

Research Article / Araştırma Makalesi

Doksorubisin Kaynaklı Kardiyotoksisite Modelinde İnsülin Benzeri Büyüme Faktörünün (IGF-1) Etkisinin Araştırılması

Cardioprotective Effects of Insulin-Like Growth Factor (Igf-1) in A Rat Model of Myocarditis

<sup>1</sup>Eriñç Yücel, <sup>2</sup>Münevver Nazlıcan Zengin, <sup>3</sup>Özlem Özmen, <sup>2</sup>Osman Çiftci

<sup>1</sup>Servergazi Devlet Hastanesi, Denizli, Türkiye

<sup>2</sup>Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye

<sup>3</sup>Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Patoloji Anabilim Dalı, Burdur, Türkiye

**Abstract:** : Doxorubicin is widely used in the treatment of various solid tumors. Despite its potent antineoplastic activity, doxorubicin's use is limited due to its cardiotoxic effects. This study aimed to evaluate the protective role of insulin-like growth factor (IGF)-1 in doxorubicin-induced cardiotoxicity. Thirty-two rats were divided into 4 groups: Control, Doxorubicin (4 mg/kg/week), IGF-1 (1 µg /kg every 2 days), doxorubicin (4 mg/kg/week)+ IGF-1 (1 µg /kg every 2 days). Doxorubicin and IGF-1 were administered intraperitoneally. After four weeks of drug administration, heart and blood samples were taken under anesthesia. In biochemical analyses, CK-MB and Troponin-I levels were measured in blood serum. TAS, TOS, TNF-α, and IL-6 levels in heart tissue were measured by ELISA method. iNOS, HIF-1α, SERCA2a, LC3, Beclin-1 and SQSTM1 mRNA expression levels were analyzed by RT-PCR. Histological and immunohistochemical (Caspase-3 and ICAM-1) analyses were performed. Doxorubicin decreased heart rate, tail blood pressure and increased serum CK-MB and Troponin-I levels. Doxorubicin shifted the total antioxidant/oxidant balance in favor of oxidants in heart tissue and caused an increase in TNF-α and IL-6 cytokine levels. Doxorubicin increased HIF-1α, SERCA2a, LC3, Beclin-1 and SQSTM1 mRNA expression levels in heart tissue. It caused histological damage and severe Caspase-3 and ICAM-1 expressions in rat heart tissue. Co-administration with IGF-1 reduced the toxic effects of doxorubicin. It was concluded that IGF-1 could improve doxorubicin-induced cardiotoxicity through antioxidant, anti-inflammatory and antiapoptotic effects.

**Keywords:** Doxorubicin, IGF-1, Myocarditis, Oxidative Damage,

**Özet:** Doksorubisin, çeşitli katı tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Doksorubisin güçlü antineoplastik aktivitesine rağmen kardiyotoksik etkisi nedeniyle kullanımı sınırlıdır. Bu çalışmada doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisitede insülin benzeri büyüme faktörünü (IGF)-1 koruyucu rolünü değerlendirilmesi amaçlandı. Otuz iki adet sıçan 4 gruba ayrıldı: Kontrol, Doksorubisin (4 mg/kg/hafta), IGF-1 (2 günde bir 1 µg /kg), doksorubisin (4 mg/kg/hafta)+ IGF-1 (2 günde bir 1 µg /kg). Doksorubisin ve IGF-1 intraperitoneal olarak uygulandı. Dört hafta süren ilaç uygulamalarının ardında anestezi altında kalp ve kan örnekleri alındı. Biyokimyasal analizlerde kan serumundan CK-MB ve Troponin-I seviyeleri ölçüldü. Kalp dokusunda TAS, TOS, TNF-α, ve IL-6 düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçüldü. iNOS, HIF-1α, SERCA2a, LC3, Beclin-1 ve SQSTM1 mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile analiz edildi. Histolojik ve immünohistokimyasal (Kaspaz-3 ve ICAM-1) analizler yapıldı. Doksorubisin kalp hızını azaltırken kuyruk kan basıncını düşürdü ve serum CK-MB ve Troponin-I seviyelerini artırdı. Doksorubisin kalp dokusunda total antioksidan/oksidan dengeyi oksidan lehine çevirdi ve TNF-α ve IL-6 sitokin seviyelerinde artışa neden oldu. Doksorubisin kalp dokusunda HIF-1α, SERCA2a, LC3, Beclin-1 ve SQSTM1 mRNA ekspresyon düzeylerini artırdı. Sıçan kalp dokusunda histolojik hasara ve şiddetli Kaspaz-3 ve ICAM-1 ekspresyonlarına neden oldu. IGF-1' ile birlikte uygulanması doksorubisin toksik etkilerini azalttı. IGF-1'in antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkilerle doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisiteyi iyileştirebileceğini sonucuna ulaşıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Doksorubisin, IGF-1, Miyokardit, Oksidatif Hasar,

**ORCID ID of the authors:** EY. [0009-0000-6704-4671](https://orcid.org/0009-0000-6704-4671), MNZ. [0000-0002-3536-6606](https://orcid.org/0000-0002-3536-6606), ÖÖ. [0000-0002-1835-1082](https://orcid.org/0000-0002-1835-1082)  
OÇ. [0000-0001-5755-3560](https://orcid.org/0000-0001-5755-3560)

Received .19.09.2024

Accepted 14.10.2024

Online published .23.10.2024

**Correspondence:** Münevver Nazlıcan ZENGİN– Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye  
e-mail: [mnzengin@pau.edu.tr](mailto:mnzengin@pau.edu.tr)

## 1. Giriş

Doksorubisin (DOX) katı tümörler, lösemi, yumuşak doku sarkomu, meme kanseri, akciğerin küçük hücreli karsinomu ve özofagus karsinomları gibi birçok kanser türünde oldukça etkili bir ilaçtır ve kanser tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır (1). Doksorubisin serbest radikal üretimini indükleyerek mitokondriyal DNA hasarına bağlı apoptotik hücre ölümünü de indükler ve geniş spektrumlu antineoplastik aktivitesine rağmen kalp dokularına spesifik toksisiteyi nedeniyle klinik kullanımı sınırlıdır (2). Literatürde kümülatif doksorubisin uygulamasına bağlı konjestif kalp yetmezliği, kardiyomiopati ve elektrokardiyografik değişiklikler bildirilmiştir (3,4). Dox'un kardiyotoksik etkileri için öne sürülen olası mekanizmalar arasında serbest radikaller yer alır. Kalp diğer organlara kıyasla daha yüksek oksijen tüketimine sahiptir (5). Buna bağlı artan oksidatif stres, serbest radikallerin salınımının azalması ve endojen antioksidan eksikliklerinin Dox kaynaklı kardiyomiopati ve kalp yetmezliğinde önemli bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (6).

Son yıllarda Dox'un neden olduğu kardiyotoksisiteye karşı koruyucu bir strateji olarak birçok bileşik kullanıldığı gösterilmiştir (7). İnsülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I), büyüme hormonu uyarımına yanıt olarak farklı dokularda üretilen bir anabolik hormondur ve antioksidatif, anti-inflamatuvar, antifibrojenik ve anti-apoptotik özelliklere sahiptir (8). IGF-1 kardiyovasküler sistemde kardiyak homeostaz ve vasküler damar direnci üzerindeki etkilerinden dolayı kardiyoprotektif olarak kullanılabilir (9). Oksidatif hasarla ilişkili kardiyomiopatlarda miyokardiyal apoptoz oluşabilir. IGF-1, kardiyomiyositlerde apoptozu önler ve ayrıca vazodilatatör etkisi ile miyokardiyal fonksiyonları korur (10,11).

Mevcut çalışmada doksorubisin ile indüklenen kardiyomyopati modelinde, IGF-1'in kardiyotoksite üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı.

## 2. Gereç ve Yöntemler

Bu çalışmada 250-300g ağırlığında erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Pamukkale Üniversitesi deneysel cerrahi uygulama ve

araştırma merkezinde standart bakım koşullarında barındırıldı ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklık,  $50\pm 5\%$  nem, karanlık-aydınlık döngüsü). Ticari pelet yem ve su ad libitum beslendi.

### *Etik Kurul*

Tüm deneysel işlemler Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı (PAUHDEK-2021/15) alındıktan sonra Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanım Kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirildi.

### *Deneysel Uygulamalar*

Çalışmada 32 adet hayvan kullanıldı ve her grupta 8 deney hayvanı olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna gün aşırı serum fizyolojik (SF) intraperitoneal yolla uygulandı. Doksorubisin (Dox) grubuna doksorubisin 4mg/kg/hafta dozunda intraperitoneal yolla uygulandı. IGF-1 grubuna IGF-1 intraperitoneal yolla 1 µg /kg dozunda gün aşırı uygulandı. Dox + IGF-1 grubuna doksorubisin (4mg/kg/hafta) ve IGF-1 (1 µg /kg) olarak uygulandı. Dört haftalık deney protokolünün bitimini takiben ketamin ksilazin anestezisi altında doku ve kan örnekleri alındı. Kan örneklerinden serum elde edildi. Elde edilen serum örnekleri CK-MB ve Troponin seviyelerini belirlemek için kullanıldı. Kalp dokusundan alınan fraksiyonlar biyokimyasal analiz için ( $-20^{\circ}\text{C}$ )'de saklandı. Diğer fraksiyonların geri kalanı immünohistokimyasal ve patolojik analizler için %10 tamponlu formaldehitte sabitlendi.

### *Kuyruk Kan Basıncının Ölçümü*

Son ilaç uygulamasından sonra kuyruk kan basınçları tail cuff yöntemiyle (Commat may nibp 200-A) kuyruk arterlerinden ölçüldü. Manşet şişirilip belli bir basınç sağlandıktan sonra kan akımının kesilip yeniden başlamasıyla sistolik ve diastolik kan basıncı ölçüldü ve her ikisinin ortalaması ortalama kan basıncı olarak verildi ve kan basıncı ölçümü sırasında meydana gelen arteriyel basınç dalgalanmaları Commat may nibp 200-A analiz ederek kalp atım hızını belirlendi (Biopac student lab PRO).

### **Serum Troponin I ve CK-MB seviyelerinin analizi**

Troponin I ve CK-MB serumdan serumundan spektrofotometrik yöntemle ölçüldü (Beckman-Coulter AU5800).

### **Proinflamatuar sitokinlerin ve Oksidatif hasar belirteçlerinin analizi**

Kalp dokusu doku homojenizatörü (Bullet Blender) ile homojenize edilerek kalp dokusunda IL-6 (Cat.No E0135Ra) ve TNF-a (Cat.No E0764Ra) seviyeleri ticari olarak satın alınan ELISA kit protokolüne göre yapıldı. Kalp dokusunda total antioksidan seviyelerini (TAS) ve total oksidan (TOS) seviyelerini belirlemek için ticari olarak alınan ELISA kit (Relassay Diagnostic) kullanıldı. Oksidatif stres indeksi (OSİ) 'TOS (µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> equivalent/L) / TAS (µmol Trolox equivalent/L) x 100' formülü kullanılarak hesaplandı.

### **Gen Ekspresyonlarının Analizleri**

Gen ekspresyon analizi için dokulardan total RNA izolasyonu (BioBasic, One Step RNA Reagent) gerçekleştirildi. Nanodrop (ND-1000) spektrofotometre kullanılarak RNA miktar tayini ve saflığı ile ölçüldü. cDNA sentezi, ticari olarak satın alınan kit (OneScript Plus, abm) protokolüne göre gerçekleştirildi. qPCR MasterMix kiti aracılığıyla (BlaTaq 2X qPCR MasterMix, abm) reaksiyon koşulları sağlandı ve StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems) ile amplifiye edildi. Primer sekansları tablo 1 verildi.

### **Histopatolojik Analiz**

Alınan kalp örnekleri %10'luk nötral formaldehit solüsyonu içinde tespit edildi. Rutin doku takibi yapıldı. (Leica ASP300S; Leica Microsystem, Nussloch, Almanya). Daha sonra parafin bloklara gömüldü. Her blokta 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Histopatolojik inceleme için preparatlar hematoksilin-eozin (HE) ile boyandı ve ışık mikroskopunda (Olympus CX21) incelendi. Yangısal reaksiyonun şiddet ve derecesi mikroskopik bulgulara göre lezyon yok (0), Hafif hiperemi ve ödem, endotelde hafif hipertrofi (1), Belirgin hiperemi, ödem mikrokanamalar (2), Myoardial hücrelerde dejenerasyon, yangısal

hücre infiltrasyonları, fibrozis (3) şeklinde skorlandı. Morfometrik analizler ve microfotografi için Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Co., Tokyo, Japan) kullanıldı.

### **İmmünohistokimyasal Analiz**

Histopatolojik inceleme için kesitler alınırken farklı iki seri kesit immünohistokimyasal değerlendirme için alındı. Poli-L-lizinin lamlara aktarıldı. Kesitler ICAM-1 (ICAM-1 (M/K-2):sc-18864, 1/100 dilüsyon) Santa cruz (Texas, USA) ve Kaspaz-3 (Anti-caspase-3 Antibody (E-8): sc-7272) ekspresyonlarının değerlendirilmesi için streptavidin-biyotin kompleks peroksidaz yöntemine göre boyandı. Kromojen olarak 3-3' diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. İmmünohistokimyasal reaksiyonunun şiddetine göre skorlama yapıldı; (0) = negatif, (1) = fokal hafif boyanma, (2) = yaygın hafif boyama, (3) = yaygın şiddetli boyama olarak belirlendi. Değerlendirme için her bölümde 40X objektif büyütme altında 10 farklı alan incelendi. Morfometrik analizler ve mikrofotografi Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Co., Tokyo, Japonya) kullanılarak yapıldı.

### **İstatistiksel Analiz**

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS (25. versiyon) paket programında Two-way ANOVA ve post-hoc Bonferroni testi kullanıldı. RT-PCR gen ekspresyon değişiklikleri 2-ΔΔCT yöntemi ile Gene Globe (RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Data Analysis) programı aracılığıyla yapıldı. Histopatolojik skorların değerlendirilmesinde SPSS (22. versiyon) programı aracılığıyla Duncan testi kullanıldı. Veriler ortalama+SEM olarak sunuldu ve p< 0.05 olarak kabul edildi.

## **3. Bulgular**

### **Kuyruk Kan Basıncı Bulguları**

4 haftalık deney sonucunda ortalama kan basıncı ve kalp atım hızı tablo 2 'de verilmiştir. Doksorubisin grubunda kontrol ve IGF-1 grubuna göre kuyruk kan basıncı anlamlı düzeyde azalırken (p < 0.001) ve kalp atım hızı anlamlı düzeyde arttığı belirlendi (p < 0.001). Doksorubisin ve IGF-1 birlikte uygulandığında

doksorubisin grubuna göre ortalama kan basıncı ve kalp atım hızı azaldı, kontrol grubu seviyelerine yaklaştı ( $p < 0.03$ ).

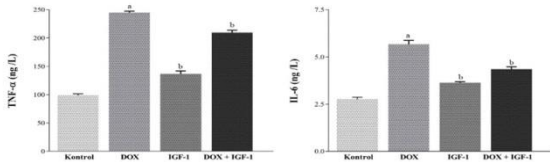
### **Biyokimya Bulguları**

Doksorubisin grubunda kontrol grubuna göre serum CK-MB ve Troponin-I seviyeleri anlamlı düzeyde arttı ( $p < 0.001$ ). Doksorubisin ve IGF-1 birlikte uygulandığında doksorubisin grubuna göre Serum CK-MB ( $p < 0.002$ ) ve Troponin-I seviyeleri anlamlı düzeyde olarak azaldı ( $p < 0.001$ ). Serum CK-MB ve troponin I seviyeleri tablo 3' de verilmiştir.

### **Proinflatuar sitokinlerin ve Oksidatif hasar belirteçlerinin analiz bulguları**

Kalp dokusunda proinflatuar sitokin seviyeleri (TNF- $\alpha$  ve IL-6) Şekil 1' de verildi. TNF- $\alpha$  ve IL-6 seviyeleri doksorubisin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttı. Dox +IGF-1 grubunda doksorubisin grubuna göre TNF- $\alpha$  ve IL-6 seviyeleri anlamlı düzeyde azaldı ( $p < 0.05$ ). Kontrol grubuna göre doksorubisin grubunda TAS seviyeleri anlamlı düzeyde azalırken TOS seviyeleri ise anlamlı düzeyde arttı ve buna bağlı olarak OSI bu grupta arttı ( $p < 0.05$ ). Doksorubisin ve IGF-1 birlikte uygulandığında doksorubisin grubuna göre TAS seviyeleri anlamlı düzeyde azalırken TAS seviyeleri anlamlı düzeyde arttı ve OSI kontrol grubu seviyelerine yaklaştı ( $p < 0.05$ ). Kalp dokusunda TAS, TOS ve OSI seviyelerindeki değişiklikler Şekil 2' de verildi.

### **RT-PCR Gen Ekspresyonu Analizleri**



**Şekil 1.** Kalp dokusunda TNF-a ve IL-6 seviyeleri Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak ifade edildi. Sütunlar üzerindeki harfler gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (a: Kontrol grubuna göre ve b: Dox grubuna göre;  $p < 0.05$ ).

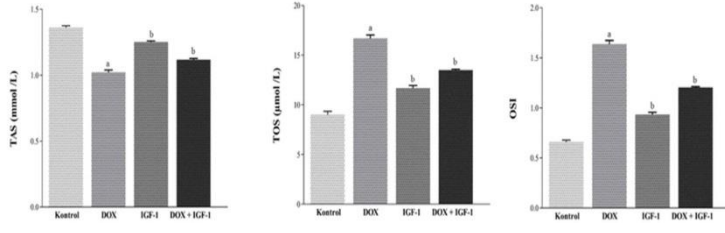
Doksorubisin grubunda kontrol grubuna göre SQSTM1, Beclin-1 ve LC3 mRNA ekspresyonları arttı. Doksorubisin ve IGF-1 birlikte uygulandığında SQSTM1, Beclin-1 ve LC3 mRNA ekspresyonları azaldı ( $p < 0.05$ ). SQSTM1, Beclin-1 ve LC3 mRNA ekspresyonları Şekil 3'te verildi. Ayrıca Doksorubisin uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla HIF-1 $\alpha$ , SERCA2a mRNA ekspresyonları artarken iNOS mRNA ekspresyonu azaldı ( $p < 0.005$ ). Doksorubisin ve IGF-1 birlikte uygulanan grupta kontrole göre HIF-1 $\alpha$  ve mRNA ekspresyonu arttı ( $p < 0.005$ ). iNOS ve SERCA2a mRNA ekspresyonları seviyesine kontrole yaklaştı. HIF-1 $\alpha$ , iNOS, SERCA2a mRNA ekspresyon değişiklikleri Şekil 4 -5' de verildi.

### **Histopatolojik Bulgular**

Kontrol ve IGF-1 gruplarında normal doku histolojisi izlendi. Doksorubisin uygulanan grupta kalp dokularında inflammatuar hücre infiltrasyonları, ödem, şiddetli hiperemi ve kanamalar belirlendi. IGF-1 tedavisiyle kalp dokularında histopatolojik değişiklikler azaldı (Tablo 4 ve Şekil 6).

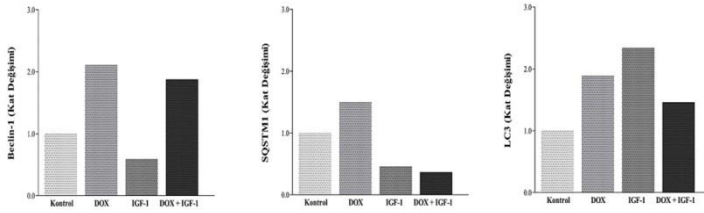
### **İmmünohistokimyasal Bulgular**

Doksorubisin uygulanan grubunda Kaspaz-3 ve ICAM-1 ekspresyonlarında artış gözlemlendi. IGF-1 uygulaması, Kaspaz-3, ICAM-1 ekspresyonlarını azalttı. Kaspaz-3 ve ICAM-1 ekspresyonları yoğun olarak miyokardiyal hücrelerde görüldü (Şekil 7-8). immünohistokimyasal skorların istatistik analizi Tablo 5 ve Tablo 6'da verildi.

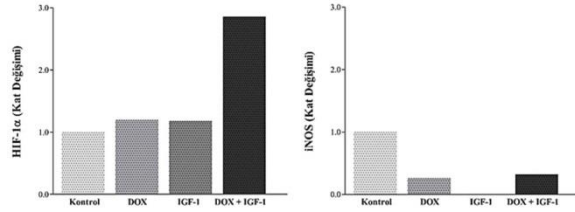


**Şekil 2.** Kalp dokusunda total antioksidan, total oksidan seviyeleri ve oksidatif stres indeksi

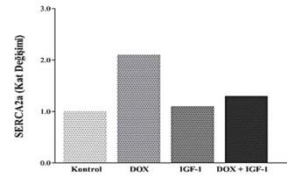
Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak ifade edildi. Sütunlar üzerindeki harfler gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (a: Kontrol grubuna göre ve b: Dox grubuna göre;  $p < 0.05$ ).



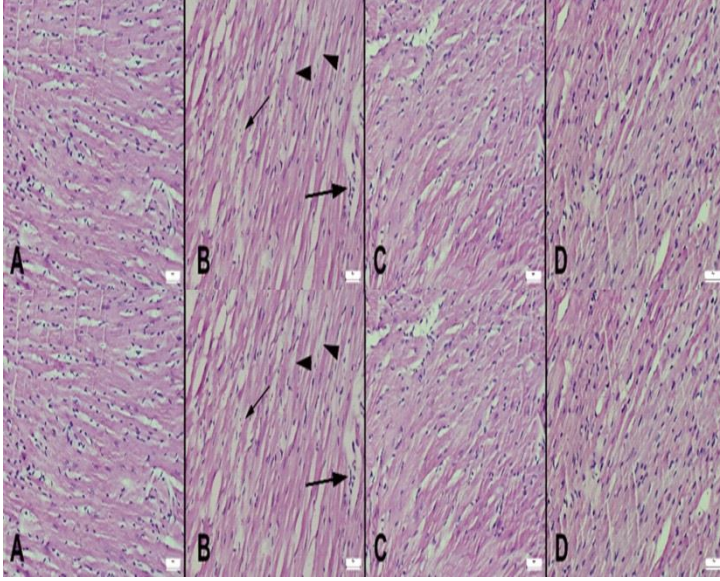
**Şekil 3.** Kalp dokularında Beclin-1, SQSTM1 ve LC3 gen ekspresyon değişimleri (Fold change)



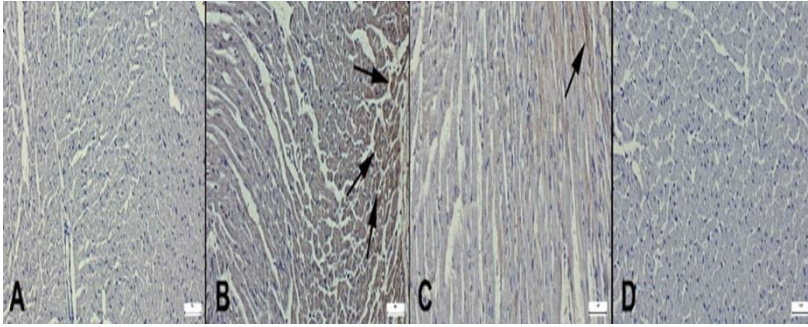
**Şekil 4.** Kalp dokularında HIF-1 $\alpha$  ve iNOS gen ekspresyon değişimleri (Fold change)



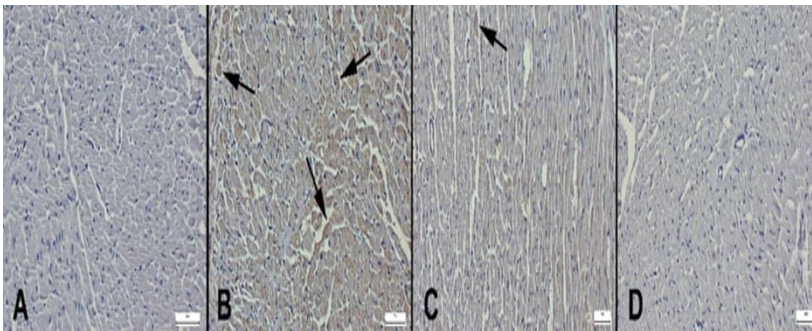
**Şekil 5.** Kalp dokularında SERCA2a gen ekspresyon değişimleri (Fold change)



**Şekil 6.** Kalp dokusu (A) Kontrol grubunda normal doku histolojisi. (B) Dox grubundan bir sıçanda kalpte şiddetli ödem (ok başı), mikrohemorajiler (ince ok) ve hafif inflamatuvar hücre infiltrasyonları (kalın ok). (C) Dox+ IGF-1 grubunda mikroskopik bulgularda belirgin iyileşme. (D) IGF-1 grubunda normal kalp histolojik görünümü (HE, barlar=50µm).



**Şekil 7.** Kalp dokusu Kaspaz-3'ün immünohistokimyasal bulguları (A) Kontrol grubunda negatif ekspresyon. (B) Dox grubundaki miyokardiyal hücrelerde belirgin ekspresyon (oklar). (C) Dox+ IGF-1 grubunda azalan ekspresyon (ok). (D) IGF-1 grubunda negatif ekspresyon (Streptavidin biotin peroksidaz yöntemi, barlar=50µm).



**Şekil 8.** Kalp dokusu ICAM-1'in immünohistokimyasal bulguları

(A) Kontrol grubunda negatif ekspresyon. (B) Dox grubunda orta düzeyde ekspresyon. (C) Dox+ IGF-1 grubunda miyokardiyal hücrelerde (ok) azalmış ekspresyon. (D) IGF-1 grubunda negatif ekspresyon (Streptavidin biotin peroksidaz yöntemi, barlar=50µm).

#### 4. Tartışma

Doksozobusinin kanser tevasinde yaygın olarak kullanılmaktadır fakat kemoterapi sonrasında kardiyotoksik yan etkileri kullanımını sınırlandırmaktadır (12). Doksozobusinin kaynaklı kardiyak hasarın oksidatif stres ve apoptoz kaynaklı olduğu bilinmektedir (13). Yapılan çalışmalarda doksozobusinin kaynaklı kardiyotoksikitenin önleminde çeşitli antioksidan bileşikler denenmiştir (14,15). IGF-1 hemen hemen tüm dokular tarafından sentezlenen etkili antioksidan, anti-apoptotik ve anti-inflamatuar etkilere sahiptir. Ayrıca hücre büyümesini ve farklılaşmasında, kardiyak fonksiyonların korunmasında önemli bir role sahiptir. Daha önceki çalışmalarda miyokardiyal iskemi, diyabet, multiple skleroz, romatoid artrit, ve inflamatuar bağırsak hastalıklarının deneysel modellerinde etkisi değerlendirilmiştir (16,17). Mevcut çalışmada sıçanlarda doksozobusinin ile indüklenen miyokardit modelinde IGF-1 'in etkisinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Doksozobusinin kardiyak yan etkileri arasında aritmi, kan basıncı değişiklikleri sol ventrikül bozukluğu ve kardiyomyopati gibi etkiler de görülebilir (18,19). Weinstein ve ark. yaptığı çalışmada doksozobusinin sol ventrikülün kasılma fonksiyonunda ve kalp atım hızında azalmaya yol açtığını bildirmişlerdir (20). IGF-1 kalpte kalsiyum geçişini artırarak pozitif inotropik etki oluşturur ve kardiyomyositlerde antiapoptotik etki gösterebileceği bildirilmiştir (21). Başka bir çalışmada IGF-1 'in iskemik kalp hastalarında kan basıncı üzerinde olumlu etkiler yaptığı gösterilmiştir (22). Mevcut çalışmada doksozobusinin kan basıncını ve kalp atımı hızını azalttığı gösterildi. Bunun yanında IGF-1 uygulamasının bu değişiklikleri azaltarak kardiyak yan etkileri azaltabileceği gösterildi. Miyokardiyal hasarlarda CK-MB ve Troponin-I enzim seviyeleri artar (23). Nitekim doksozobusinin kaynaklı miyokardiyal hasar çalışmalarında CK-MB ve Troponin-I seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (24). Literatüre benzer şekilde mevcut çalışmada da doksozobusinin serum CK-MB ve Troponin-I seviyelerini artırdı. IGF-1 uygulamasıyla beraber CK-MB ve Troponin-I seviyelerinde azaldı.

IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  inflamatuar sitokinler olup çeşitli inflamatuar durumlarda seviyeleri artar (26). Daha önceki çalışmalarda doksozobusinin miyokardiyal hasarda TNF- $\alpha$  ve IL-6 seviyeleri arttırdığını bildirildi (27,28). Bu çalışmada kalp dokusunda Doksozobusinin grubunda TNF- $\alpha$  ve IL-6 seviyelerinin arttığı ve IGF-1 uygulamasıyla artan TNF- $\alpha$  ve IL-6 seviyelerinin azaldığı gözlemlendi. Doksozobusinin miyokardiyal hücrelerde oluşturduğu hasar, topoizomeraz-II enzim inhibisyonu bağlı reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesiyle ilişkilidir ve ROS ürünleri miyokardiyal hücrelerde oksidatif hasara ve apoptoza yol açar (29). Doksozobusinin oksidatif hasar aracılığıyla kardiyotoksik etkileri oluşturduğu yapılan birçok çalışmada bildirilmiştir (5-7). Öte yandan IGF-1'in birçok dokuda antioksidan enzim seviyelerini artırarak oksidatif hasarı ve mitokondriyal disfonksiyonu iyileştirdiği gösterilmiştir (30). Nitekim literatüre benzer şekilde mevcut çalışmada doksozobusinin total antioksidan seviyelerini azaltarak oksidatif hasara yol açtı. Bunun yanında IGF-1 uygulaması ile total antioksidan seviyelerini artırarak oksidatif hasarı azalttı.

Doksozobusinin aracılı miyokardiyal hasarda iNOS ekspresyonunun kalbin kasılma gücü ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (31). Wang ve ark. miyokardiyal iskemi ve reperfüzyon hasarında iNOS'un ekspresyonunun arttığını ve sonraki günlerde ise azaldığı bildirmiştir (32). Literatüre benzer şekilde iNOS ekspresyonu doksozobusinin uygulanan gruplarda şiddetli hasara bağlı olarak azaldı. HIF-1 $\alpha$  iskemi ve oksidatif hasara karşı hipoksik koşullarda eksprese edilir (33). HIF-1 $\alpha$  ekspresyonunun ROS'ların üretimini azaltabilir. HIF-1 $\alpha$  kaspaz-3 aracılı apoptozu indükleyebileceği gibi Beclin 1 aracılı hücre sağ kalımını indükleyebilir (34). Bu çalışmada doksozobusinin ve IGF-1 birlikte verildiğinde HIF-1 $\alpha$  ekspresyonu arttığı belirlendi. Bu artışın otofaji aracılı mitokondriyal hasarın ortadan kaldırılmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanında doksozobusinin Beclin-1, SQSTM1 ve LC3 ekspresyonlarını artırarak söz konusu kardiyak hasara otofajinin de eşlik ettiği

gözlendi ve IGF-1 uygulamasıyla Beclin-1, SQSTM1 ve LC3 ekspresyonları azaldı. Nitekim sonuçlarımıza benzer şekilde sepsis kaynaklı kardiyak disfonksiyonda da Beclin-1, SQSTM1 ve LC3 gen ekspresyonlarının arttığı bildirilmiştir (35).

Kardiyak kontraktilitenin modülasyonunda kalsiyum ve SERCA2a proteinleri yer alır. SERCA2a sitozolden sarkoplazmik retikuluma kalsiyum geçişinden sorumludur ve kalbin kontraktilesinde önemli bir yere sahiptir (36). Yapılan çalışmada doksorubisinin SERCA2a ekspresyonunu artırdığı ve bunun yanında IGF-1 uygulamasının SERCA2a ekspresyonunu azalttığı belirlendi.

IGF-1'in hücre içi kalsiyum seviyesini artırarak kalbin kasılma gücünü arttırdığı daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (37). Nitekim mevcut çalışmada da IGF-1'in kalsiyum seviyelerini artırarak kalp kontraktilesini etkilediği söylenebilir.

Daha önceki çalışmalarda doksorubisinin kardiyomiyositlerde karyoreksis ve karyolizis konjesyon, intermiyokardiyal vakuolizasyon ve ödem, parçalanmış miyofibriller, kardiyomiyosit nekrozu gibi histopatolojik değişikliklere yol açtığı bildirilmiştir (38). Bu çalışmada literatüre benzer şekilde doksorubisin uygulanan grupta kalp dokusunda inflamatuvar hücre infiltrasyonları, ödem, hemoraji gibi değişiklikler saptanırken kontrol ve IGF-1 gruplarında kalp dokularının normal histolojik görünümüne sahip olduğu görüldü. Bunun yanında IGF-1 ile doksorubisinin beraber uygulamasıyla belirgin iyileşme ve histopatolojik skorlarda azalma olduğu görüldü.

Daha önceki çalışmalarda doksorubisin kaspaz-3 aracılı apoptozu indüklediği (39) ve myositlerde hücreler arası adhezyon molekülü-1 ICAM-1 ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (40). Literatüre benzer şekilde bu çalışmada doksorubisin Kaspaz-3 ve ICAM-1'in ekspresyonlarında ve immunohistokimyasal skorlarında artışa neden oldu. Öte yandan bu değişiklikler IGF-1 uygulamasıyla azaldığı görüldü. IGF-1'in doksorubisin ile indüklenen kalp hasarında anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik etki gösterdiği söylenebilir.

## 5. Sonuç

Sonuç olarak doksorubisinin ortalama kan basıncını ve kalp atım hızını artırdığı ve myokardiyal hasara bağlı serum CK-MB ve Troponin-I seviyelerinin arttığı gözlendi. IGF-1 uygulamasıyla bu değişikliklerin azaldığı görüldü. Doksorubisinin kalp dokusunda antioksidan/oksidan dengesi bozarak oksidatif hasara yol açtı. Bunun yanında inflamasyonu tetikleyerek TNF- $\alpha$  ve IL-6 sitokin seviyelerinde artışa neden oldu ve IGF-1 uygulamasıyla bu değişikliklerin azaldığı belirlendi. Doksorubisin otofajiyi indükleyerek Beclin-1, SQSTM1 ve LC3 ekspresyonlarını artırdı. Ayrıca SERCA2a ve HIF-1 $\alpha$  artışına bağlı olarak myokardiyal hasara neden oldu. Hücresel düzeyde doksorubisinin neden olduğu hasar IGF-1 uygulamasıyla histopatolojik değişikliklerin azaldığı bulundu. Bu çalışmada IGF-1'in doksorubisin kaynaklı kalp hasarına karşı antioksidan, antiinflamatuvar, antiapoptotik ve otofajiyi inhibe etme aktiviteleriyle iyileştirici etki oluşturduğu sonucuna ulaşıldı.

## KAYNAKLAR

1. Rivankar S: An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther* 10: 853–858, 2014.
2. Kalivendi, S. V., Kotamraju, S., Zhao, H., Joseph, J., & Kalyanaraman, B. (2001). Doxorubicin-induced apoptosis is associated with increased transcription of endothelial nitric-oxide synthase: effect of antiapoptotic antioxidants and calcium. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 47266-47276.
3. Mitry MA, Edwards JG: Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *IJC Heart & Vasculature* 10: 17–24, 2016.
4. Shakir DK, Rasul KI: Chemotherapy Induced Cardiomyopathy: Pathogenesis, Monitoring and Management. *J Clin Med Res* 1: 8, 2009.



5. Sheibani M, Azizi Y, Shayan M, Nezamoleslami S, Eslami F, Farjoo MH, Dehpour AR: Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: An Overview on Pre-clinical Therapeutic Approaches. *Cardiovasc Toxicol* 22: 292–310, 2022.
6. Syahputra RA, Harahap U, Dalimunthe A, Nasution MP and Satria D: The Role of Flavonoids as a Cardioprotective Strategy against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Review. *Molecules* 2022, Vol 27, Page 1320 27: 1320, 2022.
7. 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* 40: 125–139, 2018.
8. Conchillo, M., Prieto, J., & Quiroga, J. (2007). Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I) y cirrosis hepática. *Revista española de enfermedades digestivas*, 99(3), 156-164.
9. Macvanin M, Gluovic Z, Radovanovic J, Essack M, Gao X, Isenovic ER: New insights on the cardiovascular effects of IGF-1. *Front Endocrinol (Lausanne)* 14: 1142644, 2023.
10. Higashi Y, Gautam S, Delafontaine P, Sukhanov S: IGF-1 and cardiovascular disease. *Growth Hormone & IGF Research* 45: 6–16, 2019.
11. Boudina S: Cardiac Aging and Insulin Resistance: Could Insulin/Insulin-Like Growth Factor (IGF) Signaling be used as a Therapeutic Target?
12. Kciuk M, Gielecińska A, Mujwar S, Kołat D, Kałuzińska-Kołat Ż, Celik I and Kontek R: Doxorubicin—An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells* 2023, Vol 12, Page 659 12: 659, 2023.
13. Kong CY, Guo Z, Song P, et al.: Underlying the Mechanisms of Doxorubicin-Induced Acute Cardiotoxicity: Oxidative Stress and Cell Death. *Int J Biol Sci* 18: 760, 2022.
14. Koss-Mikolajczyk I, Todorovic V, Sobajic S, Mahajna J, Gerić M, Tur JA, Bartoszek A: Natural Products Counteracting Cardiotoxicity during Cancer Chemotherapy: The Special Case of Doxorubicin, a Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 10037 22: 10037, 2021.
15. Syahputra RA, Harahap U, Dalimunthe A, Nasution MP, Satria D: The Role of Flavonoids as a Cardioprotective Strategy against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Review. *Molecules* 2022, Vol 27, Page 1320 27: 1320, 2022.
16. Sádaba MC, Martín-Estal I, Puche JE, Castilla-Cortázar I: Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) therapy: Mitochondrial dysfunction and diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1862: 1267–1278, 2016.
17. Conti E, Musumeci M, Assenza G, Quarta G, Autore C, Volpe M: Recombinant human insulin-like growth factor-1: a new cardiovascular disease treatment option? *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 6: 258–271, 2008.
18. Bhagat A, Kleinerman ES: Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Causes, Mechanisms, and Prevention. *Adv Exp Med Biol* 1257: 181–192, 2020.
19. Rawat PS, Jaiswal A, Khurana A, Bhatti JS and Navik U: Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 139: 111708, 2021.
20. Weinstein DM, Mihm M, Bauer J: Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2000.
21. Ramos, P. J. (2018). IGF-1 as a Target in Emerging Heart Failure Therapeutics (Master's thesis, The University of Arizona).
22. Higashi Y, Gautam S, Delafontaine P, Sukhanov S: IGF-1 and Cardiovascular Disease.
23. Ma S, Li X, Dong L, Zhu J, Zhang H, Jia Y: Protective effect of Sheng-Mai Yin, a traditional Chinese preparation, against doxorubicin-induced cardiac toxicity in rats. *BMC Complement Altern Med* 16: 1–10, 2016.
24. Hilal MA, Mahmoud SED, Shokry MM, Said AM: Predictive Role of Cardiac Troponin I, Creatine Kinase-Mb and Electrocardiogram in Early Assessment of Acute Cardiotoxicity in Patients Poisoned by Cardiotoxic Drugs and Toxins. *Cardiology and Angiology: An International Journal*: 18–30, 2020.
25. Liao Y, Li H, Pi Y, Li Z, Jin S: Cardioprotective effect of IGF-1 against myocardial ischemia/reperfusion injury through activation of PI3K/Akt pathway in rats in vivo. *J Int Med Res* 47: 3886–3897, 2019.
26. Rose NR: Critical Cytokine Pathways to Cardiac Inflammation. <https://home.liebertpub.com/jir> 31: 705–710, 2011.
27. Durdagi G, Pehlivan DY, Oyar EO, Bahceci SA, Ozbek M: Effects of Melatonin and Adrenomedullin in Reducing the Cardiotoxic Effects of Doxorubicin in Rats. *Cardiovasc Toxicol* 21: 354–364, 2021.
28. Kim YS, Sung SH, Tang Y, et al.: Protective Effect of Taurine on Mice with Doxorubicin-induced Acute Kidney Injury. *Adv Exp Med Biol* 975: 1191–1201, 2017.
29. Renu K, V.G. A, Tirupathi TP, Arunachalam S: Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy – An update. *Eur J Pharmacol* 818: 241–253, 2018.

30. Morón, Ú. M., & Castilla-Cortázar, I. (2012). Protection against oxidative stress and "IGF-I deficiency conditions". *Antioxidant enzyme*, 3, 1135-1140.
31. Sahu BD, Kumar JM, Kuncha M, Borkar RM, Srinivas R and Sistla R: Baicalein alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity via suppression of myocardial oxidative stress and apoptosis in mice. *Life Sci* 144: 8–18, 2016.
32. Wang XL, Liu HR, Tao L, et al.: Role of iNOS-derived reactive nitrogen species and resultant nitrative stress in leukocytes-induced cardiomyocyte apoptosis after myocardial ischemia/reperfusion. *Apoptosis* 12: 1209–1217, 2007.
33. Zepeda AB, Pessoa A, Castillo RL, Figueroa CA, Pulgar VM and Fariás JG: Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: role of HIF-1 and ROS. *Cell Biochem Funct* 31: 451–459, 2013.
34. Bonello S, Zähringer C, BelAïba RS, et al.: Reactive oxygen species activate the HIF-1 $\alpha$  promoter via a functional NF $\kappa$ B site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 755–761, 2007.
35. Jiang B, Zhou X, Yang T, et al.: The role of autophagy in cardiovascular disease: Cross-interference of signaling pathways and underlying therapeutic targets. *Front Cardiovasc Med* 10: 1088575, 2023.
36. Lipskaia L, Chemaly ER, Hadri L, Lompre AM, Hajjar RJ: Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase as a therapeutic target for heart failure. *Expert Opin Biol Ther* 10: 29, 2010.
37. Obradovic M, Zafirovic S, Soskic S, Stanimirovic J, Trpkovic A, Jevremovic D, Isenovic ER: Effects of IGF-1 on the Cardiovascular System. *researchgate.net* 25: 3715–3725, 2019.
38. Cove-Smith L, Woodhouse N, Hargreaves A, et al.: An Integrated Characterization of Serological, Pathological, and Functional Events in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Toxicological Sciences* 140: 3–15, 2014.
39. Aziz MM, Abd El Fattah MA, Ahmed KA, Sayed HM: Protective effects of olmesartan and l-carnitine on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. <https://doi.org/101139/cjpp-2019-0299> 98: 183–193, 2019.
40. Hu, L. F., Lan, H. R., Li, X. M., & Jin, K. T. (2021). A Systematic Review of the Potential Chemoprotective Effects of Resveratrol on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: Focus on the Antioxidant, Antiapoptotic, and Anti-Inflammatory Activities. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021(1), 2951697.

**Etik Bilgiler**

**Etik Kurul Onayı:** Çalışma Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Kara no: 2021/03 Tarih: 28.06.2022

**Telif Hakkı Devir Formu:** Tüm yazarlar tarafından Telif Hakkı Devir Formu imzalanmıştır.

**Yazar katkısı:** Hazırlık aşaması, Veri analizi, Rapor yazımı, Literatür taraması, Veri toplanması;EY, MNZ, ÖÖ, OÇ.

**Çıkar Çatışması Beyanı:**Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

This study is a master's thesis project and was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects (Project number: 2021SABE015).