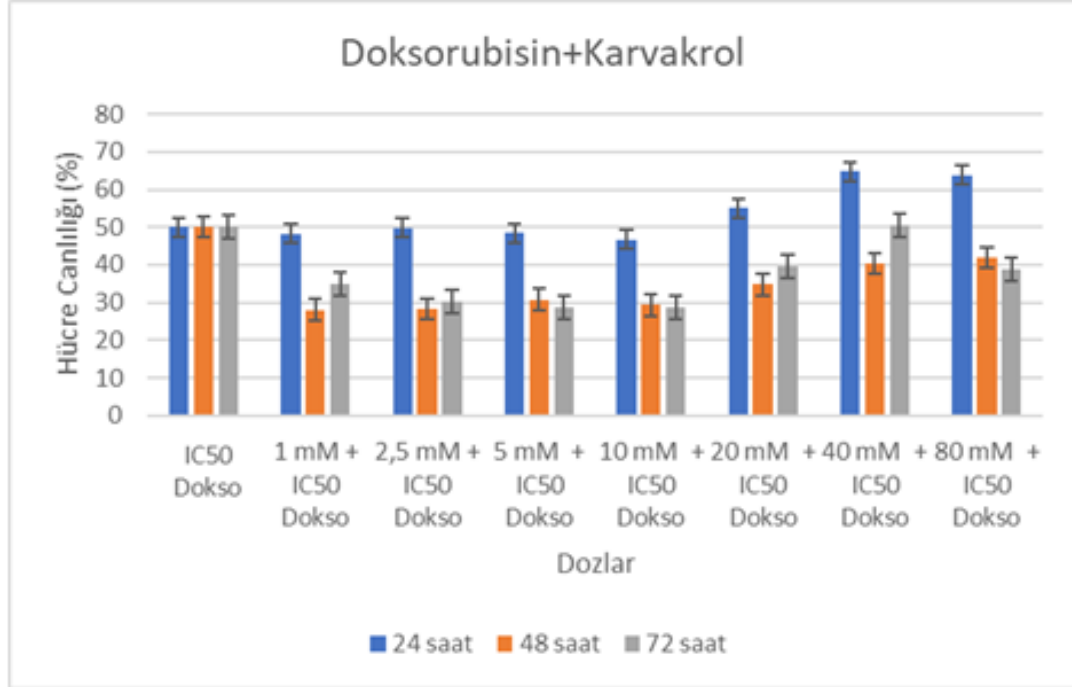
H9C2 hücre hattına IC50 dozunda doksorubisin ile birlikte çeşitli konsantrasyonlarda karvakrol ve C vitamini ayrı ayrı verilerek hücre canlılık yüzdeleri 24., 48. ve 72. saatte değerlendirildi. Sonuçlar şekil 17 ve şekil 18’de gösterilmiştir.



Şekil 17. IC50 dozunda doksorubisin ile birlikte çeşitli dozlarda C vitamininin zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi

IC50 dozunda doksorubisin ile birlikte verilen askorbik asit 24.saatte artan dozlarda hücre canlılığına olumlu etki göstermiştir. 24.saatte 50 µM ile 2 mM arası dozlarda sitotoksikite anlamlı düzeyde azaldı ($p<0,05$). 48. ve 72. saatte de 25 µM-500

μM arası dozlarda hücre canlılığını arttırsa da bu etki istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$), (Tablo 8).



Şekil 18. IC50 dozunda doksorubisin ile birlikte çeşitli dozlarda karvakrolün zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi

Düşük dozlarda (1mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM) karvakrol verildikten sonra 24.saatte hücre canlılığı %50’lerde kalmaya devam ederken daha yüksek dozlarda (20 mM, 40mM, 80 mM) hücre canlılık yüzdesi %60’lara yükseldiği görüldü. Bu etki istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$). 48.saatte 1-20 mM arası dozlar, 72. saatte ise 1-10mM arası dozlar anlamlı düzeyde sitotoksitete neden oldu ($p<0,05$), (Tablo 9).

H9C2 hücre hattına IC50 dozunda doksorubisin ile birlikte karvakrol ve C vitamini farklı dozlarda birlikte verilerek hücre canlılık düzeyleri 24. saatte değerlendirildi. Sonuçlar şekil 19’da gösterilmiştir.



Şekil 19. IC₅₀ dozunda doksorubisin ile birlikte çeşitli dozlarda karvakrol ve C vitaminin hücre canlılığına etkisini kontrol grubu ile karşılaştıran sütun grafiği gösterimi

Farklı dozlarda C vitamini ve karvakrol kombinasyonu ile yapılan deneylerde 24.saatte 400 µM C vitamini + 40 mM karvakrol kombinasyonu hariç diğer dozlarda hücre canlılığı arttı. Ancak sadece 200 µM C vitamini + 40 mM karvakrol kombinasyonunda bu artış anlamlıydı (p=0,032), (Tablo 10).

Tablo 6. C vitamininin farklı dozlarda kontrol grubu ile karşılaştırılmasını gösteren XTT deneyinin 24., 48. ve 72. saat p değerleri (n=3)

Tukey's multiple comparisons test	24.saat p değeri	48.saat	72.saat
Kontrol ve 1,56 µM C vitamini	0,765	0,017	0,282
Kontrol ve 3,12 µM C vitamini	0,026*	0,984	1
Kontrol ve 6,25 µM C vitamini	<0,001**	1	0,565
Kontrol ve 12,5 µM C vitamini	<0,001**	0,999	0,954
Kontrol ve 25 µM C vitamini	<0,001**	1	0,965
Kontrol ve 50 µM C vitamini	0,002**	1	0,965
Kontrol ve 100 µM C vitamini	0,008**	1	1
Kontrol ve 200 µM C vitamini	0,001**	0,999	1
Kontrol ve 400 µM C vitamini	0,003**	1	1
Kontrol ve 500 µM C vitamini	<0,001**	1	0,965
Kontrol ve 1000 µM C vitamini	0,486	0,069	0,98
Kontrol ve 2000 µM C vitamini	0,486	<0,001**	0,847

Tablo 7. Karvakrolün farklı dozlarda kontrol grubu ile karşılaştırılmasını gösteren XTT deneyinin 24., 48. ve 72.saat p değerleri (n=3)

Tukey's multiple comparisons test	24.saat p değeri	48.saat	72.saat
Kontrol ve 1mM karvakrol	0,8	<0,001**	0,999
Kontrol ve 2,5 mM karvakrol	0,031*	<0,001**	0,765
Kontrol ve 5 mM karvakrol	0,088	<0,001**	0,007**
Kontrol ve 10 mM karvakrol	0,69	<0,001**	0,155
Kontrol ve 20 mM karvakrol	<0,001**	0,966	0,007**
Kontrol ve 40 mM karvakrol	<0,001**	0,263	0,003**
Kontrol ve 80 mM karvakrol	<0,001**	<0,001**	1
Kontrol ve 160 mM karvakrol	0,273	<0,001**	1

Tablo 8. Doksorubisin IC50 dozu ile farklı dozlarda C vitamini ve IC50 dozunda doksorubin kombinasyonunun karşılaştırılmasını gösteren XTT deneyinin 24., 48. ve 72.saat p değerleri (n=3)

Tukey's multiple comparisons test	p değeri 24.saat	48.saat	72.saat
DOX ve DOX + 6,25 µM C vitamini	0,294	0,09	0,124
DOX ve DOX + 12,5 µM C vitamini	0,123	0,941	0,667
DOX ve DOX + 25 µM C vitamini	0,123	0,99	1
DOX ve DOX + 50 µM C vitamini	0,002**	0,941	0,969
DOX ve DOX + 100 µM C vitamini	<0,001**	1	1
DOX ve DOX + 200 µM C vitamini	<0,001**	0,99	0,969
DOX ve DOX + 500 µM C vitamini	<0,001**	1	0,969
DOX ve DOX + 1 mM C vitamini	0,003*	0,159	0,851
DOX ve DOX + 2 mM C vitamini	<0,001**	0,295	0,578

Tablo 9. Dokсорubisin IC50 dozu ile farklı dozlarda karvakrol ve IC50 dozunda dokсорubin kombinasyonunun karşılaştırılmasını gösteren XTT deneyinin 24., 48. ve 72.saat p değerleri (n=3)

Tukey's multiple comparisons test	p değeri 24.saat	48.saat	72.saat
DOX ve DOX+ 1 mM Karvakrol	1	<0,001**	0,026*
DOX ve DOX+ 2,5 mM Karvakrol	1	<0,001**	0,004**
DOX ve DOX+ 5 mM Karvakrol	0,999	<0,001**	0,002**
DOX ve DOX+ 10 mM Karvakrol	0,968	<0,001**	0,002**
DOX ve DOX+ 20 mM Karvakrol	0,904	0,001**	0,313
DOX ve DOX+ 40 mM Karvakrol	0,027*	0,036	1
DOX ve DOX+ 80 mM Karvakrol	0,032*	0,095	0,148

Tablo 10. Dokсорubisinin IC50 dozu ile farklı dozlarda karvakrol ve C vitamininin IC50 dozunda dokсорubisin ile kombinasyonunun karşılaştırılmasını gösteren XTT deneyinin 24.saat p değerleri (n=3)

Tukey's multiple comparisons test	p değeri
DOX ve D+K1+A1	1
DOX ve D+K1+A2	0,559
DOX ve D+K1+A3	0,86
DOX ve D+K1+A4	0,196
DOX ve D+K2+A1	0,86
DOX ve D+K2+A2	0,032*
DOX ve D+K2+A3	0,69
DOX ve D+K2+A4	0,559
DOX ve D+K3+A1	1
DOX ve D+K3+A2	0,773
DOX ve D+K3+A3	0,559
DOX ve D+K3+A4	0,669

DOX grubu ile DOX+ karvakrol + C vitamini karşılaştırıldı. İstatistiksel olarak anlamlı tek doz kombinasyonu 200 μ M C vitamini + 40 mM karvakrol kombinasyonu olarak görüldü ($p=0,032$). Bu sebeple çalışmanın diğer bir testi olan wound healing testinde 200 μ M C vitamini ve 40 mM karvakrol kullanıldı.

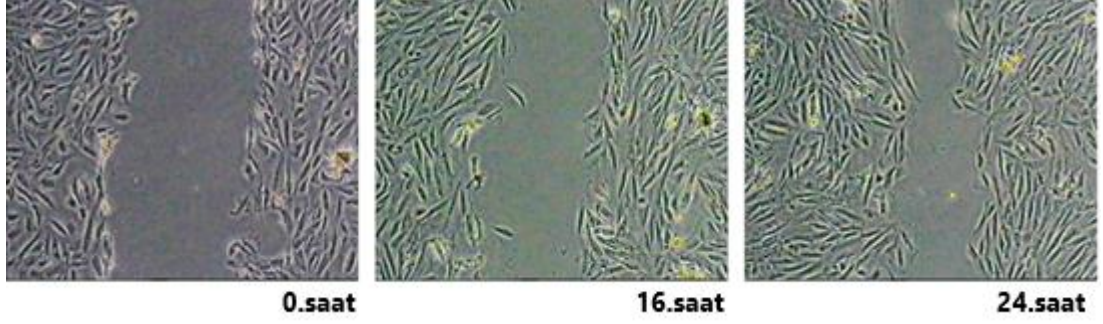
Tablo 11. Doksorubisin IC50 dozu ile C vitamini kombinasyonunun IC50 dozunda doksorubisin, çeşitli dozlarda karvakrol ve C vitamini kombinasyonunun karşılaştırılmasını gösteren XTT deneyinin 24.saat canlılık yüzdeleri ve p değerleri (n=3)

Doz	Canlılık	p değeri
DOX+A1	%77,5	
DOX+A1+K1	%54,46	0,003**
DOX+A1+K2	%60,51	0,059
DOX+A1+K3	%51,02	0,001**
DOX+A2	%76,4	
DOX+A2+K1	%63,24	0,285
DOX+A2+K2	%72,88	0,999
DOX+A2+K3	%61,4	0,137
DOX+A4	%86,07	
DOX+A4+K1	%67,04	0,024*
DOX+A4+K2	%37,19	<0,001**
DOX+A4+K3	%62,9	0,002**

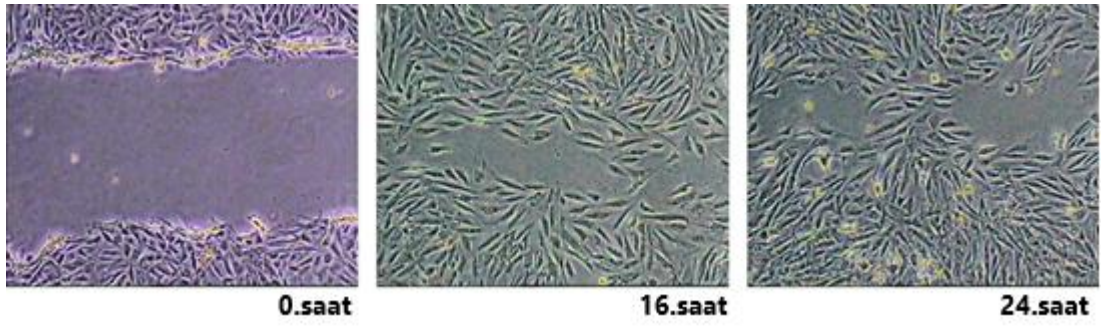
XTT testinde karvakrol ve C vitamininin etkileşimini değerlendirebilmek amacıyla IC50 dozunda doksorubisin ve C vitamini; IC 50 dozunda doksorubisin, karvakrol ve C vitamini kombinasyonları ile karşılaştırıldı. IC50 dozunda doksorubisin, 100 μ M C vitamini kombinasyonuna 20 mM ve 80 mM karvakrol eklemek; IC 50 dozunda doksorubisin 500 μ M C vitamini kombinasyonuna 20 mM, 40 mM ve 80 mM karvakrol eklemek hücre canlılığını istatistiksel anlamlı olarak azalttı ($p<0,05$). Diğer dozlarda eklenen karvakroller de hücre canlılığını azaltsa da istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$), (Tablo 11).

4.2. WOUND HEALING TESTİ SONUÇLARI

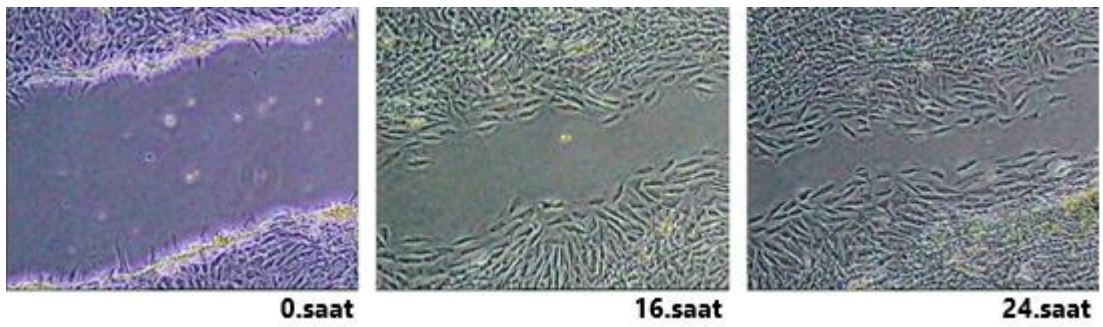
Wound healing deney sonuçlarının 0., 16. ve 24.saatte 4x büyütme ile çekilen resimleri şekil 20-26'da gösterilmiştir.



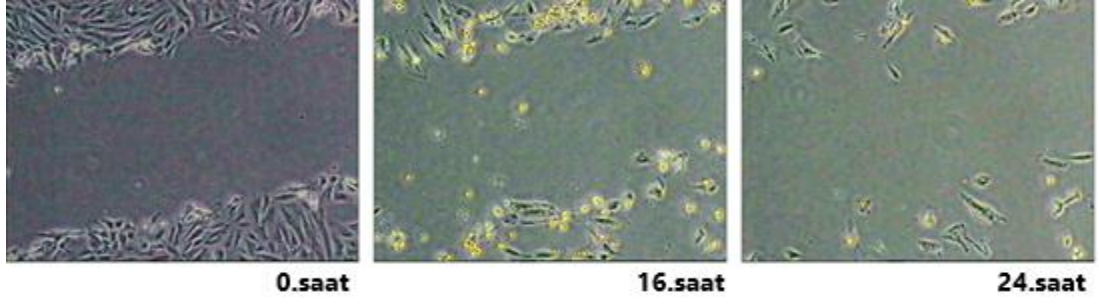
Şekil 20. Wound healing testi kontrol grubu 0. 16. ve 24. saatler



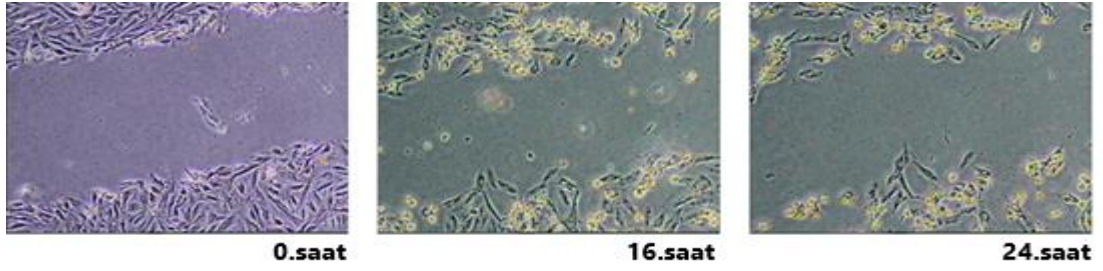
Şekil 21. Wound healing testi 40 mM karvakrol verilen grup 0, 16 ve 24. saatler



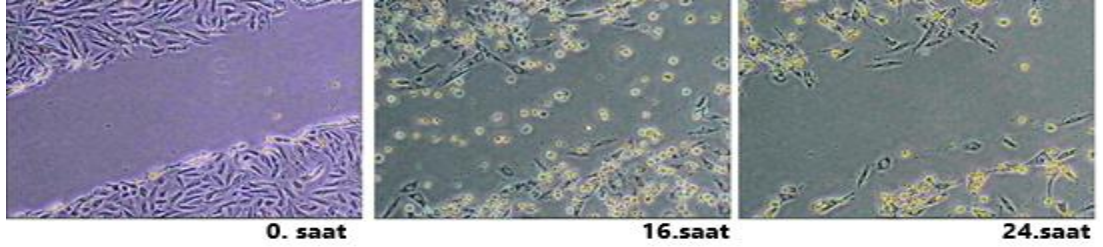
Şekil 22. Wound healing testi 200 µM C vitamini verilen grup 0, 16 ve 24. saatler



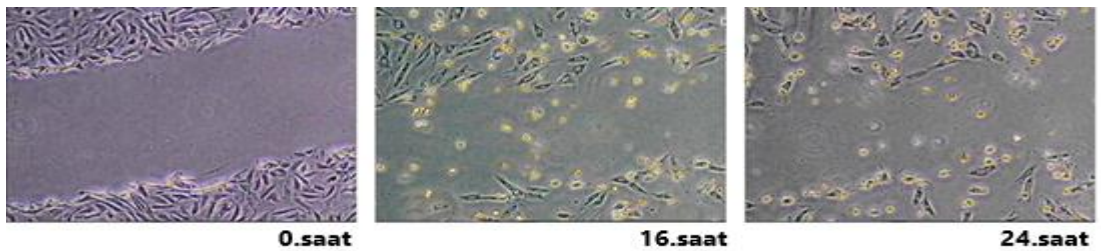
Şekil 23. Wound healing testi IC50 dozunda doksorubisin verilen grup 0, 16 ve 24. saatler



Şekil 24. Wound healing testi IC50 dozunda doksorubisin ve 40 mM karvakrol verilen grup 0, 16 ve 24. saatler



Şekil 25. Wound healing testi IC50 dozunda doksorubisin ve 200 µM C vitamini verilen grup 0, 16 ve 24. saatler



Şekil 26. Wound healing testi IC 50 dozunda doksorubisin, 200 µM C vitamini ve 40 mM karvakrol verilen grup 0, 16 ve 24. saatler

Wound healing testi sonuçlarında 16. ve 24. saat yara yeri yüzey alanları yüzdeleri Tablo 12’de gösterilmiştir.

Kontrol grubunda yara yüzeyi 16.saatte %70,6’ya 24.saatte %54,5’e gerilerken IC50 dozda doksorubisin verilen grupta 16.saatte yara yüzeyi %125’e 24.saatte %137’ye yükseldi (Tablo12).

40 mM karvakrol uygulaması sonrası yara yüzey alanı 16.saatte %29,9’a 24.saatte %20,2’ye geriledi. Kontrol grubuna göre hem 16.saat hem 24.saatte yara yeri yüzey alanlarında küçülme istatistiksel olarak anlamlı saptandı. ($p=0,03$; $p<0,0001$), (Tablo 12), (Tablo 13), (Tablo 14).

200 μ M C vitamini uygulaması sonrası yara yüzey alanı 16.saatte %56,9’a 24.saatte %27’ye geriledi. Kontrol grubuna göre 24.saatte yara yeri yüzey alanlarında küçülme istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p=0,002$), (Tablo 12), (Tablo 14).

16.saatte kombine DOX ile DOX+karvakrol, DOX+C ve DOX+karvakrol+C gruplarının değerlendirmesinde; gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı. 24.saatte ise DOX+karvakrol ve DOX+karvakrol+C vitamini gruplarındaki yara yüzey alanı DOX grubuna göre anlamlı düşük saptandı ($p=0,008$, $p=0,001$), (Tablo 13), (Tablo 14).

DOX+karvakrol ve DOX+ karvakrol+ C vitamini, DOX+ C vitamini ile DOX + karvakrol + C vitamini karşılaştırıldı. En düşük yara yüzey alan ölçüleri DOX + karvakrol + C vitamini kombinasyonu ile sağlansa da bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$), (Tablo 13), (Tablo 14).

Doksorubisin verilen bütün kombinasyonlarda (DOX, DOX+CAR, DOX+C vit, DOX+CAR+C vit) 16. ve 24. saatlerde yara yeri yüzey alanı kontrol grubuna göre daha büyük saptandı ($p<0,05$), (Tablo 13), (Tablo 14).

Tablo 12. H9C2 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında wound healing testi için oluşturduğumuz yara yüzey alanlarının yüzdelik sonuçları (n=3)

	0.saat ortalama	16.saat ortalama	24.saat ortalama
Kontrol	%100	%70,6	%54,5
Karvakrol (40 mM)	%100	%29,9	%20,2
C Vit (200 µM)	%100	%56,6	%27
DOX (IC50)	%100	%125	%137
DOX + CAR	%100	%104	%115
DOX + C Vit	%100	%109	%124
DOX + C Vit + CAR	%100	%101	%109

Tablo 13. Wound healing deneyi 16.saat istatistiksel sonuçları (n=3)

Tukey's multiple comparisons test	p değeri
Kontrol ve CAR	0,003 **
Kontrol ve C vit	0,643
Kontrol ve DOX	<0,001**
Kontrol ve DOX+CAR	0,005**
Kontrol ve DOX+C vit	0,004**
Kontrol ve DOX+CAR+C vit	0,03*
DOX ve DOX+CAR	0,569
DOX ve DOX+C vit	0,632
DOX ve DOX+CAR+C vit	0,151
DOX+CAR ve DOX+CAR+C vit	0,952
DOX+C vit ve DOX+CAR+C vit	0,925

Tablo 14. Wound healing deneyi 24.saat istatistiksel sonuçları (n=3)

Tukey's multiple comparisons test	p değeri
Kontrol ve CAR	<0,0001 **
Kontrol ve C vit	0,002 **
Kontrol ve DOX	<0,0001 **
Kontrol ve DOX+CAR	<0,0001 **
Kontrol ve DOX+C vit	<0,0001 **
Kontrol ve DOX+CAR+C vit	<0,0001 **
DOX ve DOX+CAR	0,008 **
DOX ve DOX+C vit	0,206
DOX ve DOX+CAR+C vit	0,001 **
DOX+CAR ve DOX+CAR+C vit	0,910
DOX+C vit ve DOX+CAR+C vit	0,105

4.3 İMMÜNOHİSTOKİMYA SONUÇLARI

Her antikor için 40x büyütmede 10 alan sayıldı.

4.3.1 TGF-beta:

Kontrol: Çekirdek boyanması görülemedi. Sitoplazma boyanması mevcuttu.

Doksorubisin: Hücre sayısı kontrole göre azaldı. Bazı hücrelerde apoptotik ve piknotik değişiklikler görüldü. TGF-beta boyanması yoğun (+3) şekildeydi. Çekirdek boyanması yoktu.

Karvakrol: Hücrelerin bütünlüğünün korunduğu kontrol grubu ile benzer görüntü saptandı. Apoptotik hücre değişiklikleri çok nadir görüldü. Boyanma yer yer zayıf ve sitoplazmik görüldü.

C vitamini: Hücrelerin bütünlüğünün korunduğu kontrol grubu ile benzer görüntü saptandı. Apoptotik hücre değişikliği çok nadir görüldü. Bazı hücrelerde artmakla birlikte boyanma zayıf (1+) olarak değerlendirildi.

DOX+Karvakrol: Piknotik hücrelerin karvakrol sonrası hala devam ettiği görüldü. Çekirdek boyanmasının olmadığı ve sitoplazmik boyanmanın orta (2+) olduğu görüldü.

DOX+C vitamini: C vitamini sonrası piknotik ve apoptotik değişikliklerin devam ettiği görüldü. Çekirdek boyanması yoktu. Sitoplazmik boyanma yoğun (+3) olarak saptandı.

DOX+Karvakrol+C vitamini: Hücrelerdeki sitoplazmik yoğun boyanmayla birlikte yoğun boyalı alanlarda piknotik değişiklikler mevcuttu. Çekirdek boyanması yoktu.

4.3.2. BAX:

Kontrol: Klasik hücrelerin bütünlüğünü koruduğu piknotik hücrelerin olmadığı BAX reaksiyonunun negatif olduğu gözlemlendi.

Doksorubisin: Piknoza giden hücrelerde çekirdek boyanması pozitif. Canlı kardiyomiyosit hücrelerinde çekirdek boyanması görülmezken sitoplazma boyanması yoğun (+3) pozitif saptandı.

Karvakrol: Kardiyomiyositler bütünlüğünü korumaktaydı. Çekirdek veya sitoplazma boyanması görünmedi.

C vitamini: Kardiyomiyositler bütünlüğünü korumaktaydı. Çekirdek veya sitoplazma boyanması görünmedi.

DOX+Karvakrol: Kardiyomiyositler şeklini korumuştur. Yer yer piknotik hücreler mevcuttu. Reaksiyon gözlenmedi.

DOX+C vitamini: Kardiyomiyositler şeklini korumuştur. DOX+ karvakrol grubuna göre artmış piknotik hücreler mevcuttu. Reaksiyon görülmedi.

DOX+C vitamini+Karvakrol: Kardiyomiyosit hücre şeklinin çoğu alanda bozulduğu yuvarlak çekirdekli hücre sayısında artış olduğu görüldü. Piknotik hücrelerdeki çekirdek boyanması orta (+2) düzeyde saptandı.

4.3.3. Kaspaz-3:

Kontrol: Hücreler normal şeklini korumaktadır. Kaspaz -3 reaksiyonu çok az alanda zayıf (+1) göstermekle birlikte negatif olduğu saptandı.

Doksorubisin: DOX grubunda kaspaz-3 ekspresyonu ve boyanması orta (+2) saptandı. Canlı hücrelerde sitoplazmik boyanma pozitif, çekirdek boyanması negatif saptandı. Apoptotik olarak görülen piknotik hücrelerde ise çekirdek boyanması yoğun (+3) pozitif saptandı.

Karvakrol: Hücrelerin bütünlüğü korunmaktadır. Kontrol grubuna benzer şekilde apoptotik ve piknotik hücre gözlenmedi. Kaspaz-3 reaksiyonu yer yer zayıf (1+) pozitif olmakla birlikte çoğunlukla negatifti.

C vitamini: Hücrelerin bütünlüğü korunmaktadır. Kontrol grubuna benzer şekilde apoptotik ve piknotik hücre gözlenmedi. Kaspaz-3 reaksiyonu yer yer zayıf (1+) pozitif olmakla birlikte çoğunlukla negatifti.

DOX+ Karvakrol: Hücresel bütünlüğün korunduğu karvakrolle birlikte piknotik hücre sayısının azaldığı görüldü. Ancak kaspaz-3 reaksiyonu çoğu alanda orta (+2) pozitif ve sitoplazmikti.

DOX+ C vitamini: C vitamini sonrası her alanda kardiyomiyosit hücrelerinde piknotik değişiklik görülmeye devam ediyordu. Fakat kaspaz-3 immunoreaktivitesi zayıf (+1) pozitif veya negatifti. Piknotik hücrelerin çekirdeklerinde orta (+2) düzeyde kaspaz-3 reaksiyonu görüldü.

4.3.4. BCL-2:

Kontrol: BCL-2 ekspresyonu görülmedi.

Doksorubisin: BCL-2 ekspresyonu kardiyomiyosit hücrelerinde olduğundan yoğun bir şekilde görüldü. Piknotik hücrelerin varlığı belirgindi. Boyama çekirdekte negatif, sitoplazma orta (+2) pozitif.

Karvakrol: BCL-2 ekspresyonu hem sitoplazmada hem de çekirdekte negatif olarak saptandı.

C vitamini: BCL-2 ekspresyonu sitoplazmik ve orta (+2) derecedeydi. Pozitiflik tüm hücrelerde dikkat çekmekteydi. Çekirdek boyanması saptanmadı.

Doksorubisin+ Karvakrol: Çekirdek etrafında daha belirgin olmak üzere BCL-2 ekspresyonu orta- yoğun (+2/+3) pozitif olarak değerlendirildi. Boyama sitoplazmik.

Doksorubisin+ C vitamini: Çekirdek etrafında daha belirgin olmak üzere BCL-2 ekspresyonu orta- kuvvetli (+2/+3) pozitif olarak değerlendirildi. Boyama sitoplazmik.

Doksorubisin + Karvakrol+ C vitamini: BCL-2 ekspresyonu yoğun (+3) saptandı. Piknotik hücreler mevcuttu.

4.3.5. TIMP-2:

Kontrol: Reaksiyon sitoplazmik ve orta düzeyde saptandı.

Doksorubisin: TIMP-2 ekspresyonu sitoplazmik ve yoğun (+3) pozitif. Çekirdek zarında belirgin reaksiyon gözlemlendi.

Karvakrol: TIMP-2 ekspresyonu orta ve zayıf (+2/+1) olarak saptandı. Hücreler bütünlüğünü koruyordu.

C vitamini: TIMP-2 ekspresyonu orta ve zayıf (+2/+1) olarak saptandı. Hücreler bütünlüğünü koruyordu.

Doksorubisin+ Karvakrol: Çekirdek etrafındaki sitoplazmik bölgede orta ve yoğun (+2/+3) boyanma görüldü.

Doksorubisin+ C vitamini: Çekirdek etrafındaki sitoplazmik bölgede orta ve yoğun (+2/+3) boyanma görüldü.

Doksorubisin + Karvakrol+ C vitamini: TIMP-2 ekspresyonu orta- kuvvetli (+2/+3) pozitif. Boyanma sitoplazmik bölgede saptandı. Hücrelerin morfolojik yapılarının çoğu alanda bozulduğu saptandı. Piknotik hücreler mevcuttu.

4.3.6. TIMP-1:

Kontrol: Reaksiyon saptanmadı.

Doksorubisin: Ekspresyon yoğun (+3) olarak izlendi. Çekirdek zarında ve sitoplazmada kuvvetli pozitif alanlar izlendi.

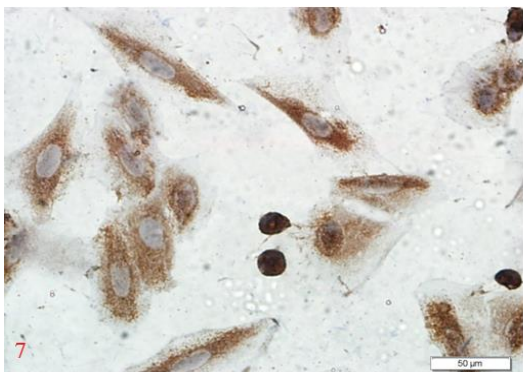
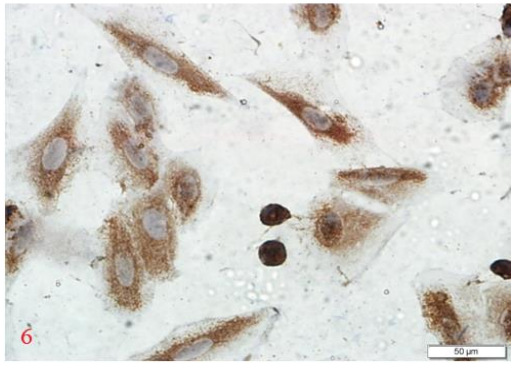
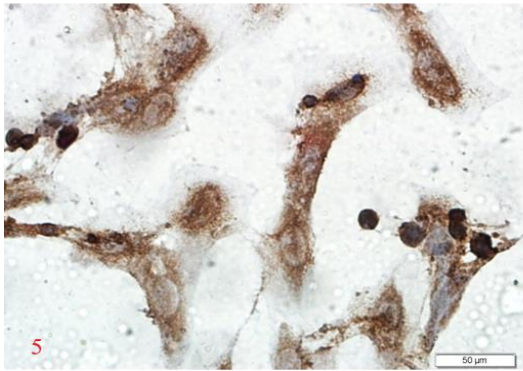
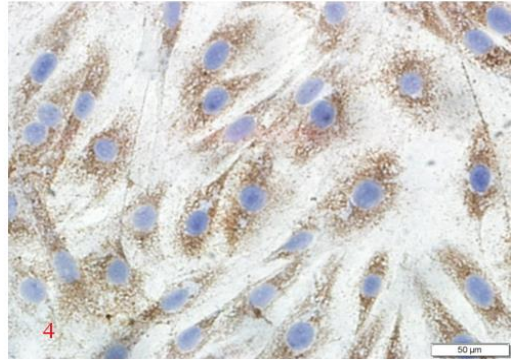
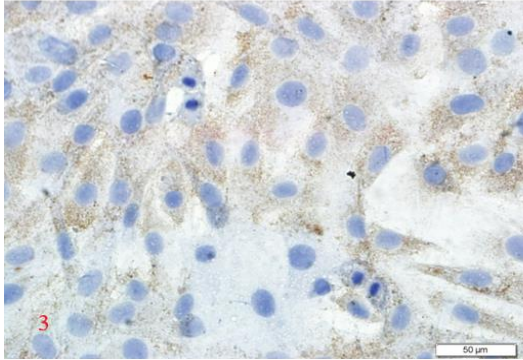
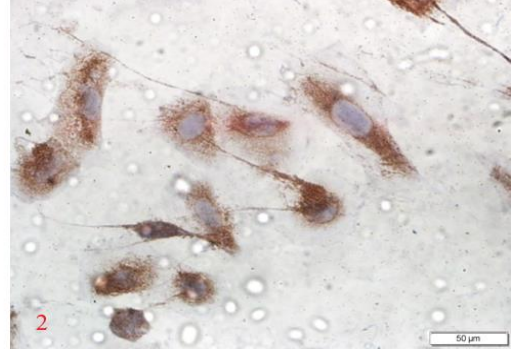
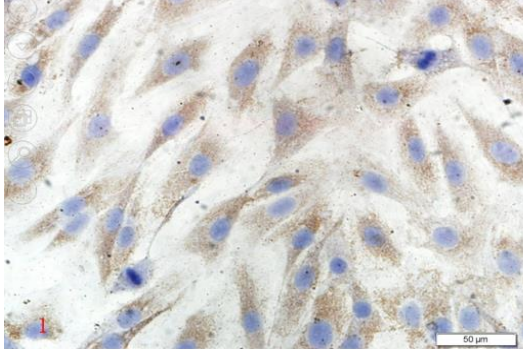
Karvakrol: Reaksiyon saptanmadı.

C vitamini: Reaksiyon saptanmadı.

Doksorubisin+ Karvakrol: Çekirdek boyanması saptanmadı. Orta derecede (+2) sitoplazma boyanması mevcut.

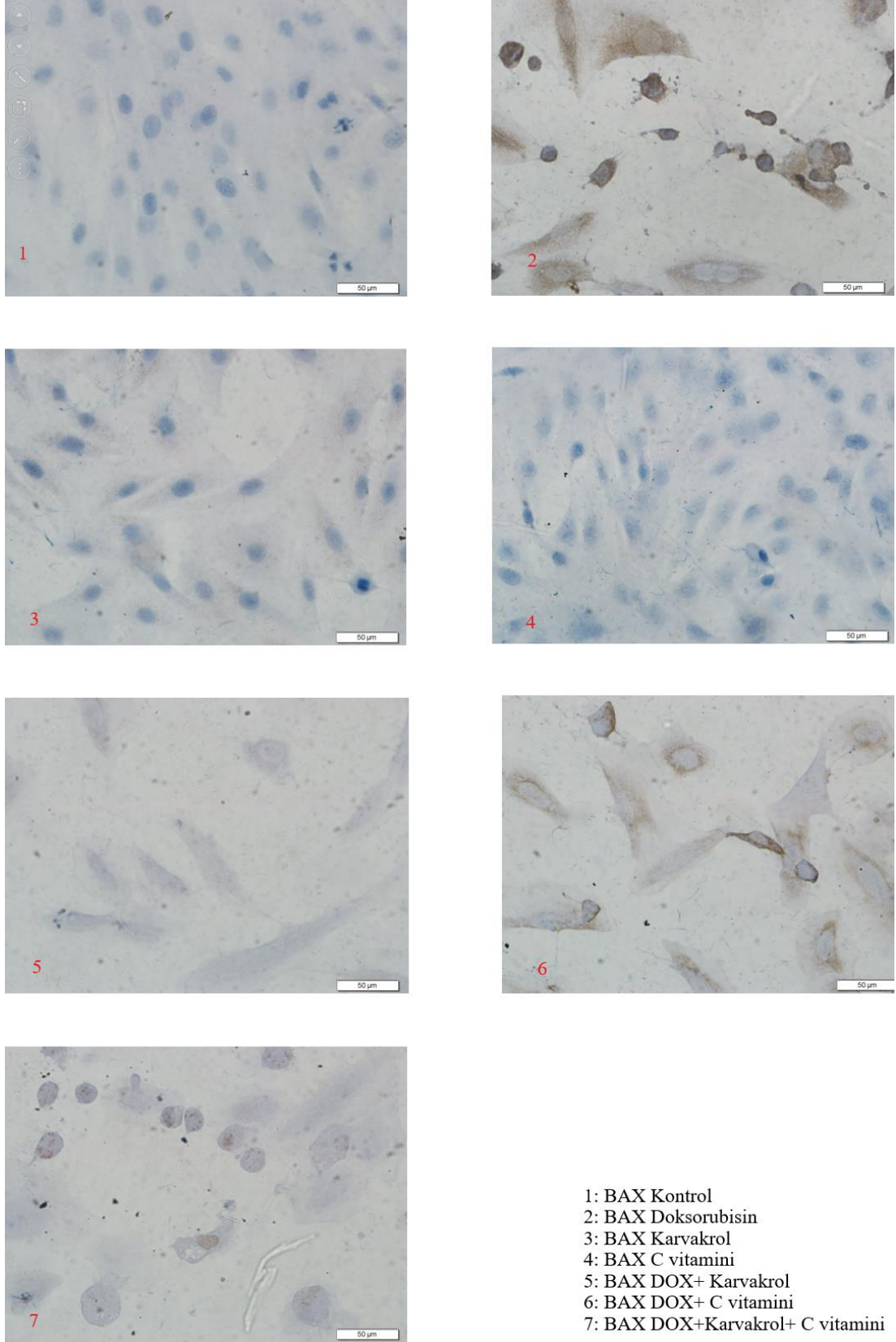
Doksorubisin+ C vitamini: Piknotik hücre miktarında artış mevcut. Ekspresyon zayıf-orta (+1/+2) saptandı. Çekirdek etrafında sitoplazmik boyanma mevcut.

Doksorubisin+ C vitamini+ Karvakrol: Hücre miktarı az. Ekspresyon bazı alanlarda çekirdekte olmakla birlikte sitoplazmik boyanmalar mevcut. Piknotik hücrelerin çekirdeğinde yoğun (+3) boyanma mevcuttu.

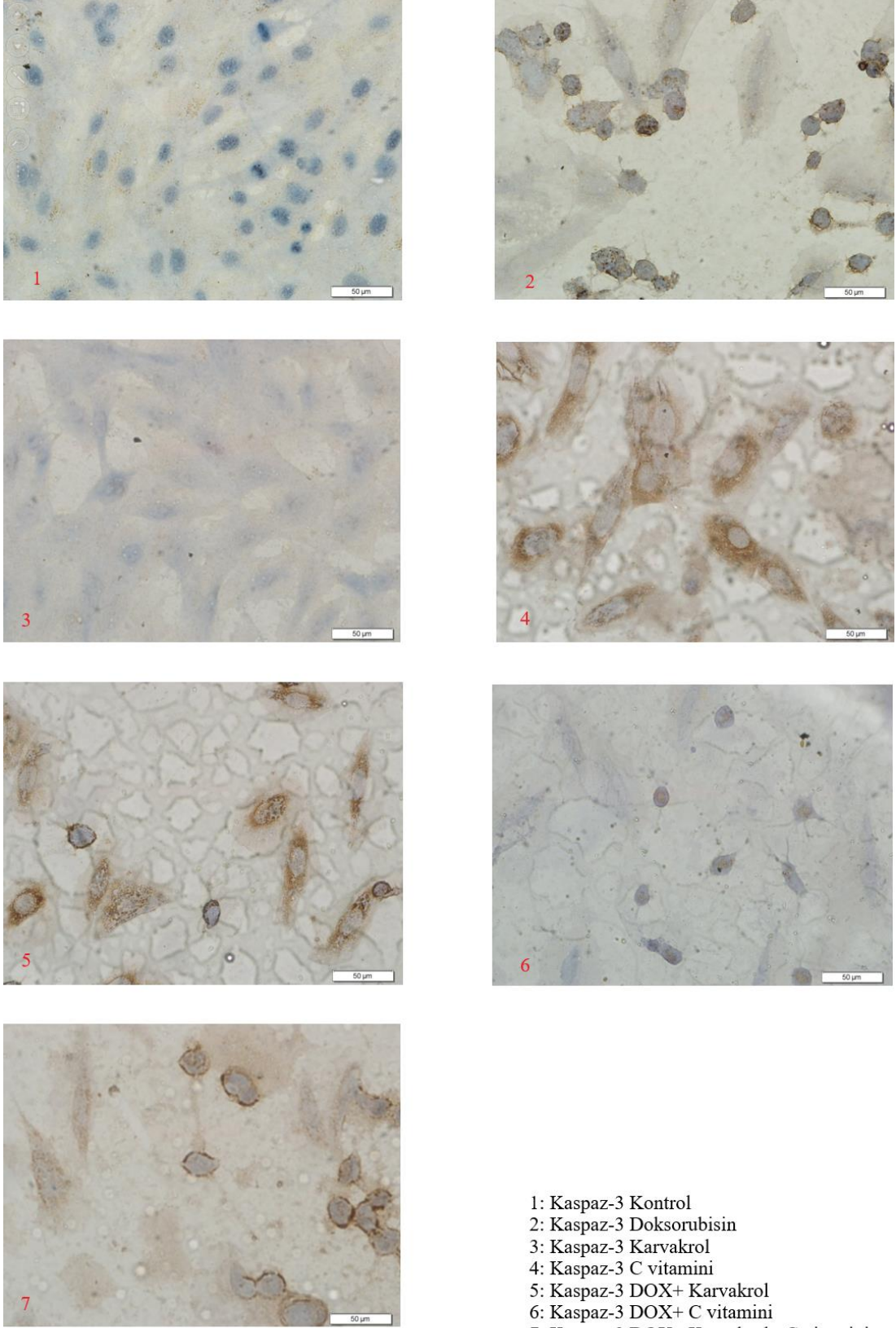


- 1: TGF- beta Kontrol
- 2: TGF-beta Doksorubisin
- 3: TGF- beta Karvakrol
- 4: TGF- bata C vitamini
- 5: TGF- beta DOX+ Karvakrol
- 6: TGF- beta DOX+ C vitamini
- 7: TGF- beta DOX+ Karvakrol + C vitamini

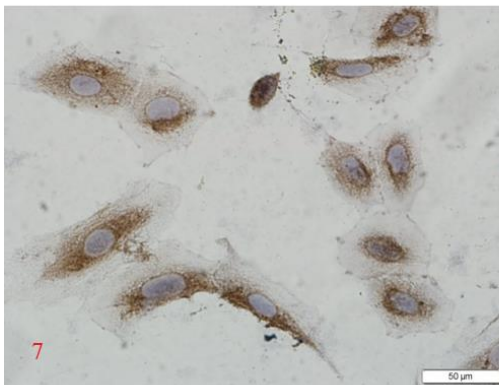
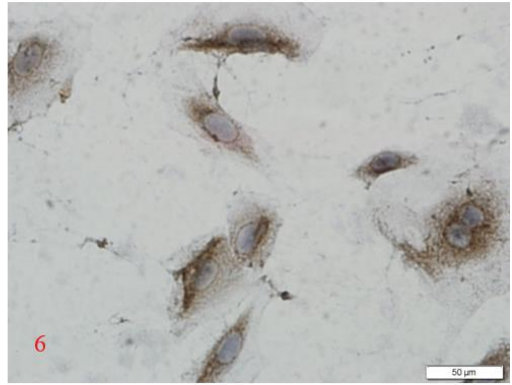
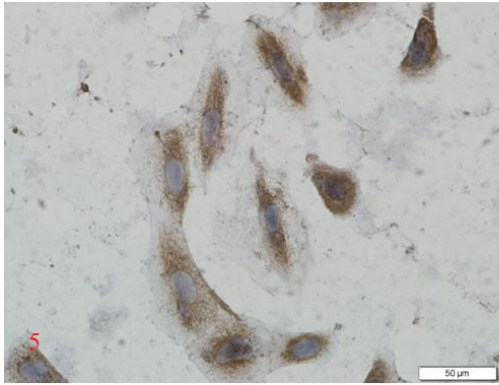
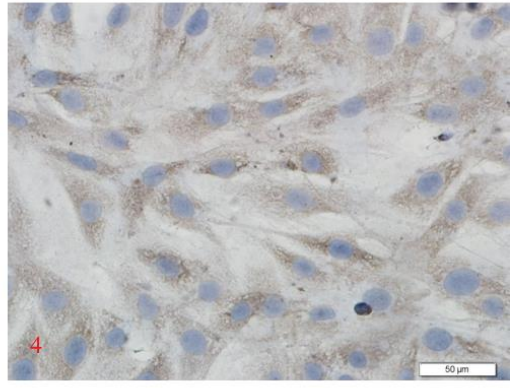
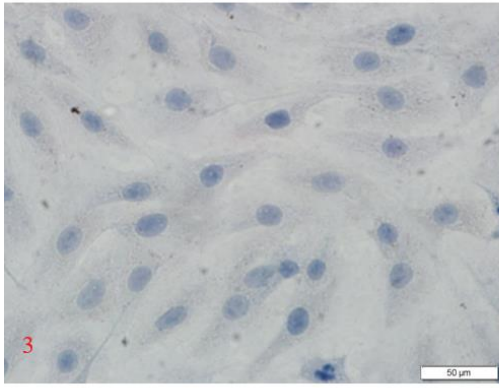
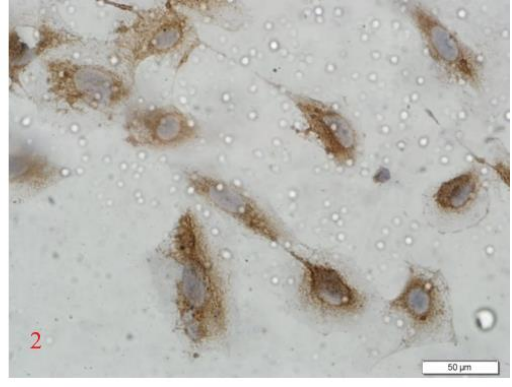
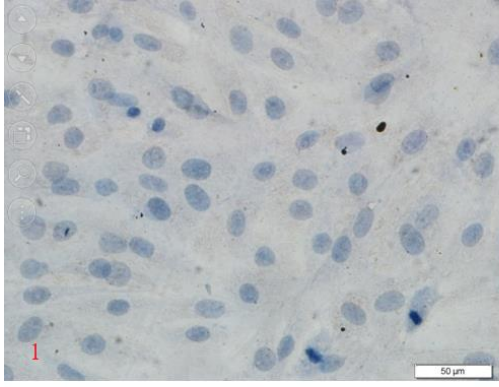
Şekil 27. TGF- beta immünohistokimya boyaması



Şekil 28. BAX immünohistokimya boyaması

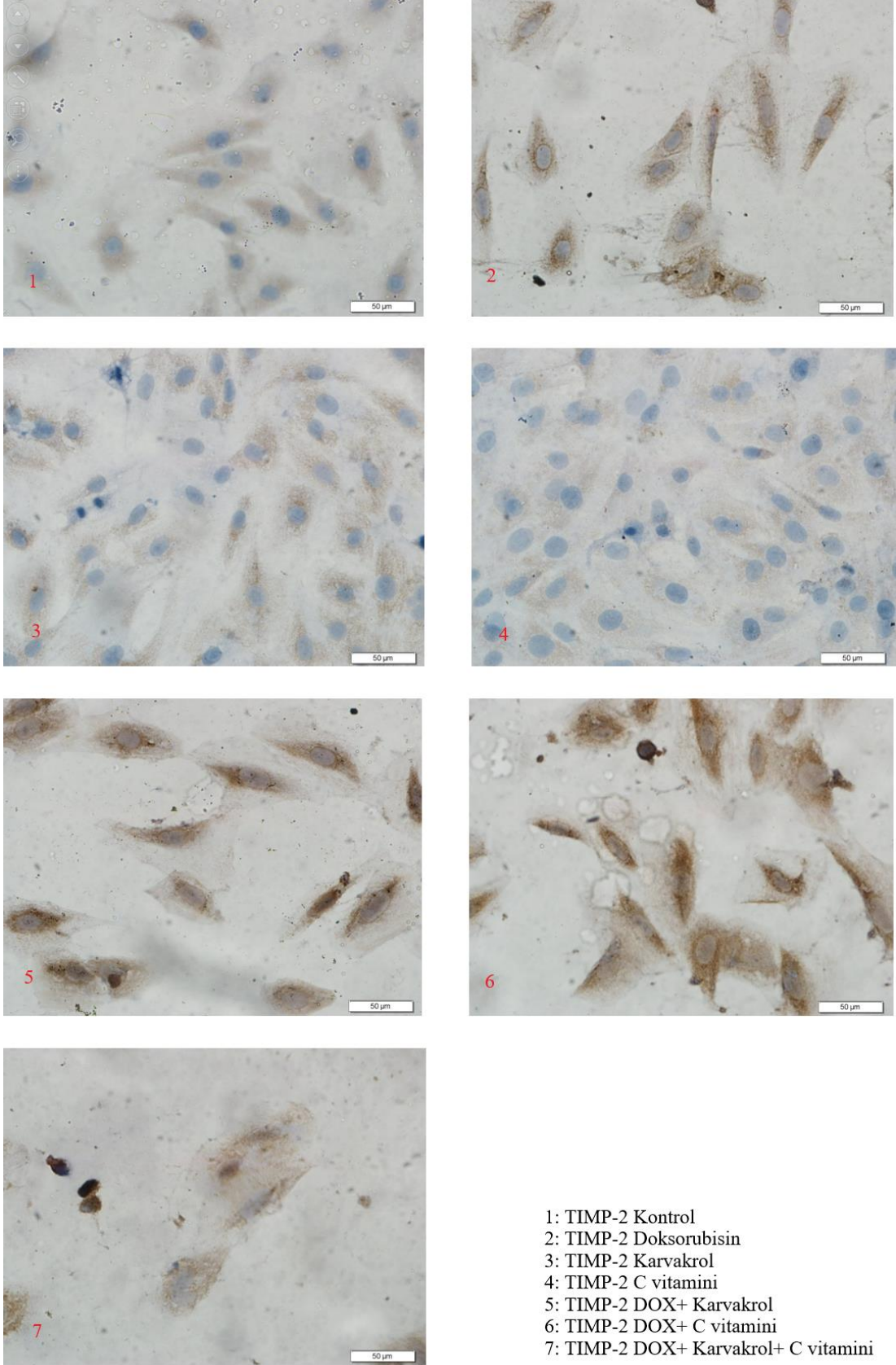


Şekil 29. Kaspaz-3 immünohistokimya boyaması

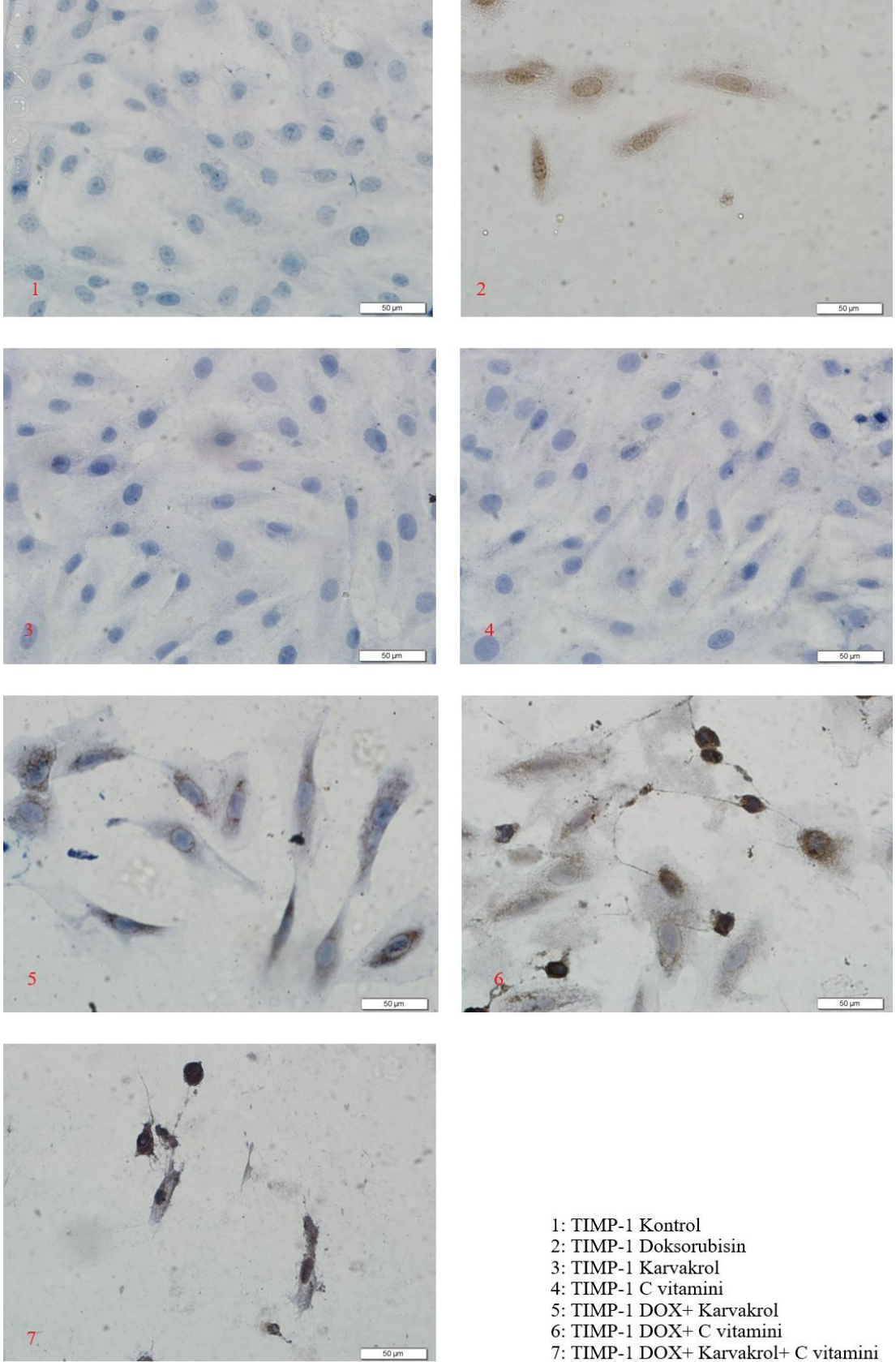


- 1: BCL-2 Kontrol
- 2: BCL-2 Doksorubisin
- 3: BCL-2 Karvakrol
- 4: BCL-2 C vitamini
- 5: BCL-2 DOX+ Karvakrol
- 6: BCL-2 DOX+ C vitamini
- 7: BCL-2 DOX+ Karvakrol+ C vitamini

Şekil 30. BCL-2 immünohistokimya boyaması



Şekil 31. TIMP-2 immünohistokimya boyaması



Şekil 32. TIMP-1 immünohistokimya boyaması

Tablo 15. TGF-beta immünohistokimya p değerleri (n=10)

Tukey's multiple comparisons test	p değeri
Kontrol ve CAR	0,01**
Kontrol ve C vit	0,015**
Kontrol ve DOX	<0,001**
Kontrol ve DOX+CAR	<0,001**
Kontrol ve DOX+C vit	<0,001**
Kontrol ve DOX+CAR+C vit	<0,001**
DOX ve DOX+CAR	0,432
DOX ve DOX+C vit	0,57
DOX ve DOX+CAR+C vit	0,397
DOX+CAR ve DOX+CAR+C vit	1
DOX+C vit ve DOX+CAR+C vit	1

TGF-beta boyanma skorları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; C vitamini ve CAR grubunda daha düşük boyanma skoru vardı ($p=0,01$ ve $p=0,015$). DOX, DOX+karvakrol, DOX+C vitamini ve DOX+karvakrol+C vitamini gruplarında, kontrol grubuna göre belirgin yüksek boyanma skorları gözlemlendi ($p<0,001$). DOX ile DOX+karvakrol, DOX+C vitamini ve DOX+karvakrol+C vitamini grupları karşılaştırıldığında ise gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu ($p>0,05$). DOX+karvakrol+C vitamini grubu ile hem DOX+karvakrol, hem de DOX+C vitamini grubunun sonuçları benzerdi ($p=1$), (Tablo 15).

Tablo 16. BAX immünohistokimya p değerleri (n=10)

Tukey's multiple comparisons test	p değeri
Kontrol ve CAR	1
Kontrol ve C vit	1
Kontrol ve DOX	<0,001**
Kontrol ve DOX+CAR	1
Kontrol ve DOX+C vit	<0,001**
Kontrol ve DOX+CAR+C vit	0,272
DOX ve DOX+CAR	<0,001**
DOX ve DOX+C vit	<0,001**
DOX ve DOX+CAR+C vit	<0,001**
DOX+CAR ve DOX+CAR+C vit	0,311
DOX+C vit ve DOX+CAR+C vit	0,034*

BAX boyanma skorları kontrol grubu ile karşılaştırıldı. C vitamini ve CAR grubunda belirgin düşük boyanma skoru varken, DOX ve DOX+C vitamini grubunda belirgin yüksek boyanma skoru ($p<0,001$). DOX+karvakrol, DOX+C vitamini ve DOX+karvakrol+C vitamini gruplarında, DOX grubuna göre boyanma skor belirgin düşük bulundu ($p<0,001$). DOX+karvakrol+C vitamini grubunda DOX+C vitamini grubuna göre daha düşük boyanma skoru gözlemlendi ($p= 0,034$), (Tablo 16).

Tablo 17. Kaspaz-3 immünohistokimya p değerleri (n=10)

Tukey's multiple comparisons test	p değeri
Kontrol ve CAR	1
Kontrol ve C vit	1
Kontrol ve DOX	<0,001**
Kontrol ve DOX+CAR	<0,001**
Kontrol ve DOX+C vit	<0,001**
Kontrol ve DOX+CAR+C vit	<0,001**
DOX ve DOX+CAR	0,278
DOX ve DOX+C vit	0,001**
DOX ve DOX+CAR+C vit	0,956
DOX+CAR ve DOX+CAR+C vit	0,858
DOX+C vit ve DOX+CAR+C vit	0,16

Kaspaz-3 boyanma skorları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; C vitamini ve CAR grubunda kontrol grubu ile benzer boyanma skoru vardı ($p=1$). DOX, DOX+karvakrol, DOX+C vitamini ve DOX+karvakrol+C vitamini gruplarında, kontrol grubuna göre belirgin yüksek boyanma skorları gözlemlendi ($p<0,001$). DOX ile DOX+karvakrol, DOX+C vitamini ve DOX+karvakrol+C vitamini grupları karşılaştırıldığında her iki grupta boyanma skoru daha düşük olmasına karşın sadece DOX+C vitamini grubunda farklılık anlamlı bulundu ($p=0,001$). DOX+C vitamini grubunun boyanma skoru DOX+karvakrol+C vitamini grubundan da düşüktü ($p=0,03$), (Tablo 17).

Tablo 18. BCL-2 immünohistokimya p değerleri (n=10)

Tukey's multiple comparisons test	p değeri
Kontrol ve CAR	1
Kontrol ve C vit	<0,001**
Kontrol ve DOX	<0,001**
Kontrol ve DOX+CAR	<0,001**
Kontrol ve DOX+C vit	<0,001**
Kontrol ve DOX+CAR+C vit	<0,001**
DOX ve DOX+CAR	0,91
DOX ve DOX+C vit	0,014**
DOX ve DOX+CAR+C vit	<0,001**
DOX+CAR ve DOX+CAR+C vit	<0,001**
DOX+C vit ve DOX+CAR+C vit	0,179

BCL-2 boyanma skorları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; C vitamini, DOX, DOX+karvakrol, DOX+C vitamini ve DOX+karvakrol+C vitamini gruplarında daha yüksek boyanma skoru vardı ($p<0,001$). DOX+C vitamini ve DOX+karvakrol+C vitamini gruplarında DOX grubuna göre, DOX+karvakrol+C vitamini grubunda ek olarak DOX+CAR grubuna göre daha düşük boyanma skorları bulundu ($p<0,05$), (Tablo 18).

Tablo 19. TIMP-2 immünohistokimya p değerleri (n=10)

Tukey's multiple comparisons test	p değeri
Kontrol ve CAR	1
Kontrol ve C vit	0,065
Kontrol ve DOX	<0,001**
Kontrol ve DOX+CAR	<0,001**
Kontrol ve DOX+C vit	<0,001**
Kontrol ve DOX+CAR+C vit	<0,001**
DOX ve DOX+CAR	0,038*
DOX ve DOX+C vit	0,995
DOX ve DOX+CAR+C vit	0,859
DOX+CAR ve DOX+CAR+C vit	0,001**
DOX+C vit ve DOX+CAR+C vit	0,479

TIMP-2 boyanma skorları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; C vitamini ve CAR grubunda kontrol grubu ile benzer boyanma skoru vardı ($p>0,05$). DOX, DOX+karvakrol, DOX+C vitamini ve DOX+karvakrol+C vitamini gruplarında, kontrol grubuna göre belirgin yüksek boyanma skorları gözlemlendi ($p<0,001$). DOX ile DOX+karvakrol, DOX+C vitamini ve DOX+karvakrol+C vitamini grupları karşılaştırıldığında ise sadece DOX+CAR grubunda boyanma skoru daha yüksek bulundu ($p=0,038$). DOX+CAR grubunun boyanma skoru DOX+karvakrol+C vitamini grubundan da yüksekti ($p=0,001$), (Tablo 19).

Tablo 20. TIMP-1 immünohistokimya p değerleri (n=10)

Tukey's multiple comparisons test	p değeri
Kontrol ve CAR	1
Kontrol ve C vit	1
Kontrol ve DOX	<0,001**
Kontrol ve DOX+CAR	<0,001**
Kontrol ve DOX+C vit	<0,001**
Kontrol ve DOX+CAR+C vit	<0,001**
DOX ve DOX+CAR	0,22
DOX ve DOX+C vit	0,07
DOX ve DOX+CAR+C vit	0,969
DOX+CAR ve DOX+CAR+C vit	0,025*
DOX+C vit ve DOX+CAR+C vit	0,006**

TIMP-1 boyanma skorları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; C vitamini ve CAR grubunda kontrol grubu ile benzer boyanma skoru vardı ($p>0,05$). DOX, DOX+karvakrol, DOX+C vitamini ve DOX+karvakrol+C vitamini gruplarında, kontrol grubuna göre belirgin yüksek boyanma skorları gözlemlendi ($p<0,001$). DOX ile DOX+karvakrol, DOX+C vitamini ve DOX+karvakrol+C vitamini grupları karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0,05$). DOX+karvakrol+C grubunun boyanma skoru hem DOX+C vitamini hem de DOX+CAR grubundan daha yüksekti ($p<0,05$), (Tablo 20).

4.4. GERÇEK ZAMANLI PZR SONUÇLARI

Çalışmamızda incelediğimiz genler ve kontrol grubuna göre değişim durumları Tablo 21 ve 22’de verilmiştir. Tablolarda kırmızı renk, housekeeping gene göre kat değişiminde artışı; mavi renk azalışı, siyah renk anlamlı olmayan artış ya da azalmayı ifade etmektedir. P değerlerindeki istatistiksel olarak anlamlı olanlar kırmızı renk ile gösterilmiştir (p değeri <0,05).

Tablo 21. DOX, CAR ve C vit gruplarının RT-PZR sonuçları

	DOX		CAR		C vit	
	Kat değişimi	p değeri	Kat değişimi	p değeri	Kat değişimi	p değeri
GAPDH	1.00		1.00		1.00	
Caspase 3	3.83	0.214	4.55	0.111	2.11	0.321
Bax	-5.45	0.291	-7.82	0.280	-11.60	0.286
Bcl-2	7.91	0.723	-29.72	0.280	-56.89	0.279
MMP-2	5.41	0.787	4.22	0.648	-1.11	0.349
TIMP-1	10.06	0.611	-9.30	0.326	-14.55	0.323
TIMP-2	-1.50	0.350	-13.80	0.257	-10.93	0.259
TGF- β	-2.47	0.387	1.69	0.705	-21.66	0.334

Tablo 22. DOX+CAR, DOX+C vit ve DOX+CAR+C vit gruplarının RT-PZR sonuçları

	DOX+CAR		DOX+C vit		DOX+CAR+C vit	
	Kat değişimi	p değeri	Kat değişimi	p değeri	Kat değişimi	p değeri
GAPDH	1.00		1.00		1.00	
Caspase 3	3.26	0.293	-4.06	0.141	5.76	0.146
Bax	-145.68	0.250	-98.36	0.250	-47.29	0.254
Bcl-2	-10.41	0.282	-27.47	0.280	-33.28	0.280
MMP-2	2.41	0.461	-8.44	0.294	-15.35	0.292
TIMP-1	3.05	0.667	1.32	0.410	-9.04	0.329
TIMP-2	1.60	0.556	1.87	0.629	-6.23	0.273
TGF- β	-3.90	0.365	-26.17	0.335	-206.02	0.331

Tablo 23. RT-PZR sonuçlarına göre her bir gen ifadesi için DOX, DOX+CAR, DOX+C vit ve DOX+CAR+C vit gruplarının istatistiksel sonuçları

Gen	Karşılaştırma	p değeri
Kaspaz 3	DOX ve DOX + CAR	0,524
	DOX ve DOX + C vit	<0,001**
	DOX ve DOX + CAR + C vit	0,522
	DOX+CAR ve DOX+C vit	<0,001**
	DOX + CAR ve DOX + CAR + C vit	0,876
	DOX + C vit ve DOX + CAR + C vit	<0,001**
Bax	DOX ve DOX + CAR	<0,001**
	DOX ve DOX + C vit	<0,001**
	DOX ve DOX + CAR + C vit	<0,001**
	DOX+CAR ve DOX+C vit	0,154
	DOX + CAR ve DOX + CAR + C vit	0,021*
	DOX + C vit ve DOX + CAR + C vit	0,032*
Bcl-2	DOX ve DOX + CAR	<0,001**
	DOX ve DOX + C vit	<0,001**
	DOX ve DOX + CAR + C vit	<0,001**
	DOX+CAR ve DOX+C vit	<0,001**
	DOX + CAR ve DOX + CAR + C vit	0,870
	DOX + C vit ve DOX + CAR + C vit	0,133
MMP2	DOX ve DOX + CAR	0,156
	DOX ve DOX + C vit	<0,001**
	DOX ve DOX + CAR + C vit	<0,001**
	DOX+CAR ve DOX+C vit	<0,001**
	DOX + CAR ve DOX + CAR + C vit	<0,001**
	DOX + C vit ve DOX + CAR + C vit	0,044*
TIMP1	DOX ve DOX + CAR	<0,001**
	DOX ve DOX + C vit	<0,001**
	DOX ve DOX + CAR + C vit	<0,001**
	DOX+CAR ve DOX+C vit	0,545
	DOX + CAR ve DOX + CAR + C vit	<0,001**
	DOX + C vit ve DOX + CAR + C vit	<0,001**
TIMP2	DOX ve DOX + CAR	0,991
	DOX ve DOX + C vit	0,136
	DOX ve DOX + CAR + C vit	0,036*
	DOX+CAR ve DOX+C vit	0,981
	DOX + CAR ve DOX + CAR + C vit	<0,001**
	DOX + C vit ve DOX + CAR + C vit	<0,001**
TGF- β	DOX ve DOX + CAR	0,912
	DOX ve DOX + C vit	<0,001**
	DOX ve DOX + CAR + C vit	<0,001**
	DOX+CAR ve DOX+C vit	<0,001**
	DOX + CAR ve DOX + CAR + C vit	<0,001**
	DOX + C vit ve DOX + CAR + C vit	<0,001**

Kaspaz 3 ifadesinde hem karvakrol hem C vitamini; kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,111$), ($p=0,321$), (Tablo 23). DOX+C vitamini grubunda DOX grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma görülmektedir ($p<0,001$), (Tablo 23). DOX+ C vit grubunda hem DOX+karvakrol hem de DOX+karvakrol+ C vitamini gruplarına göre anlamlı ölçüde azalma görülmektedir ($p<0,001$), (Tablo 23).

BAX ifadesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hem karvakrolde hem de C vitamininde azalma olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,280$), ($p=0,286$), (Tablo 23). DOX grubu ile karşılaştırıldığında DOX+karvakrol, DOX+ C vitamini, DOX+karvakrol+ C vitamini gruplarında azalma görülmektedir ($p<0,001$), (Tablo 23). DOX+karvakrol+ C vitamini grubundaki azalma hem DOX+karvakrol hem de DOX+ C vitamini gruplarından daha fazladır ($p=0,021$), ($p=0,032$), (Tablo 23).

BCL-2 ifadesinde kontrol grubuna göre karvakrol ve C vitamini gruplarında azalma gözükse de istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,280$), ($p=0,279$), (Tablo 23). DOX+karvakrol, DOX+ C vitamini, DOX+ karvakrol+ C vitamini gruplarındaki azalma DOX grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır ($p<0,001$), (Tablo 23).

MMP-2 ifadesinde C vitamini ve karvakrolün etkisi kontrol grubuna kıyasla anlamlı değildir ($p>0,05$), (Tablo 23). DOX+karvakrol ve DOX+karvakrol+C vitamini gruplarında DOX grubuna göre azalma saptandı ($p<0,001$), (Tablo 23). DOX+karvakrol+ C vitamini grubunda DOX+karvakrol grubuna göre azalma saptandı ($p=0,044$), (Tablo 23).

TIMP-1 ifadesinde karvakrol ve C vitamini uygulanan gruplarda kontrol gruplarına göre azalma gözükse de istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,326$), ($p=0,323$), (Tablo 23). DOX+karvakrol+C vitamini grubu DOX+karvakrol ve DOX+ C vitamini grubuna göre azalma saptandı ($p<0,001$), (Tablo 23).

TIMP-2 ifadesinde karvakrol ve C vitamini uygulanan gruplarda kontrol gruplarına göre azalma gözükse de istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,257$), ($p=0,259$), (Tablo 23). DOX+karvakrol+C vitamini grubu DOX+karvakrol ve DOX+ C vitamini grubuna göre azalma saptandı ($p<0,001$), (Tablo 23).

TGF- β ifadesinde DOX+karvakrol+C vitamini grubunda; DOX+karvakrol, DOX+ C vitamini ve DOX grubuna göre azalma saptandı ($p<0,001$), (Tablo 23).

4.5 TUNEL SONUÇLARI

Çalışmamızdaki TUNEL testi sonucuna göre grupların apoptotik indeksleri tablo 24'te gösterilmiştir.

Tablo 24. TUNEL sonuçlarına göre grupların apoptotik indeksi

GRUPLAR	APOPTOTİK İNDEKS
Kontrol	%9
Karvakrol	%2
C vitamini	%3
Doksorubisin	%78
Doksorubisin+Karvakrol	%76
Doksorubisin+C vitamini	%83
Doksorubisin+Karvakrol+C vitamini	%86

Çalışmamızdaki TUNEL testi sonucuna göre grupların apoptotik indeksleri karşılaştırıldı ve p değerleri tablo 25'te gösterilmiştir.

Tablo 25. TUNEL sonuçlarına göre grupların apoptotik indekslerinin karşılaştırılması

Karşılaştırma	p değeri	Karşılaştırma	p değeri
Kontrol ve Karvakrol	0,972	DOX ve DOX+KAR	1
Kontrol ve C vitamini	0,976	DOX ve DOX+C vit	0,566
Kontrol ve DOX	<0,001	DOX ve DOX+KAR+C vit	0,56
Kontrol ve DOX+KAR	<0,001	DOX+KAR ve DOX+C vit	0,836
Kontrol ve DOX+C vit	<0,001	Kontrol ve DOX+KAR+C vit	<0,001
DOX+KAR ve DOX+KAR+C vit	0,825	DOX+C vit ve DOX+KAR+C vit	1

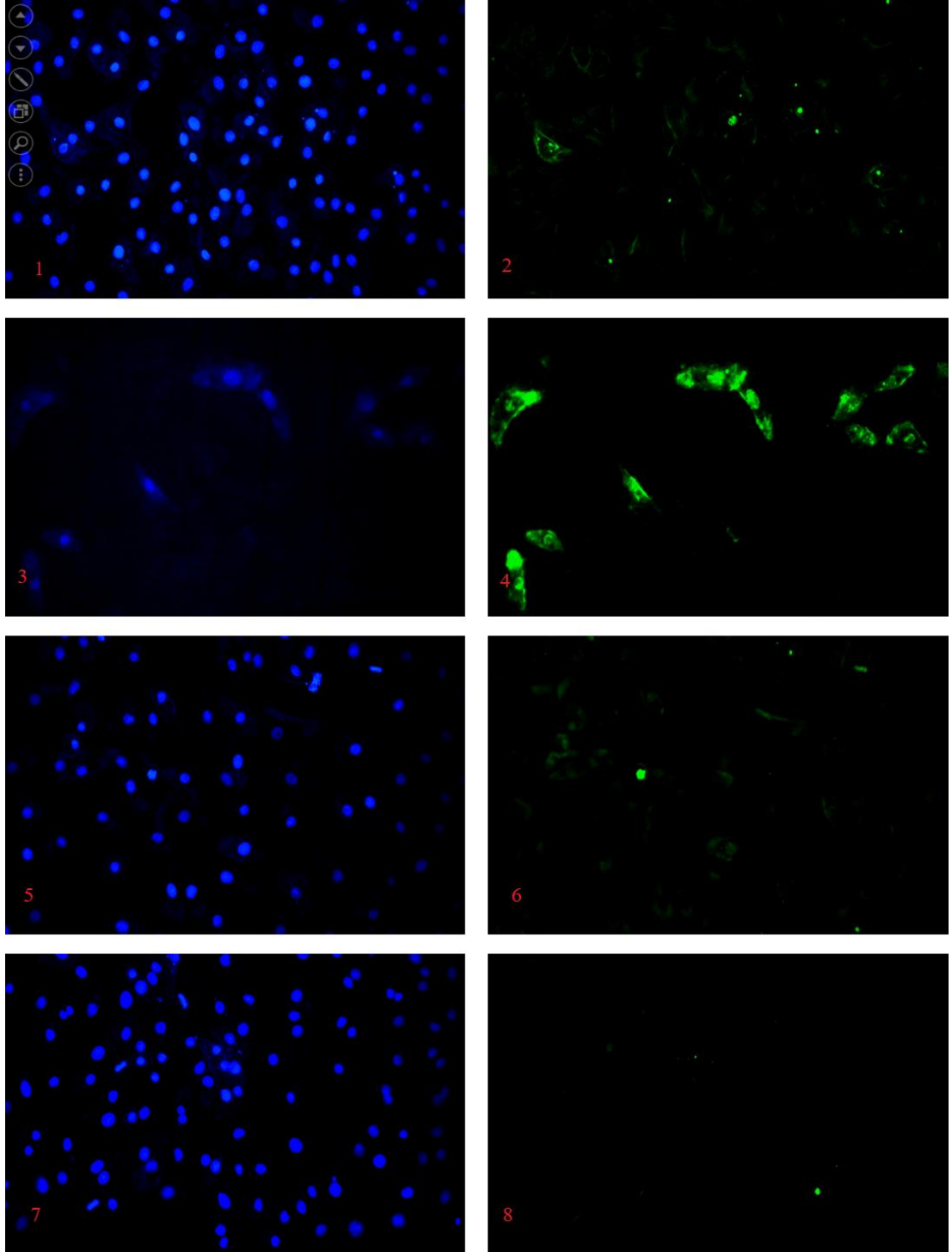
Çalışmamızda TUNEL sonuçlarına göre apoptotik etkilerin incelemesinde karvakrol ve C vitaminin apoptotik indeksi kontrol grubuna göre düşük saptanmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,972$), ($p=0,976$), (Tablo 25).

DOX, DOX+karvakrol, DOX+ C vitamini, DOX+karvakrol+C vitamini gruplarında kontrol grubuna göre apoptotik indeks yüksek saptandı ($p<0,001$), (Tablo 25).

DOX grubu ile; DOX+karvakrol, DOX+ C vitamini, DOX+karvakrol+C vitamini grupları arasında apoptotik indeks açısından anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$), (Tablo 25).

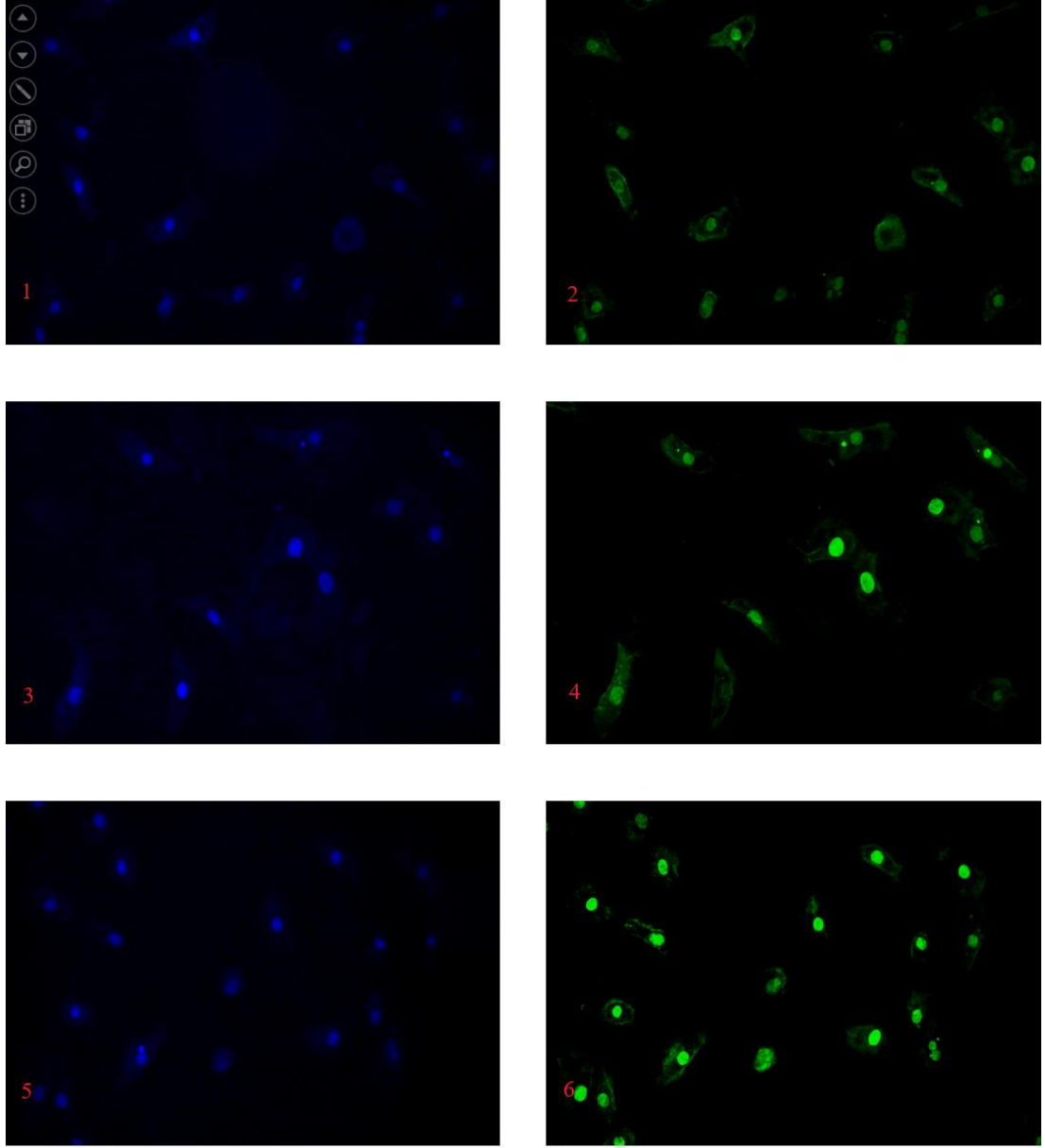
DOX+karvakrol+C vitamini grubu ile DOX+C vit ve DOX+KAR grupları arasında apoptotik indeks açısından anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$), (Tablo 25).

Grupların TUNEL ve DAPI ile boyanması şekil 33 ve 34’te gösterilmiştir.



1. Kontrol grubu DAPI
2. Kontrol grubu TUNEL
3. Doksorubisin grubu DAPI
4. Doksorubisin grubu TUNEL
5. Karvakrol grubu DAPI
6. Karvakrol grubu TUNEL
7. C vitamini grubu DAPI
8. C vitamini grubu TUNEL

Şekil 33. Kontrol, doksorubisin, karvakrol, c vitamini gruplarının DAPI ve TUNEL boyamaları



1. Doksorubisin+Karvakrol grubu DAPI
2. Doksorubisin+Karvakrol grubu TUNEL
3. Doksorubisin+C vitamini grubu DAPI
4. Doksorubisin+C vitamini grubu TUNEL
5. Doksorubisin+Karvakrol+C vitamini grubu DAPI
6. Doksorubisin+Karvakrol+C vitamini grubu TUNEL

Şekil 34. Doksorubisin+karvakrol, doksorubisin+C vitamini, doksorubisin+karvakrol+C vitamini gruplarının DAPI ve TUNEL boyamaları

5. TARTIŞMA

Miyokardit; miyositlerdeki dejenerasyon ve nekroz ile karakterize enflamasyondur (1). Hastalık, asemptomatik seyirden fulminan seyire kadar geniş bir yelpazede klinik bulgular ile görülebileceği için tanı koyulması zordur. Yapılan araştırmalarda saptanan insidans ve prevalans verilerinden çok daha fazla sayıda hasta olduğu tahmin edilmektedir. Çeşitli non-enfeksiyöz ve enfeksiyöz ajanlar etiyojide rol oynamaktadır (16). Enfeksiyöz ajanlar arasında en sık viral etkenler izlenirken non-enfeksiyöz ajanlar içerisinde ilaç toksisitesi ve SLE, romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklar öne çıkmaktadır (5). Hastalığa spesifik bir laboratuvar parametresi veya görüntüleme yöntemi olmaması nedeniyle tanı klinik bulguların yanında yardımcı tetkiklerle desteklenerek koyulur. Kesin tanı biyopside lenfosit infiltrasyonu ve miyositolizis varlığının gösterilmesi ile konulsa da yamalı patern olabilmesi sebebiyle yalancı negatifliklere de rastlanmaktadır (45). Spesifik bir tedavi yöntemi bulunmaması sebebiyle tedavi hastaya, etkene, kliniğe göre değişkenlik göstermektedir. Şu an için kabul gören en önemli tedavi, destek tedavisidir (1). Tanının kolay koyulamaması, spesifik bir tedavinin hala bulunamamış olması nedeniyle miyokardit üzerine araştırmalar devam etmektedir.

Doksorubisin, uzun yıllardır kanser kemoterapi rejimlerinde kullanılan antrasiklin türevi bir ilaçtır. Hem nükleer hem mitokondriyal DNA'ya hasar vererek, hücre ölümüne sebep olarak, oksidatif stresi arttırarak antitümoral etki gösterir (93-94). Doksorubisinin oksidatif stresi arttırması nedeniyle ortaya çıkan doksorubisin ilişkili kardiyotoksiste tedaviyi kısıtlayan en önemli yan etkilerin başındadır (98). Doksorubisine bağlı kardivasküler komplikasyonlar %4,5-7 arasındadır ve bu etkiler akut, subakut, kronik fazlarda görülebilir (99). Bu etkiler doz bağımlı olarak ortaya çıkar ve kümülatif dozun 550 mg/ m² 'nin üzerinde olması kardiyotoksiste riskini anlamlı olarak arttırır (121). Doksorubisin kardiyotoksitesi klinik olarak non-spesifik semptomlardan, kalp yetmezliğine kadar değişebilen klinik ile karşımıza çıkar. Tanı koyduran bir biyobelirteç veya görüntüleme yöntemi olmaması nedeniyle kesin tanı endomiyokardiyal punch biyopsi ile koyulur. Biyopsi işleminin ventrikül fonksiyonlarına vereceği zarar değerlendirildiğinde günümüzde sınırlı sayıda hastaya biyopsi uygulanmaktadır (135). Doksorubisin kardiyotoksitesi gelişim basamakları

henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da hem nükleer hem mitokondriyal DNA, sarkoplazmik retikulum, mitokondri ve nükleer membran hedef arasında sayılabilir (104). En fazla kabul gören görüş ise serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve antioksidan enzim seviyelerinde düşüş sonrası gözlenen miyosit hasarıdır (88). Bu durum neticesinde kardiyotoksitenin tedavisi ve önlenmesinde antioksidan tedavilerin etkilerini inceleyen çok sayıda hücre kültürü çalışması olduğu görülmüştür.

Karvakrol (5-izopropil- 2- metilfenol) lipofilik özellikte, oda sıcaklığında (25 °C)'de 0,976 g/mL yoğunlukta, suda çözünmeyen, etanol, aseton ve dietil eter içerisinde yüksek çözünürlüğe sahip bir fenoldür (153). Yapılan hücre kültürü ve hayvan deneyi çalışmaları karvakrolün, lipid peroksidasyonunu azaltma yoluyla antioksidatif etkinliğini, nitrik oksit/siklik guanozin monofosfat yolu ve opioid sistem gibi santral mekanizmalar ile antinositif özelliğini, COX-2 seviyelerini düşürerek antienflamatuvar etkilerini, MMP2 ve MMP9'u baskılayarak G2/M fazında hücre siklusunu durdurarak BCL-2 ekspresyonunu down-regüle ederek anti-tümör etkinliğini göstermiştir (155-159). Ayrıca karvakrolün kardiyoprotektif özelliği üzerine de pek çok çalışma mevcuttur. Yapılan hayvan çalışmalarında PI3K/AKT sinyal yolağı aracılığı ile, lipid peroksidasyonunu azaltarak, toplam antioksidan kapasiteyi arttırarak, kardiyak hücre apoptozunu azaltarak kardiyak fonksiyonlarda iyileşmeyi sağladığı gösterilmiştir (162-168).

C vitamini, altı karbonlu bir monosakkarit türevidir olması nedeniyle yapıca glukoz benzeyen, renksiz, hafif kokulu, ekşi bir tadı olan, optikçe aktif, polarize ışığı sağa çeviren, suda çözünen bir maddedir. Çoğu hayvanlar ve bitkiler ihtiyaç duydukları C vitaminini glukoz üzerinden üretebilse de insanlar C vitaminini dışarıdan almak zorundadır. Askorbik asit yetersiz alımı sonucu belirtileri yorgunluk, halsizlik, diş eti kanamaları, ciltte morarmalar, eklem ve kas ağrıları olan skorbut hastalığı gelişebilir. C vitamini üzerine yapılan klinik ve deneysel çalışmalar NADPH oksidaz ve ksantin oksidaz seviyeleri azaltarak, oluşan serbest radikalleri ortamdaki uzaklaştırarak, lipid peroksidasyonunu azaltarak, eksojen anti-oksidanlar ile sinerjistik etki göstererek, proinflamatuvar faktörleri azaltarak antioksidatif etki gösterdiğini kanıtlamıştır (171-179). PI3K sinyal yolağı üzerinde apoptozu azalttığı gösterilmiştir (181). Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda doksozobisin sonrası sol ventrikül

ejeksiyon fraksiyonundaki düşüşü, miyofibril sayısındaki azalmayı azalttığı gösterilmiştir (180).

Literatürde antrasiklin kardiyotoksisitesinde karvakrolün etkisini araştıran sadece üç adet çalışma mevcuttur. Retnosari ve arkadaşları, doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisiteye karşı karvakrolün koruyucu etkisini hem in vitro hem in vivo ortamda incelemişlerdir (204). Bu çalışmada sıçanlar 3 gruba ayrılmıştı. Kontrol grubuna 14 gün boyunca 0,1 mL/100 mg/gün mısır yağı ve ardından 15.gün %0,5 DMSO verilmişti. Doksorubisin grubuna 14 gün boyunca mısır yağı (0,1 mL/100 mg/gün) ve ardından 15.günde DOX (15 mg/kg/gün) intraperitoneal verilmişti. Karvakrol+ DOX grubuna 14 gün boyunca karvakrol (50 mg/kg/gün) ardından 15.gün DOX (15 mg/kg/gün) verilmişti. Yapılan in vivo çalışmalarda karvakrolün kalp kütlesi üzerine anlamlı etkisi bulunamamıştı. 14 günlük karvakrol tedavisinin DOX kaynaklı kan basıncı değişikliklerini etkisiz hale getirme potansiyelinin olabileceği saptanmıştı. Karvakrolün lipid peroksidasyonuna anlamlı etkisi bulunamasa da antioksidan seviyelerinde düşüş gözlenmişti. DOX’a bağlı kardiyomiyosit hipertrofisini ve kardiyak fibrozisi azaltmıştı. H9C2 hücreleri üzerinde yaptıkları in vitro çalışmada ise MTT testi ile hücre canlılığı ölçülmüştü. Kontrol ile karşılaştırıldığında 0,067 ve 0,67 μ M dozlarda karvakrol verilmesi hücre canlılığını değiştirmemişti, 6,7 μ M ve üzeri dozlar hücre canlılığını anlamlı ölçüde azaltmıştı. 0,067 μ M karvakrol ile ön işlem, DOX grubu ile karşılaştırıldığında canlılık anlamlı ölçüde arttırmıştı. 0,67 μ M karvakrol ile ön işlemde ise tedavi edilmeyen DOX grubu ile anlamlı hücre canlılığı farkı saptanmamıştı. Karvakrol ile ilgili yapılan bir diğer çalışmada tek doz DOX (10 mg/kg) IV uygulanan erkek sıçanlarda LDH, CK, TNF-alfa, kaspaz-3 düzeylerinin arttığı gözlenmişti. DOX uygulamasından 15 gün önce ve 2 gün sonra 25 mg/kg/gün oral karvakrol uygulanan farelerde kalp fonksiyonu ve oksidatif stresin iyileştiği gözlenmişti (205). Literatürdeki bir diğer çalışmada ise karvakrolün, DOX uygulanan erkek sıçanlardaki kardiyomiyositlerdeki çekirdek sayısının azalttığı, kardiyomiyositlerin ortalama hacimlerini azalttığı, kalp hızındaki artışı azalttığı gösterilmişti (206).

Literatürde C vitamininin, DOX’un kardiyotoksisitesine karşı etkilerini in vitro ortamda değerlendiren çalışmalar mevcuttur (207,213). Ludke ve arkadaşları yetişkin Sprague-Dawley sıçanlarından kardiyomiyosit izole etmişlerdi ve çalışmayı dört gruba

ayırmışlardı. DOX grubuna sadece 10 μ M doksorubisin verilmişti. C vitamini grubuna sadece C vitamini farklı dozlarda (5, 10, 25, 50 ve 100 μ M) verilmişti. Kombine gruba hem DOX hem C vitamini verilmişti. Kontrol grubu sadece hücre kültür ortamında incelendi. Çalışmada C vitamininin hücre canlılığına, oksidatif strese, antioksidan enzimlere ve apoptoza etkisi değerlendirilmişti. Hücre canlılığını değerlendirmek için yapılan MTT testinde 5 ve 10 μ M dozdaki vitamin C’de anlamlı canlılık farkı saptanmamıştı. En optimum etki 25 μ M’de görülmüştü ve 50 μ M ve üzeri dozlarda hücre canlılığına etki değişmemesi sebebiyle çalışma için vitamin C dozu 25 μ M olarak belirlenmişti. Çalışmada 10 μ M DOX dozu 24 saatte hücre canlılığında %23’lük bir azaltma yaparken C vitamini + DOX verilen grupta bu oran %11 olarak belirlenmişti. Kontrol ile C vitamini arasında 24.saatte hücre canlılığı açısından anlam bir fark bulunamamıştı. Aynı çalışmada doksorubisin ile artan lipid peroksidasyonunun ve apoptozun DOX+ C vitamini grubunda DOX’a göre anlamlı ölçüde azaldığı gösterilmişti.

Çalışmamızda akut doksorubisin kardiyotoksisitesi oluşturduğumuz H9C2 hücrelerinde etkileri daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan karvakrol ve C vitamini ile ikisinin kombine kullanımındaki etkilerini araştırmayı planladık. Bu amaçla kontrol, sadece DOX, sadece karvakrol, sadece C vitamini, karvakrol + DOX, C vitamini + DOX, karvakrol + C vitamini + DOX olarak yedi gruba ayırdığımız hücre hatlarının hücre canlılıkları 24. 48. ve 72. saatlerde ölçebilmek için XTT testi ve oksidan/antioksidan dengenin gösterilebilmesi açısından yara iyileşmenin değerlendirilmesi için wound healing testi yaptık. Böylece literatürde yapılan çalışmalardan farklı olarak karvakrol ve c vitamininin hem sinerjist etkisini hem de hücre canlılığı üzerine etkisinin zamana göre değişimini araştırdık.

XTT testinde, uygulanan en düşük DOX dozu olan 1,25 μ M’den itibaren verilen her dozda kontrol grubuna göre hücre canlılığının azaldığı istatistiksel olarak anlamlı saptandı. 24. saat verileri incelendiğinde 40 μ M’ye kadar DOX dozunun artması sitotoksisiteyi artırırken 40 μ M’dan sonraki dozlarda tablonun plato çizdiği gözlemlendi. 48. saat verilerinde 10 μ M’a kadar olan dozların sitotoksisiteyi arttırdığı daha fazla doz arttırmanın sitotoksisiteyi arttırmadığı gözlemlendi. 72. saat hücre canlılığında ise 2,5 μ M’dan sonra doz arttırmanın sitotoksisiteyi değiştirmedığı gözlemlendi. Literatür

verilerine paralel olarak doksorubisinin hücre canlılığına olan olumsuz etkisi artan dozla ve geçen zamanla kontrol grubuna göre artmaktadır (208-209).

XTT testinde; karvakrol ile kontrol grup karşılaştırıldığında, 24.saatte düşük dozlarda (1, 5 ve 10 mM) kontrol grubu ile fark olmadığı gözlemlendi. 20 mM, 40 mM, 80 mM dozlarda ise kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde ($p<0,05$) hücre canlılığının arttığı gözlemlendi. Doz daha fazla arttırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sitotoksik etki ortaya çıktı. 48. saatte hiçbir dozda hücre canlılığına istatistiksel anlamlı olumlu katkı yapmadığı ve hatta 1, 2,5, 5 mM gibi düşük dozlarda, 80 mM ve 160 mM gibi yüksek dozlarda hücre canlılığını kontrol gruba göre azalttığı gösterildi. 72.saatte 5 mM, 20mM ve 40 mM dozlarda kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde hücre canlılığını arttırdığı gözlemlendi. Çalışmamızda 24.saatte hücre canlılığı üzerine olumlu etkileri görülen karvakrolün 48.saatte olumlu etkilerinin gerilediği hatta yüksek dozlarda canlılığın kontrol grubuna göre %100'ün altında saptandığı görüldü. Karvakrolün hücre canlılığı üzerine 48.saatteki bu olumsuz etkileri; literatürdeki H9C2 hücre hattında, in vitro ortamda karvakrolün hücre canlılığına etkilerini inceleyen bir çalışma olan Retnosari ve ark.'ın yaptığı çalışmanın sonuçları ile uyumludur. Retnosari ve ark. H9C2 hücre hattına çeşitli dozlarda karvakrol uygulamış ve 48 saat sonra MTT testi ile hücre canlılığını analiz etmişti. 48. saatte karvakrolün düşük dozları hücre canlılığına etki etmemişti, yüksek dozlarda ise hücre canlılığını istatistiksel anlamlı ölçüde azaltmıştı (205). Bir başka çalışmada; CAR'ın HL-1 hücre hattı kardiyomiyositleri üzerindeki etkisi MTS testi kullanılarak değerlendirilmiş, canlı hücre yüzdesinin CAR tedavisinden 24 ve 48 saat sonra etkilenmediği ve 72 saat sonra artış gözlemlense de bu artışın anlamlı olmadığı bulunmuştur (163). Karvakrolün, kardiyak hipertrofiye etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise; karvakrolün H9c2 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirmek için, farklı konsantrasyonlarda karvakrolle yirmi dört saat muamele edilmiş. Karvakrolün çeşitli konsantrasyonlarının sitotoksitesi MTT testi ile test edilmiştir. Düşük doz karvakrolle tedavi edilen H9c2 hücrelerinde hücre canlılığının %90'nın üzerinde olduğu gösterilmiş. Yüksek dozlarda karvakrolün sitotoksik etkisi saptanmıştır (162). CAR'ın H9c2 hücrelerindeki hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT testiyle değerlendirildiği bir başka çalışmada düşük dozlarda CAR'ın, tedavi edilmeyen hücrelere kıyasla hücre canlılığında artış saptansa da bu değişiklik anlamlı

bulunmamıştır. Daha yüksek dozlarda hücre canlılığı azalmıştır (203). Bu bulgular H9C2 hücre hattında CAR'ın hücre canlılığını arttırsada; yüksek dozlarda sitotoksik etkiye sahip olabileceğini desteklemektedir.

XTT testinde; C vitamini ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, 24.saatte 3,12 μ M dozundan itibaren kontrol grubuna göre hücre canlılığında artış saptandı. 25 μ M dozuna kadar artan hücre canlılığı 25-500 μ M dozları arasında plato çizdikten sonra daha yüksek dozlarda düşüşe geçmiştir. Verilen en yüksek doz olan 2 mM dozunda hücre canlılığı %100'ün altında saptandı hücre canlılığını azaltması istatistiksel olarak anlamlı değildi. C vitamini kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 3,12 μ M – 500 μ M arası dozlarda hücre canlılığını anlamlı olarak arttırdığı saptandı. İstatistiksel anlamlılığının pozitif saptandığı en yüksek doz olan 500 μ M'dan sonra artan dozların hücre canlılığını azaltması daha yüksek dozlarda C vitamininin sitotoksik olabileceğini düşündürmektedir. Testin 48. ve 72. saatinde hiçbir C vitamini dozunun kontrol grubuna göre hücre canlılığını istatistiksel anlamlı olarak arttırdığı gösterilemedi. C vitamininin hücre canlılığı üzerine olumlu etkilerinin 24.saatten sonra gerilediği görüldü. Literatürde H9C2 hücre kültüründe C vitaminin hücre canlılığını değerlendirilen çalışmalarda çelişkili sonuçlar vardır (202, 207, 214) Ludke ve ark.' ın yaptığı çalışmada kontrol grubu ile sadece 25 μ M C vitamini verilen grubun 24. saat hücre canlılığı karşılaştırılmış ve istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştı (207). Yapılan diğer bir çalışmada; H9C2 hücre kültürüne, 10-200 μ g/ml C vitamini eklenmesinin hücre canlılığı üzerinde bir etkisi olmazken, 400 μ g/ml ve üzerindeki dozlar hücre canlılığını azaltmıştı (214). Sacks ve ark.' ın yaptığı çalışmada 1-1000 μ M C vitamini dozlarının 24. saatte hücre canlılığını hafifçe artırdığı, hücre dehidrogenaz aktivitesinin ölçülmesiyle gösterilmiştir (202). Sonuçlarımız; C vitamininin H9C2 hücre hattında, düşük dozlarda hücre canlılığı üzerine olumlu etkilerinin olduğunu ancak doz arttıkça sitotoksik olabileceğini desteklemektedir

XTT testinde; DOX grubu ile DOX + karvakrol verilen grup karşılaştırıldığında karvakrolün düşük dozlarında (1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM) hücre canlılığı anlamlı artış saptanmazken; daha yüksek dozlarda (20 mM, 40mM, 80 mM) hücre canlılığının arttığı görülmektedir. Sadece DOX verilmesine göre 40 mM ve 80 mM karvakrol ile birlikte DOX verilmesi, hücre canlılığını istatistiksel anlamlı ölçüde arttırdı. 48.saatte ve 72.saatte ise düşük dozlarda CAR ile birlikte DOX alanlarda hücre canlılığı, sadece

DOX alanlara göre istatistiksel anlamlı ölçüde azaldı ($p<0,05$). Literatürde karvakrolün hücre canlılığına etkisini H9C2 hücre hattında inceleyen tek çalışma olan Retnosari ve ark. çalışmalarında 10 μM doksorubisin 24 saat sonrasında hücre canlılığını %46,6'ya düşürürken doksorubisin verilemeden önce 0,067 μM karvakrol verilen grupta hücre canlılığı istatistiksel anlamlı olarak daha fazla bulunmuştu ($p<0,05$). Artan dozlarda karvakrol ile ön işlem ise hücre canlılığına etki etmemişti ($p>0,05$). Çalışmamız H9C2 hücre hattında karvakrolün DOX kardiyotoksitesine karşı koruyucu etkisini dektelemektedir. Çalışmamızda daha yüksek karvakrol dozların koruyucu etkinin gözlenmesi deneylerde kullanılan metodların farklılığından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca; farklı dozlarda farklı etkilerin gözlenmesi; CAR'ın etki mekanizması, farmakodinamik ve spesifik biyolojik modülasyon yolları dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilenebilir (205). Bu faktörler, CAR'ın farklı konsantrasyonlardaki etkinliğini etkileyebilir.

XTT testinde DOX grubu ile DOX + C vitamini verilen grup karşılaştırıldığında C vitamini içeren grupta 24., 48. ve 72. saatte 6,25 μM - 500 μM arası dozlarda C vitamini hücre canlılığını arttırırken, 500 μM ve daha yüksek dozlarda hücre canlılığı azaldı. 24.saatte doksorubisin ile birlikte 50 μM -500 μM arasındaki dozlarda C vitamini alan grubun hücre canlılığı sadece doksorubisin alan gruba göre anlamlı ölçüde artmıştır. 48. ve 72. saatteki hücre canlılığındaki artışlar anlamlı bulunmadı. Ludke ve ark.' ın yaptığı çalışmada 0,01 μM doksorubisinden 24 saat sonra sonra hücrelerin %96'sı, 0,1 μM doksorubisinden 24 saat sonra hücrelerin %90,1'i, 1 μM doksorubisinden 24 saat sonra hücrelerin %84'ü, 10 μM doksorubisinden 24 saat sonra hücrelerin %77,7 'si canlılığını koruyordu (207). Doksorubisinin artan dozlarda sitotoksitesinin artması çalışmamızla uyumluydu. Bu çalışmada; 10 μM doksorubisin ile 5 ve 10 μM C vitamini uygulamasının hücre canlılığına istatistiksel olarak anlamlı etki yapmazken, 25 μM C vitamini hücre canlılığını %77,7'den %85'e çıkarmıştı ($p<0,05$). 50 μM ve 100 μM C vitamininin ise kontrol grubuna göre hücre canlılığını artırsa da 25 μM C vitamini ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde hücre canlılığını arttırmamıştı (207). Yetişkin Sprague-Dawley sıçanlarından izole edilen kardiyomiyositler üzerinde yapılan bir çalışmada da kardiyomiyositler 24 saat boyunca 25 μM Vitamin C, 10 μM doksorubisin tedavi edildikten sonra canlılık MTT testi kullanılarak analiz edilmiştir. Kardiyomiyositlerin vitamin C ile önceden

işlenmesi, Vitamin C + DOX grubunda yaşayabilirliğin anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur (215). Yapılan diğer bir çalışmada ise 40 μ M DOX ile 1-2000 μ M C vitamininin herhangi bir dozda hücre canlılığında herhangi bir artış göstermediğini bulunmuştur (202). Çalışmamız C vitaminin H9c2 hücre kültüründe DOX kaynaklı toksisiteye karşı koruyucu etkisini desteklemektedir. Ancak diğer çalışmasından farklı olarak daha yüksek C vitamini dozlarının etkin olması çalışmamızda kullanılan dokсорubisin dozunun daha yüksek olması ve deneyde kullanılan yöntemlerdeki farklılıktan kaynaklanabilir.

XTT testinde DOX grubu ile DOX + C vitamini + karvakrol grubu karşılaştırıldı. Birçok doz kombinasyonunda canlılık %50'nin üzerinde saptansa da istatistiksel olarak anlamlı tek doz IC50 dozunda DOX + 200 μ M C vitamini + 40 mM karvakrol kombinasyonu olarak görüldü ($p=0,032$). Bu sebeple çalışmanın diğer aşamalarında 200 μ M C vitamini ve 40 mM karvakrol kullanıldı.

XTT testinde karvakrol ve C vitamininin etkileşimini değerlendirebilmek amacıyla IC50 dozunda dokсорubisin ve çeşitli dozlarda C vitamini; IC 50 dozunda dokсорubisin, ve çeşitli dozlarda karvakrol ve C vitamini kombinasyonu ile karşılaştırıldı. IC50 dozunda dokсорubisin, 100 μ M C vitamini kombinasyonuna 20 mM ve 80 mM karvakrol eklemek; IC 50 dozunda dokсорubisin 500 μ M C vitamini kombinasyonuna 20 mM, 40 mM ve 80 mM karvakrol eklemek hücre canlılığını istatistiksel anlamlı olarak azalttı ($p<0,05$). Diğer dozlarda eklenen karvakroller de hücre canlılığını azaltsa da istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Miyokard infarktüsü, miyokardit ve kardiyotoksite sonrası miyokard kaybı kalp yetmezliği nedenleri arasında sayılabilir. Bu yüzden çeşitli sebeplerle oluşan kardiyak hücre zedenlenmesinin iyileşmesinin değerlendirilmesi önemlidir (216-217). Wound healing testi, in vitro hücre göçünü incelemek için geliştirilen en eski yöntemlerden biridir. Bu yöntem, hücre tek tabakasında oluşturulan bir "yaraya" hücre göçünün gözlemlenmesine dayanır. Bu yöntem bir dereceye kadar yara iyileşmesindeki hücre göçünü taklit eder. Hücre tipine bağlı olarak, hücreler yara gevşekçe bağlı popülasyonlar (örn. fibroblastlar) veya hücre tabakaları (örn. epitel ve endotel hücreleri) olarak göç eder ve bu hücreler in vivo göç sırasında bu hücrelerin davranışını da taklit eder. Hücrelerin göçü, hücrelerin altındaki ekstrasellüler matriks,

çözünür faktörler, hücreler arası etkileşimler tarafından düzenlenir. Bu faktörlerin hücre göçü üzerindeki etkileri yara iyileştirme yöntemi kullanılarak incelenebilir (218). Wound healing testi için hücrelerin plak zeminine pipet ucu yardımıyla "+" şeklinde çizim yapılarak yara oluşturuldu ve 0., 16., ve 24. saatlerde yara yüzey alanları ölçülerek yara iyileşmesi değerlendirildi.

Kontrol grubunda yara yüzeyi 16.saatte %70,6'ya 24.saatte %54,5'e gerilerken IC50 dozda doksorubisin verilen grupta 16.saatte yara yüzeyi %125'e 24.saatte %137'ye yükseldi. Literatürde değişik hücre kültürlerinde DOX'un yara yüzey alanını arttırdığını gösteren birçok çalışma olsa da H9C2 hücre hattında doksorubisinin wound healing testi ile değerlendirildiği sadece bir çalışmaya rastlandı. Koczurkiewicz-Adamczyk ve arkadaşları, H9c2 hücre hattında sinamik asidin kardiyoprotektif etkilerini değerlendirirken 0,5 μ M doksorubisinin yara yeri iyileşmesini kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak geciktirdiğini saptamıştı. Koczurkiewicz-Adamczyk ve arkadaşları çalışmasında wound healing deneyini 15 saate kadar devam ettirmişlerdi ve zamanın ilerlemesi ile DOX'a maruz kalan yara yeri yüzey alanının bizim çalışmamıza benzer şekilde genişlediğini saptamışlardı (210).

40 mM karvakrol uygulaması sonrası yara yüzey alanı 16.saatte %29,9'a 24.saatte %20,2'ye geriledi. Kontrol grubuna göre hem 16.saat hem 24.saat verileri istatistiksel olarak anlamlı saptandı. ($p=0,03$; $p<0,0001$). Literatürde H9C2 hücre hattında karvakrolün kullanıldığı wound healing testinin yapıldığı bir çalışmaya rastlanmadı. Karvakrol ve hyalüronik asit kombinasyonunun kullanıldığı HaCaT hücreleri (ölümsüz keratinosit hücre hattı) üzerindeki bir çalışmada 10 μ g/mL dozda karvakrol ve hyalüronik asit kombinasyonunun yara yüzey alanını 6. saatte %80'e 18.saatte %40'a geriletmiş. 24.saatte yaranın tamamen kapandığı saptanmış (211).

200 μ M C vitamini uygulaması sonrası yara yüzey alanı 16.saatte %56,9'a 24.saatte %27'ye geriledi. Kontrol grubuna göre 24.saat verisi istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p=0,002$). Literatürde H9C2 hücre hattında C vitamininin kullanıldığı wound healing testinin yapıldığı bir çalışmaya rastlanmadı. HEK001 keratinosit hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada kronik yara tedavisinde yapay deri yerine kullanılabilecek kitosan/agaroz filmini C vitamini ile zenginleştirerek yara

kapanma yüzdeleri karşılaştırılmış. Filmin C vitamini ile zenginleşip zenginleşmemesinin yara kapanma miktarı ile farkı bulunamamıştı (212).

Kombine grupların değerlendirmesinde 16.saatte hiçbir grubun birbiri ile kıyaslanmasında anlamlı fark saptanmadı. 24.saatte ise DOX grubu ile DOX + karvakrol grubu, DOX grubu ile DOX + karvakrol + C vitamini grubu arasında anlamlı fark saptandı. ($p=0,008$, $p=0,001$)

Sinerjist etkinin değerlendirilmesi açısından DOX+ karvakrol ve DOX+ karvakrol+ C vitamini, DOX+ C vitamini ile DOX + karvakrol + C vitamini karşılaştırıldı. En düşük yara yüzey alan ölçüleri DOX + karvakrol + C vitamini kombinasyonu ile sağlansa da istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

DOX sonrası CAR'ın yara iyileşmesine etkin olduğunu saptandı. C vitamininin ise DOX sonrası yara iyileşmesinde etkisi gösterilemedi.

BAX, birçok hücrel aktivitede rol oynar. Proapoptotik düzenleyici olarak görev alır. BAX ekspresyonunun artması, sonucu programlanmış hücre ölümüne giden yolağın aktifleşmesine yol açar (224-225). Kontrol grubunda yaptığımız değerlendirmede BAX reaksiyonunun negatif olduğunu ve boyanmanın hiç olmadığını saptadık. Sadece 40 mM karvakrol ve sadece 200 μ M C vitamini verilen grupta da BAX reaksiyonu negatif saptandı.

Doksorubisin uygulanan grupta yoğun BAX reaksiyonu görüldü. Literatürde doksorubisinin BAX üzerinden apoptotik aktiviteye neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (224-225). Çalışmamızdaki veriler literatür ile uyumlu saptandı.

Doksorubisin ile birlikte 40 mM karvakrol uygulaması sonrası BAX reaksiyonu negatif saptandı ve doksorubisin grubuna göre anlamlı ölçüde BAX reaksiyonu azdı. Hücrelerin morfolojik değerlendirilmesinde ise; kardiyomiyositler şeklini korumuştur, yer yer piknotik hücreler mevcuttu. Lashkari ve ark.'ın, 48 saat boyunca 10 nM doksorubisin ve 100 μ g/mL zataira multiflora özütüne (karvakrol) maruz kalan NALM-6 (akut lenfoblastik lösemi hücreleri) hücreleri üzerinde yapmış olduğu çalışmada hem aynı anda hem de ayrı ayrı karvakrol daha yüksek BAX ekspresyonu oluşturduğunu saptamıştı (226). Lashkari ve ark.'ın yapmış olduğu çalışma karvakrolün, NALM-6 hücrelerinde doksorubisinin apoptotik etkilerini arttırdığını

göstermişti. Bizim çalışmamız ise H9C2 miyosit hücre hattında karvakrolün BAX üzerinden apoptoza karşı koruyucu etkisini desteklemektedir. Bu sonuçlar Karvakrolün BAX ve apoptoz üzerinde farklı dokularda farklı etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Bu konuda yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Doksorubisin ile birlikte 200 μ M C vitamini verilen grupta BAX reaksiyonu kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha yüksek, sadece DOX verilen gruba göre daha düşük saptandı. Hüclerin morfolojik değerlendirilmesinde, kardiyomiyositler şeklini korumuştı ancak DOX+ karvakrol grubuna göre artmış piknotik hücreler mevcuttu. Bulgularımız C vitamininin de BAX üzerinden doksorubisinin apoptotik etkisini azalttığını düşündürmektedir. Nematollahi ve ark. yapmış olduğu çalışmada kardiyak girişimsel işlem sırasında radyasyon alacak olan hastalara işlem öncesi C vitamini verilmesi ile verilmemesi sonucunda hastaların BAX ekspresyonu karşılaştırılmıştı. İşlemden 3 saat önce 25 mg/kg C vitamini alan grupta almayanlara göre BAX daha düşük saptanmıştı (230). BAX'taki bu düşüş C vitamininin muhtemel antioksidan ve serbest radikalleri temizleme etkisinin bir sonucu olabilir.

Çalışmamız doksorubisin uygulanan gruba 40 mM karvakrol, 200 μ M C vitamini ve karvakrol+ C vitamini eklenmesinin BAX ekspresyonunda azalma ile birlikte kardiyomiyositlerin şeklinin de korunmuş olduğunu göstermektedir. DOX+karvakrol uygulanan gruba C vitaminin eklenmesi BAX düzeylerini değiştirmezken DOX+ C vitamini uygulanan gruba karvakrol eklemek BAX düzeylerini anlamlı düzeyde azalttı. Bu sonuçlar; karvakrolün H9C2 miyosit hücre hattında BAX ve apoptoz üzerinde C vitamininden daha etkin olabileceğini düşündürmektedir. Bu konuda yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kaspaz-3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 ile etkileşime girerek hücre apoptozunun oluşmasını sağlayan bir moleküldür. Apoptozis ile sonuçlanan reaksiyon dizilerinde ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (224,227). Kaspaz ailesi üyeleri arasında kaspaz-3, apoptozisin kritik bir düzenleyicisidir ve apoptozisin son aşamasında önemli bir rol oynayarak endojen ve ekzojen apoptotik yolların merkezi olarak görev yapar (228). Kontrol grubunda yaptığımız değerlendirmede kaspaz-3 reaksiyonunun negatif olduğunu ve boyanmanın hiç olmadığını saptadık. Sadece 40 mM karvakrol ve sadece 200 μ M C vitamini verilen grupta da kaspaz-3 reaksiyonu negatif saptandı.

Doksorubisin uygulanan grupta yoğun kaspaz-3 reaksiyonu görüldü. Çalışmamıza benzer şekilde literatürde doksorubisinin kaspaz-3 üzerinden apoptotik aktiviteye neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (224,227).

Sadece DOX verilen gruba göre DOX+ 200 µM C vitamini verilen grupta kaspaz-3 ekspresyonu anlamlı ölçüde düşük saptandı. Hücrelerin morfolojik değerlendirilmesinde, hücrelerin bütünlüğü korunmuştu ve kontrol grubuna benzer şekilde apoptotik ve piknotik hücre gözlenmedi. Sonuçlarımız; H9C2 miyosit hücre hattında C vitaminin kaspaz-3 ekspresyonunu azaltarak apoptotik aktiviteyi azalttığını düşündürmektedir. Mussa ve ark., MDA-MB-231 ve MCF-7 olmak üzere farklı iki meme kanseri hücre hattında yapmış olduğu çalışmada C vitamini uygulamasının çalışmamıza benzer şekilde kaspaz-3 ekspresyonunu artan dozlarda daha çok olmak üzere azalttığını göstermişlerdi (228).

Sadece DOX verilen grup ile DOX+40 mM karvakrol verilen grup arasında kaspaz-3 ekspresyonu açısından anlamlı fark bulunmadı. Zeidan ve ark. yapmış olduğu çalışmada HaCaT (insan epitelyal keratinositleri) hücre hattına 0,3 M sorbitol vererek kaspaz-3 aktivitesi oluşturulduktan sonra 4,3 µl/ml (%0,43) karvakrol vererek kaspaz-3 aktivitesi değerlendirilmişti (229). Sonuçlarda sadece DMEM verilen kontrol grubu ile sadece karvakrol verilen kontrol grubu arasında kaspaz-3 aktivite farkı saptanmasa da sorbitol verildikten sonra %35'e ulaşan kaspaz aktivitesi karvakrol verilerek %10'un altına düşürülmüştü. Çalışmamızda ise karvakrolün H9C2 miyosit hücre hattında kaspaz-3 ekspresyonuna belirgin etkisi yoktu.

Endotel hücreleri ve kardiyomiyositlerde doksorubisin kaynaklı apoptozu gösterilmiştir (231). Ayrıca, mitokondrilerin sitokrom c salgılayarak apoptozu düzenlemede önemli bir rol oynamaktadır. Bu salınım, kısmen dış mitokondriyal membranda bulunan birkaç pro- ve antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteini tarafından düzenlenir. Daha önce yapılan çalışmalar doksorubisinin BCL-2 ekspresyonunun azaldığı ve arttığı çalışmalar vardır. (224-225, 232). Çalışmamızda da doksorubisin verilen grupta BCL-2 ekspresyonu artmıştı. BCL-2 ekspresyonundaki artış Childs ve ark. çalışmalarına benzer şekilde apoptoza karşı adaptif bir yanıtın meydana gelmiş olabileceğini düşündürmektedir.

TGF-beta, fibroblast işlevini düzenleyerek fibrogenezin aracısı rolünü üstlenir. Yapılan çalışmalarda fibrozis ile giden pek çok hastalıkta TGF-beta düzeylerinin up-regüle olduğu görülmektedir (219,220). İmmünohistokimyasal testlerde; 40 mM karvakrol verilen grupta TGF-beta seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azaldı ($p<0,05$). Liu ve ark.; yapmış olduğu çalışmada, aralarında karvakrolün de bulunduğu 7 farklı bitkinin ekstratının anti inflamatuvar etkinliğini değerlendirmişti (219). Domuz alveolar makrofajları üzerinde yapılan çalışmada çalışmada 25, 50, 100 ve 200 µg/mL dozlarda verilen karvakrol lipopolisakkarit yolağı aracılığı ile doz arttıkça daha fazla olmak üzere TGF-β'yi azaltmıştı. Bir diğer çalışmada ise Ram ve ark. tek taraflı üreter obstrüksiyonu yolu ile böbrek fibrozisi oluşturdukları farelere 25 mg/kg ve 50 mg/kg 14 gün boyunca karvakrol verilmişlerdi (220). Sonuç olarak karvakrol tedavisi TGF beta-1'in artmış seviyelerini hafifletmişti. Karvakrolün oksidatif stres ve inflamasyonu hedef alarak böbrek fibrozisini azalttığını göstermişlerdi. Çalışmamızda karvakrolün in vitro ortamda TGF-beta üzerindeki azaltıcı etkisi literatür ile uyumludur.

200 µM C vitamini verilen grupta TGF-beta seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak azaldı ($p<0,05$). Li ve ark. hiperürisemik nefropatili sıçanlarda yapmış olduğu çalışmada 10 mg/kg/gün C vitamini verilen sıçanlarda tedavi verilmeyen gruba göre TGF-beta seviyelerinin azaldığı bu da infiltrasyonu 4 kat, fibröz alanlarını 7 kat azaltmıştı (221).

Literatürde doksorubisinin TGF-beta seviyesini arttırdığı gösterilmiştir (222-223). Çalışmamızda da doksorubisin verilen grupta TGF-beta seviyesi kontrol gruba göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı. Doksorubisin ile birlikte karvakrol, C vitamini ve karvakrol+C vitamini verilen grupta da yüksek TGF-beta seviyesi vardı. DOX verdiğimiz gruba 40 mM karvakrol veya 200 µM C vitamini eklemek TGF beta seviyelerinde anlamlı değişikliğe yol açmadı.

TIMP-1 ve TIMP-2 matriks metalloproteinazları (MMP'ler) ve disintegrin-metalloproteinazları (ADAM'lar ve ADAMTS'ler) düzenleyen bir inhibitör moleküldür. MMP'leri düzenlemede TIMP-1-2, hücre dışı matris (ECM) bileşiminde, yara iyileşmesinde önemli görevleri mevcuttur. TIMP-1'in düzensiz aktivitesinin kanserle bağlantısı olduğunu ileri süren çalışmalar mevcuttur. TIMP-1; MMP-7, MMP-9, MMP-1 ve MMP-3'ü daha iyi inhibe ederken TIMP-2 ise MMP-2'yi daha iyi

inhibe eder (233). DOX'a yanıt olarak matris metalloproteinazlarındaki (MMP'ler) değişikliklerini araştıran çalışmalarda MMP'lerdeki düzensizliğin çeşitli kalp yaralanmalarında kalp yetmezliğinin gelişimine katkıda bulunan erken bir mekanizma olduğu bildirilmiştir. Fare ve domuz modellerinde DOX'un akut uygulaması MMP-2 ve MMP-9 mRNA ve protein seviyelerinde bir artış göstermiştir (234). DOX ile tedavi edilen MMP-2 ekspresyonu yukarı düzenlenirken TIMP-2 azaldığı Chen ve ark. tarafından gösterilmiştir (235). Çalışmamızda ise hem TIMP-1 hem de TIMP-2 ekspresyonunda artış saptandı. Karvakrol ve C vitamini eklenmesinin TIMP-2 üzerine etkisi olmazken TIMP-1 ekspresyonu arttı. Sun ve ark BGC-823 (insan mide kanseri hücreleri) üzerinde yapmış olduğu çalışmalarda 10 µmol/L, 20 µmol/L, 40 µmol/L, 80 µmol/L uygulanan hücrelerde uygulanmayanlara göre TIMP-1 ekspresyonunda artış saptamıştı (236). H9C2 miyosit hücre hattında TIMP-1 ve TIMP-2'nin değerlendirildiği daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Gen ekspresyonunun kantitasyonu gerçek zamanlı PCR testi aracılığı ile ölçüldü. Doksorubisin+ C vitamini verilen grupta sadece doksorubisin verilen gruba göre kaspaz- 3 ve BAX ifadesinin daha az saptanması, doksorubisin+karvakrol verilen gruba C vitamini eklenmesi ile MMP-2 ve TGF-beta ifadesinin azalması C vitaminin anti-apoptotik, anti-oksidan, antifibrotik, anti-inflamatuvar etkilerini göstermektedir. Elde edilen sonuçlar önceki çalışmalardaki bulgular ile paralellik göstermektedir (171-181).

Doksorubisin verilen gruba karvakrol eklenmesi ile BAX ve MMP-2 ekspresyonundaki azalması, Doksorubisin+C vit verilen gruba karvakrol eklenmesi ile MMP-2 ve TGF-beta ifadesinin azalması karvakrolün anti-apoptotik, anti-oksidan, antifibrotik etkilerini göstermektedir. Karvakrolün bu özellikleri önceki pek çok çalışmada gösterilmiştir (155,158,159).

Apoptoza giden hücrelerin değerlendirilmesi amacıyla yapılan TUNEL testinde ayrı ayrı karvakrol ve C vitamini verilen grupların apoptotik indeksleri kontrol grubuna göre daha düşük saptansa da istatistiksel olarak anlamlı değildi. Sadece doksorubisin verilen grupta kontrol grubuna göre yaşayan hücre sayısı belirgin olarak azaldı ve apoptotik indeks yükseldi. Bu sonuçlar doksorubisinin sitotoksik ve apoptotik etkisini göstermektedir. Çalışmamızda doksorubisin verilen gruba C

vitamini, karvakrol, C vitamini+karvakrol kombinasyonunun uygulanması apoptotik indekse etki etmedi. C vitamini ve karvakrolün anti-apoptotik etkilerinin TUNEL testi ile gösterilmesi adına daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, çalışmamızda; doksorubisin kardiyotoksitesisi oluşturduğumuz hücre hatlarında karvakrol ve C vitamininin bazı dozlarda ayrı ayrı kardiyoprotektif etkileri gösterilse de XTT hücre canlılık testi ve yara iyileşme testinde IC50 dozunda kontrol grubuna göre sinerjistik etkisi saptanmadı. XTT testinde DOX+C vitamini grubuna karvakrol eklenmesinin hücre canlılığını azalttığı saptandı. Doksorubisin uygulanan gruba 40 mM karvakrol, 200 µM C vitamini ve karvakrol+ C vitamini eklenmesinin BAX ekspresyonunda azalma ile birlikte kardiyomiyositlerin şeklinin de korunmuş olduğu ve C vitaminin kaspaz-3 ekspresyonunu azaltarak apoptotik aktiviteyi azalttığı bulunmuştur. C vitamini ve karvakrolün gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanarak BAX, MMP-2, TGF-beta faktörlerin gen ekspresyonlarını azalttığı gösterildi.

6. SONUÇLAR

Bu çalışma; doksorubisin ilişkili akut kardiyotoksisite oluşturulan H9C2 hücre hattında, karvakrol ve C vitamini ile ikisinin kombine kullanımındaki etkilerinin araştırılması amacıyla yapıldı.

1. Doksorubisinin hücre canlılığı üzerine etkisi doz bağımlıdır. Çalışmamızda kullanılan en düşük doz olan 1,25 μM 'den 40 μM 'ye kadar olan artan dozlarda hücre canlılığı azaldı. 40 μM 'den yüksek dozların hücre canlılığına etki etmede anlamlı fark saptanmadı.

2. Doksorubisinin hücre canlılığına etkisi zaman geçtikçe artmaktadır. 1,25 μM 'den 20 μM 'ye kadar olan dozlarda 72. saat ve 48. saat hücre canlılığı yüzdesi 24.saatte göre anlamlı olarak azalmış saptandı. 40 μM ve daha yüksek dozlarda 24., 48. ve 72.saat hücre canlılıkları arasında anlamlı fark saptanmadı.

3. C vitamininin 3,12 μM - 500 μM dozları arasında 24.saatte kontrol grubuna göre hücre canlılığını arttırmaktadır.

4. C vitamini, 48. ve 72. saatte hiçbir dozda hücre canlılığını arttırmamaktadır.

5. C vitamininin hücre canlılığını artırma etkisi 500 μM 'den sonra azalmaktadır. 2 mM dozda hücre canlılığı hem 24. hem 48. hem 72.saatte kontrole göre %100'ün altında saptanmıştır.

6. Karvakrol 24.saatte 20 mM, 40 mM ve 80 mM dozlarda hücre canlılığını arttırmaktadır. ($p<0,001$).

7. Karvakrol 48.saatte 1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 80 mM, 160 mM dozlarda hücre canlılığını azaltmaktadır. ($p<0,001$)

8. Doksorubisin IC50 dozu ve 50-2000 μM dozda C vitamini verilen grup ile sadece IC50 dozunda doksorubisin verilen grup arasında 24. saatte hücre canlılığı açısından anlamlı fark saptandı. ($p<0,05$)

9. Doksorubisin IC50 dozu ve C vitamini verilen grup ile sadece IC50 dozunda doksorubisin verilen grup arasında 48. ve 72. saatte hücre canlılığı açısından anlamlı fark saptanmadı.

10. Doksorubisin IC50 dozu ve 40-80 mM dozda karvakrol verilen grup ile sadece IC50 dozunda doksorubisin verilen grup arasında 24. saatte hücre canlılığı açısından anlamlı fark saptandı. ($p<0,05$)

11. Doksorubisin IC50 dozunun yanına 1-10 mM dozda karvakrol verilmesi sadece doksorubisin IC50 dozu verilmesine göre hücre canlılığını azalttı. ($p<0,05$)

12. IC50 dozunda doksorubisin verilen hücrelere 40 mM karvakrol, 200 μ M C vitamini verilmesi 24. saatte hücre canlılığını arttırdı. ($p=0,032$)

13. 40 mM karvakrol 200 μ M C vitamini kombinasyonu dışındaki hiçbir doz kombinasyonu IC50 dozunda doksorubisin verilen grubun hücre canlılığını arttırmadı.

14. DOX + karvakrol verilen gruba 100,200,400,500 μ M C vitamini eklenmesi hücre canlılığını arttırmadı.

15. IC50 dozunda doksorubisin, 100 μ M C vitamini kombinasyonuna 20 mM ve 80 mM karvakrol eklemek; IC 50 dozunda doksorubisin 500 μ M C vitamini kombinasyonuna 20 mM, 40 mM ve 80 mM karvakrol eklemek hücre canlılığını istatistiksel anlamlı olarak azalttı ($p<0,05$). Diğer dozlarda eklenen karvakroller de hücre canlılığını azaltsa da istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

16. Wound healing deneyinin 16. saatinde kontrol grubuna göre 40 mM karvakrol verilen grupta yara kapanmasının hızlandığı saptandı. ($p=0,03$) Diğer gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.

17. Wound healing deneyinin 24. saatinde kontrol grubuna göre 40 mM karvakrol verilen grupta yara kapanmasının hızlandığı saptandı. ($p<0,0001$)

18. Wound healing deneyinin 24. saatinde kontrol grubuna göre 200 μ M C vitamini verilen grupta yara kapanmasının hızlandığı saptandı. ($p<0,0001$)

19. Wound healing deneyinin 24. saatinde sadece IC50 dozunda DOX verilen gruba göre IC50 dozunda DOX + 40 mM karvakrol + 200 μ M C vitamini verilen grupta yara kapanmasının hızlandığı saptandı. ($p=0,001$)

20. Wound healing deneyinin 16. ve 24. Saatlerinde karvakrol ve C vitamininin ayrı ayrı verilmesi ile beraber verilmesi arasında istatistiksel fark saptanmadı.

21. TGF-beta boyanma skorları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; C vitamini ve CAR grubunda daha düşük boyanma skoru vardı ($p=0,01$ ve $p=0,015$).

22. TGF-beta boyanma skorlarında DOX, DOX+karvakrol, DOX+C vitamini ve DOX+karvakrol+C vitamini gruplarında, kontrol grubuna göre belirgin yüksek boyanma skorları gözlemlendi ($p<0,001$).

23. BAX boyanma skorlarında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında C vitamini ve CAR grubunda belirgin düşük boyanma skoru varken, DOX ve DOX+C vitamini grubunda belirgin yüksek boyanma skoru ($p<0,001$).

24. BAX boyanma skorlarında, DOX+karvakrol, DOX+C vitamini ve DOX+karvakrol+C vitamini gruplarında, DOX grubuna göre boyanma skor belirgin düşük bulundu ($p<0,001$).

25. BAX boyanma skorlarında, DOX+karvakrol+C vitamini grubunda DOX+C vitamini grubuna göre daha düşük boyanma skoru gözlemlendi ($p=0,034$).

26. Kaspaz-3 boyanma skorlarında; DOX, DOX+karvakrol, DOX+C vitamini ve DOX+karvakrol+C vitamini gruplarında, kontrol grubuna göre belirgin yüksek boyanma skorları gözlemlendi ($p<0,001$).

27. Kaspaz-3 boyanma skorlarında; DOX+C vitamini grubunun boyanma skoru DOX+karvakrol+C vitamini grubundan da düşüktü ($p=0,03$).

28. BCL-2 boyanma skorlarında C vitamini, DOX, DOX+karvakrol, DOX+C vitamini ve DOX+karvakrol+C vitamini gruplarında kontrol gruplarına göre daha yüksek boyanma skoru vardı ($p<0,001$).

29. BCL-2 boyanma skorlarında; DOX+C vitamini ve DOX+karvakrol+C vitamini gruplarında DOX grubuna göre, DOX+karvakrol+C vitamini grubunda DOX+CAR grubuna göre daha düşük boyanma skorları bulundu ($p<0,05$).

30. TIMP-2 boyanma skorlarında DOX, DOX+karvakrol, DOX+C vitamini ve DOX+karvakrol+C vitamini gruplarında, kontrol grubuna göre belirgin yüksek boyanma skorları gözlemlendi ($p<0,001$).

31. TIMP-2 boyanma skorlarında DOX ile DOX+karvakrol, DOX+C vitamini ve DOX+karvakrol+C vitamini grupları karşılaştırıldığında ise sadece DOX+CAR grubunda boyanma skoru daha yüksek bulundu ($p=0,038$).

32. TIMP-2 boyanma skorlarında DOX+CAR grubunun boyanma skoru DOX+karvakrol+C vitamini grubundan da yüksekti ($p=0,001$).

33. TIMP-1 boyanma skorlarında, DOX, DOX+karvakrol, DOX+C vitamini ve DOX+karvakrol+C vitamini gruplarında, kontrol grubuna göre belirgin yüksek boyanma skorları gözlemlendi ($p<0,001$).

34. TIMP-1 boyanma skorlarında, DOX+karvakrol+C grubunun boyanma skoru hem DOX+C vitamini hem de DOX+CAR grubundan daha yüksekti ($p<0,05$).

35. Gerçek zamanlı PCR sonuçlarında DOX+C vitamini grubunda DOX grubuna göre kaspaz-3 ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma görüldü ($p<0,001$).

36. Gerçek zamanlı PCR sonuçlarında DOX+ C vit grubunda hem DOX+karvakrol hem de DOX+karvakrol+ C vitamini gruplarına göre kaspaz-3 ifadesinde anlamlı ölçüde azalma saptandı ($p<0,001$).

37. Gerçek zamanlı PCR sonuçlarında DOX grubu ile karşılaştırıldığında DOX+karvakrol, DOX+ C vitamini, DOX+karvakrol+ C vitamini gruplarında BAX ifadesinde azalma saptandı ($p<0,001$).

38. Gerçek zamanlı PCR sonuçlarında DOX+karvakrol ve DOX+karvakrol+C vitamini gruplarında DOX grubuna göre MMP-2 ifadesinde azalma saptandı ($p<0,001$).

39. Gerçek zamanlı PCR sonuçlarında DOX+karvakrol+ C vitamini grubunda DOX+karvakrol grubuna göre MMP-2 ifadesinde azalma saptandı ($p=0,044$).

40. Gerçek zamanlı PCR sonuçlarında DOX+karvakrol+C vitamini grubunda DOX+karvakrol ve DOX+ C vitamini grubuna göre TIMP-1 ifadesinde azalma saptandı ($p<0,001$).

41. Gerçek zamanlı PCR sonuçlarında DOX+karvakrol+C vitamini grubunda DOX+karvakrol ve DOX+ C vitamini grubuna göre TIMP-2 ifadesinde azalma saptandı ($p<0,001$).

42. Gerçek zamanlı PCR sonuçlarında TGF- β ifadesinde DOX+karvakrol+C vitamini grubunda; DOX+karvakrol, DOX+ C vitamini ve DOX grubuna göre azalma saptandı ($p<0,001$).

43. TUNEL sonuçlarında DOX, DOX+karvakrol, DOX+ C vitamini, DOX+karvakrol+C vitamini gruplarında kontrol grubuna göre apoptotik indeks yüksek saptandı ($p<0,001$).

KAYNAKLAR

1. Fung G, Luo H, Qiu Y, Yang D, McManus B. Myocarditis. *Circ Res* 2016;118(3):496-514.
2. Bilgiç A, Özbarlas N, Özkutlu S, et al. Cardiomyopathies in children: Clinical, epidemiological and prognostic evaluation. *Jpn Heart J.* 1990; 31:789-97
3. Kim J, Cho MJ. Acute Myocarditis in Children: a 10-year Nationwide Study (2007-2016) based on the Health Insurance Review and Assessment Service Database in Korea. *Korean Circ J.* 2020;50(11):1013-22.
4. Ammirati, E., Veronese, G., Bottiroli, M., Wang, D. W., Cipriani, M., Garascia, A., Pedrotti, P., Adler, E. D., & Frigerio, M. (2021). Update on acute myocarditis. *Trends in cardiovascular medicine*, 31(6), 370–379.
5. Simmons A, Vacek JL, Meyers D. Anthracycline-induced cardiomyopathy. *Postgrad Med* 2008;120(4):67-72.
6. Carvalho, C., Santos, R. X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P. J., Santos, M. S., & Moreira, P. I. (2009). Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Current medicinal chemistry*, 16(25), 3267-3285.
7. Narezkina, A., & Nasim, K. (2019). Anthracycline cardiotoxicity: one step closer to reversing the irreversible. *Circulation: Heart Failure*, 12(3), e005910.
8. Spallarossa P, Garibaldi S, Altieri P, Fabbi P, Manca V, Nasti S, et al. Carvedilol prevents doxorubicin induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:837-46.
9. Zhang YY, Yi M, Huang YP. Oxymatrine ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Cell Physiol Biochem* 2017;43(2):626- 35.
10. Abushouk AI, Ismail A, Salem AMA, Afifi AM, Abdel-Daim MM. Cardioprotective mechanisms of phytochemicals against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biomed Pharmacother* 2017;90:935- 46.
11. Yu J, Wang C, Kong Q, Wu X, Lu JJ, Chen X. Recent progress in doxorubicin induced cardiotoxicity and protective potential of natural products. *Phytomedicine* 2018;40:125-39.
12. Wang, S., Konorev, E. A., Kotamraju, S., Joseph, J., Kalivendi, S., & Kalyanaraman, B. (2004). Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. intermediacy of H(2)O(2)- and p53-dependent pathways. *The Journal of biological chemistry*, 279(24), 25535–25543
13. Sharifi-Rad M, Varoni EM, Iriti M, et al. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytother Res.* 2018;32(9):1675-1687
14. Somensi, N., Rabelo, T. K., Guimarães, A. G., Quintans-Junior, L. J., de Souza Araújo, A. A., Moreira, J. C. F., & Gelain, D. P. (2019). Carvacrol suppresses

- LPS-induced pro-inflammatory activation in RAW 264.7 macrophages through ERK1/2 and NF- κ B pathway. *International immunopharmacology*, 75, 105743.
15. Demyashkin, G., Parshenkov, M., Koryakin, S., Skovorodko, P., Shchekin, V., Yakimenko, V., Uruskhanova, Z., Ugurchieva, D., Pugacheva, E., Ivanov, S., Shegay, P., & Kaprin, A. (2024). Targeting Oxidative Stress: The Potential of Vitamin C in Protecting against Liver Damage after Electron Beam Therapy. *Biomedicines*, 12(10), 2195
 16. Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation* 1996;93:841–2.
 17. Olejniczak, M., Schwartz, M., Webber, E., Shaffer, A., & Perry, T. E. (2020). Viral myocarditis—incidence, diagnosis and management. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*, 34(6), 1591-1601.
 18. Weber MA, Ashworth MT, Risdon RA, Malone M, Burch M, Sebire NJ. Clinicopathological features of paediatric deaths due to myocarditis: an autopsy series. *Arch Dis Child*. 2008;93(7):594-8.
 19. Neuspiel DR, Kuller LH. Sudden and unexpected natural death in childhood and adolescence. *Jama*. 1985;254(10):1321-5.
 20. Anderson DW, Virmani R, Reilly JM, et al. Prevalent myocarditis at necropsy in the acquired immunodeficiency syndrome. *J Am Coll Cardiol* 1988;11:792–9.
 21. Schultz JC, Hilliard AA, Cooper LT Jr., Rihal CS. Diagnosis and treatment of viral myocarditis. *Mayo Clin Proc* 2009;84:1001–9.
 22. Breinholt JP, Moulik M, Dreyer WJ, et al. Viral epidemiologic shift in inflammatory heart disease: the increasing involvement of parvovirus B19 in the myocardium of pediatric cardiac transplant patients. *J Heart Lung Transplant* 2010;29:739–46.
 23. Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, et al. Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation* 2008; 118:639–48.
 24. Pankuweit S, Moll R, Baandrup U, Portig I, Hufnagel G, Maisch B. Prevalence of the parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsy specimens. *Hum Pathol* 2003;34:497–503.
 25. Towbin JA. Myocarditis. In: Hugh D. Allen M, editor. *Moss and Adams' Heart Disease in Infants, Children, and Adolescents* 7th ed Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins 2008:1207-24.
 26. Law, Y. M., Lal, A. K., Chen, S., Čiháková, D., Cooper, L. T., Jr, Deshpande, S., Godown, J., Grosse-Wortmann, L., Robinson, J. D., Towbin, J. A., & American Heart Association Pediatric Heart Failure and Transplantation Committee of the Council on Lifelong Congenital Heart Disease and Heart Health in the Young

- and Stroke Council (2021). Diagnosis and Management of Myocarditis in Children: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 144(6), e123–e135.
27. Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation* 1999;99:1091–100.
 28. Freimuth P, Philipson L, Carson SD. The coxsackievirus and adenovirus receptor. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;323:67–87.
 29. Shi Y, Chen C, Lisewski U, et al. Cardiac deletion of the Coxsackievirus-adenovirus receptor abolishes Coxsackievirus B3 infection and prevents myocarditis in vivo. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53:1219–26
 30. Noutsias M, Fechner H, de Jonge H, et al. Human coxsackieadenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections. *Circulation* 2001;104:275–80.
 31. Kindermann, I., Barth, C., Mahfoud, F., Ukena, C., Lenski, M., Yilmaz, A., Klingel, K., Kandolf, R., Sechtem, U., Cooper, L. T., & Böhm, M. (2012). Update on myocarditis. *Journal of the American College of Cardiology*, 59(9), 779–792.
 32. Liu PP, Mason JW. Advances in the understanding of myocarditis. *Circulation* 2001;104:1076–82.
 33. Gürses, D., Oğuz, M., & YILMAZ, M. (2018). Miyoperikarditli Hastalarımızın Klinik ve Ekokardiyografik Değerlendirilmesi. *Türkiye Klinikleri Journal of Pediatrics*, 27(3).
 34. Durani, Y., Egan, M., Baffa, J., Selbst, S. M., & Nager, A. L. (2009). Pediatric myocarditis: presenting clinical characteristics. *The American journal of emergency medicine*, 27(8), 942-947.
 35. Peretto, G., Sala, S., Rizzo, S., De Luca, G., Campochiaro, C., Sartorelli, S., Benedetti, G., Palmisano, A., Esposito, A., Tresoldi, M., Thiene, G., Basso, C., & Della Bella, P. (2019). Arrhythmias in myocarditis: State of the art. *Heart rhythm*, 16(5), 793–801.
 36. Pauschinger M, Noutsias M, Lassner D, Schultheiss HP, Kuehl U. Inflammation, ECG changes and pericardial effusion: who to biopsy in suspected myocarditis? *Clin Res Cardiol* 2006;95:569–83.
 37. Nakashima H, Katayama T, Ishizaki M, Takeno M, Honda Y, Yano K. Q wave and non-Q wave myocarditis with special reference to clinical significance. *Jpn Heart J* 1998;39:763–74.

38. Ukena C, Mahfoud F, Kindermann I, Kandolf R, Kindermann M, Böhm M. Prognostic electrocardiographic parameters in patients with suspected myocarditis. *Eur J Heart Fail* 2011;13:398–405
39. Smith SC, Ladenson JH, Mason JW, Jaffe AS. Elevations of cardiac troponin I associated with myocarditis. Experimental and clinical correlates. *Circulation* 1997;95:163–8.
40. Lauer B, Niederau C, Kuhl U, et al. Cardiac troponin T in patients with clinically suspected myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 1997;30: 1354–9.
41. Mahfoud F, Gartner B, Kindermann M, et al. Virus serology in patients with suspected myocarditis: utility or futility? *Eur Heart J* 2011;32:897–903.
42. Rohrer C, Gartner B, Sauerbrei A, et al. Seroprevalence of parvovirus B19 in the German population. *Epidemiol Infect* 2008;136:1564–75.
43. Felker GM, Boehmer JP, Hruban RH, et al. Echocardiographic findings in fulminant and acute myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:227–32.
44. Alis D, Güler A, Aşmakutlu O, Uygur B, Ördemci S. Diagnostic values of edema-sensitive T2-weighted imaging, TSE T1- weighted early contrast-enhanced imaging, late gadolinium enhancement, and the Lake Louise criteria in assessing acute myocarditis: A single-center cardiac magnetic resonance study. *Türk Kardiyol Dern Ars* 2020;48:246-54.
45. Basso, C., Calabrese, F., Angelini, A., Carturan, E., & Thiene, G. (2013). Classification and histological, immunohistochemical, and molecular diagnosis of inflammatory myocardial disease. *Heart failure reviews*, 18, 673-681.
46. Rroku, A., Kottwitz, J., & Heidecker, B. (2021). Update on myocarditis - what we know so far and where we may be heading. *European heart journal. Acute cardiovascular care*, 10(4), 455–467.
47. Godsel LM, Leon JS, Wang K, Fornek JL, Molteni A, Engman DM. Captopril prevents experimental autoimmune myocarditis. *J Immunol* 2003;171:346–52.
48. Reyes MP, Khatib R, Khatib G, Ho KL, Smith F, Kloner RA. Prolonged captopril therapy in murine viral myocarditis. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 1998;3:43–50.
49. Bahk TJ, Daniels MD, Leon JS, Wang K, Engman DM. Comparison of angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockade for the prevention of experimental autoimmune myocarditis. *Int J Cardiol* 2008;125:85–93.
50. Seko Y. Effect of the angiotensin II receptor blocker olmesartan on the development of murine acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *Clin Sci (Lond)* 2006;110:379–86.

51. Sukumaran V, Watanabe K, Veeraveedu PT, et al. Beneficial effects of olmesartan, an angiotensin II receptor type 1 antagonist, in rats with dilated cardiomyopathy. *Exp Biol Med* (Maywood) 2010;235: 1338–46.
52. Veeraveedu PT, Watanabe K, Ma M, et al. Torasemide, a longacting loop diuretic, reduces the progression of myocarditis to dilated cardiomyopathy. *Eur J Pharmacol* 2008;581:121–31.
53. Yuan Z, Shioji K, Kihara Y, Takenaka H, Onozawa Y, Kishimoto C. Cardioprotective effects of carvedilol on acute autoimmune myocarditis: anti-inflammatory effects associated with antioxidant property. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H83–90.
54. Wang, J. F., Meissner, A., Malek, S., Chen, Y., Ke, Q., Zhang, J., Chu, V., Hampton, T. G., Crumpacker, C. S., Abelmann, W. H., Amende, I., & Morgan, J. P. (2005). Propranolol ameliorates and epinephrine exacerbates progression of acute and chronic viral myocarditis. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 289(4), H1577–H1583.
55. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2008;29:2388–442
56. Xiao J, Shimada M, Liu W, Hu D, Matsumori A. Antiinflammatory effects of eplerenone on viral myocarditis. *Eur J Heart Fail* 2009;11:349–53.
57. Matsumori A, Igata H, Ono K, et al. High doses of digitalis increase the myocardial production of proinflammatory cytokines and worsen myocardial injury in viral myocarditis: a possible mechanism of digitalis toxicity. *Jpn Circ J* 1999;63:934–40.
58. Wang WZ, Matsumori A, Yamada T, et al. Beneficial effects of amlodipine in a murine model of congestive heart failure induced by viral myocarditis. A possible mechanism through inhibition of nitric oxide production. *Circulation* 1997;95:245–51.
59. Veeraveedu PT, Watanabe K, Ma M, et al. Comparative effects of pranidipine with amlodipine in rats with heart failure. *Pharmacology* 2006;77:1–10.
60. Lotrionte M, Biondi-Zoccai G, Imazio M, et al. International collaborative systematic review of controlled clinical trials on pharmacologic treatments for acute pericarditis and its recurrences. *Am Heart J* 2010;160:662–70.
61. Costanzo-Nordin MR, Reap EA, O’Connell JB, Robinson JA, Scanlon PJ. A nonsteroid anti-inflammatory drug exacerbates Coxsackie B3 murine myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 1985;6:1078–82.
62. Khatib R, Reyes MP, Smith F, Khatib G, Rezkalla S. Enhancement of coxsackievirus B4 virulence by indomethacin. *J Lab Clin Med* 1990;116:116–20.

63. Friman G, Wesslen L, Karjalainen J, Rolf C. Infectious and lymphocytic myocarditis: epidemiology and factors relevant to sports medicine. *Scand J Med Sci Sports* 1995;5:269–78.
64. Piepoli MF, Guazzi M, Boriani G, et al. Exercise intolerance in chronic heart failure: mechanisms and therapies. Part I. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2010;17:637–42.
65. Cabinian AE, Kiel RJ, Smith F, Ho KL, Khatib R, Reyes MP. Modification of exercise-aggravated coxsackievirus B3 murine myocarditis by T lymphocyte suppression in an inbred model. *J Lab Clin Med* 1990;115:454–62.
66. Maron BJ, Ackerman MJ, Nishimura RA, Pyeritz RE, Towbin JA, Udelson JE. Task Force 4: HCM and other cardiomyopathies, mitral valve prolapse, myocarditis, and Marfan syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1340–5.
67. Hidron A, Vogenthaler N, Santos-Preciado JI, Rodriguez-Morales AJ, Franco-Paredes C, Rassi A Jr. Cardiac involvement with parasitic infections. *Clin Microbiol Rev* 2010;23:324–49.
68. Nunes H, Freynet O, Naggara N, et al. Cardiac sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2010;31:428–41.
69. Cooper LT Jr. Giant cell and granulomatous myocarditis. *Heart Fail Clin* 2005;1:431–7.
70. Cooper LT Jr. Myocarditis. *N Engl J Med* 2009;360:1526–38.
71. Mason JW, O’Connell JB, Herskowitz A, et al., for the Myocarditis Treatment Trial Investigators. A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. *N Engl J Med* 1995;333:269–75.
72. McNamara DM, Holubkov R, Starling RC, et al. Controlled trial of intravenous immune globulin in recent-onset dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2001;103:2254–9.
73. Drucker NA, Colan SD, Lewis AB, et al. Gamma-globulin treatment of acute myocarditis in the pediatric population. *Circulation* 1994;89:252–7.
74. Felix SB, Staudt A, Landsberger M, et al. Removal of cardiodepressant antibodies in dilated cardiomyopathy by immunoadsorption. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:646–52.
75. Doesch AO, Konstandin M, Celik S, et al. Effects of protein A immunoadsorption in patients with advanced chronic dilated cardiomyopathy. *J Clin Apher* 2009;24:141–9.
76. Herda LR, Trimpert C, Nauke U, et al. Effects of immunoadsorption and subsequent immunoglobulin G substitution on cardiopulmonary exercise capacity in patients with dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 2010;159:809–16.

77. Felix SB, Staudt A, Dorffler WV, et al. Hemodynamic effects of immunoadsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated cardiomyopathy: three-month results from a randomized study. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1590–8.
78. Bulut D, Scheeler M, Wichmann T, Borgel J, Miebach T, Mugge A. Effect of protein A immunoadsorption on T cell activation in patients with inflammatory dilated cardiomyopathy. *Clin Res Cardiol* 2010; 99:633–8.
79. Wang YX, da Cunha V, Vincelette J, et al. Antiviral and myocyte protective effects of murine interferon-beta and -{alpha}2 in Cocksackievirus B3-induced myocarditis and epicarditis in Balb/c mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H69–76.
80. Kuhl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, et al. Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2003;107:2793–8.
81. Schultheiss HP, Piper C, Sowade K, et al. The effect of subcutaneous treatment with interferon-beta-1b over 24 weeks on safety, virus elimination and clinical outcome in patients with chronic viral cardiomyopathy (abstr). *Circulation* 2008;118:3322.
82. Blauwet LA, Cooper LT. Myocarditis. *Prog Cardiovasc Dis* 2010; 52:274–88.
83. McCarthy RE III, Boehmer JP, Hruban RH, et al. Long-term outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (nonfulminant) myocarditis. *N Engl J Med* 2000;342:690–5.
84. Stein, A. P., Stewart, B. D., Patel, D. C., Al-Ani, M., Vilaro, J., Aranda, J. M., Jr, Ahmed, M. M., & Parker, A. M. (2023). Recurrent Cardiac Sarcoidosis and Giant Cell Myocarditis After Heart Transplant: A Case Report and Systematic Literature Review. *The American journal of cardiology*, 207, 271–279.
85. Ammirati, E., Frigerio, M., Adler, E. D., Basso, C., Birnie, D. H., Brambatti, M., Friedrich, M. G., Klingel, K., Lehtonen, J., Moslehi, J. J., Pedrotti, P., Rimoldi, O. E., Schultheiss, H. P., Tschöpe, C., Cooper, L. T., Jr, & Camici, P. G. (2020). Management of Acute Myocarditis and Chronic Inflammatory Cardiomyopathy: An Expert Consensus Document. *Circulation. Heart failure*, 13(11), e007405.
86. Crespi-Perellino, N., Grein, A., Merli, S., Minghetti, A., & Spalla, C. (1982). Biosynthetic relationships among daunorubicin, doxorubicin and 13-dihydrodaunorubicin in *Streptomyces peucetius*. *Experientia*, 38(12), 1455-1456.
87. Tan, C., Tasaka, H., Yu, K. P., Murphy, M. L., & Karnofsky, D. A. (1967). Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer*, 20(3), 333-353.

88. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004; 56(2):185-229.
89. Wenningmann N, Knapp M, Ande A, Vaidya TR, Ait-Oudhia S. Insights into doxorubicin induced cardiotoxicity: molecular mechanisms, preventive strategies, and early monitoring. *Mol Pharmacol* 2019;96(2):219-32.
90. Anton W, Giuseppe G, Michael BA, Edward AS. Pharmacotherapy of Neoplastic Diseases. In: Laurence LB, Randa HD, Björn CK, eds. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 13th ed McGraw-Hill: 2018:1426-28.
91. Speth PA, van Hoesel QG, Haanen C. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. *Clin Pharmacokinet* 1988;15(1):15-31.
92. Pehlivan, D. Y. (2016). *Sıçanlarda doksorubisin ile oluşturulmuş kardiyotoksisite üzerine melatonin ve timokinonun etkileri* (Master's thesis, Izmir Katip Celebi University (Turkey)).
93. Zhang, S., Liu, X., Bawa-Khalfe, T., Lu, L. S., Lyu, Y. L., Liu, L. F., & Yeh, E. T. (2012). Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature medicine*, 18(11), 1639-1642.
94. Ling, Y. H., El-Naggar, A. K., Priebe, W., & Perez-Soler, R. (1996). Cell cycle-dependent cytotoxicity, G2/M phase arrest, and disruption of p34cdc2/cyclin B1 activity induced by doxorubicin in synchronized P388 cells. *Molecular pharmacology*, 49(5), 832-841.
95. Berlin, V., & Haseltine, W. A. (1981). Reduction of adriamycin to a semiquinone-free radical by NADPH cytochrome P-450 reductase produces DNA cleavage in a reaction mediated by molecular oxygen. *Journal of Biological Chemistry*, 256(10), 4747-4756.
96. Ye, H., Wu, L., & Liu, Y. (2024). Iron metabolism in doxorubicin-induced cardiotoxicity: From mechanisms to therapies. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 174, 106632.
97. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects, *Pharm Genomics* 2011;21:440-6.
98. Songbo, M., Lang, H., Xinyong, C., Bin, X., Ping, Z., & Liang, S. (2019). Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicology letters*, 307, 41-48.
99. Larussi D, Indolfi P, Galderisi M, Bosonne E. Cardiac toxicity after anthracycline chemotherapy in childhood. *Hertz* 2000;25:676-88.
100. Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1998;339: 900-5.

101. Deng S, Wojnowski L. Genotyping the risk of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol* 2007;7:129-33.
102. Sepe DM, Ginsberg JP, Balis FM. Dexrazoxane as a cardioprotectant in children receiving anthracyclines. *Oncologist* 2010;15:1220-6.
103. Luo X, Reichetzer B, Trines J, Benson LN, Lehotay D. L-Carnitine attenuates Doxorubicin-induced lipid peroxidation in rats. *Free Radic Biol Med* 1999;26:1158-65.
104. Hale JP, Lewis IJ. Anthracyclines: cardiotoxicity and its prevention. *Arch Dis Child* 1994;71:457-62.
105. Dolinsky VW. The role of sirtuins in mitochondrial function and doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Biol Chem* 2017;398(9):955-74.
106. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol* 2013;65(2):157-70.
107. Morishima I, Okumura K, Matsui H, et al. Zinc accumulation in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: effects of cardioprotective antioxidant. *J Pineal Res.* 1999; 26: 204-210.
108. Liu, Y., Thurman, R.G. (1992) Potentiation of adriamycin toxicity by ethanol in perfused rat liver. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 263 (2), 651-656.
109. Singal, P., Iliskovic, N., Li, T., Kumar, D. (1997) Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *The FASEB Journal*, 11 (12), 931-936.
110. Arai, M., Tomaru, K., Takizawa, T., Sekiguchi, K., Yokoyama, T., Suzuki, T., & Nagai, R. (1998). Sarcoplasmic reticulum genes are selectively down-regulated in cardiomyopathy produced by doxorubicin in rabbits. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 30(2), 243-254.
111. Giantris A, Abdurrahman L, Hinkle A, Asselin B, Lipshultz SE. Anthracycline-induced cardiotoxicity in children and young adults. *Crit Rev Oncol/Hematol.* 1998; 27: 53–68.
112. Leandro J, Dycj J, Poppe D, Shore R, Airhart C, Greenberg M, Gilday D, Smallhorn J, Benson L. Cardiac dysfunction late after cardiotoxic therapy for childhood cancer. *Am J Cardiol* 1994; 74: 1152-1156.
113. Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD, Perez-Atayda AR, Sallan SP. Late cardiac effect of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *NEngl J Med* 1991; 324: 808-815.
114. Sorensen K, Levitt G, Bull C, Chessells J, Sullivan I. Anthracycline dose in childhood acute lymphoblastic leukemia: issues of early survival versus late cardiotoxicity. *J Clin Oncol* 1997; 15(1): 61-68.

115. Minotti, G., Mancuso, C., Frustaci, A., Mordente, A., Santini, S.A., Calafiore, A.M. ve diğerleri. (1996) Paradoxical inhibition of cardiac lipid peroxidation in cancer patients treated with doxorubicin. Pharmacologic and molecular reappraisal of anthracycline cardiotoxicity. *Journal of Clinical Investigation*, 98 (3), 650.
116. Singal, P., Li, T., Kumar, D., Danelisen, I., Iliskovic, N. (2000) Adriamycin-induced heart failure: mechanisms and modulation. *Molecular and cellular biochemistry*, 207 (1- 2), 77-86.
117. Menna P, Salvatorelli E, Minotti G. Cardiotoxicity of antitumor drugs. *Chem Res Toxicol* 2008;21:978-89.
118. Ascensão A, Magalhães J, Soares J, Ferreira R, Neuparth M, Marques F, et al. Endurance training attenuates doxorubicin induced cardiac oxidative damage in mice. *Int J Cardiol* 2005;100:451-60.
119. Simunek T, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R, Gersl V. Anthracycline induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Reports* 2009;61:154-71.
120. Vejpongsa P, Yeh ET. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. *J Am Coll Cardiol* 2014;64(9):938-45.
121. Outomuro D, Grana DR, Azzato F, Milei J. Adriamycin-induced myocardial toxicity: new solutions for an old problem? *Int J Cardiol* 2007;117:6-15.
122. Larsen RL, Jakacki RI, Vetter VL, Meadows AT, Silber JH, Barber G. Electrocardiographic changes and arrhythmias after cancer therapy in children and young adults. *Am J Cardiol* 1992;70:73-4.
123. Herrmann J, Lerman A, Sandhu NP, Villarraga HR, Mulvagh SL, Kohli M. Evaluation and management of patients with heart disease and cancer: cardio-oncology. *Mayo Clin Proc* 2014;89:1287-306.
124. Bolis FM, Holcenberg JS, Poplack DG. General Principles of Chemotherapy. In: Pizzo PA, Poplack DG (eds) *Principle and Practice Pediatric Oncology*. J.B. Lippincott Company, USA, 2001:186-9.
125. Kremer LC, van Dalen EC, Offringa M, Voûte PA. Frequency and risk factors of anthracycline-induced clinical heart failure in children: a systematic review. *Ann Oncol* 2002;13(4):503-12.
126. Casper ES, Gaynor JJ, Hajdu SI, Magill GB, Tan C, Friedrich C, et al. A prospective randomized trial of adjuvant chemotherapy with bolus versus continuous infusion of doxorubicin in patients with high-grade extremity soft tissue sarcoma and an analysis of prognostic factors. *Cancer* 1991;68(6):1221-9.
127. Mahmaljy, H., Yelamanchili, V. S., & Singhal, M. (2023). Dilated cardiomyopathy. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.

128. Morgera T, Di Lenarda A, Dreas L, et al. Electrocardiography of myocarditis revisited: clinical and prognostic significance of electrocardiographic changes. *Am Heart J* 1992;124:455–67.
129. Thavendiranathan P, Grant AD, Negishi T, Plana JC, Popovic ZB, Marwick TH. Reproducibility of echocardiographic techniques for sequential assessment of left ventricular ejection fraction and volumes: application to patients undergoing cancer chemotherapy. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:77-84.
130. Plana JC, Galderisi M, Barac A, Ewer MS, Ky B, Scherrer-Crosbie M, et al. Expert consensus for multimodality imaging evaluation of adult patients during and after cancer therapy: a report from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 2014;27(9):911-39.
131. Gulati A, Jabbour A, Ismail TF, Guha K, Khwaja J, Raza S, et al. Association of fibrosis with mortality and sudden cardiac death in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *JAMA* 2013;309:896-908.
132. Armenian SH, Hudson MM, Mulder RL, Chen MH, Constine LS, Dwyer M, et al. Recommendations for cardiomyopathy surveillance for survivors of childhood cancer: a report from the International Late Effects of Childhood Cancer Guideline Harmonization Group. *Lancet Oncol* 2015;16(3):e123-36.
133. Sawaya H, Sebag IA, Plana JC, Januzzi JL, Ky B, Tan TC, et al. Assessment of echocardiography and biomarkers for the extended prediction of cardiotoxicity in patients treated with anthracyclines, taxanes, and trastuzumab. *Circ Cardiovasc Imaging* 2012;5:596-603.
134. Ledwidge M, Gallagher J, Conlon C, Tallon E, O'Connell E, Dawkins I, et al. Natriuretic peptidebased screening and collaborative care for heart failure: the STOP-HF randomized trial. *JAMA* 2013;310:66-74.
135. Billingham ME, Mason JW, Bristow MR, Daniels JR. Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep* 1978;62:865-72.
136. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis* 2007;49:330-52.
137. Kik, K., & Szmigiero, L. (2006). Deksraksozan (ICRF-187)–czynnik kardioochronny i modulator działania niektórych leków przeciwnowotworowych Dexrazoxane (ICRF-187)–a cardioprotectant and modulator of action of some anticancer drugs. *Postepy Hig Med Dosw.(online)*, 60, 584-590.
138. Van Dalen EC, Caron HN, Dickinson HO, Kremer LCM. Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011;15(6):CD003917.

139. Lipshultz SE, Scully RE, Lipsitz SR, Sallan SE, Silverman LB, Miller TL, et al. Assessment of dexrazoxane as a cardioprotectant in doxorubicin-treated children with high-risk acute lymphoblastic leukaemia: Long-term follow-up of a prospective, randomised, multicentre trial. *The Lancet Oncol* 2010;11(10):950-61.
140. Tebbi CK, London WB, Friedman D, Villaluna D, De Alarcon PA, Constine LS, et al. Dexrazoxane-associated risk for acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome and other secondary malignancies in pediatric Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 2007;25(5):493-500.
141. Borghi C, Bacchelli S, Degli Esposti D, Ambrosioni E. A review of the angiotensin-converting enzyme inhibitor, zofenopril, in the treatment of cardiovascular diseases. *Exp Opin Pharmacother* 2004;5(9):1965-77.
142. Hiona A, Lee AS, Nagendran J, Xie X, Connolly AJ, Robbins RC, et al. Pretreatment with angiotensin-converting enzyme inhibitor improves doxorubicin-induced cardiomyopathy via preservation of mitochondrial function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011;142(2):396-403.
143. Silber JH, Cnaan A, Clark BJ, Paridon SM, Chin AJ, Rychik J, et al. Enalapril to prevent cardiac function decline in long-term survivors of pediatric cancer exposed to anthracyclines. *J Clin Oncol* 2004;22(5):820-8.
144. Mao, M., Zheng, W., Deng, B., Wang, Y., Zhou, D., Shen, L., Niku, W., & Zhang, N. (2023). Cinnamaldehyde alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity by decreasing oxidative stress and ferroptosis in cardiomyocytes. *PloS one*, 18(10), e0292124.
145. Eisvand, F., Imenshahidi, M., Ghasemzadeh Rahbardar, M., Tabatabaei Yazdi, S. A., Rameshrad, M., Razavi, B. M., & Hosseinzadeh, H. (2022). Cardioprotective effects of alpha-mangostin on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Phytotherapy research*, 36(1), 506-524.
146. Rocha, J. D., Gallon, M. E., de Melo Bisneto, A. V., Santana Amaral, V. C., de Almeida, L. M., Borges, L. L., Chen-Chen, L., Gobbo-Neto, L., & Bailão, E. F. L. C. (2022). Phytochemical Composition and Protective Effect of *Vernonanthura polyanthes* Leaf against In Vivo Doxorubicin-Mediated Toxicity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(8), 2553.
147. Xu, M. F., Ho, S., Qian, Z. M., & Tang, P. L. (2001). Melatonin protects against cardiac toxicity of doxorubicin in rat. *Journal of pineal research*, 31(4), 301–307.
148. Arica, V., Demir, İ. H., Tutanc, M., Basarslan, F., Arica, S., Karcoğlu, M., Öztürk, H., & Nacar, A. (2013). N-acetylcysteine prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Human & experimental toxicology*, 32(6), 655–661.
149. Jačević, V., Dragojević-Simić, V., Tatomirović, Ž., Dobrić, S., Bokonjić, D., Kovačević, A., Nepovimova, E., Vališ, M., & Kuča, K. (2018). The Efficacy of

- Amifostine against Multiple-Dose Doxorubicin-Induced Toxicity in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2370.
150. Cecen, E., Dost, T., Culhaci, N., Karul, A., Ergur, B., Birincioglu, M. (2010) Protective effects of silymarin against doxorubicin-induced toxicity. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 12 (10), 2697-2704.
 151. Peng, Y., Wang, L., Zhang, Z., He, X., Fan, Q., Cheng, X., Qiao, Y., Huang, H., Lai, S., Wan, Q., He, M., & He, H. (2022). Puerarin activates adaptive autophagy and protects the myocardium against doxorubicin-induced cardiotoxicity via the 14-3-3 γ /PKC ϵ pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 153, 113403.
 152. Varela-López, A., Battino, M., Navarro-Hortal, M. D., Giampieri, F., Forbes-Hernández, T. Y., Romero-Márquez, J. M., Collado, R., & Quiles, J. L. (2019). An update on the mechanisms related to cell death and toxicity of doxorubicin and the protective role of nutrients. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 134, 110834.
 153. Yadav G., Kamble S.B. Synthesis of carvacrol by Friedel–Crafts alkylation of o-cresol with isopropanol using superacidic catalyst UDCaT-5. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2009;84:1499–1508.
 154. De Vincenzi M., Stamatii A., de Vincenzi A., Silano M. Constituents of aromatic plants: Carvacrol. *Fitoterapia*. 2004;75:801–804.
 155. Bellés, M., Alonso, V., Roncalés, P., & Beltrán, J. A. (2019). Sulfite-free lamb burger meat: antimicrobial and antioxidant properties of green tea and carvacrol. *Journal of the science of food and agriculture*, 99(1), 464–472.
 156. Guimarães, A. G., Oliveira, G. F., Melo, M. S., Cavalcanti, S. C., Antoniolli, A. R., Bonjardim, L. R., Silva, F. A., Santos, J. P., Rocha, R. F., Moreira, J. C., Araújo, A. A., Gelain, D. P., & Quintans-Júnior, L. J. (2010). Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 107(6), 949–957.
 157. Du, W. X., Olsen, C. W., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., Levin, C. E., & Friedman, M. (2008). Antibacterial activity against E. coli O157:H7, physical properties, and storage stability of novel carvacrol-containing edible tomato films. *Journal of food science*, 73(7), M378–M383.
 158. Lima, M.daS., Quintans-Júnior, L. J., de Santana, W. A., Martins Kaneto, C., Pereira Soares, M. B., & Villarreal, C. F. (2013). Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. *European journal of pharmacology*, 699(1-3), 112–117.
 159. Fan, K., Li, X., Cao, Y., Qi, H., Li, L., Zhang, Q., & Sun, H. (2015). Carvacrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer cells. *Anti-cancer drugs*, 26(8), 813-823.

160. Mohseni, R., Karimi, J., Tavilani, H., Khodadadi, I., & Hashemnia, M. (2019). Carvacrol ameliorates the progression of liver fibrosis through targeting of Hippo and TGF- β signaling pathways in carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver fibrosis in rats.
161. Xu, L., Yang, X., Liu, X. T., Li, X. Y., Zhu, H. Z., Xie, Y. H., Wang, S. W., Li, Y., & Zhao, Y. (2024). Carvacrol alleviates LPS-induced myocardial dysfunction by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- κ B and NLRP3 inflammasome in cardiomyocytes. *Journal of inflammation (London, England)*, 21(1), 47.
162. Jamhiri, M., Safi Dahaj, F., Astani, A., Hejazian, S. H., Hafizibarjin, Z., Ghobadi, M., Moradi, A., Khoradmehr, A., & Safari, F. (2019). Carvacrol Ameliorates Pathological Cardiac Hypertrophy in Both *In-vivo* and *In-vitro* Models. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 18(3), 1380–1394.
163. Marconi, G. D., Della Rocca, Y., Fonticoli, L., Guarnieri, S., Carradori, S., Rajan, T. S., Pizzicannella, J., & Diomede, F. (2022). The Beneficial Effect of Carvacrol in HL-1 Cardiomyocytes Treated with LPS-G: Anti-Inflammatory Pathway Investigations. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(2), 386.
164. Hou, N., Mai, Y., Qiu, X., Yuan, W., Li, Y., Luo, C., Liu, Y., Zhang, G., Zhao, G., & Luo, J. D. (2019). Carvacrol Attenuates Diabetic Cardiomyopathy by Modulating the PI3K/AKT/GLUT4 Pathway in Diabetic Mice. *Frontiers in pharmacology*, 10, 998.
165. Sadeghzadeh, S., Hejazian, S. H., Jamhiri, M., Hafizibarjin, Z., Sadeghzadeh, S., & Safari, F. (2018). The effect of carvacrol on transcription levels of Bcl-2 family proteins in hypertrophied heart of rats. *Physiology and Pharmacology*, 22(1), 54-62.
166. Cetik, S., Ayhanci, A., & Sahinturk, V. (2015). Protective effect of carvacrol against oxidative stress and heart injury in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rat. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(4), 569-576.
167. Chen, Y., Ba, L., Huang, W., Liu, Y., Pan, H., Mingyao, E., Shi, P., Wang, Y., Li, S., Qi, H., Sun, H., & Cao, Y. (2017). Role of carvacrol in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through activation of MAPK/ERK and Akt/eNOS signaling pathways. *European journal of pharmacology*, 796, 90–100.
168. Yu, W., Liu, Q., & Zhu, S. (2013). Carvacrol protects against acute myocardial infarction of rats via anti-oxidative and anti-apoptotic pathways. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36(4), 579-584.
169. Norum, K. R., & Grav, H. J. (2002). Axel Holst and Theodor Frolich--pioneers in the combat of scurvy. *Tidsskrift for den Norske laegeforening: tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke*, 122(17), 1686-1687.

170. Piro, A., Tagarelli, G., Lagonia, P., Tagarelli, A., & Quattrone, A. (2010). Casimir Funk: his discovery of the vitamins and their deficiency disorders. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 57(2), 85-88.
171. Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*, 91(2), 179-194.
172. Matsuo M, Kaneko T. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. In: Radak Z, editors. Free radicals in exercise and aging. USA: Human Kinetics; 2000. p. 1-33.
173. Miranda, C. L., Reed, R. L., Kuiper, H. C., Alber, S., & Stevens, J. F. (2009). Ascorbic acid promotes detoxification and elimination of 4-hydroxy-2(E)-nonenal in human monocytic THP-1 cells. *Chemical research in toxicology*, 22(5), 863–874.
174. González, E. A., & Nazareno, M. A. (2011). Antiradical action of flavonoid–ascorbate mixtures. *LWT-Food Science and Technology*, 44(2), 558-564.
175. Dai, F., Chen, W. F., & Zhou, B. (2008). Antioxidant synergism of green tea polyphenols with α -tocopherol and l-ascorbic acid in SDS micelles. *Biochimie*, 90(10), 1499-1505.
176. Hasan Khudhair, D., Al-Gareeb, A. I., Al-Kuraishy, H. M., El-Kadem, A. H., Elekhrawy, E., Negm, W. A., Saber, S., Cavalu, S., Tirla, A., Alotaibi, S. S., & Batiha, G. E. (2022). Combination of Vitamin C and Curcumin Safeguards Against Methotrexate-Induced Acute Liver Injury in Mice by Synergistic Antioxidant Effects. *Frontiers in medicine*, 9, 866343.
177. Chen, Y., Luo, G., Yuan, J., Wang, Y., Yang, X., Wang, X., Li, G., Liu, Z., & Zhong, N. (2014). Vitamin C mitigates oxidative stress and tumor necrosis factor- α in severe community-acquired pneumonia and LPS-induced macrophages. *Mediators of inflammation*, 2014, 426740.
178. Gholizadeh, M., Saeedy, S. A. G., Abdi, A., Khademi, F., Lorian, K., Clark, C. C., & Djafarian, K. (2021). Vitamin C reduces interleukin-6 plasma concentration: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Clinical Nutrition Open Science*, 40, 1-14.
179. Kong, E. H., Ma, S. Y., Jeong, J. Y., & Kim, K. H. (2015). Effects of L-ascorbic acid on the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in C57BL/6 mouse splenocytes. *Kosin Medical Journal*, 30(1), 41-49.
180. Akolkar, G., da Silva Dias, D., Ayyappan, P., Bagchi, A. K., Jassal, D. S., Salemi, V. M. C., Irigoyen, M. C., De Angelis, K., & Singal, P. K. (2017). Vitamin C mitigates oxidative/nitrosative stress and inflammation in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 313(4), H795–H809.

181. Guaiquil, V. H., Golde, D. W., Beckles, D. L., Mascareno, E. J., & Siddiqui, M. A. (2004). Vitamin C inhibits hypoxia-induced damage and apoptotic signaling pathways in cardiomyocytes and ischemic hearts. *Free radical biology & medicine*, 37(9), 1419–1429.
182. Harrison, R. G. (1906). Observations on the living developing nerve fiber. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 4(1), 140-143.
183. Carrel A. (1912). On the permanent life of tissues outside of the organism. *The Journal of experimental medicine*, 15(5), 516–528.
184. Gey, G. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer research*, 12, 264-265.
185. Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of medical science : AMS*, 14(4), 910–919.
186. Fischer A. (1948). Amino-acid metabolism of tissue cells in vitro. *Nature*, 161(4104), 1008.
187. Eagle H. (1955). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science (New York, N.Y.)*, 122(3168), 501–514.
188. Henschler, R. (2018). Cell Culture Media. *Cell Culture Technology*, 49-59.
189. Ham, R. G. (1963). An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines. *Experimental cell research*, 29(3), 515-526.
190. Mather J, Sato G (1977). Hormones and growth factors in cell cultures: problems and perspectives. *Cell, Tissue, and Organ Cultures in Neurobiology* 619–630.
191. Price P. J. (2017). Best practices for media selection for mammalian cells. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 53(8), 673–681.
192. Schwartz PB, Ronnekleiv-Kelly SM (2019). Effective cell culture. 157–169.
193. Verma A, Verma M, Singh A (2020). Animal tissue culture principles and applications. *Animal Biotechnology* 269–293.
194. Hassan SN, Ahmad F (2020). The relevance of antibiotic supplements in mammalian cell cultures: Towards a paradigm shift. *Gulhane Medical Journal* 62(4): 224–230.
195. Ryu AH, Eckalbar WL, Kreimer A, Yosef N, Ahituv N (2017). Use antibiotics in cell culture with caution: Genome-wide identification of antibiotic-induced changes in gene expression and regulation. *Scientific Reports* 7(1): 1–9.
196. Kimes, B. W., & Brandt, B. L. (1976). Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Experimental cell research*, 98(2), 367-381.

197. Louch W, Sheehan K, Wolska B (2001) Methods in cardiomyocyte isolation culture, and gene transfer. *J Mol Cell Cardiol* 51:288–298.
198. Tan X, Wang DB, Lu X, Wei H, Zhu R, Zhu SS, Jiang H, Yang ZJ (2010) Doxorubicin induces apoptosis in H9c2 cardiomyocytes: role of overexpressed eukaryotic translation initiation factor 5A. *Biol Pharm Bull* 33:1666–1672.
199. Watkins S, Borthwick G, Arthur H (2011) The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 47:125–131.
200. Fu J, Gao J, Pi R, Liu P (2005) An optimized protocol for culture of cardiomyocyte from neonatal rat. *Cytotechnology* 49:109–116.
201. Witek, P., Korga, A., Burdan, F., Ostrowska, M., Nosowska, B., Iwan, M., & Dudka, J. (2016). The effect of a number of H9C2 rat cardiomyocytes passage on repeatability of cytotoxicity study results. *Cytotechnology*, 68, 2407-2415.
202. Sacks, B., Onal, H., Martorana, R., Sehgal, A., Harvey, A., Wastella, C., Ahmad, H., Ross, E., Pjetergjoka, A., Prasad, S., Barsotti, R., Young, L. H., & Chen, Q. (2021). Mitochondrial targeted antioxidants, mitoquinone and SKQ1, not vitamin C, mitigate doxorubicin-induced damage in H9c2 myoblast: pretreatment vs. co-treatment. *BMC pharmacology & toxicology*, 22(1), 49.
203. Joshi, S., Kundu, S., Priya, V. V., Kulhari, U., Mugale, M. N., & Sahu, B. D. (2023). Anti-inflammatory activity of carvacrol protects the heart from lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction by inhibiting pyroptosis via NLRP3/Caspase1/Gasdermin D signaling axis. *Life sciences*, 324, 121743.
204. Retnosari, Rini, et al. "The Protective Effects of Carvacrol Against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity In Vitro and In Vivo." *Cardiovascular Toxicology* (2024): 1-15.
205. El-Sayed, el-S. M., Mansour, A. M., & Abdul-Hameed, M. S. (2016). Thymol and Carvacrol Prevent Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Abrogation of Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis in Rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 30(1), 37–44.
206. Jafarinezhad, Z., Rafati, A., Ketabchi, F., Noorafshan, A., & Karbalay-Doust, S. (2019). Cardioprotective effects of curcumin and carvacrol in doxorubicin-treated rats: Stereological study. *Food science & nutrition*, 7(11), 3581–3588.
207. Ludke, A. R., Sharma, A. K., Akolkar, G., Bajpai, G., & Singal, P. K. (2012). Downregulation of vitamin C transporter SVCT-2 in doxorubicin-induced cardiomyocyte injury. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 303(6), C645-C653.
208. Zhang, Y., Liu, S., Ma, J. L., Chen, C., Huang, P., Ji, J. H., Wu, D., & Ren, L. Q. (2022). Apocynum venetum leaf extract alleviated doxorubicin-induced cardiotoxicity through the AKT/Bcl-2 signaling pathway. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 94, 153815.

209. Shafiee, F., Safaeian, L., & Gorbani, F. (2023). Protective effects of protocatechuic acid against doxorubicin- and arsenic trioxide-induced toxicity in cardiomyocytes. *Research in pharmaceutical sciences*, 18(2), 149–158.
210. Koczurkiewicz-Adamczyk, P., Kłaś, K., Gunia-Krzyżak, A., Piska, K., Andrysiak, K., Stępniewski, J., Lasota, S., Wójcik-Pszczola, K., Dulak, J., Madeja, Z., & Pękala, E. (2021). Cinnamic Acid Derivatives as Cardioprotective Agents against Oxidative and Structural Damage Induced by Doxorubicin. *International journal of molecular sciences*, 22(12), 6217.
211. Marinelli, L., Cacciatore, I., Costantini, E., Dimmito, M. P., Serra, F., Di Stefano, A., & Reale, M. (2022). Wound-healing promotion and anti-inflammatory properties of carvacrol prodrugs/hyaluronic acid formulations. *Pharmaceutics*, 14(7), 1468.
212. Vivcharenko, V., Wojcik, M., & Przekora, A. (2020). Cellular response to vitamin C-enriched chitosan/agarose film with potential application as artificial skin substitute for chronic wound treatment. *Cells*, 9(5), 1185.
213. Ludke, A., Sharma, A. K., Bagchi, A. K., & Singal, P. K. (2012). Subcellular basis of vitamin C protection against doxorubicin-induced changes in rat cardiomyocytes. *Molecular and cellular biochemistry*, 360, 215-224.
214. Yin B, Tang S, Sun J, Zhang X, Xu J, Di L, Li Z, Hu Y, Bao E. Vitamin C and sodium bicarbonate enhance the antioxidant ability of H9C2 cells and induce HSPs to relieve heat stress. *Cell Stress Chaperones*. 2018 Jul;23(4):735-748.
215. Akolkar, G., Bagchi, A. K., Ayyappan, P., Jassal, D. S., & Singal, P. K. (2017). Doxorubicin-induced nitrosative stress is mitigated by vitamin C via the modulation of nitric oxide synthases. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 312(4), C418-C427.
216. Ertl, G., & Frantz, S. (2005). Healing after myocardial infarction. *Cardiovascular research*, 66(1), 22-32.
217. Heymans, S. (2006). Inflammation and cardiac remodeling during viral myocarditis. *Chronic Viral and Inflammatory Cardiomyopathy*, 197-218.
218. Rodriguez, L. G., Wu, X., & Guan, J. L. (2005). Wound-healing assay. *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols*, 23-29.
219. Liu, Y., Song, M., Che, T. M., Bravo, D., & Pettigrew, J. E. (2012). Anti-inflammatory effects of several plant extracts on porcine alveolar macrophages in vitro. *Journal of Animal Science*, 90(8), 2774-2783.
220. Ram, C., Gairola, S., Syed, A. M., Verma, S., Mugale, M. N., & Sahu, B. D. (2022). Carvacrol preserves antioxidant status and attenuates kidney fibrosis via modulation of TGF- β 1/Smad signaling and inflammation. *Food & Function*, 13(20), 10587-10600.

221. Li, H., Liu, X., Lee, M. H., & Li, H. (2021). Vitamin C alleviates hyperuricemia nephropathy by reducing inflammation and fibrosis. *Journal of food science*, 86(7), 3265-3276.
222. Rawat, P. S., Jaiswal, A., Khurana, A., Bhatti, J. S., & Navik, U. (2021). Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111708.
223. Sun, Z., Schriewer, J., Tang, M., Marlin, J., Taylor, F., Shohet, R. V., & Konorev, E. A. (2016). The TGF- β pathway mediates doxorubicin effects on cardiac endothelial cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 90, 129-138.
224. İlhan, İ., Aşcı, H., Sevük, M. A., İmeci, O. B., Milletsever, A., & Sancer, O. (2022). DOKSORUBİSİN İLE OLUŞTURULAN BÖBREK HASARINDA LERKANİDİPİNİN ANTİOKSİDAN VE ANTİAPOPTOTİK ETKİLERİNİN BCL-2/BAX/SİT C/CAS-3 YOLAĞI ÜZERİNDEN ARAŞTIRILMASI. *Medical Journal of Süleyman Demirel University*, 29(4), 671-679.
225. Kciuk, M., Gielecińska, A., Mujwar, S., Kołat, D., Kałuzińska-Kołat, Ż., Celik, I., & Kontek, R. (2023). Doxorubicin—an agent with multiple mechanisms of anticancer activity. *Cells*, 12(4), 659.
226. Lashkari, M., Fatemi, A., Valandani, H. M., & Khalilabadi, R. M. (2022). Promising anti-leukemic effect of Zataria multiflora extract in combination with doxorubicin to combat acute lymphoblastic leukemia cells (Nalm-6)(in vitro and in silico). *Scientific Reports*, 12(1), 12657.
227. Michihiko, U., Yoshihiko, K., Koh-ichi, Y., Nobuyuki, M., Motoyuki, I., Takashi, M., & Iwao, Y. (2006). Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. *Journal of pharmacological sciences*, 101(2), 151-158.
228. Mussa, A., Hamid, M., Hajissa, K., Murtadha, A. H., Al-Hatamleh, M. A. I., Mokhtar, N. F., Uskoković, V., Plebanski, M., Mohamud, R., & Hassan, R. (2025). Pharmacological Vitamin C-induced high H₂O₂ generation mediates apoptotic cell death by caspase 3/7 activation in breast cancer tumor spheroids. *Journal of translational medicine*, 23(1), 31.
229. Zeidán-Chuliá, F., Gursoy, M., de Oliveira, B. H., Gelain, D. P., Könönen, E., Gursoy, U. K., Moreira, J. C., & Uitto, V. J. (2014). Focussed microarray analysis of apoptosis in periodontitis and its potential pharmacological targeting by carvacrol. *Archives of oral biology*, 59(5), 461–469.
230. Nematollahi, H., Gh, H., & Jorat, M. V. (2020). The effect of vitamin C on Apoptosis and Bax/Bcl-2 proteins ratio in peripheral blood lymphocytes of patients during cardiac interventional procedures. *Journal of Biomedical Physics & Engineering*, 10(4), 421.

231. Kotamraju S., Konorev E. A., Joseph J., Kalyanaraman B. Doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and cardiomyocytes is ameliorated by nitron spin traps and ebselen. Role of reactive oxygen and nitrogen species. *J. Biol. Chem.* 275: 33585-33592, 2000.
232. Childs, A. C., Phaneuf, S. L., Dirks, A. J., Phillips, T., & Leeuwenburgh, C. (2002). Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2: Bax ratio. *Cancer research*, 62(16), 4592-4598.
233. Cabral-Pacheco, G. A., Garza-Veloz, I., Castruita-De la Rosa, C., Ramirez-Acuña, J. M., Perez-Romero, B. A., Guerrero-Rodriguez, J. F., ... & Martinez-Fierro, M. L. (2020). The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9739.
234. Mancilla, T. R., Iskra, B., & Aune, G. J. (2019). Doxorubicin-induced cardiomyopathy in children. *Comprehensive Physiology*, 9(3), 905.
235. Chen, X., Guo, Z., Wang, P., & Xu, M. (2014). Erythropoietin modulates imbalance of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Heart, lung and circulation*, 23(8), 772-777.
236. (Sun, S., Jiang, R., Zhu, H., & Jiang, J. (2015). Anti-proliferation Effect of Carvacrol on Human Gastric Cancer Cells. *China Pharmacist*, 558-562).