

Klorokuin endoplazmik retikulum stresini ve enflamasyonu inhibe ederek sıçanlarda adriamisin uyarılı kardiyotoksisiteyi engeller

Chloroquine inhibits adriamycin-induced cardiotoxicity in rats by inhibiting endoplasmic reticulum stress and inflammation

Emin KAYMAK¹, Ali Tuğrul AKIN², Emel ÖZTÜRK³, Tayfun CEYLAN⁴, Nurhan KULOĞLU⁴, Derya KARABULUT⁴, Birkan YAKAN⁴

ÖZET

Amaç: Adriamisin (ADR) kanser türlerinde kullanılan kemoterapötik bir ilaç olarak bilinmektedir. ADR uyarılı kardiyomiyopati toksik özelliğinden dolayı ilacın kullanımını zorlaştırmaktadır. ADR uyarılı kardiyotoksistide enflamasyon ve endoplazmik retikulum stresi (ERs) artmaktadır. Pek çok kanser türünde kullanılan kemoterapötik ilaç olan ADR'nin yol açtığı kardiyotoksisteye karşı sıtma ilacı olan klorokuin (CLQ) kullanımının ERs ve enflamasyon üzerinden koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Yöntem: Sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldı: Kontrol grubu (n = 8) dışındakilere, CLQ (n = 8) günde 50 mg/kg intraperitoneal (i.p.), ADR (n = 8) 2 mg/kg i.p. olarak her 3 günde bir, ADR + CLQ grubuna da (n = 8) 2mg/kg i.p. ADR + 50 mg/kg i.p. CLQ uygulandı. Deney toplam 30 gün sürdü. Deneyin sonunda, sıçanlar sakrifiye edildi ve kalp dokuları inceleme için hayvanlardan çıkarıldı. Kalp dokularındaki histopatolojik değişiklikler değerlendirildi ve ERs'yi belirlemek için (Glukoz düzenleyici protein) GRP78 antikor ve enflamasyon için tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) antikor ile immün boyama yapıldı. Fotoğraflar Olympus BX53 mikroskobu ile çekildi analiz edildi.

ABSTRACT

Objective: Adriamycin (ADR) is known as a chemotherapeutic drug used in cancer types. ADR-induced cardiomyopathy makes it difficult to use the drug due to its toxic properties. Inflammation and ER stress increase in ADR-induced cardiotoxicity. The aim of this study was to investigate the protective effects of chloroquine (CLQ), a malaria medication used in many types of cancer, against the cardiotoxicity caused by ADR on endoplasmic reticulum stress and inflammation.

Methods: Rats were randomly divided into 4 groups: Control (n = 8), CLQ (n = 8) 50 mg/kg intraperitoneal (i.p.) daily, ADR (n = 8) 2 mg/kg i.p. every 3 days, ADR + CLQ (n = 8) 2mg/kg i.p. ADR + 50 mg/kg i.p. CLQ. The experiment lasted a total of 30 days. At the end of the experiment, the rats were sacrificed and the heart tissues were removed from the animals for examination. Histopathological changes in the heart tissues were evaluated and immune staining was performed with Glucose-regulated protein 78 (GRP78) antibody and tumor necrosis factor- α (TNF- α) antibody for inflammation to determine endoplasmic reticulum stress. Photos were taken with Olympus BX53 microscope and analyzed.

¹Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-embriyoloji Anabilim Dalı, Yozgat

²Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kayseri

³Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-embriyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa

⁴Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri



İletişim / Corresponding Author : Emin KAYMAK

Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-embriyoloji Anabilim Dalı, Yozgat - Türkiye

E-posta / E-mail : e_kaymak@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 07.09.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 01.10.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.04378

Kaymak E, Akın AT, Öztürk E, Ceylan T, Kuloğlu N, Karabulut D, Yakan B. Klorokuin endoplazmik retikulum stresini ve enflamasyonu inhibe ederek sıçanlarda adriamisin uyarılı kardiyotoksisiteyi engeller. Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(4): 459-466

Bulgular: ADR grubunun kontrol grubuna kıyasla histopatolojik bozulma gösterdiğini ve CLQ tedavisinin ADR tarafından indüklenen bu hasarı iyileştirdiği gözlemlendi. ADR grubunda GRP78 ve TNF- α immünoaktivitesinde kontrol grubuna göre artış vardı ($p < 0.0001$). ADR + CLQ grubunda GRP78 ve TNF- α immünoaktivitesinde ADR grubuna göre azalma vardı ($p < 0.0001$).

Sonuç: Kronik olarak ADR uygulanan sıçanların kalp dokusunda enflamasyonun ve ERs'nin önemli ölçüde arttığı görülmüştür. Fakat ADR verilen sıçanlarda CLQ uygulamasıyla, ERs ve enflamasyon baskılanmıştır. Bu da tedavi uygulanan gruplarda kalp hasarını önemli ölçüde azaltmıştır.

Anahtar Kelimeler: Adriamisin, klorokuin, kalp, endoplasmik retikulum stresi, enflamasyon

Results: We observed that the ADR group showed histopathological impairment compared to the Control group and that CLQ treatment improved this ADR-induced damage. In the ADR group, there was an increase in GRP78 and TNF- α immunoreactivity compared to the control group ($p < 0.0001$). In the ADR + CLQ group, GRP78 and TNF- α immunoreactivity decreased compared to the ADR group ($p < 0.0001$).

Conclusion: As a result, it was observed that the inflammation and endoplasmic reticulum stress significantly increased in the heart tissue of rats administered chronically ADR. However, endoplasmic reticulum stress and inflammation were suppressed by CLQ application in rats given ADR. This significantly reduced heart damage in the treated groups.

Key Words: Adriamycin, chloroquine, heart, endoplasmic reticulum stress, inflammation

GİRİŞ

Adriamisin (ADR) pek çok kanser tedavisinde kullanılan kuvvetli bir terapötik maddedir (1). ADR solid ve hemotopoetik tümörlerin tedavisinde kullanılan antrasiklin bir ilaçtır (2). İlaç kanser hücrelerinde bu özelliğini topoizomeraz II ile DNA hasarının başlatılması ve apoptozisi gibi süreçlerle yapmaktadır (3). İlaç klinikte kullanılmasına rağmen yan etkieri de bulunmaktadır. Kanser hastalarında ADR kullanımı arasında böbrek, karaciğer, testis ve kalp gibi önemli organlarda hasara yol açmaktadır (4-7). ADR uyarılı kardiyomiyopati toksik özelliğinden dolayı ilacın kullanımını sınırlandırmaktadır (8). ADR uyarılı kardiyotoksisteye birçok mekanizma karışmaktadır. ADR kardiyomiyositlerde geri dönüşümsüz hasar oluşturabilmektedir. Sistolik ve diastolik fonksiyon kaybına yol açabilmektedir. Kalp yetmezliğine götürmektedir (8, 9). ADR vücuda girdiğine

mitokondride birikir ve oksidatif stresi oluşturarak apoptozise yol açmaktadır (10). Son yıllarda kaydedilen çalışmalarda ADR uyarılı kardiyotoksistede endoplasmik retikulum stresinin (ERs) de önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Endoplasmik retikulum (ER) yüksek oranda kalsiyum homeostazındaki değişikliklere ve serbest radikallere maruz kalmaya açıktır (11). ADR uyarılı kardiyotoksistede ER lümeninde yanlış katlanan proteinler ve katlanma seviyesindeki artışa bağlı olarak ERs'nin arttığı görülmüştür (11). Şaperon glikoz ayarlı protein 78 (GRP78) ER'da Ca²⁺ homeostazı için önemlidir. ERs sırasında katlanmamış protein cevabının merkezi aracısı olan (GRP78), ADR kardiyotoksistesinde gen terapisi için potansiyel bir adaydır (12).

ADR uyarılı kardiyotoksisteye mekanizmalarından bir diğeri de aşırı inflamasyon oluşumdur. İnflamatuar

hücrelerin aktivasyonu ve pro-inflamatuarların salınımı ile birlikte kardiyak fonksiyon bozukluğu meydana gelir (13). Proenflamatuar sitokinlerden olan tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ADR uyarılı kardiyotoksistide önemli role sahiptir. Kardiyotoksistide TNF- α seviyesinin arttığı görülmüştür (14).

Klorokuin (CLQ) antimalarial bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Son dönemde ise yeni koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19)' da kullanılmaktadır (15, 16). CLQ'nun oksidatif stres ve enflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (15, 17).

ADR uyarılı kardiyotoksistenin hala aydınlatılmış olmamakla birlikte kullanımında da sınırlamalar bulunmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı, CLQ'nun ADR kaynaklı kardiyotoksisteye karşı koruyucu etkilerini ve olası mekanizmalarını araştırmaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Deneysel Araştırma Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DEKAM) üretilen 8 haftalık 150-200 g erişkin 32 Wistar albino tipi erkek sıçan kullanıldı. Kafeslerde tutulan sıçanlar günün normal düzeninde 21 °C'de ve 12 saat aydınlık / karanlık ortamda tutuldu ve su ve besin ihtiyacı karşılandı. Deneysel grupları deneklerin tartılması ve ağırlıklarının birbirine yakın olacak şekilde bir araya getirilmesiyle oluşturulmuştur.

Deneysel prosedür

Deneyin başlangıcında, ratlar rastgele aşağıdaki gibi dört gruba ayrıldı; Kontrol grubu (n=8) tedavi edilmeyen sıçanlar, literatürle benzer şekilde 30 gün boyunca üç günde bir olmak üzere 2 mg/kg ADR intraperitoneal olarak (i.p.) ADR (n=8) grubuna uygulandı (18), CLQ grubu (n = 8) grubu 30 gün boyunca i.p. 50 mg/kg CLQ (19) ve ADR artı CLQ grubu (n=8) üç günde bir i.p. 2 mg/kg ADR ve 30 gün boyunca i.p. 50 mg/kg CLQ verildi. Deneyin sonunda hayvanlara ketamin ve ksilazin kombinasyonu ile anestezi uygulandı. Kalp dokuları deneklerden alındıktan sonra

histopatolojik ve immünohistokimyasal inceleme için formaldehite kondu.

Histopatolojik değerlendirme

Kalp dokusunun yapısının histopatolojik değerlendirmesi rutin histolojik metodlar kullanılarak yapıldı. Kalp dokuları, %10 formalin çözeltisi içinde 24-48 saat süreyle sabitlendi, alkol ile dehidre edildi, ksilen ile temizlendi ve parafin içine gömüldü ve 5 um kalınlığında bölümler halinde kesildi. Doku örneklerindeki histopatolojik değişikliklerin değerlendirilmesi için hematoksilin-eozin (H&E) boyaması yapıldı (20). Fotoğraflar ışık mikroskopuyla (Olympus BX53; Olympus, Tokyo, Japan) çekildi ve çalışma grubu tarafından analiz edildi.

İmmünohistokimya

Kalp dokularında GRP78 ve TNF-a antikorlarını araştırmak için immünohistokimya yöntemi kullanıldı. Avidin biyotin peroksidaz yöntemi, GRP78 (bs-1219R, Bioss) ve TNF- α (bs-2081R, Bioss) ekspresyonundaki farkı belirlemek için kullanıldı. Parafin kesitlerin ksilen ile parafini giderildi. Antijen geri kazanımı için, mikrodalgada 7 dakika süreyle 600 w'de 0.01 M% 10 sitrat tamponu uygulandı ve daha sonra oda sıcaklığında 10 dakika soğumaya bırakıldı. Fosfat tamponu (PBS) ile yıkanan kısımlar, endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için 12 dakika boyunca %3 hidrojen peroksit (H2O2) ile muamele edildi. 5 dakika boyunca tekrar PBS ile 3 kez yıkandı. Boyama kiti (TA-125-HDX, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) sonraki adımlar için kullanıldı. PBS içinde 3 kez tekrar yıkandıktan sonra, dokulara ultra v blok çözeltisi ilave edildi ve tankta 10 dakika tutuldu. Daha sonra GRP78 ve TNF-a antikorları, dokulara ilave edildi ve gece boyunca 4 °C'de inkübe edildi. Yeniden yıkandıktan sonra, kitle bulunan ve iminobenzidin (DAB) (TA-060-HDX, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) sergileyen peroksidaz, immünoaktivitesini görünür hale getirmek için peroksidaz substratı ile 1.5 dakika muamele edildi (6, 21, 22). Fotoğraflar ışık mikroskopuyla (Olympus BX53; Olympus, Tokyo, Japan) çekildi ve çalışma grubu tarafından analiz

edildi. Antikor ekspresyonlarını değerlendirmek için boyama yoğunluğuna göre 3 histolog tarafından her gruba 30 farklı alanda skor verildi. Bu skorlar aşağıdaki şekilde özetlenmiştir;

0: boyanma yok, 1: az boyanma var, 2: orta şiddette boyanma var, 3: yoğun boyanma var.

İstatistiksel Analiz

Verilerin normal dağılımını belirlemek için Kolmogorov - Smirnov testi kullanıldı. Gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için One-way varyans analizi ve posthoc Tukey testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. İstatistiksel analiz için SPSS/PC programı (Sürüm 20.0; SPSS, Chicago, IL) ve Graph pad Prism 8.0 yazılımı kullanıldı. $P < 0.05$.

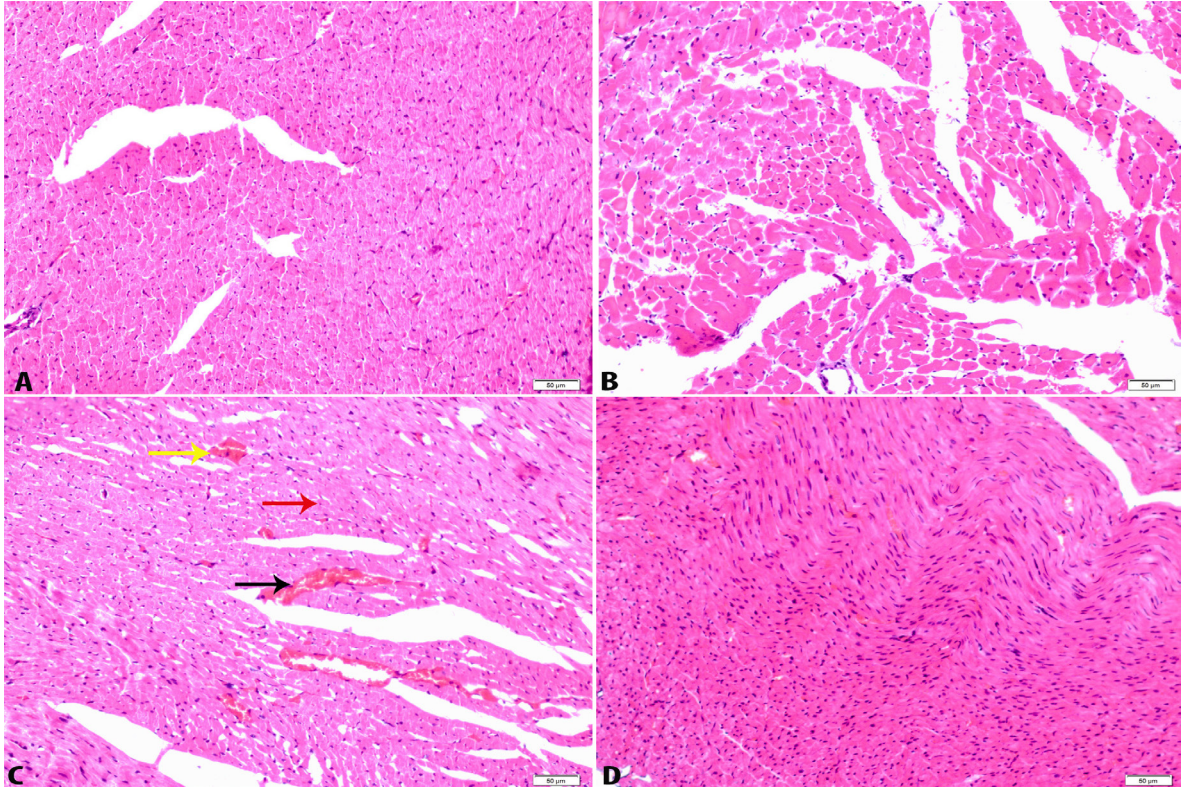
İstatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Histopatolojik bulgular

Hematoksilen ve eozin boyama görüntüsü Şekil 1'de gösterilmiştir. Kontrol grubunda ve CLQ grubunda normal sağlıklı kalp görüntüsü mevcuttur. ADR uygulanan gruba bakıldığında, kalp hücrelerinde piknotik çekirdek, nekrotik hücreler ve hemorajinin olduğu alanlar görülmektedir. ADR+CLQ grubuna bakıldığında ise bu hasarlı bölgelerin azaldığı ve kontrole yakın bir kalp dokusu görülmektedir.

İmmünohistokimyasal sonuçlar



Şekil 1. Grupların Hematoksilen ve Eozin (H&E) boyama görüntüsü.

A. Kontrol grubu, B. CLQ grubu, C. ADR grubu, D. ADR+CLQ grubunu göstermektedir.

Sarı ok: nekrotik hücre, kırmızı ok: piknotik çekirdek ve siyah ok: hemoraji, Görüntü büyütmesi x200.

Kısaltmalar: ADR: Adriamisin, CLQ: Klorokuin

Kalp dokusunun immünohistokimyasal sonuçları ve boyama görüntüsü Tablo 1 ve Şekil 2' de gösterilmiştir. GRP78 ve TNF- α immünreaktivitesi ADR grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

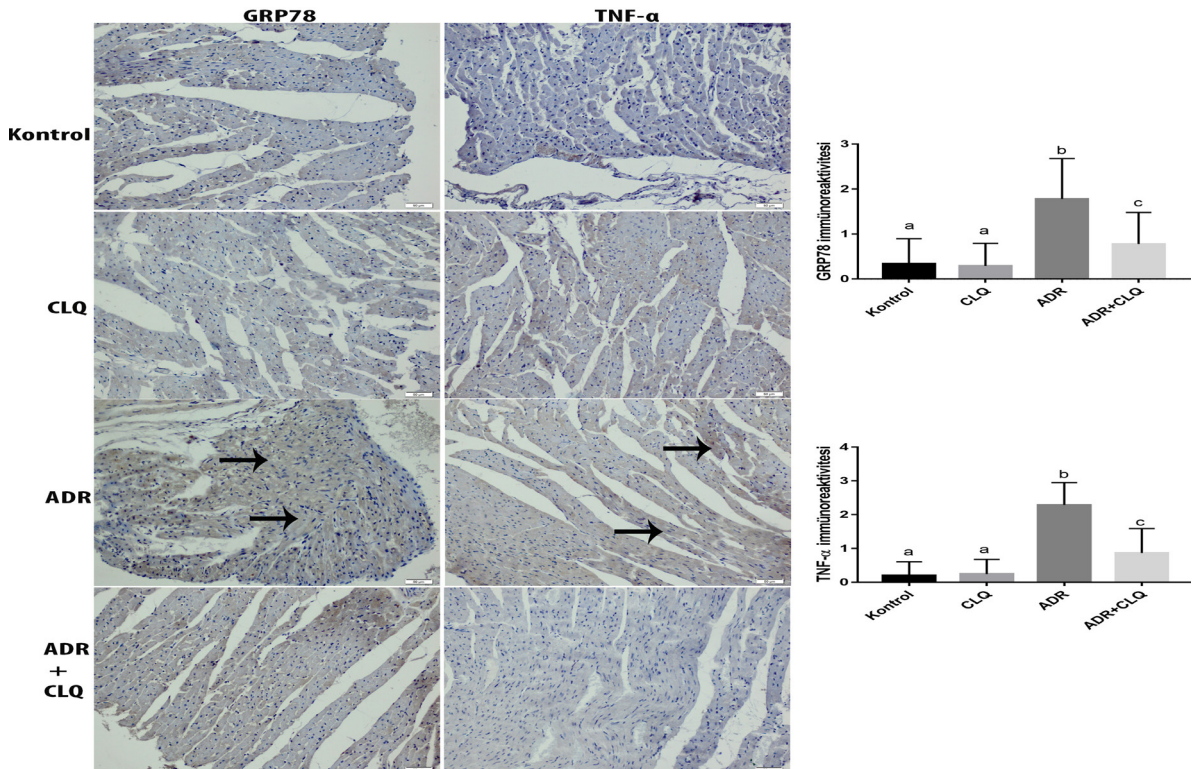
bir şekilde artış göstermiştir ($p < 0.0001$). ADR+CLQ grubunda GRP78 ve TNF- α immünreaktivitesi ADR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma göstermiştir ($p < 0.0001$).

Tablo 1. Gruplar arasında GRP78 ve TNF- α immünohistokimya sonuçları

Gruplar	Kontrol	CLQ	ADR	ADR+CLQ	<i>p</i>
GRP78 immünreaktivitesi	0.33 \pm 0.5 ^{6a}	0.28 \pm 0.50 ^a	1.77 \pm 0.90 ^b	0.77 \pm 0.70 ^c	0.0001
TNF- α immünreaktivitesi	0.20 \pm 0.40 ^a	0.24 \pm 0.43 ^a	2.28 \pm 0.66 ^b	0.86 \pm 0.72 ^c	0.0001

Veriler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı harfi içeren gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Kısaltmalar: ADR: Adriamisin, CLQ: Klorokuin, GRP78: Glukoz düzenleyici protein 78, TNF- α : Tümör nekrozis faktör- α



Şekil 2. Kalp dokusunda gruplardaki GRP78 ve TNF- α immünohistokimya boyama görüntüleri.

Siyah oklar ile boyalı alanlar gösterilmektedir.

Görüntü büyütmesi X200.

Kısaltmalar: ADR: Adriamisin, CLQ: Klorokuin, GRP78: Glukoz düzenleyici protein 78, TNF- α : Tümör nekrozis faktör- α

TARTIŞMA

Biz bu çalışmada ADR uyarılı kardiyotoksisite üzerine CLQ'nun etkisini hayvan model üzerinde değerlendirdik. Bir antrasiklin kemoterapötik olan ADR'nin kardiyotoksisiteye yol açmakta ve ölümcül kalp hasarı oluşturmaktadır. ADR uygulanması reaktif oksijen türlerinin oluşmasıyla hasarı başlatmaktadır ve bunu da antrasiklin demir serbest radikal oluşumu ile yapmaktadır (23, 24). ADR ile yapılan çalışmalarda kalp dokusunda en önemli patojenik olaylardan birisi nekrozis, piknotik çekirdek, hemoraji ve vakuolizasyon gibi hasarlar görülmesidir (23, 25). Bizim çalışmamızda da nekrozis, piknotik çekirdek ve hemoraji gibi hasarlar ADR uygulanan grupta gözlenmektedir. Bu hasarlar ADR'nin kardiyotoksisitesini yansıtmaktadır. CLQ ile tedavi edilen grupta bu kardiyotoksisitenin verdiği hasarı önemli ölçüde azaldığını görmekteyiz.

ER, protein katlanmasında kilit rol oynayan bir organeldir. Çeşitli yıkıcı uyarılar ve hipoglisemi, enflamasyon, oksidatif stres ve hipoksi gibi patolojik durumlar ER fonksiyonunu bozabilir. Yapılan çalışmalarda ADR uyarılı kardiyotoksisitede ERs'nin arttığı ve bu süreçte rol oynayan GRP78 ifadesinde belirgin düzeyde yükseldiği görülmüştür (11, 12, 26-28). CLQ ile tedavi edilen grupta GRP78 ifadesinde önemli ölçüde azalma olduğu ve ERs'nin düştüğü görülmektedir. Bu da gösteriyor ki ADR tarafından oluşturulan kardiyotoksisiteye karşı ERs'nin azaltılmasında ve kalp hasarının azaltılmasında potansiyel olarak CLQ'nun önemini göstermektedir.

ADR, ERs yolunun bir kısmını spesifik olarak aktive eder, böylece enflamasyona yol açar (26, 27). ADR'ye maruz kalan dokuda daha sonra proenflamatuar sitokinlerden TNF- α artış göstermektedir (28-30). Yapılan çalışmalar CLQ'nun proenflamatuar sitokinlerden TNF- α seviyesini düşürerek enflamasyonu azalttığını göstermiştir (31-33). Bizim sonuçlarımızda benzer bir şekilde ADR ile birlikte inflamatuvar cevabı artırırken kalp fonksiyonunun bozulmasına yol açmaktadır. Çalışmamızda ADR grubunda artmış olan proenflamatuar sitokin TNF- α seviyesinin CLQ ile tedavi edildikten sonra önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. CLQ'nun yapılan çalışmalarda yüksek dozlarda uzun süre kullanımında kardiyotoksisiteye yol açtığı belirtilmiştir (34). Fakat bazı çalışmalarda bu ilacı kullanan ve kullanmayan kişilerde farklılık olmadığı da görülmüştür (35). Yüksek doz kullanımında kardiyotoksisiteye yol açmasına rağmen çalışmamızda kullanılan doz ile ADR uyarılı kardiyak enflamasyonun ve ERs'nin azalmasında rol oynadığı gösterilmiştir.

Bu sonuçlarla bizim çalışmamızda, ADR tarafından oluşturulan kardiyotoksisitede CLQ'nun, enflamasyonu ve ERs'yi azaltarak kalbin hasarına karşı korumada önemli rol oynayacağı yapılan yöntem ve analizlerle gösterilmiştir. Bu bulgular, CLQ'nun ADR kaynaklı kardiyotoksisitenin tedavisi için potansiyel bir terapötik olabileceğini düşündürmektedir. Yapılacak çalışmalar ile CLQ'nun antiinflamatuvar ve ERs üzerine etkileri aydınlatılacaktır.

KAYNAKLAR

1. Chung CK, Garcia-Couce J, Campos Y, Kralisch D, Bierau K, Chan A, et al. Doxorubicin loaded poloxamer thermosensitive hydrogels: chemical, pharmacological and biological evaluation. *Molecules*, 2020;25(9).
2. Jang YJ, Lee D, Hossain MA, Aravinthan A, Kang CW, Kim NS, et al. Korean Red Ginseng enhances cardiac hemodynamics on doxorubicin-induced toxicity in rats. *J Ginseng Res*, 2020;44(3):483-9.
3. 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.
4. Zhang Q, Wu G, Guo S, Liu Y, Liu Z. Effects of tristetraprolin on doxorubicin (adriamycin)-induced experimental kidney injury through inhibiting IL-13/STAT6 signal pathway. *Am J Trans Res*, 2020;12(4):1203-21.
5. Wali AF, Rashid S, Rashid SM, Ansari MA, Khan MR, Haq N, et al. Naringenin Regulates Doxorubicin-Induced Liver Dysfunction: Impact on Oxidative Stress and Inflammation. *Plants*, 2020;9(4).
6. Ozturk E, Kaymak E, Akin AT, Karabulut D, Unsal HM, Yakan B. Thymoquinone is a protective agent that reduces the negative effects of doxorubicin in rat testis. *Hum Exp Toxicol*, 2020;960327120924108.
7. Yang HL, Hsieh PL, Hung CH, Cheng HC, Chou WC, Chu PM, et al. Early moderate intensity aerobic exercise intervention prevents doxorubicin-caused cardiac dysfunction through inhibition of cardiac fibrosis and inflammation. *Cancers*, 2020;12(5).
8. Tadokoro T, Ikeda M, Ide T, Deguchi H, Ikeda S, Okabe K, et al. Mitochondria-dependent ferroptosis plays a pivotal role in doxorubicin cardiotoxicity. *JCI Insight*, 2020;5(9).
9. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*, 2010;115(2):155-62.
10. Hu J, Wu Q, Wang Z, Hong J, Chen R, Li B, et al. Inhibition of CACNA1H attenuates doxorubicin-induced acute cardiotoxicity by affecting endoplasmic reticulum stress. *Biomed Pharmacother*, 2019;120:109475.
11. Sishi BJ, Loos B, van Rooyen J, Engelbrecht AM. Doxorubicin induces protein ubiquitination and inhibits proteasome activity during cardiotoxicity. *Toxicol*, 2013;309:23-9.
12. Tscheschner H, Meinhardt E, Schlegel P, Jungmann A, Lehmann LH, Muller OJ, et al. CaMKII activation participates in doxorubicin cardiotoxicity and is attenuated by moderate GRP78 overexpression. *PLoS One*, 2019;14(4):e0215992.
13. Lan Y, Wang Y, Huang K, Zeng Q. Heat shock protein 22 attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via regulating inflammation and apoptosis. *Front pharmacol*, 2020;11:257.
14. Bin Jardan YA, Ansari MA, Raish M, Alkharfy KM, Ahad A, Al-Jenoobi FI, et al. Sinapic acid ameliorates oxidative stress, inflammation, and apoptosis in acute doxorubicin-induced cardiotoxicity via the NF-kappaB-mediated pathway. *BioMed Res Int*, 2020;2020:3921796.
15. Hu TY, Frieman M, Wolfram J. Insights from nanomedicine into chloroquine efficacy against COVID-19. *Nat Nanotechnol*, 2020;15(4):247-9.
16. Askanase AD, Khalili L, Buyon JP. Thoughts on COVID-19 and autoimmune diseases. *Lupus Sci Med*, 2020;7(1):e000396.
17. Zhan F, Zhao G, Li X, Yang S, Yang W, Zhou S, et al. Inositol-requiring enzyme 1 alpha endoribonuclease specific inhibitor STF-083010 protects the liver from thioacetamide-induced oxidative stress, inflammation and injury by triggering hepatocyte autophagy. *Int Immunopharmacol*, 2019;73:261-9.
18. Shivakumar P, Rani MU, Reddy AG, Anjaneyulu Y. A study on the toxic effects of Doxorubicin on the histology of certain organs. *Toxicol Int*, 2012;19(3):241-4.
19. Long L, Yang X, Southwood M, Lu J, Marciniak SJ, Dunmore BJ, et al. Chloroquine prevents progression of experimental pulmonary hypertension via inhibition of autophagy and lysosomal bone morphogenetic protein type II receptor degradation. *Circ Res*, 2013;112(8):1159-70.
20. Oztürk Küp F, Koçak B, Akin At, Doğanyığıt İ, Okan A, Kaymak E, et al. The effect of biosynthetic silver nanoparticles against intestinal toxicity caused by Lipopolysaccharide (LPS). *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2020;77(3):333-42.

21. Karabulut D, Ulusoy HB, Kaymak E, Sonmez MF. Therapeutic effects of pentoxifylline on diabetic heart tissue via NOS. *Anatol J Cardiol*, 2016;16(5):310-5.
22. Sönmez MF, Ozdemir Ş, Guzel M, Kaymak E. The ameliorative effects of vinpocetine on apoptosis and HSP-70 expression in testicular torsion in rats. *Biotech Histochem*, 2017;92(2):92-9.
23. Sharma A, Parikh M, Shah H, Gandhi T. Modulation of Nrf2 by quercetin in doxorubicin-treated rats. *Heliyon*, 2020;6(4):e03803.
24. Gammella E, Maccarinelli F, Buratti P, Recalcati S, Cairo G. The role of iron in anthracycline cardiotoxicity. *Front Pharmacol*, 2014;5:25.
25. Sandamali JAN, Hewawasam RP, Jayatilaka K, Mudduwa LKB. Cardioprotective potential of *murraya koenigii* (L.) Spreng. leaf extract against Doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020;2020:6023737.
26. Liao D, Xiang D, Dang R, Xu P, Wang J, Han W, et al. Neuroprotective effects of dl-3-n-Butylphthalide against Doxorubicin-induced neuroinflammation, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and behavioral changes. *Oxid Med Cell Longev*, 2018;2018:9125601.
27. Chen RC, Sun GB, Ye JX, Wang J, Zhang MD, Sun XB. Salvianolic acid B attenuates doxorubicin-induced ER stress by inhibiting TRPC3 and TRPC6 mediated Ca(2+) overload in rat cardiomyocytes. *Toxicol Lett*, 2017;276:21-30.
28. Wang Z, Wang M, Liu J, Ye J, Jiang H, Xu Y, et al. Inhibition of TRPA1 attenuates Doxorubicin-induced acute cardiotoxicity by suppressing oxidative stress, the inflammatory response, and endoplasmic reticulum stress. *Oxid Med Cell Longev*, 2018;2018:5179468.
29. Rafiee Z, Moaiedi MZ, Gorji AV, Mansouri E. p-Coumaric acid mitigates Doxorubicin-induced nephrotoxicity through suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Arch Med Res*, 2020;51(1):32-40.
30. Xu Y, Lin H, Zheng W, Ye X, Yu L, Zhuang J, et al. Matrine ameliorates adriamycin-induced nephropathy in rats by enhancing renal function and modulating Th17/Treg balance. *Eur J Pharmacol*, 2016;791:491-501.
31. Yu T, Liu D, Gao M, Yang P, Zhang M, Song F, et al. Dexmedetomidine prevents septic myocardial dysfunction in rats via activation of alpha7nAChR and PI3K/Akt- mediated autophagy. *Biomed Pharmacother*, 2019;120:109231.
32. Yayi H, Yeda X, Huaxin W, Yang W, Qian S, Zhongyuan X. Toll-like receptor 7 involves the injury in acute kidney ischemia/reperfusion of STZ-induced diabetic rats. *Acta Cir Bras*, 2016;31(7):448-55.
33. Todorovic Z, Medic B, Basta-Jovanovic G, Radojevic Skodric S, Stojanovic R, Rovcanin B, et al. Acute pretreatment with chloroquine attenuates renal I/R injury in rats. *PLoS One*, 2014;9(3):e92673-e.
34. Mubagwa K. Cardiac effects and toxicity of chloroquine: a short update. *Int J Antimicrob Agents*, 2020;56(2):106057.
35. Costedoat-Chalumeau N, Hulot J-S, Amoura Z, Leroux G, Lechat P, Funck-Brentano C, et al. Heart conduction disorders related to antimalarials toxicity: an analysis of electrocardiograms in 85 patients treated with hydroxychloroquine for connective tissue diseases. *Rheumatology*, 2007;46(5):808-10.