

Evaluation of the Effects of Chrysin on Diclofenac-Induced Cardiotoxicity in Rats by the Markers of Oxidative Stress, Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis

Cihan GÜR^{1*}, Özge KANDEMİR², Fatih Mehmet KANDEMİR¹

¹Atatürk University, Veterinary Faculty, Biochemistry Department, 25050, Erzurum, Turkey

²Aksaray University, Aksaray Technical Sciences Vocational School, 68000, Aksaray, Turkey

ABSTRACT

Diclofenac (DF) is among non-steroidal anti-inflammatory drugs and in high doses it has toxic effects on various tissues, including the heart. Chrysin (CRS) has many beneficial effects such as antioxidant and anti-apoptotic. In the present study, the effects of CRS on DF-induced cardiotoxicity were investigated. For this purpose, after DF and/or CRS treatments were applied to Sprague Dawley rats, the markers of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and apoptosis in heart tissues and serum CK-MB levels were analyzed. The data obtained displayed that oxidative stress induced by DF was alleviated by triggering the expression of SOD, CAT and GPx enzymes and increasing GSH levels after CRS administration, and a decrease in MDA levels occurred. It was also determined that the expressions of ATF-6, PERK, IRE1 and GRP78, which are ER stress markers and induced by DF, were downregulated after CRS treatment. Additionally, CRS suppressed Bax and Caspase-3 expressions and increased Bcl-2 expression in connection with ER stress. Another finding of this study demonstrated that CK-MB levels, which are an important indicator of heart damage, decreased after CRS administration. As a result, CRS provided a significant protection against cardiotoxicity caused by DF.

Keywords: Cardiotoxicity, chrysin, diclofenac, endoplasmic reticulum stress, oxidative stress.

Ratlarda Diklofenak ile İndüklenen Kardiyotoksisite Üzerine Krisinin Etkilerinin Oksidatif Stres, Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptoz Belirteçleri ile Değerlendirilmesi

ÖZ

Diklofenak (DF), steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlar arasındadır ve yüksek dozlarda kalp dahil çeşitli dokularda toksik etkiler göstermektedir. Krisin (KRS) antioksidan ve anti-apoptotik gibi birçok yararlı etkiye sahiptir. Sunulan çalışmada DF ile indüklenen kardiyotoksisite üzerine KRS'nin etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla Sprague Dawley ratlara DF ve/veya KRS uygulamaları yapıldıktan sonra kalp dokularında oksidatif stres, endoplazmik retikulum stresi ve apoptoz belirteçleri ve serum CK-MB seviyeleri analiz edildi. Elde edilen veriler DF ile indüklenen oksidatif stresin KRS uygulamasından sonra SOD, CAT ve GPx enzimlerinin ekspresyonlarının tetiklenmesi ve GSH seviyelerinin artması ile hafiflediğini ve MDA seviyelerinde azalma meydana geldiğini göstermektedir. Ayrıca ER stres belirteçleri olan ve DF'nin indüklediği ATF-6, PERK, IRE1 ve GRP78 ekspresyonlarının KRS tedavisinden sonra aşağı yönlü düzenlendiği belirlendi. ER stresi ile bağlantılı olarak KRS'nin Bax ve Kaspaz-3 ekspresyonlarını baskıladığı ve Bcl-2 ekspresyonunu arttırdığı da elde edilen veriler arasındadır. Ayrıca kalp hasarının önemli bir göstergesi olan CK-MB seviyelerinin KRS uygulamasından sonra azaldığı görüldü. Sonuç olarak DF'nin neden olduğu kardiyotoksisiteye karşı KRS'nin önemli bir koruma sağladığı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Diklofenak, endoplazmik retikulum stresi, kardiyotoksisite, krisin, oksidatif stres.

To cite this article: Gür C, Kandemir Ö, Kandemir F.M. Evaluation of the Effects of Chrysin on Diclofenac-Induced Cardiotoxicity in Rats by the Markers of Oxidative Stress, Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis. Kocatepe Vet J. (2022):15(2):151-160

Submission: 24.01.2022 Accepted: 29.03.2022 Published Online: 13.04.2022

ORCID ID; CG: 0000-0001-6775-7858, ÖK: 0000-0001-8884-4168, FMK: 0000-0002-8490-2479

*Corresponding author e-mail: cihan.gur@atauni.edu.tr

GİRİŞ

Steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlar (NSAID), ağrı ve inflamasyonun kontrolü için birçok ülkede yaygın olarak kullanılmaktadır (Alabi and Akomolafe, 2020; Prince, 2018). ABD’de her yıl yaklaşık 70 milyon NSAID’nin reçete edildiği bilinmektedir (Prince, 2018). Bunların normal terapötik dozlarının hafif yan etki gösterdiği ancak aşırı dozlarda ciddi toksisite sergilediği bildirilmiştir. NSAID’lerin çoğu COX enzimlerini (COX-1 ve COX-2) inhibe etmektedir. COX-1 ve COX-2, gastrointestinal, renal ve kardiyovasküler homeostazın korunmasında önemli bir rol oynayan araziidonik asidin eikosanoidlere dönüşümünü katalize ederler (Abdulmajeed et al., 2015; Alabi and Akomolafe, 2020). Son yıllarda, klinik uygulamalarda NSAID’lerin kullanımının güvenliği sorgulanır hale gelmiştir. Öte yandan kardiyovasküler sonuçları değerlendirme kapasitesine sahip randomize ve kontrollü çalışmaların eksikliği nedeniyle, NSAID’lerin kullanımı ile kardiyovasküler riskte artışa ilişkin kanıtlar yetersiz kalmaktadır. Bununla birlikte, ileriye dönük klinik çalışmaların ve meta-analizlerin sonuçları, bu ilaçların, artan miyokard enfarktüsü, iskemik kalp hastalıkları, kalp yetmezliği ve arteriyel hipertansiyon riskini içeren önemli olumsuz kardiyovasküler etkilere neden olduğunu göstermektedir (Abdulmajeed et al., 2015). Diklofenak (DF), fenil asetik asitten türetilen ve 4’hidroksidiklofenak şeklinde metabolize edilen seçici olmayan bir NSAID’dir (Prince, 2018). DF, anti-inflamatuar, analjezik, antinosiseptif özelliklerinden dolayı romatoid artrit ve ağrı tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. DF’nin terapötik faydalarına rağmen, kayda değer ciddi yan etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Bunlar arasında gastrointestinal toksisite ve akciğerler, kalp, karaciğer ve böbrek dokularında meydana gelen hasar önemli bir yere sahiptir (Abdulmajeed et al., 2015). DF kalp krizi ve felç riskini yaklaşık %40 oranında arttırmaktadır (Ghosh et al., 2016). Yüksek dozlarda DF’nin mitokondriyal transmembranda hasara neden olan glutatyon konjugasyonunun azalmasına neden olduğu bilinmektedir. Bunlar toksik metabolitleri oluşturur ve hücrel membranlarda peroksidatif hasara neden olan antioksidan aktiviteyi azaltır ve böylece nekroz oluşumuna ve ATP üretiminin azalmasına neden olur (Prince, 2018). Bu nedenle doğal olarak oluşan ve antioksidan özelliklere sahip bileşiklerin kullanımının DF toksisitesine karşı önemli koruma sağlayacağı düşünülmektedir. Çeşitli meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunan flavonoidler, farklı farmakolojik özellikleri nedeniyle birçok sağlık sorununa karşı etkin bir şekilde kullanılmakta ve yeni araştırmalar için umut vermektedir (Ileriturk et al., 2021). Krisin (KRS),

yaygın olarak kullanılan ve birçok bitki özü, bal ve propoliste bulunan flavonoid aile üyelerinden biridir (Kucukler et al., 2021). KRS’nin antioksidan, anti-inflamatuar, antikanser, antidiyabetik, antiarteriyel ve antiapoptotik özellikleri birçok çalışmanın odak noktası olmuş (Aksu et al., 2018; Taslimi et al., 2019; Temel et al., 2020) ancak DF’nin neden olduğu kardiyotoksiste üzerine etkileri araştırılmamıştır. Sunulan çalışmada DF’nin kalp hasarına karşı KRS’nin potansiyel koruyucu etkileri oksidatif stres, endoplazmik retikulum stresi ve apoptozda rol oynayan bazı biyolojik belirteçler üzerinden araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Çalışmada kullanılan hayvanlar ve etik kurul onayı

Çalışmada 35 adet Sprague Dawley erkek rat kullanıldı. Ağırlıkları 250-300 g olan hayvanların yaşları 12-14 hafta arasındaydı. Barındırıldıkları ortam şartları 24 ± 1 °C sıcaklık, 45 ± 5 % nem ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsüne sahipti. Ratlar standart laboratuvar yemi ve musluk suyu ile ad libitum olarak beslendiler. Çalışma için etik kurul onayı Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’ndan alınmıştır (Onay no: 2021-10/248).

Deney tasarımı

DF ve KRS’nin dozları önceki çalışmalar referans alınarak belirlendi (Ileriturk et al., 2021; Prince, 2018). Çalışmaya başlamadan önce hayvanlar her grupta 7 adet olacak şekilde 5 farklı gruba ayrıldı ve 1 hafta boyunca ortama adaptasyonları sağlandı. Gruplar ise şu şekilde tasarlandı;

1. Grup (Kontrol); hayvanlara sadece 5 gün intraperitoneal (i.p.) yoldan 0,5 ml serum fizyolojik verildi.
2. Grup (KRS); hayvanlara 5 gün süre ile oral olarak 50 mg/kg/gün dozunda KRS verildi.
3. Grup (DF); Hayvanlara kalp toksisitesi oluşturmak için 4. ve 5. günlerde 50 mg/kg/vücut ağırlığı i.p. DF uygulandı.
4. Grup (DF + KRS 25 mg/kg); hayvanlara 5 gün ard arda oral olarak 25 mg/kg/gün KRS verildi ayrıca 4. ve 5. günlerde 50 mg/kg/vücut ağırlığı i.p. DF uygulandı.
5. Grup (DF + KRS 50 mg/kg); hayvanlara 5 gün ard arda oral olarak 50 mg/kg/gün KRS verildi ayrıca 4. ve 5. günler 50 mg/kg/vücut ağırlığı i.p. DF uygulandı.

Deney sonunda hayvanlar hafif sevofloran anestezisi altında dekapite edilerek kalp dokuları ve kanları alındı.

Serumda CK-MB seviyelerinin belirlenmesi

Ratlardan alınan kanlar sarı kapaklı serum tüplerine aktarıldı ve 4000 rpm’de +4 °C santrifüj edilerek

serumları ayrıldı. Serumlarda Mindray Perfect Plus 400 cihazı vasıtasıyla CK-MB seviyeleri analiz edildi.

Kalp dokusunda lipid peroksidasyon derecesinin belirlenmesi

Kalp dokusunda lipid peroksidasyon derecesi malondialdehit (MDA) seviyelerinin ölçümü ile belirlendi. Bunun için ratlardan alınan kalp dokuları sıvı azot ile dondurulduktan sonra homojenizatörde toz hale getirildi. Daha sonra dokular %1,15'lik KCl içerisinde homojenize edilerek +4 °C ve 3500 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantta lipit peroksidasyon (LPO) derecesi MDA'nın tiyobarbitürik asit ile reaksiyonu sonucu oluşturduğu rengin 532 nm'deki absorbanasının ölçümüne dayanan metot ile analiz edildi (Placer et al., 1966).

Kalp dokusunda glutatyon seviyelerinin belirlenmesi

Kalp dokusunda glutatyon (GSH) seviyelerinin analizi için homojenatlar 10000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüjlenerek süpernatantlar elde edildi. Daha sonra

Sedlak and Lindsay (1968)'in yöntemi kullanılarak dokuda GSH seviyeleri analiz edildi.

Real-Time PCR analizleri

Toz hale getirilen kalp dokularından 100 mg alınarak steril ependorf tüplere aktarıldı. Daha sonra QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Cat: 79306, Germany) kullanılarak üreticinin verdiği talimatlar ile total RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen total RNA'ların konsantrasyonları NanoDrop cihazında belirlendi ve alınan sonuçlara göre total RNA eşitlemesi yapıldı. Total RNA'lardan cDNA sentezi High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Applied Biosystems™ Cat: 4368814, USA) ile firmanın verdiği talimatlara göre gerçekleştirildi. cDNA'lar dizilimleri Tablo 1'de sunulan genlerin mRNA transkript seviyelerinin belirlenmesinde kullanıldı. RT-PCR aşamasında SOD, KAT, GPx, Bax, Bcl-2, Kaspaz-3, ATF-6, PERK, IRE1 ve GRP78 genlerine ait primerler, SYBR Green PCR Master Mix, RNaz free water ve cDNA'lar ile mix hazırlandı. Sonrasında ROTOR-GENE Q (Qiagen, Germany) ile üç tekrarlı olarak analiz işlemi yapıldı. $\Delta\Delta$ -aktin housekeeping gen olarak kullanıldı ve elde edilen CT değerlerinden Livak and Schmittgen (2001)'in 2-DeltaDeltaCT metodu ile görel mRNA transkript seviyeleri hesaplandı.

Tablo 1. Primer dizilimleri

Table 1. Primer sequences

Gene	Sequences (5'-3')	Length (bp)	Accession No
SOD	F: AATGTGGCTGCTGGAAAGGA	171	NM_017050.1
	R: GCTTCCAGCATTTCCAGTCT		
KAT	F: CTGAGAGAGTGGTACATGCA	130	NM_012520.2
	R: AATCGGACGGCAATAGGAGT		
GPx	F: CAAGGTGCTGCTCATTGAGA	139	NM_030826.4
	R: ATGTCCGAACTGATTGCACG		
Bcl-2	F: GACITTTGCAGAGATGTCCAG	214	NM_016993.2
	R: TCAGGTACTCAGTCATCCAC		
Bax	F: TTTCATCCAGGATCGAGCAG	154	NM_017059.2
	R: AATCATCCCTCTGCAGCTCCA		
Kaspaz-3	F: ACTGGAATGTCAGCTCGCAA	270	NM_012922.2
	R: GCAGTAGTCGCTCTGAAGA		
ATF-6	F: TCAACTCAGCACGTTCTCTGA	130	NM_001107196.1
	R: GACCAGTGACAGGCTTCTCT		
PERK	F: GATGCCGAGAATCATGGGAA	198	NM_031599.2
	R: AGATTGAGAAGGGACTCCA		

IRE1	F: GCAGTTCAGTACATTGCCATTG R: CAGGTCTCTGTGAACAATGTTGA	163	NM_001191926.1
GRP78	F: CATGCAGTTGTGACTGTACCAG R: CTCTTATCCAGGCCATATGCAA	143	NM_013083.2
β-Aktin	F: CAGCCTTCCTTCTTGGGTATG R: AGCTCAGTAACAGTCCGCCT	360	NM_031144.3

SOD: Süperoksit dismutaz, KAT: Katalaz, GPx: Glutasyon peroksidaz, Bcl-2: B hücreli lenfoma 2, Bax: Bcl-2 ile ilişkili X proteini, ATF-6: aktive edilmiş transkripsiyon faktörü 6, PERK: çift sarmallı RNA ile aktive olan kinaz (PKR) benzeri ER kinaz, IRE1: enzim 1 gerektiren inositol, GRP78: glukozla düzenlenen protein 78.

İstatistiksel Analizler

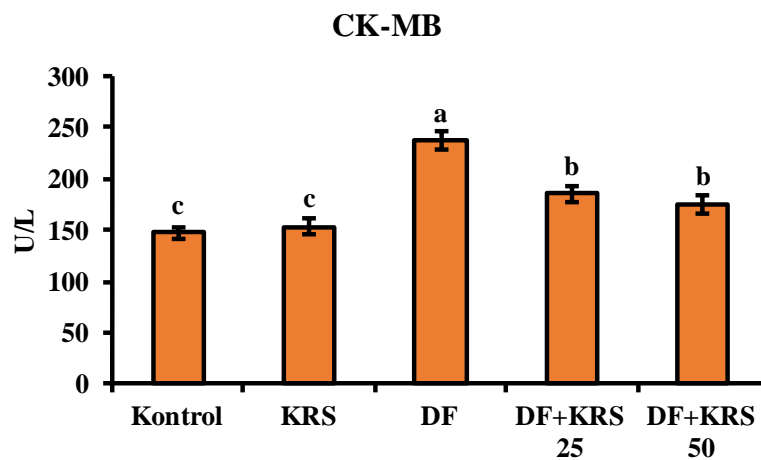
Kalp dokularında gerçekleştirilen analizlerin istatistiksel değerlendirmesi IBM SPSS programında yapıldı. Deney grupları arasında istatistiksel farkın olup olmadığı One-way ANOVA ve Tukey's post hoc tests ile belirlendi. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak sunuldu.

BULGULAR

Diklofenak ve krisin verilen ratların serum CK-MB seviyeleri

Ratlara DF ve KRS verildikten sonra kalp hasarının belirlenmesi için serumda CK-MB seviyeleri belirlendi

ve sonuçlar Şekil 1'de sunuldu. Elde edilen verilere göre DF verilen hayvanların serum CK-MB seviyelerinde kontrol grubuna göre artış meydana geldiği görüldü ($p<0.05$). Bununla birlikte KRS tedavisinin kalp hasarına karşı koruma sağlayarak CK-MB seviyelerini DF grubuna göre önemli derecede azalttığı belirlendi ($p<0.05$). Öte yandan KRS tedavisinin dozları arasında anlamlı bir farkın olmadığı tespit edildi.



Şekil 1: Diklofenak ve krisin uygulamaları sonrasında ratların serum CK-MB seviyeleri. Tüm veriler ortalama±SD olarak ifade edildi (n=7). Sütunlardaki farklı harfler (a–c) gruplar arası istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0.05$). (CK-MB: Kreatin kinaz-MB, DF: Diklofenak, KRS: Krisin)

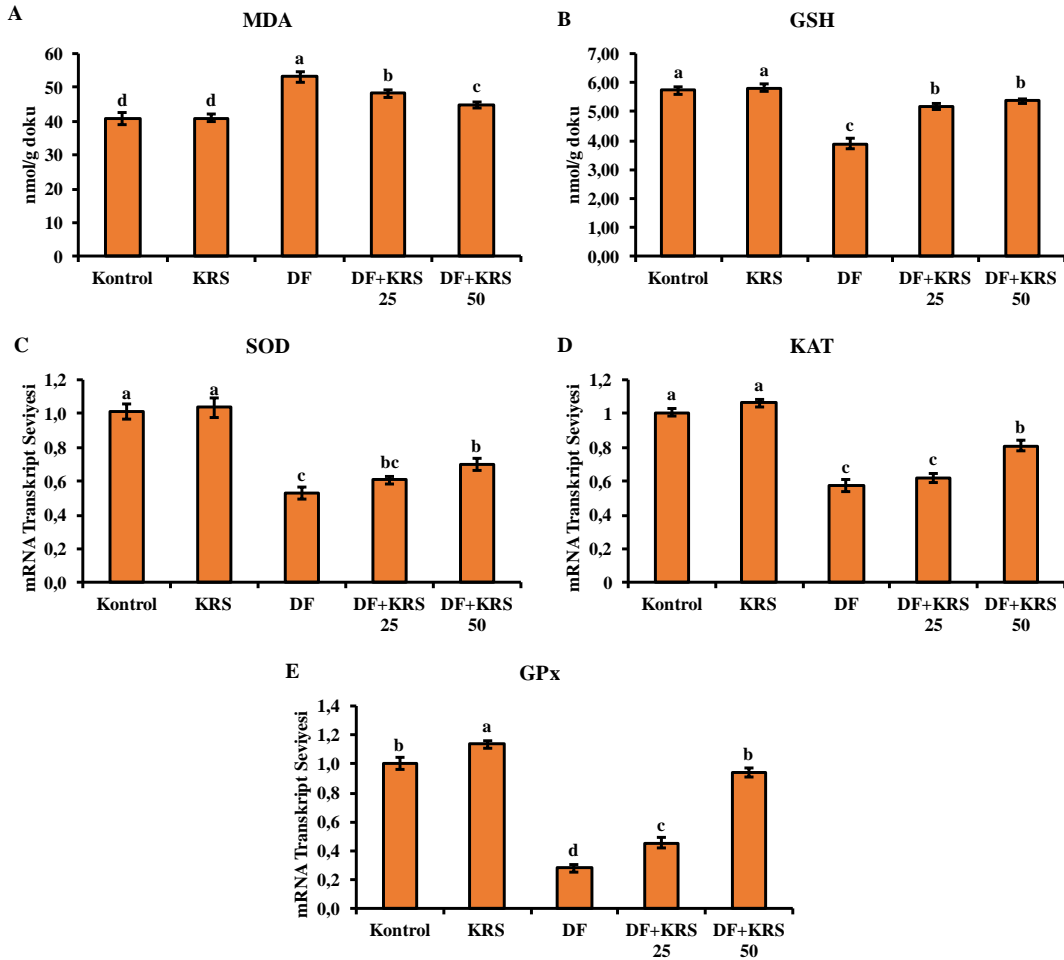
Figure 1: Serum CK-MB levels of rats after diclofenac and chrysin administration. All data were expressed as mean±SD (n=7). Different letters (a–c) on the columns show a statistical difference ($p<0.05$).

Diklofenak ve krisin verilen ratların kalp dokularında oksidatif stres durumu

DF ve KRS uygulamalarından sonra kalp dokusunda oksidatif stres durumunu belirlemek için doku MDA ve GSH seviyeleri ile SOD, KAT ve GPx enzimlerinin mRNA transkript seviyeleri analiz edildi. Sonuçlar Şekil 2'de özetlenmiştir. DF uygulamasının kalp dokusunda GSH seviyeleri ile SOD, KAT ve

GPx enzimlerinin mRNA transkript seviyelerini önemli derecede azalttığı belirlendi ($p<0.05$). Ayrıca MDA seviyelerinin DF grubunda kontrol grubuna göre artış gösterdiği ve oksidatif strese neden olduğu görüldü ($p<0.05$). KRS tedavisinden sonra GSH seviyelerinde artış olduğu ($p<0.05$) ancak dozlar arasında anlamlı bir fark oluşmadığı tespit edildi. KAT ve GPx enzimlerinin mRNA transkript seviyelerinin

özellikle 50 mg/kg verilen grupta DF grubuna göre arttığı belirlendi ($p<0.05$). DF ve DF+KRS 25 grupları arasında SOD enziminin ekspresyon seviyeleri anlamlı bir fark oluşturmazken, KRS'nin 50 mg/kg uygulamasının SOD ekspresyonunu yukarı yönlü düzenlediği görüldü ($p<0.05$). Ayrıca MDA seviyelerinin KRS tedavisi ile doz bağımlı olarak azaldığı ($p<0.05$) ve böylece DF ile tetiklenen oksidatif stresin hafiflediği belirlendi.



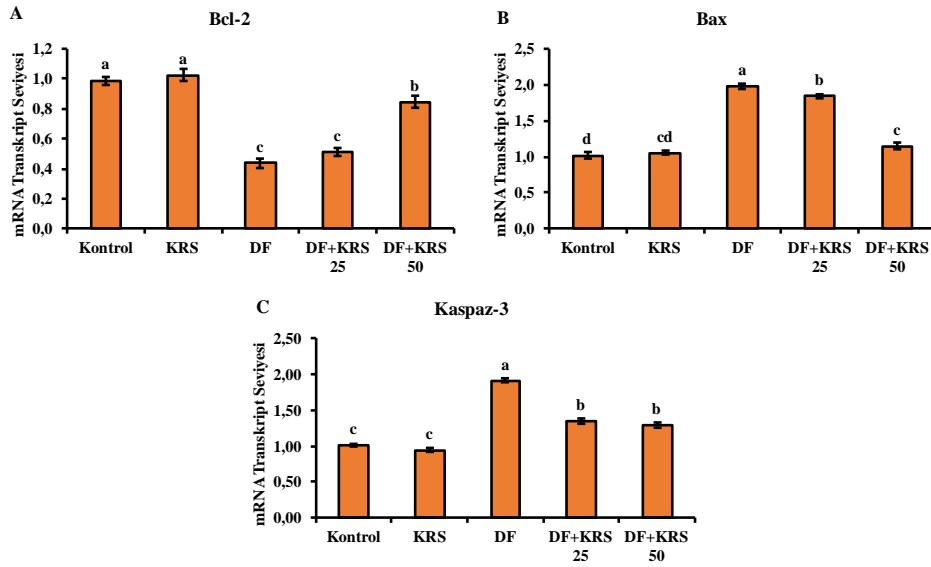
Şekil 2: Diklofenak ve krisin uygulamaları sonrasında ratların kalp dokularında oksidatif stres durumu. Tüm veriler ortalama±SD olarak ifade edildi (n=7). Sütunlardaki farklı harfler (a–d) gruplar arası istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0.05$). (DF: Diklofenak, GSH: Glutasyon, GPx: Glutasyon peroksidaz, KAT: Katalaz, KRS: Krisin, MDA: Malondialdehit, SOD: Süperoksit dismutaz)

Figure 2: Oxidative stress status in heart tissues of rats after diclofenac and chrysin administration. All data were expressed as mean±SD (n=7). Different letters (a–d) on the columns show a statistical difference ($p<0.05$).

Diklofenak ve krisin verilen ratların kalp dokularında apoptoz durumu

Şekil 3'te verilen sonuçlara göre DF verilen ratların kalp dokularında anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ekspresyon seviyelerinin azaldığı, apoptotik belirteçler olan Bax ve Kaspaz-3 ekspresyonlarının ise yukarı yönlü düzenlendiği belirlendi ($p<0.05$). Öte yandan 50 mg/kg KRS tedavisinin Bcl-2 mRNA transkript seviyelerini DF grubuna göre arttırdığı görüldü

($p<0.05$). 25 mg/kg KRS tedavisinin ise Bcl-2 ekspresyonunu etkilemediği belirlendi. Ayrıca Bax ve Kaspaz-3 mRNA transkript seviyelerinin her iki dozda da azaldığı tespit edildi ($p<0.05$). Kaspaz-3 ekspresyonu üzerinde dozlar arasında anlamlı bir farkın oluşmadığı da elde edilen veriler arasındadır.

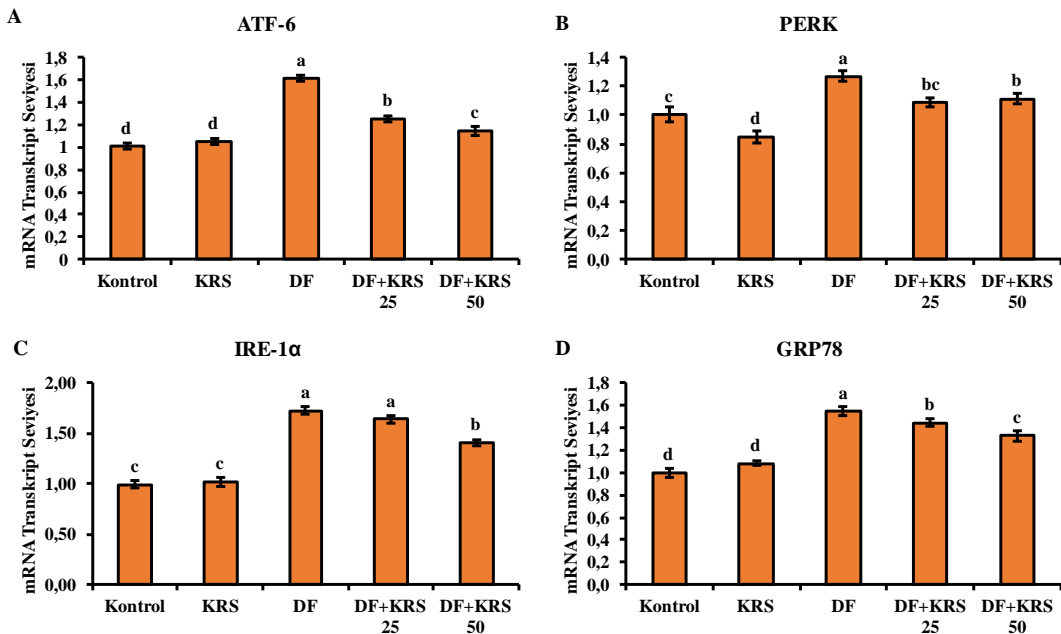


Şekil 3: Diklofenak ve krisin uygulamaları sonrasında ratların kalp dokularında apoptoz durumu. Tüm veriler ortalama±SD olarak ifade edildi (n=7). Sütunlardaki farklı harfler (a–d) gruplar arası istatistiksel farklılığı göstermektedir (p<0.05). (Bax: Bcl-2 ile ilişkili X proteini, Bcl-2: B hücreli lenfoma 2, DF: Diklofenak, KRS: Krisin)
Figure 3: Apoptosis status in heart tissues of rats after diclofenac and chrysin administration. All data were expressed as mean±SD (n=7). Different letters (a–d) on the columns show a statistical difference (p<0.05).

Diklofenak ve krisin verilen ratların kalp dokularında endoplazmik retikulum stres durumu

Kalp dokusunda ER stresinin belirlenmesi için ATF-6, PERK, IRE-1 ve GRP78 genlerinin ekspresyon seviyeleri RT-PCR analizi ile belirlendi. DF verilen ratların kalp dokularında ATF-6, PERK, IRE1 ve GRP78 mRNA transkript seviyelerinin artış göstererek ER stresine neden olduğu belirlendi (p<0.05). ATF-6 ve GRP78 ekspresyonlarının KRS

tedavisinden sonra doz bağımlı olarak azaldığı görüldü (p<0.05). IRE-1 ekspresyonunun düşük doz verilen KRS tedavisinde DF grubu ile fark oluşturmadığı ancak yüksek doz verilen grupta önemli derece azaldığı tespit edildi (p<0.05). PERK ekspresyonunun ise DF grubuna göre hem düşük dozda hem de yüksek dozda azaldığı (p<0.05) ancak dozların kendi aralarında anlamlı bir fark oluşturmadığı görüldü.



Şekil 4: Diklofenak ve krisin uygulamaları sonrasında ratların kalp dokularında endoplazmik retikulum stres durumu. Tüm veriler ortalama±SD olarak ifade edildi (n=7). Sütunlardaki farklı harfler (a–d) gruplar arası istatistiksel farklılığı göstermektedir (p<0.05). (ATF-6: aktive edilmiş transkripsiyon faktörü 6, DF: Diklofenak, GRP78: glukozla düzenlenen protein 78, IRE1: enzim 1 gerektiren inositol, KRS: Krisin, PERK: çift sarmallı RNA ile aktive olan kinaz (PKR) benzeri ER kinaz)

Figure 4: Endoplasmic reticulum stress status in heart tissues of rats after diclofenac and chrysin administrations. All data were expressed as mean±SD (n=7). Different letters (a–d) on the columns show a statistical difference (p<0.05).

TARTIŞMA

Bazı çalışmalar, kardiyomiyositlerde COX-2'nin inhibisyonunun, NSAID alan hastalarda kalp yetmezliğine katkıda bulunabileceğini öne sürmektedir. Bunun nedeni kardiyomiyositlerde COX-2'nin seçici olarak silinmesinin kalp debisini baskılaması ve indüklenmiş aritmogeneze duyarlılığı arttırmasıdır (Ghosh et al., 2016). Bir NSAID olan DF'nin de yaygın kullanımı göz önüne alındığında DF kaynaklı kardiyotoksikite acil olarak çözülmesi gereken sağlık sorunlarından biridir. Bu nedenle sunulan çalışmada DF'nin kardiyotoksik etkisi üzerine KRS'nin potansiyel etkileri araştırılmıştır.

Diklofenak kaynaklı toksisite mekanizmasının mitokondriyal disfonksiyon ve artan oksidatif stresi içerdiği bilinmektedir (Aycan et al., 2018). Oksidatif stres hücrelerde aşırı miktarda reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretildiği durumlarda meydana gelmektedir (Semis et al., 2021b) ve DF'nin in vivo metabolizması, ROT'ların aşırı üretimi ile ilişkilendirilmiştir. Bu da sonuç olarak oksidatif stres, genomik hasar ve hücrel apoptoz ile ölüme neden olur (Owumi et al., 2020). MDA, çoklu doymamış yağ asidi oksidasyonunun bir yan ürünüdür ve lipid oksidasyonunun ve oksidatif stresin bir göstergesidir (Küçükler et al., 2022). Sunulan çalışmada DF'nin kalp dokusunda oksidatif strese neden olarak MDA seviyelerini arttırdığı düşünülmektedir. Öte yandan antioksidan özelliği ile bilinen KRS'nin DF kaynaklı ROT'ların süpürülmesini sağlayarak oksidatif stresi hafiflettiği ve MDA seviyelerini azalttığı görüldü.

SOD, KAT ve GPx gibi enzimatik ve GSH gibi enzimatik olmayan antioksidanlar, oksidatif hasara maruz kalan hücrelerin korunmasında önemli bir rol oynar (Eldutar et al., 2017). SOD süperoksit radikalinin hidrojen peroksite dönüştürülmesinden sorumluyken, hücreler için oldukça toksik bir bileşik olan hidrojen peroksit KAT ve GPx tarafından su ve moleküler oksijene parçalanmaktadır. GSH ise oksidatif metabolizma sonucu meydana gelen serbest radikalleri bağlayarak okside forma (GSSG) dönüşmekte ve vücudu oksidatif hasardan korumaktadır (Gur et al., 2021b). Öte yandan çeşitli toksik ajanlar antioksidan enzimlerin aktivitesinde azalmaya neden olmaktadır (Adeyemi and Olayaki,

2018; Gür et al.; Gur et al., 2021a; Kandemir et al., 2017). Ayrıca artan ROT'lar GSH'ı GSSG formuna dönüştürerek GSH depolarının tükenmesine sebep olmaktadır (Aja et al., 2020; Radwan et al., 2018). Tüm bunlar bir araya gelerek oksidatif strese neden olmakta ve canlı organizmalarda hayati rolleri bulunan makromoleküllere hasar vererek dokuların işlevlerinin yitirilmesine yol açmaktadır (İleritürk et al., 2021; Kuzu et al., 2021; Yardım et al., 2021). Sunulan çalışmada da DF'nin SOD, KAT ve GPx ekspresyonlarını baskıladığı ve muhtemel artan ROT seviyelerine bağlı olarak GSH depolarının azaldığı ve oksidatif stres meydana geldiği belirlendi. Öte yandan KRS'nin SOD, CAT ve GPx enzimlerinin gen ekspresyonlarını tetiklediği ve ROT'ların temizlenmesiyle GSH depolarının yenilediği görüldü. Endoplazmik retikulum (ER) ökaryotik hücrelerde hayati bir role sahiptir. ER'nin görevleri arasında transmembran proteinlerin biyosentezi, proteinlerin üç boyutlu yapılarının oluşumu ve translayon sonrası modifikasyonlarının yanı sıra kalsiyum homeostazi, lipid ve steroid biyosentezi yer almaktadır (AL-Megrin et al., 2020; Liu et al., 2015). Çeşitli faktörler, ER'de katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olan endoplazmik retikulum stresi adı verilen hücrel bir süreci indükler (Semis et al., 2021c). ROT'ların da bu süreçte önemli bir rol üstlendiği bilinmektedir (Yardım et al., 2020). ER, stres durumu meydana geldiğinde, katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak bilinen bir dizi sinyal yolunun aktivasyonu ile bu sürece yanıt vermektedir (Jiang et al., 2009). İlk etapta UPR'nin meydana gelmesi ile hücrelerde normal fonksiyonlar geri getirilmeye çalışılır. Ancak UPR sürecindeki uzama hücrelerde işlev bozukluğu ile birlikte apoptoza neden olabilmektedir (Yardım et al., 2020). Memelilerde ER transmembran protein sensörleri olan enzim 1 gerektiren inositol (IRE1), çift sarmallı RNA ile aktive olan kinaz (PKR) benzeri ER kinaz (PERK) ve aktive edilmiş transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) UPR'ye eşlik etmekte ve ER stresinin önemli göstergeleri olarak kabul edilmektedir (Deng et al., 2016). GRP78 ise ER tabanlı bir şaperon ve ER homeostazının merkezi düzenleyicisidir (Celik et al., 2020). DF'nin de ER stresini tetiklediğine dair kanıtlar bulunmaktadır (Foufelle and Fromenty, 2016). Sunulan çalışmada

DF'nin kalp dokusunda muhtemelen ROT'ların artışına bağlı olarak ER homeostazını bozduğu ve ATF-6, PERK, IRE1 ve GRP78 ekspresyonlarını tetikleyerek UPR yanıtını aktive ettiği belirlendi. Apoptotik belirteçler de göz önüne alındığında kalp dokusunda UPR yanıtının uzayarak apoptoza neden olduğu da söylenebilir. Öte yandan KRS tedavisinin kalp dokusunda ATF-6, PERK, IRE1 ve GRP78 ekspresyonlarını baskıladığı ve böylece ER stresini hafiflettiği görüldü. KRS'nin bu etkisi apoptozun baskılanması ile birlikte kalp dokusunu DF'nin hasar verici etkisinden koruduğunu düşündürmektedir.

Apoptoz, doku homeostazını sağlayan oksidatif hasar dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik uyaranların yönlendirdiği normal bir hücre ölüm sürecidir (Kandemir et al., 2018). Yüksek derecelerde meydana gelen apoptoz, çeşitli patolojik durumların temel nedenlerinden biri olarak değerlendirilmektedir (Semis et al., 2021a). Ayrıca biriken kanıtlar oksidatif stres ve apoptoz arasında yakın bir ilişkinin olduğunu göstermektedir (Aja et al., 2020; Yesildag et al., 2021). Aktif merkezlerinde sistein kalıntıları bulunan ve aspartata özgü olan kaspazlar apoptotik sürecin merkezinde yer alan proteolitik enzimlerdir. Mitokondri tarafından üretilen ROT'lar sitokrom c salınımına ve bu da kaspaz-9 aktivasyonuna neden olur. Kaspaz-9 aktivasyonu ile apoptozun en önemli göstergelerinden biri olan kaspaz-3 etkin hale gelmektedir (Semis et al., 2021c; Yardım et al., 2020). Bcl-2 mitokondriyal dış membrana bağlanarak sitokrom c salınımını engellemekte ve böylece anti-apoptotik işlev göstermektedir (Ansari et al., 2017). Bax proteini ise büyüme faktörlerini tüketerek apoptozu desteklemektedir (Geng et al., 2015). Yakın tarihli bir çalışmada DF'nin kalp dokularında kaspaz-3 protein ekspresyonunun alan %'sinde önemli bir artışa ve bcl-2 protein ekspresyonunun alan %'sinde önemli bir düşüşe neden olduğu bildirilmiştir (Oda and Derbalah, 2018). Sunulan çalışmada RT-PCR ile analiz edilen Bax ve kaspaz-3 mRNA transkript seviyelerinin DF verilen grupta önemli derecede artış sergilediği belirlendi. Ayrıca DF'nin Bcl-2 ekspresyonunu baskılayarak muhtemelen olarak mitokondriden sitokrom c ve kaspaz-3 gibi apoptotik faktörlerin serbest bırakılmasına ve böylece içsel bir apoptoza sebep olduğu düşünülmektedir. Öte yandan KRS tedavisinin Bax ve kaspaz-3 ekspresyonlarını baskıladığı Bcl-2 ekspresyonunu ise aktive ettiği görüldü. Böylece KRS'nin apoptozun baskılanması yoluyla DF kaynaklı kardiyotoksisteyi hafifletebileceği belirlendi. Çeşitli toksik ajanlar tarafından farklı dokularda meydana getirilen toksisitelerde de KRS'nin anti-apoptotik etki göstererek dokuları koruduğu bildirilmiştir (Aksu et al., 2018; Çelik et al., 2020; Hanedan et al., 2018; Kandemir et al., 2020).

CK-MB, hücre enerji metabolizmasında hayati bir role sahip olan ve akut kardiyak hasar için kesin bir belirteç olarak kabul edilen kreatin kinazın alt tipidir.

Bu biyobelirtecin serum düzeylerinin yükselmesi, dejeneratif veya nekrotizan kardiyak miyositlerin bozulmuş hücre membranından sızmasına bağlanabilir (Oda and Derbalah, 2018). Önceki bir çalışmada DF uygulamasının CK-MB seviyelerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Arafa et al., 2020). Sunulan çalışmada da DF uygulaması ile kardiyak hasar meydana geldiği ve böylece serum CK-MB seviyelerinde artış olduğu düşünülmektedir. Öte yandan KRS'nin kalp dokusunu DF'nin yıkıcı etkisinden koruduğu CK-MB'nin seruma salınımının azalmasından anlaşılmaktadır.

SONUÇ

Çalışmadan elde edilen tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde DF'nin oksidatif strese neden olarak zincirleme reaksiyonlarla ER stresine ve akabinde apoptoza neden olduğu ve buna bağlı olarak ratların kalp dokularında hasar meydana getirebileceği görüldü. Bununla birlikte KRS tedavisinin DF kaynaklı oksidatif stresi hafifleterek ER stresine ve apoptoza karşı koruma sağlayabileceği ve böylece kalp dokusunu DF'nin toksik etkilerine karşı koruyabileceği belirlendi.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Yazarların Katkı Oranı: ¹CG: %60, ²ÖK: %20, FMK: %20

Etik İzin: ¹Bu çalışma ATAUNİ HADYEK 10/248 numara ve 25.11.2021 tarih ile izin almıştır.

² Bu yazıda sunulan veri, bilgi ve belgeler akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde edilmiştir.

Finansal Destek: Bu çalışmada herhangi bir finansal destek alınmamıştır.

KAYNAKLAR

- Abdulmajeed N, Alnahdi H, Ayas N, Mohamed A.** Amelioration of cardiotoxic impacts of diclofenac sodium by vitamin B complex. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015; 19(4): 671-681.
- Adeyemi WJ, Olayaki LA.** Diclofenac-induced hepatotoxicity: Low dose of omega-3 fatty acids have more protective effects. *Toxicol Rep.* 2018; 5: 90-95.
- Aja PM, Izekwe FI, Famurewa AC, Ekpono EU, Nwite FE, Igwenyi IO, Awoke JN, Ani OG, Aloke C, Obasi NA.** Hesperidin protects against cadmium-induced pancreatitis by modulating insulin secretion, redox imbalance and iNOS/NF-κB signaling in rats. *Life Sci.* 2020; 259: 118268.
- Aksu EH, Kandemir FM, Küçükler S, Mahamadu A.** Improvement in colistin-induced reproductive damage, apoptosis, and autophagy in testes via reducing oxidative

- stress by chrysin. *J Biochem Mol Toxicol*. 2018; 32(11): e22201.
- AL-Megrin WA, Alomar S, Alkhuriji AF, Metwally DM, Mohamed SK, Kassab RB, Abdel Moneim AE, El-Khadragy MF.** Luteolin protects against testicular injury induced by lead acetate by activating the Nrf2/HO-1 pathway. *IUBMB life*. 2020; 72(8): 1787-1798.
- Alabi QK, Akomolafe RO.** Kolaviron diminishes diclofenac-induced liver and kidney toxicity in wistar rats via suppressing inflammatory events, upregulating antioxidant defenses, and improving hematological indices. *Dose-Response*. 2020; 18(1): 1559325819899256.
- Ansari MA, Raish M, Ahmad A, Alkharfy KM, Ahmad SF, Attia SM, Alsaad AM, Bakheet SA.** Sinapic acid ameliorate cadmium-induced nephrotoxicity: In vivo possible involvement of oxidative stress, apoptosis, and inflammation via NF- κ B downregulation. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017; 51: 100-107.
- Arafa MH, Mohammad NS, Atteia HH.** Rho-Kinase inhibitors ameliorate diclofenac-induced cardiotoxicity in chloroquine-treated adjuvant arthritic rats. *Life sci*. 2020; 254: 117605.
- Aycan İÖ, Elpek Ö, Akkaya B, Kıraç E, Tuzcu H, Kaya S, Coşkunfirat N, Aslan M.** Diclofenac induced gastrointestinal and renal toxicity is alleviated by thymoquinone treatment. *Food Chem Toxicol*. 2018; 118: 795-804.
- Celik H, Kucukler S, Ozdemir S, Comakli S, Gur C, Kandemir FM, Yardim A.** Lycopene protects against central and peripheral neuropathy by inhibiting oxaliplatin-induced ATF-6 pathway, apoptosis, inflammation and oxidative stress in brains and sciatic tissues of rats. *Neurotoxicology*. 2020; 80: 29-40.
- Çelik H, Kucukler S, Çomaklı S, Caglayan C, Özdemir S, Yardim A, Karaman M, Kandemir FM.** Neuroprotective effect of chrysin on isoniazid-induced neurotoxicity via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats. *Neurotoxicology*. 2020; 81: 197-208.
- Deng H, Kuang P, Cui H, Chen L, Luo Q, Fang J, Zuo Z, Deng J, Wang X, Zhao L.** Sodium fluoride (NaF) induces the splenic apoptosis via endoplasmic reticulum (ER) stress pathway in vivo and in vitro. *Aging (Albany NY)*. 2016; 8(12): 3552.
- Eldutar E, Kandemir FM, Kucukler S, Caglayan C.** Restorative effects of Chrysin pretreatment on oxidant-antioxidant status, inflammatory cytokine production, and apoptotic and autophagic markers in acute paracetamol-induced hepatotoxicity in rats: an experimental and biochemical study. *J Biochem Mol Toxicol*. 2017; 31(11): e21960.
- Foufelle F, Fromenty B.** Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharmacol res perspect*. 2016; 4(1): e00211.
- Geng X, Shao H, Zhang Z, Ng JC, Peng C.** Malathion-induced testicular toxicity is associated with spermatogenic apoptosis and alterations in testicular enzymes and hormone levels in male Wistar rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015; 39(2): 659-667.
- Ghosh R, Goswami SK, Feitoza LFB, Hammock B, Gomes AV.** Diclofenac induces proteasome and mitochondrial dysfunction in murine cardiomyocytes and hearts. *Int J Cardiol*. 2016; 223: 923-935.
- Gur C, Kandemir FM, Darendelioglu E, Caglayan C, Kucukler S, Kandemir O, Ileriturk M.** Morin protects against acrylamide-induced neurotoxicity in rats: an investigation into different signal pathways. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2021a; 49808-49819.
- Gur C, Kandemir O, Kandemir FM.** Investigation of the effects of hesperidin administration on abamectin-induced testicular toxicity in rats through oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, inflammation, apoptosis, autophagy, and JAK2/STAT3 pathways. *Environ Toxicol*. 2021b.
- Gür C, Kandemir F, Genç A.** Bortezomib ile Kalp Hasarı Oluşturulan Ratlarda Berberinin Oksidatif ve Nitrozatif Stres Üzerine Etkisi. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*. 2020; 9(2): 118-126.
- Hanedan B, Ozkaraca M, Kirbas A, Kandemir FM, Aktas MS, Kilic K, Comakli S, Kucukler S, Bilgili A.** Investigation of the effects of hesperidin and chrysin on renal injury induced by colistin in rats. *Biomed Pharmacother*. 2018; 108: 1607-1616.
- İleriturk M, Benzer F, Aksu EH, Yildirim S, Kandemir FM, Dogan T, Dortbudak MB, Genc A.** Chrysin protects against testicular toxicity caused by lead acetate in rats with its antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic properties. *J Food Biochem*. 2021; 45(2): e13593.
- İleritürk M, Doğan T, Kandemir O.** Investigation of the effect of berberine with arginase activity and oxidantantioxidant parameters on bortezomib-induced spleen injury in rats. *Kocatepe Vet J*. 2021; 14(1): 6-15.
- Jiang CC, Yang F, Thorne RF, Zhu BK, Hersey P, Zhang XD.** Human melanoma cells under endoplasmic reticulum stress acquire resistance to microtubule-targeting drugs through XBP-1-mediated activation of Akt. *Neoplasia*. 2009 (5); 11: 436-447.
- Kandemir FM, Kucukler S, Caglayan C, Gur C, Batil AA, Gülçin İ.** Therapeutic effects of silymarin and naringin on methotrexate-induced nephrotoxicity in rats: Biochemical evaluation of anti-inflammatory, antiapoptotic, and antiautophagic properties. *J Food Biochem*. 2017; 41(5): e12398.
- Kandemir FM, Yıldırım S, Kucukler S, Caglayan C, Darendelioglu E, Dortbudak MB.** Protective effects of morin against acrylamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity: A multi-biomarker approach. *Food Chem Toxicol*. 2020; 138: 111190.
- Kandemir FM, Yildirim S, Kucukler S, Caglayan C, Mahamadu A, Dortbudak MB.** Therapeutic efficacy of zingerone against vancomycin-induced oxidative stress, inflammation, apoptosis and aquaporin 1 permeability in rat kidney. *Biomed Pharmacother*. 2018; 105: 981-991.
- Kucukler S, Benzer F, Yildirim S, Gur C, Kandemir FM, Bengu AS, Ayna A, Caglayan C, Dortbudak MB.** Protective effects of chrysin against oxidative stress and inflammation induced by lead acetate in rat kidneys: a biochemical and histopathological approach. *Biol Trace Elem Res*. 2021; 199(4): 1501-1514.
- Kuzu M, Kandemir FM, Yildirim S, Çağlayan C, Küçükler S.** Attenuation of sodium arsenite-induced cardiotoxicity and neurotoxicity with the antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic effects of hesperidin. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2021; 28(9): 10818-10831.
- Küçükler S, Kandemir FM, Yildirim S.** Protective effect of chrysin on indomethacin induced gastric ulcer in rats: role of multi-pathway regulation. *Biotech Histochem*. 2022; 1-14.
- Liu W, Yang B, Wu L, Zou W, Pan X, Zou T, Liu F, Xia L, Wang X, Zhang D.** Involvement of NRF2 in perfluorooctanoic acid-induced testicular damage in male mice. *Biol Reprod*. 2015; 93(2): 41, 41-47.

- Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*. 2001; 25(4): 402-408.
- Oda SS, Derbalah AE.** Impact of diclofenac sodium on tilmicosin-induced acute cardiotoxicity in rats (tilmicosin and diclofenac cardiotoxicity). *Cardiovasc Toxicol*. 2018; 18(1): 63-75.
- Owumi SE, Aliyu-Banjo NO, Odunola OA.** Selenium attenuates diclofenac-induced testicular and epididymal toxicity in rats. *Andrologia*. 2020; 52(9): e13669.
- Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC.** Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem*. 1966; 16(2): 359-364.
- Prince SE.** Diclofenac-induced renal toxicity in female Wistar albino rats is protected by the pre-treatment of aqueous leaves extract of *Madhuca longifolia* through suppression of inflammation, oxidative stress and cytokine formation. *Biomed Pharmacother*. 2018; 98: 45-51.
- Radwan OK, Alzahrani YA, Kassab RB.** Neuroprotective efficiency of *Mangifera indica* leaves extract on cadmium-induced cortical damage in rats. *Metab Brain Dis*. 2018; 33(4): 1121-1130.
- Sedlak J, Lindsay RH.** Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*. 1968; 25: 192-205.
- Semis HS, Gur C, Ileriturk M, Kandemir FM, Kaynar O.** Evaluation of Therapeutic Effects of Quercetin Against Achilles Tendinopathy in Rats via Oxidative Stress, Inflammation, Apoptosis, Autophagy, and Metalloproteinases. *Am J Sports Med*. 2021a; 03635465211059821.
- Semis HS, Gur C, Ileriturk M, Kaynar O, Kandemir FM.** Investigation of the anti-inflammatory effects of caffeic acid phenethyl ester in a model of λ -Carrageenan-induced paw edema in rats. *Hum Exp Toxicol*. 2021b; 40(12-suppl): S721-S738.
- Semis HS, Kandemir FM, Kaynar O, Dogan T, Arikan SM.** The protective effects of hesperidin against paclitaxel-induced peripheral neuropathy in rats. *Life Sci*. 2021c; 287: 120104.
- Taslimi P, Kandemir FM, Demir Y, İleritürk M, Temel Y, Caglayan C, Gulçin İ.** The antidiabetic and anticholinergic effects of chrysin on cyclophosphamide-induced multiple organ toxicity in rats: Pharmacological evaluation of some metabolic enzyme activities. *J Biochem Mol Toxicol*. 2019; 33(6): e22313.
- Temel Y, Kucukler S, Yıldırım S, Caglayan C, Kandemir FM.** Protective effect of chrysin on cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via the inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2020; 393(3): 325-337.
- Yardim A, Kandemir FM, Ozdemir S, Kucukler S, Comakli S, Gur C, Celik H.** Quercetin provides protection against the peripheral nerve damage caused by vincristine in rats by suppressing caspase 3, NF- κ B, ATF-6 pathways and activating Nrf2, Akt pathways. *Neurotoxicology*. 2020; 81: 137-146.
- Yardim A, Kucukler S, Özdemir S, Çomaklı S, Caglayan C, Kandemir FM, Çelik H.** Silymarin alleviates docetaxel-induced central and peripheral neurotoxicity by reducing oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats. *Gene*. 2021; 769: 145239.
- Yesildag K, Gur C, Ileriturk M, Kandemir FM.** Evaluation of oxidative stress, inflammation, apoptosis, oxidative DNA damage and metalloproteinases in the lungs of rats treated with cadmium and carvacrol. *Mol Biol Rep*. 2021; 1-11.