

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĐI
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI
TIBBİ ONKOLOJİ BİLİM DALI BAŞKANLIĞI

DOKSORUBİSİN VE TRASTUZUMAB'A BAĞLI DENEYSEL
KARDİYOTOKSİSİTENİN ÖNLENMESİNDE MELATONİN,
1400W VE MERKAPTOETİLGUANİDİN'İN YERİ

Mustafa ÖZTÜRK
Uzman Hv. Tbp. Kd. Bnb.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı
Yandal Uzmanlık Tezi olarak hazırlanmıştır.

Ankara
2007

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĐI
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI
TIBBİ ONKOLOJİ BİLİM DALI BAŞKANLIĞI

DOKSORUBİSİN VE TRASTUZUMAB'A BAĞLI DENEYSEL
KARDİYOTOKSİSİTENİN ÖNLENMESİNDE MELATONİN,
1400W VE MERKAPTOETİLGUANİDİN'İN YERİ

Mustafa ÖZTÜRK

Uzman Hv. Tbp. Kd. Bnb.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı
yandal uzmanlık tezi olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI

Fikret ARPACI

Prof. Tbp. Kd. Alb.

Ankara

2007

GATA Askeri Tıp Fakóltesi Dekanlığına:

‘Doksorubisin ve Trastuzumab’a Bağlı Deneysel Kardiyotoksisitenin Önlenmesinde Melatonin, 1400w ve Merkaptotetilguanidin’in Yeri’ konulu çalışma jürimiz GATA Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı’nda yan dal uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı: Fikret ARPACI İmza
Prof. Tbp. Kd. Alb.

Üye : Ahmet ÖZET İmza
Prof. Tbp. Kd. Alb.

Üye : Vedat KÖSEOĞLU İmza
Prof. Tbp. Kd. Alb.

Üye : Gökhan KANDEMİR İmza
Prof. Tbp. Kd. Alb.

Üye : Şeref KÖMÜRCÜ İmza
Doç. Tbp. Kd. Alb.

ONAY :

Mustafa ÖZTÜRK’ün 03.12.2007 tarihinde savunduğı bu tez Akademi Kurulu’nca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görölmüş ve kabul edilmiştir.

M. Zeki BAYRAKTAR
Prof. Tbp. Tümg.
GATA As. Tıp Fak. Dekanı

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince bilimsel gelişmemde ve çalışmalarımda beni sürekli destekleyen başta Türkiye’de Tıbbi onkolojinin önde gelen isimlerinden Tıbbi Onkoloji BD. başkanı Prof. Dr. Ahmet ÖZET’e, değerli bilim adamı ve tez danışmanım Prof. Dr. Fikret ARPACI’ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tıbbi Onkoloji kliniğinin diğer değerli öğretim üyeleri olan Doç. Dr. Şeref KÖMÜRCÜ, Doç. Dr. Bekir ÖZTÜRK, Yrd. Doç. Dr. Selmin ATAERGİN ve Yrd. Doç. Dr. Okan KUZHAN’ a yardımları için teşekkür ederim. Ayrıca kliniğimizde beni destekleyen bütün personelimize teşekkürü bir borç biliyorum. Fizyoloji ABD. öğretim üyesi Doç. Dr. Ahmet KORKMAZ’a ve arkadaşlarına çalışmamla ilgili desteklerinden dolayı minnettarım. GATA Patoloji ve Biyokimya ABD.’lerinde çalışmamla ilgili desteklerini esirgemeyen değerli meslektaşlarıma ve deney hayvanı temininde yardımlarından dolayı veteriner Alb. Tayfun İDE’ye teşekkür ederim.

Bu proje 10/03/2006 tarihinde (AR-2006/31) GATA Araştırma Bilimsel Kurul Başkanlığı’nca kabul edilmiş ve Türk Onkoloji Derneği tarafından desteklenmiştir.

Yoğun klinik faaliyetleri nedeniyle yeterince zaman ayıramadığımı düşündüğüm canımdan çok sevdiğim değerli eşim Ülker ÖZTÜRK, çocuklarım Nihal, Kemal ve Hilal’den özür dileyerek, bana vermiş oldukları destekten dolayı kendilerini sevgiyle kucaklıyorum. Hayat boyu sevgileriyle beni bu günlere getiren ve her an kalpleri benimle olan sevgili babam Yusuf ÖZTÜRK ve annem Saniye ÖZTÜRK’e hürmetler eder ellerinden öperim. Ayrıca üzerime emeği geçmiş olan tüm hocalarım, akrabalarım ve arkadaşlarıma da teşekkürü bir borç bilirim.

Mustafa ÖZTÜRK

Hv. Tbp. Kd. Bnb.

ÖZET

Doksorubisin ve Trastuzumab'a Bağlı Deneysel Kardiyotoksisitenin Önlenmesinde Melatonin, 1400w ve Merkaptotetilguanidin'in Yeri:

Doksorubisin (DOKS) ve Trastuzumab (TRAST) çok yaygın kullanılan antikanser ajanlardır. DOKS ve TRAST'ın en önemli yan etkileri kardiyotoksisitedir. Bu iki ilaç birlikte kullanıldığında additif kardiyotoksisiteye neden oldukları için kombine kullanımları tavsiye edilmemektedir. Bu çalışmada Melatonin (MEL), Merkaptotetilguanidin (MEG) ve 1400w'nin, DOKS veya DOKS+TRAST'a bağlı deneysel kardiyotoksisite oluşturulan ratlarda kuruyucu etkisi araştırıldı. Bu amaçla DOKS (20mg/kg) ve TRAST (10mg/kg) dozlarında kullanılarak ratlarda kardiyotoksisite geliştirildi. Toplam 66 Sprague-Dawley türü rat kullanılarak 9 grup oluşturuldu ve ratlar DOKS (toksisite grubu), DOKS+MEL, DOKS+MEG, DOKS+1400w, DOKS+TRAST (toksisite grubu), DOKS+TRAST+MEL, DOKS+TRAST+MEG, DOKS+ TRAST+1400w ve kontrol gruplarına ayrıldı. Ratlara kardiyotoksisite indüksiyonundan 36 saat öncesinden başlanarak 72 saat sonrasına kadar 12 saatte bir MEL (10mg/kg), MEG (10mg/kg.) veya 1400W (10mg/kg) uygulandı. Kalp dokusunda malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon perokidaz (GPx) ve serum CKMB düzeylerine bakılarak kalbin patolojik incelemesi yapıldı. Kontrol grubuna göre DOKS veya DOKS+TRAST ile kardiyotoksisite oluşturulan ratlarda kalp dokusunda MDA düzeyleri yüksek (0.152 ± 0.023 vs 0.653 ± 0.078 , 0.847 ± 0.117 mmol/g protein $p < 0.05$), SOD ve GPx düzeyleri ise düşük bulundu (1940.80 ± 164.12 vs 791.67 ± 65.49 , 475.50 ± 98.08 U/g protein ve 519.03 ± 74.98 vs 95.50 ± 14.09 , 57.82 ± 19.26 U/g protein $p < 0.05$). MEL, MEG veya 1400W verilen gruplar toksisite gruplarıyla kıyaslandığında kalp dokusunda MDA düzeyleri düşük, SOD ve GPx düzeyleri ise yüksek bulundu ($p < 0.05$). MEL, MEG veya 1400w verilen gruplar toksisite gruplarıyla kıyaslandığında serum CKMB düzeyleri düşük bulundu ($p < 0.05$). Ultrastrüktürel incelemelerde toksisite gruplarında kalpte hücresel ödem, miyokard nekrozu, vakuolizasyon, miyofibrillerin düzensiz dağılımı ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu belirgindi. MEL, MEG veya 1400W uygulanan gruplarda miyokard nekrozu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu görülmedi ve diğer bulgular ise daha hafif düzeyde bulundu.

Sonuç olarak, MEL, MEG ve 1400w DOKS veya DOKS +TRAST kökenli deneysel kardiyotoksisitenin azaltılmasında etkili bulundu.

Anahtar Kelimeler : Doksorubisin, Trastuzumab, Kardiyotoksisite,
Melatonin, İNOS

Destekleyen Kurumlar : GATA Araştırma Bilimsel Kurul Başkanlığı,
Türk Onkoloji Derneği

Yazar Adı : Hv. Tbp. Kd. Bnb. Mustafa ÖZTÜRK

Danışman : Prof.Tbp. Kd. Alb. Fikret ARPACI

SUMMARY

The role of Melatonin, 1400w and Mercaptoethylguanidine in Doxorubicin and Trastuzumab induced cardiotoxicity:

Doxorubicin (DOX) and Trastuzumab (TRAST) are commonly used anticancer agents. The main complication of DOX and TRAST is cardiotoxicity. It is not recommended to use these agents together, because of additional cardiotoxicity.

This study focused on the protective effect of Melatonin (MEL), Mercaptoethylguanidine (MEG) or 1400w in DOX or DOX+TRAST induced cardiotoxicity in rats. Cardiotoxicity was induced with DOX (20mg/kg) and TRAST (10mg/kg) on 66 Sprague-Dawley rats and these were divided in 9 groups (DOX (toxicity group), DOX+MEL, DOX+MEG, DOX+1400w, DOX+TRAST (toxicity group), DOX+TRAST+MEL, DOX+TRAST+MEG, DOX+TRAST+1400w and control group). Rats were given DOX (20 mg/kg), TRAST (10mg/kg), and treated 36 hours before to 72 hours after cardiotoxicity induction with MEL (10 mg/kg), MEG (10mg/kg) or 1400w (10mg/kg). Cardiac Malondialdehyde (MDA), superoxide dismutaz (SOD), glutation peroxidase (GPx) and serum CKMB levels were examined and pathologic examinations were done. MDA levels were significantly higher when compared control group rats with DOX or DOX+TRAST cardiotoxicity induced rats (0.152 ± 0.023 vs 0.653 ± 0.078 , 0.847 ± 0.117 mmol/g protein $p< 0.05$). SOD and GPx levels were significantly lower (1940.80 ± 164.12 vs 791.67 ± 65.49 , 475.50 ± 98.08 U/g protein and 519.03 ± 74.98 vs 95.50 ± 14.09 , 57.82 ± 19.26 U/g protein $p< 0.05$). MEL, MEG or 1400W treated groups had lower cardiac MDA, higher SOD and GPx levels when compared with toxicity groups ($p< 0.05$). Serum CKMB levels were lower in MEL, MEG or 1400W treated groups, when compared with toxicity groups ($p< 0.05$). Ultrastructural analysis showed cellular edema, myocardial necrosis, myocardial vacuolization, and disordered myofibrillary structure and inflammatory cell infiltration in toxicity groups. Myocardial necrosis and inflammatory cell infiltration were not seen in MEL, MEG or 1400W treatment groups. Other pathologic findings were only moderately seen.

Conclusion: MEL, MEG and 1400W are effective in DOX or DOX +TRAST induced cardiotoxicity.

Keywords : Doxorubicin, Trastuzumab, Cardiotoxicity, Melatonin, İNOS
Supported by : Gulhane Military Medical Academy Scientific Research Council,
Turkish Oncology Association
Author : Mustafa ÖZTÜRK, M.D.
Counsellor : Prof. Fikret ARPACI, M.D.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR..	ii
ÖZET.....	iii
İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY).	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLOLAR DİZİNİ.....	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
GİRİŞ	1
1.1. Çalışmanın Amaç ve Kapsamı	2
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Doksorubisin ve kardiyotoksisite	3
2.2. Trastuzumab ve kardiyotoksisite	4
2.3. Melatonin antioksidan sistemler üzerine etkisi ve kardiyotoksisitedeki rolü ...	5
2.3.1. Melatoninin reaktif moleküllerle olan etkileşimleri	6
2.3.2. Melatoninin antioksidan enzimlere olan etkileri	7
2.4. 1400W.	8
2.5. Merkaptotetilguanidin.....	8
2.6. Oksidatif denge.....	9
GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1. Deney hayvanlarının ve Grupların Belirlenmesi	13
3.2. Deneyin uygulanması	13
3.3. Çalışma analizlerinin yapılması.....	17
3.3.1. Biyokimyasal analizler.....	17
3.3.2. Doku homojenizasyonu.....	17
3.3.3. Protein ölçümü.....	17
3.3.4. Malondialdehit ölçümü	18
3.3.5. Total süperoksit dismutaz ölçümü	19
3.3.6. Glutasyon peroksidaz ölçümü	20
3.3.7. Rutin biyokimyasal analizler	22
3.3.8. Histopatolojik analizler	22

3.3.9. İstatistiksel analizler	22
BULGULAR	23
4.1. Genel klinik değerlendirme.....	23
4.2. Kalp dokusunda MDA, SOD ve GPx değerleri.	24
4.3. Biyokimyasal parametrelerin incelenmesi	33
4.4. Histopatolojik inceleme	35
TARTIŞMA.....	42
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	46
KAYNAKLAR.....	47

SİMGELER ve KISALTMALAR

CAT	: Katalaz
$\text{CO}_3^{\cdot -}$	: Trioksokarbonat radikali
CK-MB	: Kreatinin kinaz - MB
DOKS, DOX	: Doksorubisin
eNOS	: Endotelial nitrik oksit sentaz
GATA	: Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Gpx	: Glutasyon peroksidaz
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
HOCl	: Hipoklorik asit
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
LDH	: Laktat dehidrojenaz
$\text{LOO}^{\cdot}$	: Peroksi radikalleri
MEG	: Merkaptoetilguanidin
MEL	: Melatonin
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
$\text{NO}^{\cdot}$	: Nitrikoksit
NO_2^+	: Nitrit iyonu
NO_2Cl	: Nitril Klorit
OH	: Hidroksil radikali
ONOO^-	: Peroksinitrit anyonu
ONOOH	: Peroksinitröz asit
$\text{O}_2^{\cdot -}$	: Süperoksit radikali
$^1\text{O}_2$	: Singlet oksijen
ROT	: Reaktif oksijen türevleri
RNT	: Reaktif nitrojen türevleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
TRAST	: Trastuzumab

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Oksidatif metabolizma ve enzimatik antioksidanlar.....	12
3.1. Deney hayvanına intraperitoneal ilaç enjeksiyonu.....	14
3.2. Deney hayvanında kan örneğinin alınması.....	15
3.3. Deney hayvanında kalbin eksizyonu.	15
4.1. Kontrol, Doksorubisin ve Doksorubisin+Trastuzumab gruplarında kalp dokusunda MDA düzeyleri	24
4.2. Kontrol, Doksorubisin ve Doksorubisin+Trastuzumab gruplarında kalp dokusundan SOD düzeyleri	24
4.3. Kontrol, Doksorubisin ve Doksorubisin+Trastuzumab gruplarında kalp dokusunda GPx düzeyleri	25
4.4. Kontrol ve Doksorubisin gruplarında kalp dokusunda MDA düzeyleri.....	26
4.5. Kontrol, Doksorubisin ve Trastuzumab gruplarında kalp dokusunda MDA düzeyleri	27
4.6. Kontrol ve Doksorubisin gruplarında kalp dokusunda SOD düzeyleri.....	28
4.7. Kontrol, Doksorubisin ve Trastuzumab gruplarında kalp dokusunda SOD düzeyleri.	29
4.8. Kontrol ve Doksorubisin gruplarında kalp dokusunda GPx düzeyleri.....	30
4.9. Kontrol, Doksorubisin ve Trastuzumab gruplarında kalp dokusunda GPx düzeyleri	31
4.10. Kontrol ve Doksorubisin gruplarında serum CKMB düzeyleri.....	33
4.11. Kontrol, Doksorubisin ve Trastuzumab gruplarında serum CKMB düzeyleri.....	34

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Serbest radikaller ve kimyasal yapıları	9
2.2. Endojen Antioksidanların kaynakları	11
3.1. Deney hayvanlarına DOKS, TRAST, MEL, MEG, 1400w'nin deney prosedüründeki uygulama saatleri.....	16
3.2. DOKS, TRAST, MEL, MEG, 1400W'nin deney boyunca uygulama şekli ve dozları.	16
4.1. Deney hayvanlarına ait klinik gözlemlerin değerlendirilmesi	23
4.2. Kalp dokusu oksidan ve antioksidan parametreleri (Ortalama±Standart Sapma)	32
4.3. Kalp dokusu oksidan ve antioksidan parametreleri (Ortalama±Standart Sapma)	32
4.4. DOKS gruplarında serum CKMB düzeyleri (Ortalama±Standart Sapma)	34
4.5. DOKS ve TRAST gruplarında serum CKMB düzeyleri (Ortalama±Standart Sapma)	35

RESİMLER DİZİNİ

<u>Resim</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. DOKS grubuna ait kalp örneğinde inflamatuvar hücre infiltrasyonu odağı.	35
4.2. DOKS+TRAST grubuna ait kalp örneğinde inflamatuvar hücre infiltrasyonu odağı.	36
4.3. DOKS+TRAST grubuna ait ratın kalp örneğinde tek lif nekrozu.	36
4.4. DOKS+TRAST grubuna ait ratın kalp örneğinde interstisyel ödem.....	37
4.5. DOKS grubuna ait ratın kalp dokusunda kas liflerinde disorganizasyon.	37
4.6. DOKS+1400w grubundaki rata ait kalp dokusunda kas liflerinde vakuoluzasyon.	38
4.7. DOKS+MEL grubundaki rat kalbinde kas liflerindeki hafif düzeyde disorganizasyon.	39
4.8. DOKS+1400w grubundaki rat kalbinde kas liflerindeki hafif düzeyde interstisyel ödem.	39
4.9. Kontrol grubuna ait normal kalp dokusu örnekleri.....	40
4.10. Süksinik dehidrogenaz (mitokondri boyası) boyamasıyla DOKS+MEL grubunda doku mitokondri düzeyi.	40
4.11. Süksinik dehidrogenaz (mitokondri boyası) boyamasıyla DOKS+TRAST grubunda doku mitokondri düzeyi	41

1. GİRİŞ

Doksorubisin (DOKS), anti-tümoral etkinliği yüksek, antrasiklin grubu bir antineoplastik ajandır. Klinikte yaygın olarak meme kanseri, lösemi, lenfomalar, sarkomlar ve diğer kanser türlerinde kullanılmaktadır. Ancak yan etkilerinin fazlalığı nedeni ile doz kısıtlaması gerektirmektedir. En önemli yan etkisi kardiyotoksik etkisi olup, 550 mg/m^2 kümülatif dozda %7, 700 mg/m^2 total dozun üzerine çıktığında %18 oranında görülmektedir (1). Ancak birçok kanser türünde vazgeçilmez bir ajan olması kullanımını zorunlu kılmaktadır. DOKS'in kalp hücrelerinde pek çok zarara neden olduğu, ancak bunlardan en önemlisinin serbest oksijen radikalleri (SOR) üzerinden ortaya çıkan hasar olduğu gösterilmiştir. DOKS'in SOR üretimini artırdığı, bununla ilintili olarak hücrelerin antioksidan enzim düzeylerini düşürdüğü ve radikal hasarına neden olduğu gösterilmiştir (2). Hücrelerde SOR üretiminin artmasına neden olan DOKS aynı zamanda indüklenebilir nitrik oksit (iNOS) enzimini de aktive etmektedir. SOR hasarına uğrayan hücrelerde, ortamda yüksek düzeyde SOR ve iNOS kaynaklı nitrik oksit bulunduğu, ortaya peroksinitritler çıkmaktadır. Hedef hücrelerde oluşan peroksinitritler, hücrelerin makromoleküllerine saldırarak hasar oluşturmaktadır.

Pek çok antioksidan madde ile yapılan çalışmada kardiyotoksisite üzerine yararlı etkiler gösterilmiştir. Ancak bu ajanlardan kaynaklanan başka klinik yan etkilerin ortaya çıkması veya bazı ajanların DOKS'in klinik etkinliğini azaltması bu ajanların klinik pratikte kullanımını engelleyen unsurlar olmuştur. Önemli bir antioksidan olan melatonin ile yapılan çalışmalarda daha yararlı sonuçlar elde edilmiştir (3).

Her2/neu, erbB-2 olarak da bilinmektedir ve meme kanserlerinin yaklaşık olarak %20-30'unda aşırı eksprese edilmektedir (4). Her2/neu hücre yüzeyinde yerleşen bir tirozin kinaz reseptörüdür ve aşırı eksprese edilmesinin kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (5). TRAST, her-2/neu reseptörüne karşı geliştirilmiş monoklonal antikordur ve dirençli ileri evre meme kanserli hastalarda yapılan çalışmalarda tek başına %11-15 yanıt oranlarına sahip olduğu gösterilmiştir (6). TRAST DOKS ile birlikte kullanıldığında cevap oranlarında belirgin artış saptanmıştır. Ancak tek başına TRAST'ın kullanılmasıyla kardiyotoksik etki %4 iken, TRAST DOKS ile kombine edildiğinde bu oran %28'e çıkmaktadır (7, 8). Klinik etkinliğin artırılması açısından DOKS dozlarının daha yukarıya çekilmesi ve

TRAST+DOKS kombinasyonlarının kullanılması tedavi etkinliğini arttırabileceği düşünülmektedir. Ancak kardiyotoksik etkinin artmasından çekinildiği için klinik pratikte bu kombinasyonlar kullanılmamakta ve belli bir dozun üzerine çıkılamamaktadır. Kardiyotoksisite oluşum mekanizmaları göz önünde bulundurulduğunda antioksidan tedavilerin DOKS kombinasyonlarına ilave edilmesinin kardiyotoksik etkileri azaltılabileceği düşünülmektedir.

1.1. Çalışmanın Amaç ve Kapsamı

Deneyssel DOKS ve DOKS+TRAST kardiyotoksisitesi oluşturulan ratlarda önemli bir antioksidan olan melatonin, güçlü bir peroksinitrit süpürücüsü olan MEG, iNOS inhibitörü olan 1400W'nin koruyucu etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada aşağıdaki soruların cevaplanması hedeflenmiştir:

1. MEL, 1400W ve MEG'in DOKS kardiyotoksisitesi üzerine etkisi var mıdır?
2. MEL, 1400W ve MEG'in DOKS+TRAST kardiyotoksisitesi üzerine etkisi var mıdır?
3. MEL, 1400W ve MEG tedavilerinden hangisi daha etkilidir?

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Doksorubisin ve kardiyotoksisite

Doksorubisin antrasiklin grubu bir antineoplastik ajandır. İlk kez 1960'lı yılların başında streptomyces peucetius'dan elde edilmiştir. Bu tarihten itibaren antikanser etkinliği nedeniyle klinikte yaygın olarak meme kanseri, lösemi, lenfomalar, sarkomlar ve diğer kanser türlerinde kullanılmaktadır. Diğer antineoplastik ajanlarda olduğu gibi DOKS kullanımının belli terapötik sınırlarda uygulanması potansiyel toksisitelerinin çıkmaması açısından önemlidir. En önemli yan etkisi kardiyotoksisitedir. Bu nedenle hastalarda 550 mg/m² kümülatif doza kadar kullanımına müsaade edilmektedir (9). Bu dozların üzerine çıkıldığında konjestif kalp yetmezliği gelişmekte ve bu durum bilinen tıbbi tedavilerle düzeltilememektedir. Antrasiklinlerin antitümör etki mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen aşağıdaki gibi sıralanmaktadır (10):

- DNA interkalasyonu: Makromoleküllerin sentezini engelleyerek hücrenin hasarlanmasına sebep olmaktadır.
- SOR üretimine sebep olarak DNA hasarlanması ve lipit peroksidasyonuna neden olması.
- DNA'nın bağlanması ve alkilenmesi
- DNA'nın çapraz bağlanması
- DNA sarmalının açılması esnasında bağlanma ve helikaz aktivitesi
- Membranlar üzerine direkt toksik etki
- Topoizomerez II inhibisyonu ile DNA hasarlanması
- Topoizomerez II inhibisyonu sonrasında apoptozis indüklenmesi

DOKS mitokondriyal enzimlerle reaksiyona girerek SOR üretimine neden olmaktadır DOKS'e bağlı kardiyotoksisitenin patogenezi kesin olarak bilinmemesine rağmen histopatolojik bulguların değişken olması farklı etki mekanizmaların aynı anda etkili olduğunu düşündürmüştür (2). Birçok bulgu DOKS'e bağlı

kardiyotoksisitenin patogenezinde oksidan streslerin rol oynadığını desteklemektedir. Özellikle redoks aracılı SOR üretimi suçlanmaktadır (11, 12). DOKS'e bağlı serbest radikallerin oluşumu neticesinde lipid peroksidasyonu oluşmakta ve bunun neticesinde malondialdehit (MDA) seviyeleri artmaktadır (2). DOKS SOR oluşumuna neden olması yanında; glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) gibi antioksidan enzimlerin düzeylerinin azalmasına sebep olarak kardiyotoksisiteye neden olduğu da gösterilmiştir (2). DOKS dokuya özgü mitokondriyal hasara neden olmakta ve hücrenin enerji krizine girmesine sebep olmaktadır (13). Ayrıca hücre içi kalsiyum (14) ve demir (15) dengesini bozarak hücresel düzeyde hasarlanmalara neden olmaktadır.

2.2. Trastuzumab ve kardiyotoksisite:

Meme kanserlerinin yaklaşık %20-30'unda HER2 reseptörü aşırı eksprese edilmektedir. HER2 tirozin kinaz aktivitesi olan transmembran glikoprotein yapısında bir moleküldür. TRAST monoklonal bir antikor olup spesifik olarak HER2 proteinini bağlamaktadır. Bu bağlanma sayesinde HER2 üzerinden gerçekleşen sinyal iletimi engellenmektedir. Bunun sonucunda hücresel çoğalma engellenmektedir (16).

TRAST diğer antikanser etkili ilaçlarla kombinasyonlarda kullanılmakta ve tek başına kullanıldığında ciddi bir yan etki olmaksızın uzun süreli kullanıma müsaade etmektedir. TRAST'ın en önemli yan etkisi klinik olarak belirgin hale gelebilen kardiyomiyopatidir (17).

Yapılan faz II ve faz III çalışmalarda TRAST DOKS ile olan kombinasyonları DOKS kardiyotoksisitenin belirgin olarak artmasına sebep olmaktadır (18).

Yapılan çalışmalarda HER2 reseptörü eksprese eden meme kanserli olgularda TRAST DOKS kombinasyonu ile en yüksek cevap oranlarına ulaşılmasına rağmen belirgin kardiyotoksik etki nedeniyle bu ilaçların birlikte kullanımı tavsiye edilmemektedir. TRAST DOKS'in yanında dozetaksel ve paklitaksel gibi kemoterapötiklerin de kardiyak toksisitesini potansiyalize ettiği görülmüştür. TRAST, hafif ejeksiyon fraksiyon düşüklüğünden belirgin kalp yetmezliğine kadar varan kardiyotoksisiteye neden olabilmektedir (19, 20). Aynı zamanda aritmilere de neden olabileceği bildirilmiştir (21). TRAST kardiyotoksisitenin fizyopatolojik mekanizması

tam olarak anlaşılmış değildir (22). TRAST'a bağlı kardiyotoksisite gelişen hastaların kalp biyopsileri incelendiğinde DOKS kardiyotoksisitesinden farklı ultrastrüktürel değişikliklerin ortaya çıktığı görülmüştür (23). HER2'nin kalp yetmezliği patogenezinde nasıl bir role sahip olduğu tam olarak bilinmemektedir. Çalışmalarda HER2 düzeyinin kronik kalp yetmezliği hastalarında artmış olduğu ve sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ile ters ilişkili olduğu görülmüştür (24, 25). Bu nedenle TRAST kardiyotoksisite fizyopatolojisini aydınlatacak olan çalışmalar tedavilerin daha güvenli yapılabilmesi için önemli olabilecektir.

2.3. Melatoninin antioksidan sistemler üzerine etkisi ve kardiyotoksisitedeki rolü:

45 yıl önce keşfedilmesine rağmen MEL serbest oksijen radikal süpürücüsü ve antioksidan olarak tanınması 15 yıl öncesine dayanmaktadır. Bu tarihten önce MEL'nin memelilerde sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde etkili olduğu biliniyordu.

Melatonin pineal glanddan salgılanan ve bir aminoasit olan triptofandan kökenini alan bir moleküldür. Ancak melatonin düşük oranlarda üretebilen başka organlar da bildirilmiştir. Retinal dokuda üretildiğini gösteren çalışmalar olduğu gibi (26), overler, lens dokusu, gastrointestinal dokuda üretilebildiğine dair bulgular mevcuttur. Bunun yanında bazı vücut sıvılarında ve hücrelerde melatonin düzeylerinin serum düzeylerinden yüksek olduğu saptanmıştır. Örneğin kemik iliği hücrelerinde (27), safranin içeriğinde (28) ve serebrospinal sıvıda (29) serumdan daha yüksek oranlarda melatonin seviyeleri bildirilmiştir.

Melatoninin serbest oksijen radikal süpürücüsü olduğu ilk kez lanas tarafından ortaya konulmuştur (30). 2 yıl sonra yapılan bir çalışmada Reiter ve arkadaşları bu iddiayı kuvvetlendirmiş ve melatoninin reaktif hidroksil radikalleri üzerinden etkili olduğu ortaya konulmuştur (31, 32). Bu tarihten sonra melatoninin serbest radikal süpürücü özelliği ve antioksidan özellikleri ile yüzlerce literatür yayınlanmıştır(33, 34)

Melatonin antioksidan özelliğini genel olarak iki mekanizma üzerinden gösterir.

- 1.) Direkt radikal süpürücü özellik
- 2.) Diğer antioksidan mekanizmaları harekete geçirmek yoluyla (indirekt etki)

Melatoninin lipitte çözünür olması hücre içinde, suda çözünür olması ise hücre dışında etkili olmasını sağlar (35). Direkt süpürücü özelliğinin reseptörden bağımsız, indirekt antioksidan özelliğinin ise reseptör bağımlı olduğu düşünülmektedir (36). Melatoninin antioksidan özelliğinden sorumlu olduğu sanılan asetil ve metoksi gruplarının serbest radikalleri bağladığı düşünülmektedir (37).

2.3.1. Melatoninin reaktif moleküllerle olan etkileşimleri:

2.3.1.1.Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$). MEL'in, en yıkıcı serbest radikal olarak değerlendirilen $\cdot\text{OH}$ radikalini detoksifiye ettiğini ilk kez Tan ve arkadaşları bildirmiştir. Doza bağımlı olan $\cdot\text{OH}$ radikali süpürücü etkisinin glutatyon ve mannitolden sırasıyla 5 ve 10 kat daha etkin olduğu ortaya konmuştur (31). $\cdot\text{OH}$ radikalının bilinen bir özelliği yarılanma ömrünün az olması, dolayısıyla yayılma alanının sınırlı kalmasıdır (38). Bunun için süpürücü maddenin etkili olabilmesi için $\cdot\text{OH}$ radikali oluştuğunda hemen yanı başında olması gereklidir; melatoninin hücre içi ve dışına yayılımının çok iyi olması bu yönde etkin bir süpürücü özellik göstermesini sağlamaktadır (35,39).

2.3.1.2.Hidrojen peroksit (H_2O_2). H_2O_2 kendisi bir serbest radikal olmamakla beraber, yarılanma ömrünün daha uzun olması, dokulara yayılabilme kabiliyetinin iyi olması ve $\cdot\text{OH}$ radikale her an dönüşebilme riskini taşıması nedeniyle önemlidir. MEL'in H_2O_2 'yi direkt süpürücü etkisinin olduğuna dair araştırmalar bulunmaktadır (40, 41). Zang melatoninin H_2O_2 süpürücü etkisinin doza bağımlı olduğunu (41), Tan ise melatoninin bu etkiyi bir metaboliti olan N-Asetil-N-formil metoksi kinüramin yoluyla gösterdiğini savunmaktadır (40).

2.3.1.3.Süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Zang indollerin direkt süpürücü etkisi olabileceğini teorik bir şema ile açıklamasına rağmen (42), Marshall (43), Chan ve

Tang (44) yaptıkları deneylerde melatoninin $O_2^{\cdot-}$ üzerinde direkt süpürücü etkisinin olmadığını göstermişlerdir.

2.3.1.4.Singlet oksijen ($^1O_2$). $^1O_2$, moleküler O_2 'nin fotosensitif reaksiyonlarında ortaya çıkan yüksek enerjili bir formudur. Çeşitli çalışmalarda MEL'in $^1O_2$ 'nin oluşumunu ve sitotoksitesini azalttığı ortaya konmuştur (45).

2.3.1.5.Hipoklorik asit (HOCl). HOCl, makrofajlar tarafından bakteri fagositozu sırasında salınır ve etrafa da yayılabilmesi nedeniyle çevre moleküller üzerinde hasar oluşturabilir. Marshall (43), Chan ve Tang (46), daha sonra da başka otörler ayrı ayrı deneylerde HOCl'nin MEL tarafından süpürüldüğünü ortaya koymuştur (47).

2.3.1.6.Peroksi radikalleri ($LOO^{\cdot}$). MEL'in vitamin E'den daha iyi bir $LOO^{\cdot}$ süpürücüsü olduğu Pierri tarafından in vitro sistemlerde gösterilmiştir. Hatta $LOO^{\cdot}$ süpürülmesindeki etkinlik sıralaması, MEL > vitamin C > GSH olarak ortaya konmuştur (48).

2.3.1.7.Nitrikoksit ($NO^{\cdot}$). Nitrojen bazlı bir radikal olan $NO^{\cdot}$ 'nun özellikle iskemi/reperfüzyon ile seyreden süreçlerde hasar oluşturduğu bilinmektedir. İn vitro çalışmalarda MEL ve bazı indol türevlerinin $NO^{\cdot}$ 'yu direkt süpürücü etkisi gösterilmiştir (49).

2.3.1.8.Peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) ve peroksinitröz asit ($ONOOH$). $ONOO^-$ serbest radikal olmadığı halde makromoleküllere karşı çok yıkıcıdır. Melatoninin $ONOO^-$ 'a karşı direkt süpürücü etkisi hem in vitro hemde in vivo olarak gösterilmiştir. MEL'in $ONOOH$ 'e karşı da süpürücü etkinliği ortaya konmuş ancak bu konudaki çalışmalar halen tartışmalıdır (50, 51).

2.3.2. Melatoninin antioksidan enzimlere olan etkileri:

Organizmadaki belli başlı antioksidan enzimler SOD, CAT ve GPx olarak bilinmektedir. Birçok çalışmada MEL'in hem farmakolojik hem de fizyolojik dozlarda

bu enzimlerin gen ekspresyonunu, dolayısıyla da aktivitelerini artırdığı gösterilmiştir (52). MEL'in bu etkilerinin reseptör bağımlı olduğu düşünülmektedir.

SOD, $O_2^{\cdot-}$ 'nin H_2O_2 'e dönüşümünde, dolayısıyla $O_2^{\cdot-}$ 'nin ortadan kaldırılması ve H_2O_2 , $ONOO^{\cdot-}$ 'nin oluşumunun önlenmesinde önemli bir enzimdir. GPx ve GR ise, H_2O_2 'nin çeşitli reaksiyonlarla $\cdot OH$ 'e dönüşümünü engelleyerek hasarı enzimatik olarak önlemekten sorumludur (53).

Yapılan çalışmalarda farmakolojik ve fizyolojik dozlardaki melatoninin GPx ve GR aktivitesini önemli ölçüde artırdığı gösterilmiş (54) ve çeşitli dokularda SOD aktivitesini de artırdığı ortaya konmuştur (55).

CAT da, GPx gibi, H_2O_2 'nin $\cdot OH$ 'a dönüşümünü enzimatik olarak engelleyerek H_2O_2 'i detoksifiye eden bir enzimdir (56) ve melatoninin bu enzimin de aktivitesini artırdığı görülmüştür (57).

Bunun yanında MEL'in G-6-PDH (58), 5-lipoksijenaz (59), nitrik oksit sentaz (NOS) (60) üzerine etkili olduğu gösterilmiştir ve bu yolla da oksidatif hasarın önüne geçilmesi sağlanmaktadır.

2.4. 1400W:

1400W; memeli iNOS'una sıkı bağlanan bir inhibitörüdür. L-Arginin, 1400W ile yarışmalı olarak bu inhibisyonu engeller. Etkisi 2 saatten uzun sürer. 1400W, iNOS'u genelde geri dönüşümsüz olarak, nadiren de olsa yavaş bir şekilde geri dönüşümlü olarak inhibe eder. iNOS'un üzerindeki etkisi, eNOS ve nNOS'a göre sırasıyla 5000 ve 200 kat fazla ve çoğunlukla geri dönüşümsüzdür (61). 1400W, deneysel olarak ispatlanan en güçlü iNOS inhibitörüdür (62).

2.5. Merkaptotetilguanidin (MEG):

iNOS inhibitörü ve peroksinitrit süpürücüsü etkilerinin kombinasyonuna sahip bir ajandır. 1960'lı yıllarda pek çok inflamatuvar süreçte yararlı etkileri gösterilmesine

rağmen mekanizması tanımlanamadığı için araştırmalarda kullanımı yaygınlaşamamıştır. 1990'lı yıllardan itibaren oksidatif stresin pekçok hastalığın patofizyolojisinde rol oynadığı ortaya çıkmaya başlayınca yeniden popüler olmuştur. 2005 yılından itibaren Sigma tarafından yeniden deneysel amaçlı üretimine başlanmıştır. (63).

2.6. Oksidatif denge

Atom veya moleküllerin dış yörüngesinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunması “serbest radikal” olarak tanımlanır. Eşleşmiş durumdaki elektronlar birbirine zıt yönde dönerler, bu durum moleküle stabil ve dengeli bir yapı kazandırır. Eşleşmemiş elektronlar ise molekülleri stabil olmayan bir hale sokar. Serbest radikaller, eşleşmemiş elektronlarını eşleştirmek ve daha dengeli hale gelebilmek isterler ve bunun için diğer moleküller ile reaksiyona girmeye meyillidirler. Bu durum da serbest radikaller organizmada kendisine elektron kaynağı olabilecek organizmanın temel yapıları olan DNA, protein, lipid ve karbonhidratlara saldırarak bunlarla reaksiyona girer ve sonuçta bu yapılarının bozulmasına neden olur (64).

Serbest radikaller başlıca oksijen ve azottan köken alırlar. Oksijenden köken alan serbest radikallere “reaktif oksijen türevleri” (ROT), azottan köken alan serbest radikallere ise “reaktif nitrojen türevleri” (RNT) adı verilir. Oksijen ve azottan köken alan başlıca serbest radikaller tablo 2.1’de özetlenmiştir.

Tablo 2.1: Serbest radikaller ve kimyasal yapıları

Oksijenden köken alan (ROT)		Azottan köken alan (RNT)	
Singlet oksijen	$^1\text{O}_2$	Peroksinitrit anyonu	ONOO^-
Süperoksit	O_2^-	Peroksinitröz asit	ONOOH
Hidroperoksi radikali	$\text{O}_2\text{H}^\cdot$	Nitronium anyonu	NO_2^+
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Nitrojen dioksit radikali	$\text{NO}_2^\cdot$
Hidroksil radikali	$\text{OH}^\cdot$	Nitril Klorit	NO_2Cl
Hipokloröz asit	HOCl	Nitrit iyonu	NO_2^-
Trioksokarbonat radikali	$\text{CO}_3^{\cdot-}$		

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde. Buna "oksidatif denge" adı verilir. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerin toksik etkisinden etkilenmemektedir. Buna karşın oluşum hızında artma yada ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur ki; buna "oksidatif stres" adı verilir (65).

Biyolojik sistemlerde, serbest radikal oluşumu normal metabolik olayların seyri esnasında meydana geldiği gibi (endojen kaynaklar) organizmanın çeşitli dış etkenlere maruz kalmasıyla da oluşabilir (eksojen kaynaklar). Özellikle kanser tedavisinde kullanılan ajanların oksidatif denge üzerine çok olumsuz etkileri bulunmaktadır.

Organizmada çeşitli endojen ve eksojen kaynaklar yoluyla ortaya çıkan ROT ve RNT, antioksidan savunma sistemi yoluyla ortadan kaldırılır. Canlı organizmadaki antioksidan savunma sistemini başlıca iki bölüme ayırabiliriz:

1) Enzimatik antioksidanlar

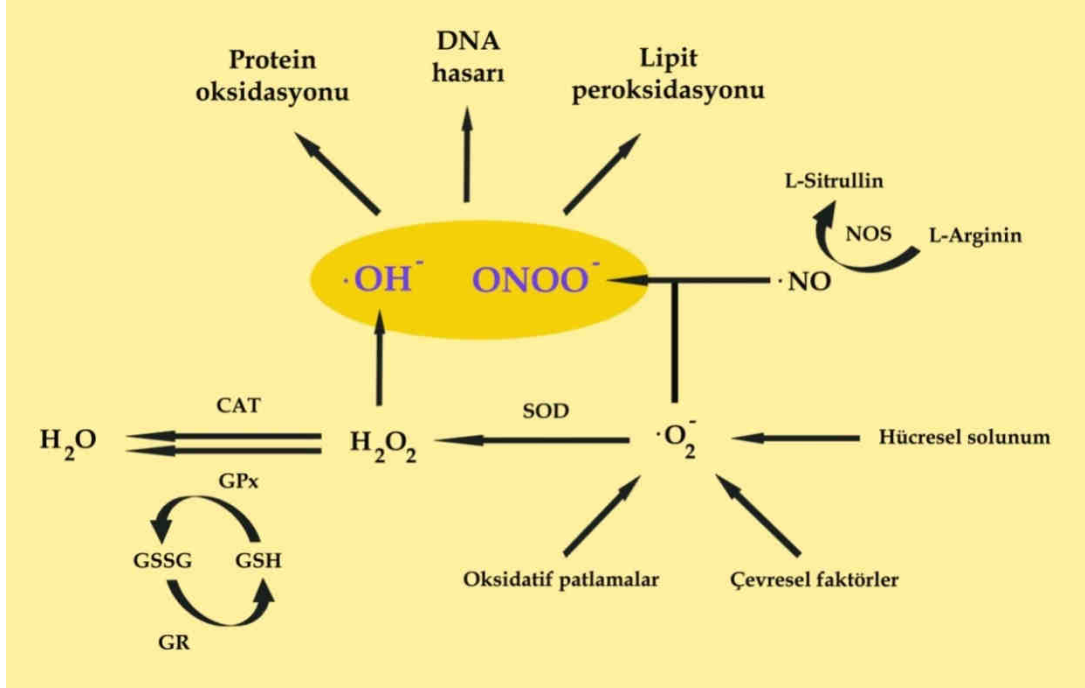
2) Nonenzimatik antioksidanlar (Tablo 2.2). Bunun dışında organizmaya dışarıdan alınan ekzojen antioksidan kaynakları da mevcuttur.

Enzimatik antioksidan savunma sistemi, oluşan radikallerin detoksifikasyonunu enzimatik yolla sağlar. Enzimatik antioksidan savunmanın önemli bir bölümünü süperoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksiti (H_2O_2) temizleyen çok özel enzimler oluşturur. Bunların başlıcaları süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) dır (66). SOD, süperoksitin (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşümünü sağlayan metalloenzimdir. Böylece süperoksitin (O_2^-) potansiyel substratlarla reaksiyona girmesi ve daha toksik ürünlerin ($\cdot OH$ gibi) oluşması önlenmiş olur. CAT, konsantrasyonu değişmekle birlikte bütün hücre tiplerinde bulunan bir enzimdir ve daha çok peroksizomlarda bulunur. CAT, kendisi radikal olmasa da en reaktif ROT olarak kabul edilen ve hidroksil ($\cdot OH$) radikalinin öncüsü olan, hidrojen peroksit (H_2O_2) moleküllerinin suya indirgenmesini sağlar.

Tablo 2.2: Endojen Antioksidanların kaynakları

Enzimatik Antioksidanlar	Non Enzimatik Antioksidanlar
Mitokondrial Sitokrom Oksidaz Sistemi	Alfa - Tokoferol (Vitamin E)
Süperoksit Dismutaz (SOD)	Beta (β) Karoten (Vitamin A prekürsörü)
Katalaz (CAT)	Askorbik Asit (Vitamin C)
Glutasyon Peroksidaz (GPx)	Ürat
Peroksidaz	Sistin
	Albümin
	Bilirubin
	Seruloplazmin
	Transferrin
	Laktoferrin
	Ferritin

Hidrojen peroksiti (H_2O_2), düşük oluşum hızlarında peroksidatik reaksiyonla, yüksek oluşum hızlarında ise katalitik reaksiyonla suya dönüştürerek temizler. GPx ise hidrojen peroksiti (H_2O_2) sadece katalitik reaksiyonla indirger. Organizmada hidroksil radikalini ($\cdot OH$) kontrol eden enzim sistemi yoktur. Kuvvetli okside edici potansiyeli nedeniyle hiç bir enzim kendisi oksidatif harabiyete uğramadan bu ürünü detoksifiye edemez. Bunun için canlı organizmadaki temel strateji SOD, CAT ve GPx aracılığıyla süperoksit ($O_2^{\cdot -}$) ve hidrojen peroksiti (H_2O_2) detoksifiye ederek daha toksik ürünlerin oluşumunu önceden önlemektir (Şekil 2.1) .



Şekil 2.1. Oksidatif metabolizma ve enzimatik antioksidanlar

Nonenzimatik antioksidanlar ise enzim sistemlerinin dışında antioksidan etki gösteren maddelerdir. Bunlar bazı makromoleküller (seruloplazmin, transferrin, hemoglobin, miyoglobin, ferritin), mikromoleküller (vitamin E, C ve A, ürik asit, glutatyon, N-asetil sistein, melatonin, metionin, kaptopril, ubiquinon, glukoz, bilirubin) ve bazı ilaçlar (rekombinant h-SOD, 21-aminosteroidler, demir şelatörleri, interlekin-1, ksantin oksidaz inhibitörleri, mannitol, barbitüratlar, karboksimetilsistein, trakeobronşial mukus, albumin ve taurin) olarak sıralanabilir. Daha çok hücre içinde etkili olan enzimatik antioksidanlara karşılık, nonenzimatik antioksidanlar ekstrasellüler mesafede de etkinlik gösterir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının ve Grupların Belirlenmesi:

Bu tez çalışması, GATA Araştırma Bilimsel Kurul Başkanlığı'nca 10/03/2006 tarihinde (AR-2006/31) kabul edildi ve Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 13 Ekim 2006 gün ve 2006/97 sayılı kararı ile onaylandı. Çalışmada, 308.0 ± 16.0 g ağırlıkta, toplam 66 adet Sprague-Dawley türü erkek rat kullanıldı. Deney hayvanları GATA - Araştırma ve Geliştirme Merkezi - Deney Hayvanları Bölümü'nden temin edilerek çalışma süresince aynı laboratuvar koşullarında tutuldu, ticari sıçan yemi ve normal musluk suyuyla beslendi.

Ratlar 'basit rasgele örnekleme' yöntemiyle toplam 9 gruba ayrıldı:

1. Doksorubisin Toksisite grubu (n=6)
2. Doksorubisin+ Melatonin grubu (n=8)
3. Doksorubisin+ MEG grubu (n=8)
4. Doksorubisin+ 1400w grubu (n=8)
5. Doksorubisin+Trastuzumab Toksisite grubu (n=6)
6. Doksorubisin+Trastuzumab+Melatonin grubu (n=8)
7. Doksorubisin+Trastuzumab+MEG grubu (n=8)
8. Doksorubisin+ Trastuzumab+1400w grubu (n=8)
9. Kontrol grubu (n=6) (Sadece intraperitoneal serum fizyolojik uygulanan grup)

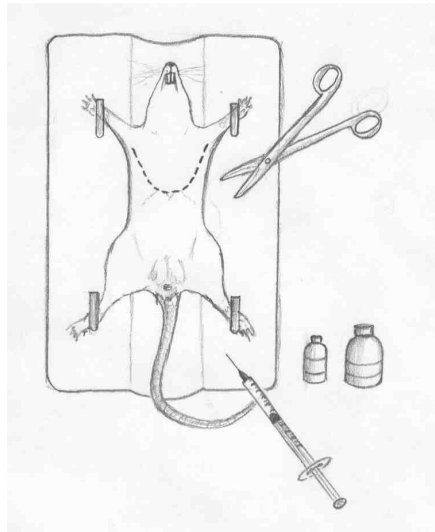
3.2. Deneyin uygulanması:

Ratlarda oluşturulacak kardiyotoksisite modelinde DOKS ve TRAST dozlarını tam olarak belirleyebilmek amacıyla çalışma öncesi üç deney yapıldı. Her deneyde 6 rat kullanılmak suretiyle kardiyotoksisite modelinde kullanılacak olan DOKS ve TRAST'ın 3 günlük süre içinde lethal doz 10 düzeyleri tespit edildi. Buna göre DOKS 20 mg/kg intraperitoneal tek doz, TRAST 10 mg/kg intraperitoneal tek doz

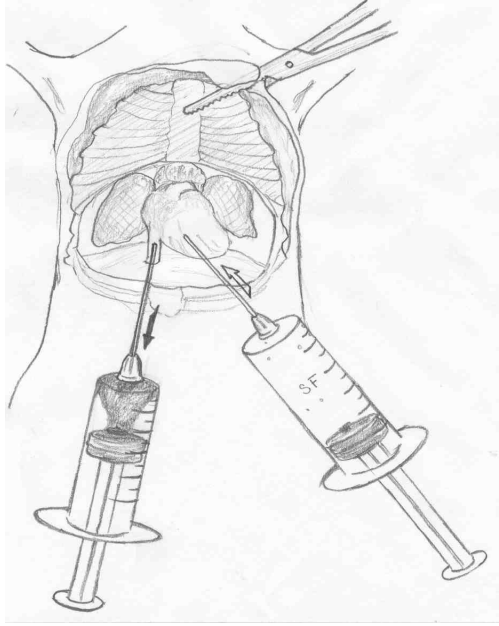
uygulamasına karar verildi. Gruplara ayrılan deney hayvanlarına 7 günlük aklimatizasyon sürecinden sonra DOKS 20 mg/kg tek doz intraperitoneal, TRAST 10 mg/kg tek doz intraperitoneal, MEL 10mg/kg oral 12 saatte bir 5 gün boyunca, MEG 10mg/kg intraperitoneal 12 saatte bir 5 gün boyunca ve 1400W 10mg/kg intraperitoneal 12 saatte bir 5 gün boyunca verildi (Tablo 3.1 ve Tablo 3.2) (2, 34, 61, 63).

İlaç uygulamaları sonlandırıldıktan sonra hayvanlar 5 mg/kg rompun+100 mg/kg ketamin kullanılarak anesteziye alındı. Diseksiyona başlamadan, hayvanların ayak parmakları pens ile sıkıştırılarak ağrı duyusunun tam olarak kaybolup kaybolmadığı kontrol edildi. Bu işlemde rattan herhangi bir tepki alınmadığı zaman anestezinin yeterli olduğuna karar verildi ve hayvan, küçük deney hayvanları için özel olarak yapılmış, bir diseksiyon masasına sırtüstü yatırılarak dört ayağından sabitlendi (Şekil 3.1).

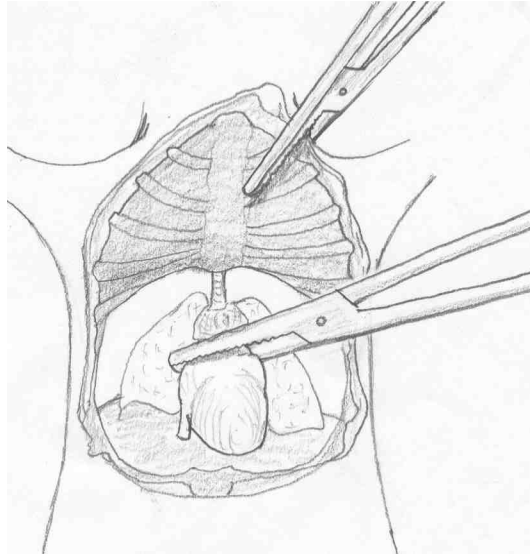
Hayvanın göğüs boşluğu açılarak kalp dokusunun ortaya çıkarılması sağlandıktan sonra vena cava inferiordan veya kalpten kan alınarak rutin biyokimya tüplerine konuldu (Şekil 3.2). Daha sonra kalp dokusu çıkarıldı (Şekil 3.3). Soğuk serum fizyolojik (%0,9'lük NaCl) içerisinde yıkanarak dışındaki kan artıklarından arındırıldı ve bir kısmı oksidan ve antioksidan parametreler için etiketlenmiş ependorf tüpleri içerisine konularak, işlem sonunda -80°C'de saklanmak üzere, sıvı nitrojen tankına kondu. Bir kısmı da histopatolojik inceleme için ise %10'luk formaldehit içerisine alındı.



Şekil 3.1. Deney hayvanına intraperitoneal ilaç enjeksiyonu



Şekil 3.2. Deney hayvanında kan örneğinin alınması



Şekil 3.3. Deney hayvanında kalbin eksizyonu

Tablo 3.1. Deney hayvanlarına DOKS, TRAST, MEL, MEG, 1400w'nin deney prosedüründeki uygulama saatleri

MEL veya MEG veya 1400W	MEL veya MEG veya 1400W	MEL veya MEG veya 1400W	MEL veya MEG veya 1400W DOKS veya DOKS+TRAST	MEL veya MEG veya 1400W	MEL veya MEG veya 1400W	MEL veya MEG veya 1400W	MEL veya MEG veya 1400W	MEL veya MEG veya 1400W	MEL veya MEG veya 1400W	Sakrifikasyon
-36. saat	-24. saat	-12. saat	0. saat	12. saat	24. saat	36. saat	48. saat	60. saat	72. saat	84. saat

Tablo 3.2. DOKS, TRAST, MEL, MEG, 1400W'nin deney boyunca uygulama şekli ve dozları

Uygulanan Kimyasal Ajan	Dozu	Uygulama şekli	Uygulama aralığı ve süresi
DOKS	20 mg/kg	intraperitoneal	tek doz
TRAST	10 mg/kg	intraperitoneal	tek doz
MEL	10 mg/kg/gün	oral	12 saat arayla, toplam 5 gün
MEG	10 mg/kg/gün	intraperitoneal	12 saat arayla, toplam 5 gün
1400 W	10 mg/kg/gün	intraperitoneal	12 saat arayla, toplam 5 gün

3.3. Çalışma Analizlerinin yapılması

3.3.1. Biyokimyasal analizler:

Oksidatif strese bağlı oluşan lipid peroksidasyonu düzeyinin tayini için MDA, antioksidan cevabın derecesinin belirlenmesi için SOD ve GPx'in kalp dokusu düzeylerinin ölçümü, kardiyak hasarın belirlenmesi için ise serum CK_{MB} ölçümü yapıldı. Kalp dokusunda oksidan ve antioksidan parametrelerin analizi ile elde edilecek sonuçların standart olarak ifade edilebilmesi için ek olarak doku protein düzeyleri de ölçüldü.

3.3.2. Doku homojenizasyonu:

Dokuların analizler için hazır hale getirilmesi gerektiğinden, dokular derin dondurucudan çıkarılarak çözünmesi sağlandıktan sonra 'fosfat tampon' ile $\frac{1}{9}$ hacim oranında karıştırılarak Heidolph diax 900 model homojenizatör ile homojenize edildi. Elde edilen homojenatın bir kısmı MDA ve protein ölçümleri için ayrıldı. Bir kısmı SOD, GPx ölçümünde kullanılmak üzere, +6 °C'de 3220 rpm hızında 30 dakika süreyle santrifüje edilerek süpernatantları alındı ve ependorflara kondu.

Fosfat tampon (50 mM); distile sudaki 6,8 g/l oranındaki KH₂PO₄ çözeltisi üzerine pH 7,4 olana kadar yine distile suda 7,1 g/l oranında çözünmüş Na₂HPO₄ ilave edilerek hazırlandı.

3.3.3. Protein ölçümü:

Lowry'nin tarif ettiği yöntem kullanıldı (67). MDA ve OH-prolin için homojenizatta, SOD için ekstraktta, GPx için süpernatantta protein miktarları ölçüldü.

Kullanılan Reaktifler:

Stok NaHCO₃; 0,1 mol/l NaOH içerisinde 2 g/dl Na₂CO₃ çözüldü.

Stok NaK tartarat solüsyonu; distile su içerisinde 2 g/dl NaK tartarat çözöldü.

Stok CuSO₄ solüsyonu; distile su içerisinde 1 g/dl CuSO₄ çözöldü.

A reaktifi; 98 birim stok NaCO₃, 1 birim stok NaK tartarat solüsyonu, 1 birim stok CuSO₄ solüsyonu karıştırıldı.

B reaktifi; 1 birim folin-ciocalteu fenol reaktifi eş miktarda distile su ile karıştırıldı.

1 g/dl ile 16 mg/dl arasında seri standartlar bovin serum albumin (BSA) ve distile su kullanılarak hazırlandı. 10µl örnek konmuş tüplere 90µl distile su eklendi. Kör çalışması için 2 adet tüpe 100'er µl distile su kondu. Standartların her birinden ise 100 µl kullanıldı.

Yapılan İşlem:

100µl örnek bulunan her tüpe 1 ml. A reaktifinden eklenerek 30 dk oda ısısında beklendi. Sonra her tüpe 100µl B reaktifinden eklendi. Tekrar 30 dk oda ısısında bekletildi ve "Helios epsilon" marka spektrofotometrede 595 nm dalga boyundaki absorbans değeri okundu. Bulunan değeri standart miktarlarda protein içeren karışımlara göre hazırlanan xy dağılım grafiğı ile karşılaştırılarak (kalibrasyon grafiğı) her bir örneğın içerdığı protein değerine ulaşıldı.

3.3.4. Malondialdehit ölçümü:

MDA ölçümü Okhawa ve arkadaşlarının tarif ettiğı yöntemle yapıldı (68).

Kullanılan reaktifler

% 10'luk triklorasetik asit (TCA)

% 0.675'lik tiyobarbitürik asit (TBA)

Yapılan işlem:

Ağızı kapaklı tüplere 2,5 ml %10' luk TCA ve 0,5 ml yara dokusu homojenatı konularak vorteksle karıştırıldı. Kör için ayrılan tüpe yara homojenizatı yerine 0,5 ml

distile su konuldu. 90 °C'lik sıcak su banyosunda 15 dakika inkübe edildikten sonra tüpler çeşme suyuyla yıkanarak soğutuldu. Daha sonra 3000 x g 'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi bittikten sonra oluşan süpernatantlardan 2 ml alınarak üzerine % 0.675'lik TBA eklenip vorteks yardımı ile karıştırıldı. Tüplerin ağzı kapatılarak 90 °C'lik sıcak su banyosunda 15 dakika tekrar inkübe edildi. Sıcak su banyosundan çıkarılan tüpler çeşme suyuyla yıkanarak soğutulan tüpler 532 nm'de "Helios epsilon" marka spektrofotometre cihazında köre karşı okundu. TBA-MDA kompleksinin ekstinksiyon katsayısından ($1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) yararlanılarak nmol / mL cinsinden MDA değerleri hesaplandı.

3.3.5. Total süperoksit dismutaz ölçümü:

SOD aktivitesi Sun ve arkadaşları tarafından tarif edilen yöntemle ölçüldü (69). SOD ölçümü için gereken ekstraktlar şu şekilde elde edildi; Homojenatlar 3220 rpm'de 30 dakika +6 °C soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Süpernatant 1:1 oranında kloroform/etanol (3:5 oranında) ilavesi yapılarak vorteks cihazı yardımı ile karıştırıldı. Bu tüpler, 3220 rpm' de 40 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ekstrakt dediğimiz üste kalan sıvı SOD ölçümü için kullanıldı.

Kullanılan Reaktifler

0.3 mmol/l Xantine

0.6 mmol/l EDTA (2 sodyum tuzu)

150 µmol/l nitro blue tetrazolium (NBT)

1g/l BSA

400 mmol/l Na_2CO_3

Yukarıda hazırlanan kimyasal çözeltilerin hepsi karıştırılarak ASSAY reaktifi elde edildi.

0.8 mmol/l CuCl_2

2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

167 U/l Xantine Oxidase (XO)

Tüm bu reaktifler hazırlandıktan sonra aşağıdaki çizelgede belirtilen oranlarda karıştırıldı.

	Kör (mL)	Numune (mL)
ASSAY reaktifi	2.85	2.85
Ekstrakt numune	-	0.10
Bidistile su	0.10	-
167 U/L XO	0.05	0.05

Bu işlemden sonra 25 °C' de 20 dakika inkübasyondan hemen sonra 0.08 mmol/L olarak hazırladığımız CuCl_2 çözeltisinden tüm tüplere 1 ml eklendi. Daha sonra "Helios epsilon" marka spektrofotometre cihazında 560 nm dalga boyunda distile suya karşı absorbands sıfırlanarak körün ve numunelerin absorbands değerleri okundu.

Bulunan absorbands değerleri aşağıdaki formülde yerine konarak SOD miktarı hesaplandı.

$$(((K - N)/N) \times D \times 20) / E = \text{SOD miktarı U/mg}$$

K =körün absorbandsı N= numune absorbandsı D= dilüsyon miktarı

E= ekstrakt protein miktarı mg/ml

3.3.6. Glutatyon peroksidaz ölçümü:

GPx aktivitesi düzeylerinin ölçümü Paglia'nın tarif ettiği yöntemle yapıldı (70).

Kullanılan Reaktifler

GPx tamponu: pH=7'de 50mM'lık fosfat tamponu içinde 5 mM EDTA konsantrasyonu olacak şekilde hazırlandı.

3.2 M Amonyum Sülfat: Distile suda çözöldü.

150 mM redökte Glutasyon (GSH): GPx tamponunda çözöldü.

8 mM redökte NADPH: GPx tamponunda çözöldü.

1 M Sodyum Azid: GPx tamponunda çözöldü.

GSH-Redöktaz enzimi: 1.5 ml 3.2 M amonyum sülfat solösyonu içine 50 µl glutasyon redöktaz katılarak hazırlandı.

Reaktifler hazırlandıktan sonra aşğıdaki çizelgede belirtilen oranlarda karıştırdı.

KULLANILAN REAKTİF	KONULAN MİKTAR (ml)
Fosfat tamponu (pH 7, 50 mM) 5 mM EDTA'lı	2.650
150 mM Redökte GSH	0.100
8 mM NADPH	0.100
GSH-Redöktaz	0.010
1 M NaN ₃ (sodyum azid)	0.010
Numune (süpernatant)	0.020

Bu işlemden sonra 30 dakika oda ısısında bekletildi. 2mM hidrojen peroksit 100 µl katılarak karıştırdılan solösyon 340 nm ayarlanmış "Helios epsilon" marka spektrofotometre cihazında absorbanlar 5 dakika süreyle 15'er saniye arayla kaydedildi. Lineer aktivite azalışının olduğı absorbans aralığının 1 dakikalık süresi esas alınarak hesap yapıldı. Bulunan değler aşğıda belirtilen formöle koyularak GPx miktarı hesaplandı.

$$((A1-A2/T) \times D \times 24100) / P \times 1000 = \text{GPx miktarı U/mg protein}$$

A1= ilk okunan absorbans A2= 1 dakika sonra okunan absorbans

T= zaman D= dilösyon miktarı P= süpernatant protein mg/ml

3.3.7. Rutin biyokimyasal analizler:

Alınan serumlarda (rutin biyokimya tüplerine alınmasından hemen sonra taze olarak) AU-2700 Otoanalizör (Olympus, Tokyo, Japan) cihazında CK_{MB} seviyesi ölçüldü.

3.3.8. Histopatolojik analizler:

Kalp örnekleri 24 saat boyunca %10'luk tamponlu formalinde fikse edildi. Rutin histopatolojik takip sonrasında parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler hazırlandı. Kesitler Hematoksilen Eozin ile boyandı.

Histopatolojik incelemede;

- Miyokardiyal kas lifi şişmesi ve interstisyel ödem,
- Miyokardiyal kas liflerindeki disorganizasyon
- Miyokardiyal kas lifi nekrozu
- Miyokardiyal kas liflerindeki vakuolizasyon değerlendirildi.

Yukarıdaki veriler kullanılarak patolojik veriler 0 ila 4 arasında skorlanarak değerlendirildi. Skorlama 0= patolojik bulgu yok, 1= patolojik bulguların görüldüğü alan incelenen alanın < %25, 2= patolojik bulguların görüldüğü alan incelenen alanın %25-50, 3= patolojik bulguların görüldüğü alan incelenen alanın %50-75, 4= patolojik bulguların görüldüğü alan incelenen alanın %75-100'ü olarak yapıldı (71). Gruplar arasındaki fark değerlendirildi.

3.3.9. İstatistiksel analizler:

Tüm istatistiksel analizler SPSS11.0 (SPSSFW, SPSS Inc., Chicago, IL., USA) istatistik paket programı ile yapıldı. Önce "Kruskal wallis" testi ile analiz yapıldıktan sonra, anlamlı sonuç veren grupların ikişerli olarak karşılaştırılmalarında denek sayısına uygun olarak nonparametrik bir yöntem olan "Mann Whitney-U" testi kullanıldı. Sonuçta $p < 0.05$ bulunduğunda sonuç anlamlı olarak kabul edildi.

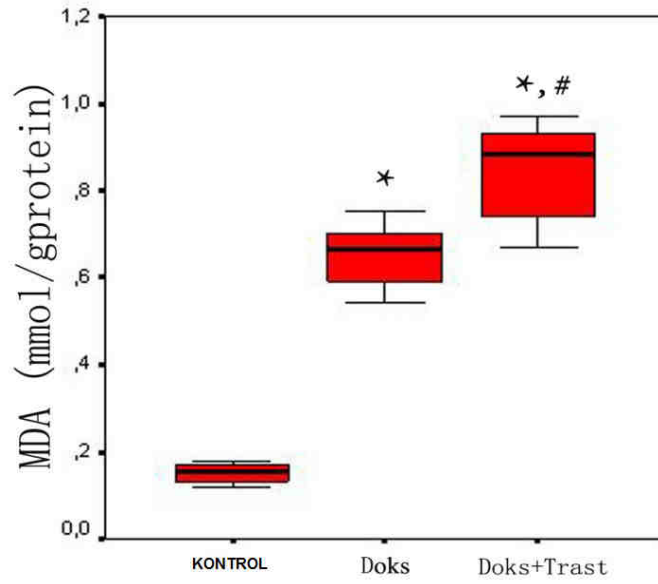
4. BULGULAR

4.1. Genel klinik değerlendirme:

Genel klinik değerlendirmede 5 günlük süre içinde kontrol grubuna göre bütün gruplarda rat başına ortalama 34-53 g ağırlık azalması kaydedildi. Ratlar sakrifikasyon öncesi gözlenerek fiziksel aktiviteleri kaydedildi, elle yapılan uyarılara dirençleri ve refleksleri gözlemlendi. Ölüm öncesi tabloda olan veya uyarılara çok zayıf cevap veren ve yavaş hareket eden ratlar kötü klinik durumda olarak değerlendirildi. Elle yapılan uyarılara kaçma şeklinde cevap veren, refleksleri iyi olan ve hızlı hareket eden ratlar iyi klinik durumda olarak değerlendirildi. Kardiyotoksisite oluşturulduktan sonra 84 saat içinde ölen ratlar kaydedildi. Klinik olarak kötü durumda olan rat oranı DOKS toksisite grubunda %50 oranında saptandı. DOKS+MEL, DOKS+MEG, DOKS+1400w tedavi kollarında kötü klinik durumda olan ratların oranı daha az olarak gözlemlendi (%12,5, %25, %37,5). DOKS+TRAST gruplarında genel klinik durumun kötü olma oranı %50-66 arasında değişmekteydi. Grupların incelenmesinde klinik olarak kötü olan ratların oranı sadece DOKS kardiyotoksisitesi oluşturulup tedavi edilen gruplarda daha az orandaydı. Kontrol grubu ve DOKS ve DOKS+tedavi kollarında mortalite saptanmazken, DOKS+TRAST ve tedavi kollarında %0-25 oranında mortalite saptandı (Tablo 4.5).

Tablo 4.1. Deney hayvanlarına ait klinik gözlemlerin değerlendirilmesi

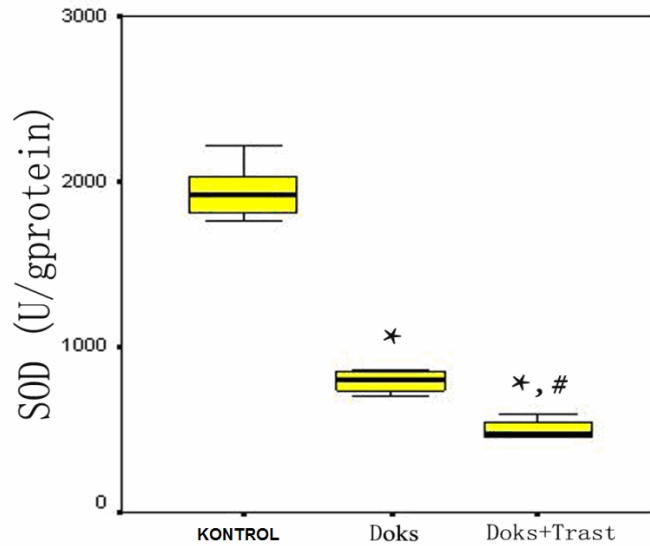
Gruplar	Başlangıç ortalama ağırlık (g)	Ortalama ağırlık kaybı/ artışı (g)	Klinik gözlemde kötü olan ratların oranı (%)	Mortalite oranı (%)
Kontrol	296±12	+3	0	0
DOKS	316±15	-53	50	0
DOKS+MEL	300±14	-40	12,5	0
DOKS+MEG	287±10	-30	25	0
DOKS+1400w	293±17	-48	37,5	0
DOKS+TRAST	288±20	-34	66	16
DOKS+TRAST+MEL	298±16	-36	50	12,5
DOKS+TRAST+MEG	300±15	-35	57	25
DOKS+TRAST+1400w	295±13	-43	50	0



Şekil 4.1. Kontrol, DOKS ve DOKS+TRAST kollarında kalp dokusunda MDA düzeyleri

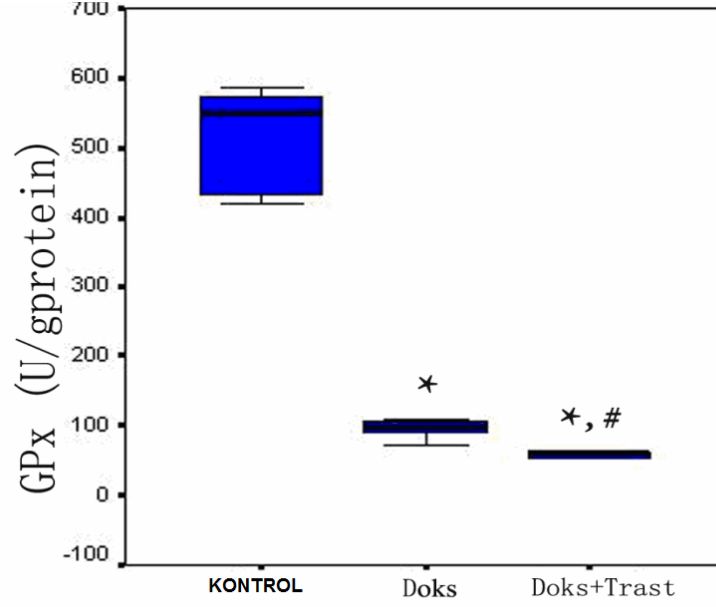
4.2. Kalp dokusunda MDA, SOD ve GPx değerleri:

Kalp dokusunda MDA düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna göre DOKS ve DOKS+TRAST gruplarında anlamlı artma dikkati çekti ($p < 0.01$). DOKS ile DOKS+TRAST kıyaslandığında kardiyotoksitenin DOKS+TRAST kolunda daha belirgin olduğu görüldü ve MDA düzeylerinin anlamlı olarak arttığı dikkati çekti (0.152 ± 0.023 vs 0.653 ± 0.078 , 0.847 ± 0.117 mmol/g protein $p < 0.05$) (Şekil 4.1).



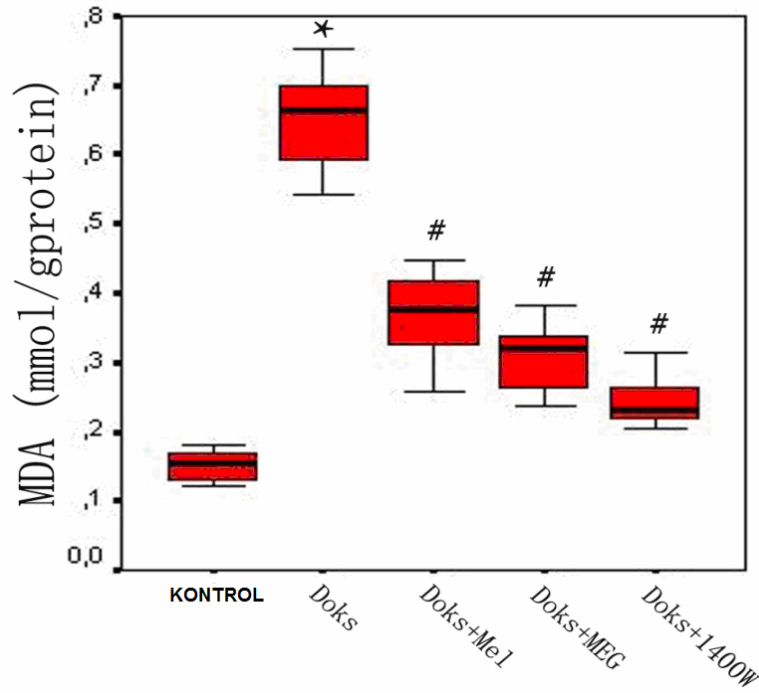
Şekil 4.2. Kontrol, DOKS ve DOKS+TRAST kollarında kalp dokusunda SOD düzeyleri

Kalp dokusunda SOD düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna göre DOKS ve DOKS+TRAST gruplarında anlamlı azalma dikkati çekti ($p < 0.01$). DOKS ile DOKS+TRAST kıyaslandığında kardiyotoksisitenin DOKS+TRAST kolunda daha belirgin olduğu görüldü ve SOD düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı dikkati çekti (1940.80 ± 164.12 vs 791.67 ± 65.49 , 475.50 ± 98.08 U/g protein $p < 0.05$) (Şekil 4.2).



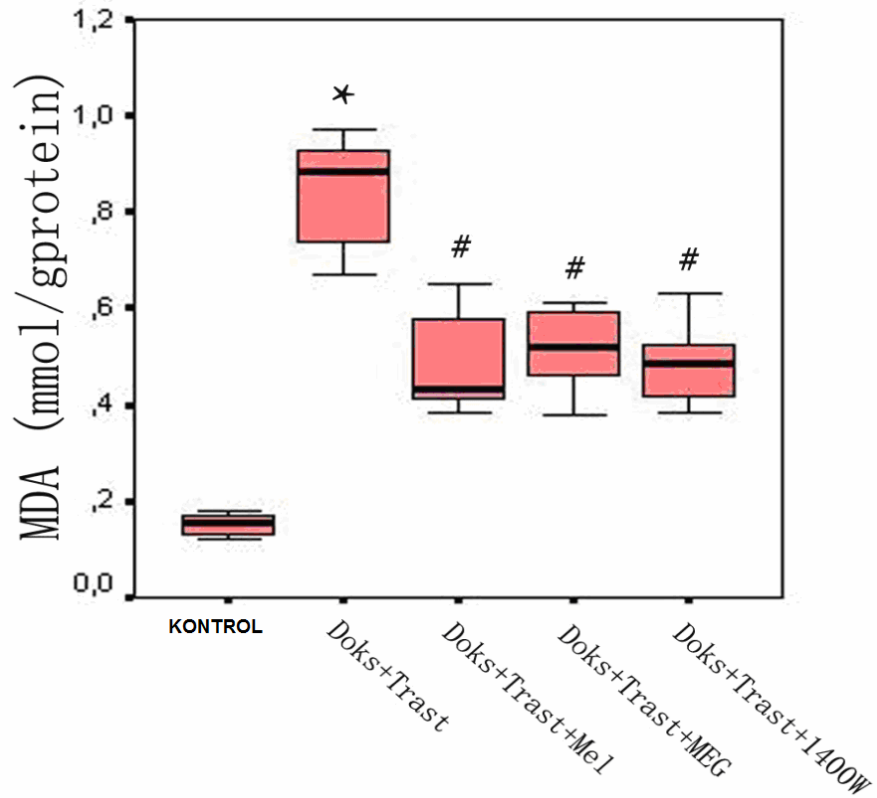
Şekil 4.3. Kontrol, DOKS ve DOKS+TRAST kollarında kalp dokusunda GPx düzeyleri

Kalp dokusunda GPx düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna göre DOKS ve DOKS+TRAST gruplarında anlamlı azalma dikkati çekti ($p < 0.01$). DOKS ile DOKS+TRAST kıyaslandığında kardiyotoksisitenin DOKS+TRAST kolunda daha belirgin olduğu görüldü ve GPx düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı dikkati çekti (519.03 ± 74.98 vs 95.50 ± 14.09 , 57.82 ± 19.26 U/g protein $p < 0.05$) (Şekil 4.3).



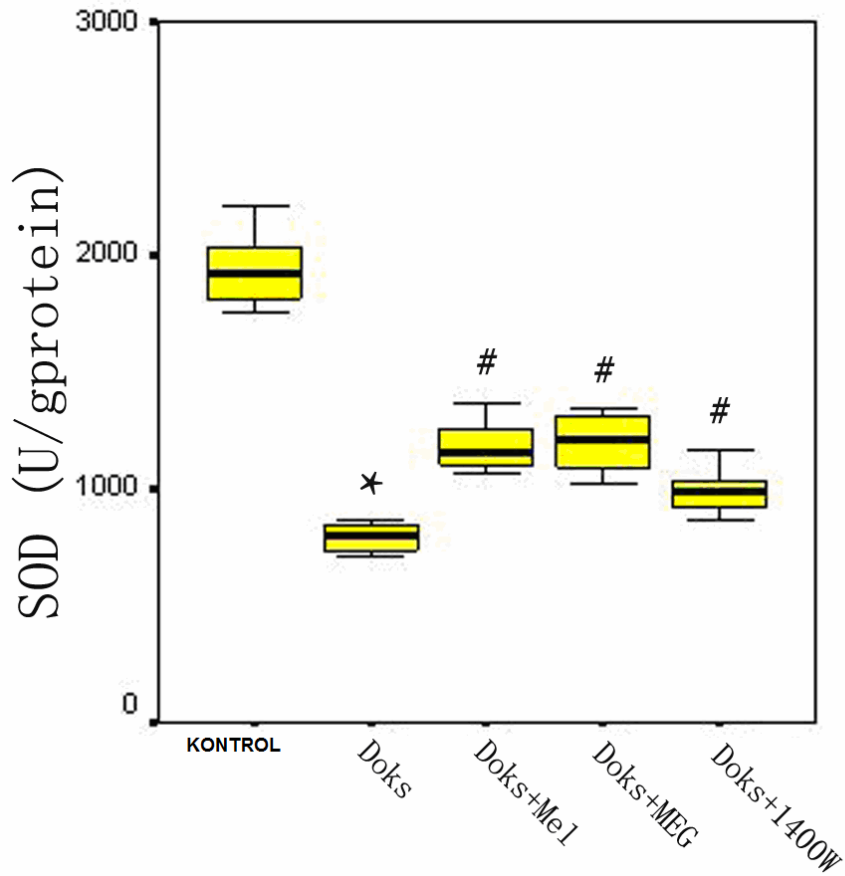
Şekil 4.4. Kontrol ve DOKS kollarında kalp dokusunda MDA düzeyleri

Kalp dokusunda MDA düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna göre gruplarda anlamlı artma dikkati çekti ($p < 0.01$). Ancak kontrol grubu olan DOKS ile tedavi kolları olan DOKS+MEL, DOKS+MEG, DOKS+1400W grupları karşılaştırıldığında tedavi kollarında MDA düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı dikkati çekti (0.653 ± 0.078 vs 0.368 ± 0.066 , 0.307 ± 0.048 , 0.244 ± 0.039 mmol/gprotein $p < 0.05$). Tedavi kolları birbirleri ile kıyaslandığında DOKS+1400W grubunda kalp MDA düzeylerinin DOKS+MEL ve DOKS+MEG gruplarına göre daha düşük olduğu görüldü ($p < 0.05$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.5. Kontrol, DOKS ve TRAST kollarında kalp dokusunda MDA düzeyleri

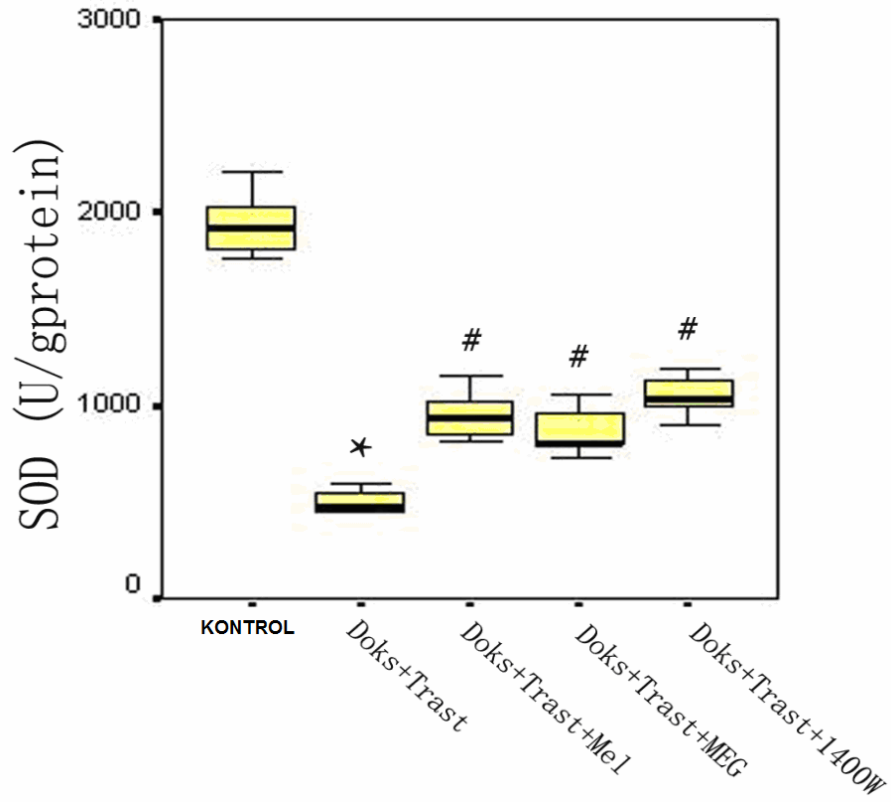
Kalp dokusunda MDA düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna göre gruplarda anlamlı artma dikkati çekti ($p < 0.01$). Kontrol grubu olan DOKS+TRAST ile tedavi kolları olan DOKS+TRAST+MEL, DOKS+TRAST+MEG, DOKS+TRAST+1400W karşılaştırıldığında tedavi kollarında MDA düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı dikkati çekti (0.847 ± 0.117 vs 0.494 ± 0.110 , 0.513 ± 0.095 , 0.484 ± 0.078 mmol/gprotein, $p > 0.05$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.6. Kontrol ve DOKS kollarında kalp dokusunda SOD düzeyleri

Kalp dokusunda SOD düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna göre gruplarda anlamlı azalma dikkati çekti ($p < 0.01$). Kontrol grubu olan DOKS ile tedavi kolları olan DOKS+MEL, DOKS+MEG, DOKS+1400W karşılaştırıldığında tedavi kollarında SOD düzeylerinin anlamlı olarak arttığı dikkati çekti (791.67 ± 65.49 vs 1179.84 ± 105.92 , 1266.93 ± 270.28 , 991.80 ± 100.53 U/ gprotein, $p < 0.05$).

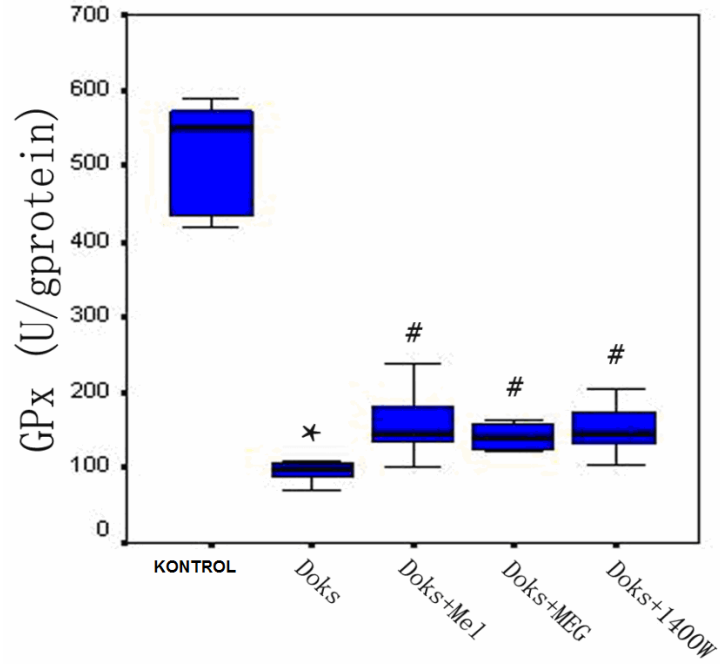
Tedavi kolları birbirleri ile kıyaslandığında DOKS+MEG grubunda kalp SOD değerleri DOKS+1400W grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.7. Kontrol, DOKS ve TRAST kollarında kalp dokusunda SOD düzeyleri

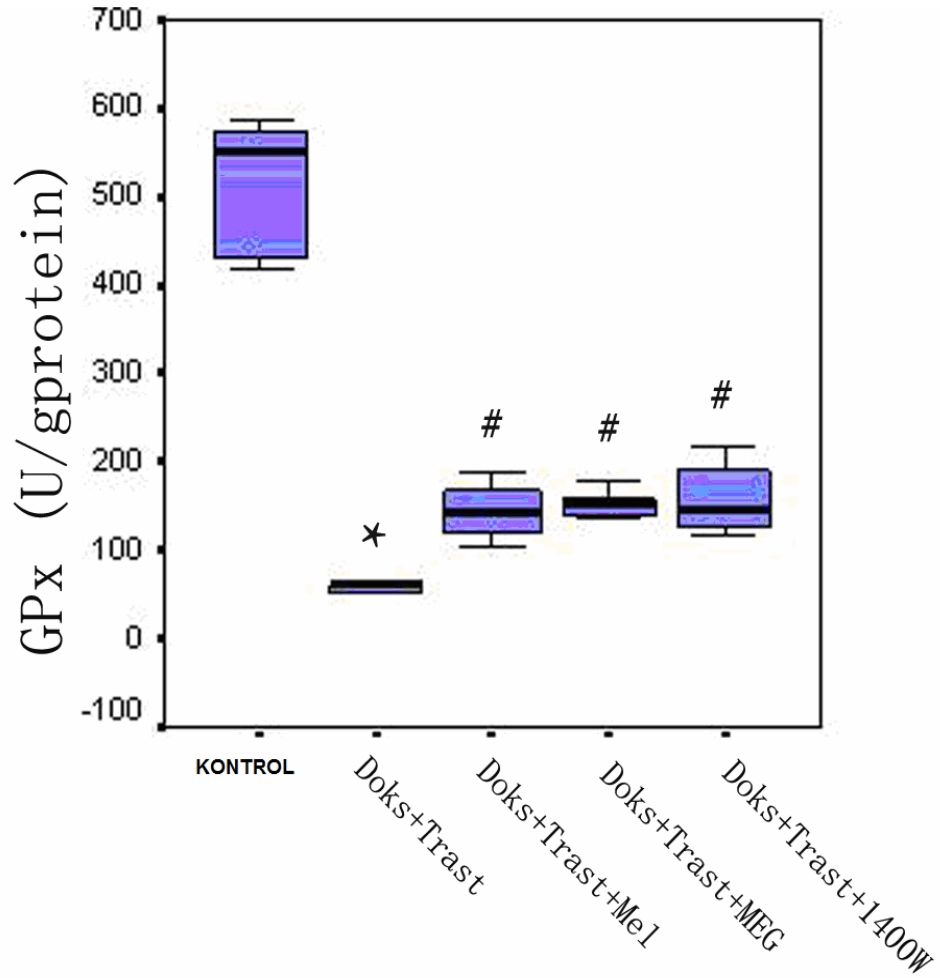
Kalp dokusunda SOD düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna göre gruplarda anlamlı azalma dikkati çekti ($p < 0.01$). Kontrol grubu olan DOKS+TRAST ile tedavi kolları olan DOKS+TRAST+MEL, DOKS+TRAST+MEG, DOKS+TRAST+1400W karşılaştırıldığında tedavi kollarında SOD düzeylerinin anlamlı olarak arttığı dikkati çekti (475.50 ± 98.08 vs 950.19 ± 128.17 , 869.74 ± 132.12 , 1052.30 ± 94.02 U/ gprotein, $p < 0.05$).

Tedavi kolları birbirleri ile kıyaslandığında DOKS+TRAST+1400W grubunda kalp SOD değerleri DOKS+TRAST+MEG grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.8. Kontrol ve DOKS kollarında kalp dokusunda GPx düzeyleri.

Kalp dokusunda GPx düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna göre karşılaştırılan gruplarda anlamlı azalma dikkati çekti ($p < 0.01$). Kontrol grubu olan DOKS ile tedavi kolları olan DOKS+MEL, DOKS+MEG, DOKS+1400W karşılaştırıldığında tedavi kollarında GPx düzeylerinin anlamlı olarak arttığı dikkati çekti (95.50 ± 14.09 vs 157.33 ± 42.10 , 141.72 ± 17.96 , 152.20 ± 35.32 U/ gprotein, $p < 0.05$). Tedavi kolları birbirleri ile kıyaslandığında fark saptanmadı ($p > 0.05$) (Şekil 4.8).



Şekil 4.9. Kontrol, DOKS ve TRAST kollarında kalp dokusunda GPx düzeyleri

Kalp dokusunda GPx düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna göre karşılaştırılan gruplarda anlamlı azalma dikkati çekti ($p < 0.01$). Kontrol grubu olan DOKS+TRAST ile tedavi kolları olan DOKS+TRAST+MEL, DOKS+TRAST+MEG, DOKS+TRAST+1400W karşılaştırıldığında tedavi kollarında GPx düzeylerinin anlamlı olarak arttığı dikkati çekti (57.82 ± 19.26 vs 144.43 ± 31.88 152.94 ± 17.17 , 158.21 ± 37.08 U/gprotein, $p < 0.05$). Tedavi kolları birbirleri ile kıyaslandığında DOKS+TRAST+1400W grubunda kalp GPx düzeylerinin DOKS+TRAST+MEL grubuna göre daha yüksek bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 4.9).

Tablo 4.2. Kalp dokusu oksidan/antioksidan parametreleri (Ortalama±Standart sapma)

Gruplar	MDA (mmol/gprotein)	SOD (U/gprotein)	GPx (U/gprotein)
Kontrol	0.152±0.023	1940.80±164.12	519.03±74.98
DOKS	0.653±0.078 *	791.67±65.49 *	95.50±14.09 *
DOKS+MEL	0.368±0.066 * #	1179.84±105.92 * #	157.33±42.10 * #
DOKS+MEG	0.307±0.048 * # ∞	1266.93±270.28 * #	141.72±17.96 * #
DOKS+1400w	0.244±0.039 * # ∞ Δ	991.80±100.53 * # ∞ Δ	152.20±35.32 * #

* p< 0.01 Kontrol grubuna göre anlamlı azalma veya artma

p< 0.05 Deney gruplarında DOKS grubuna göre anlamlı azalma veya artma

∞ p< 0.05 DOKS+MEL grubuna göre diğer deney gruplarında anlamlı azalma veya artma

Δ p< 0.05 DOKS+MEG grubuna göre DOKS+1400w grubunda anlamlı azalma veya artma

Tablo 4.3. Kalp dokusu oksidan ve antioksidan parametreleri (Ortalama±Standart Sapma)

Gruplar	MDA (mmol/gprotein)	SOD (U/gprotein)	GPx (U/gprotein)
Kontrol	0.152±0.023	1940.80±164.12	519.03±74.98
DOKS+TRAST	0.847±0.117 * #	475.50±98.08 * #	57.82±19.26 * #
DOKS+TRAST+MEL	0.494±0.110 * #	950.19±128.17 * #	144.43±31.88 * #
DOKS+TRAST+MEG	0.513±0.095 * #	869.74±132.12 * #	152.94±17.17 * #
DOKS+TRAST+1400w	0.484±0.078 * #	1052.30±94.02 * # Δ	158.21±37.08 * # Δ

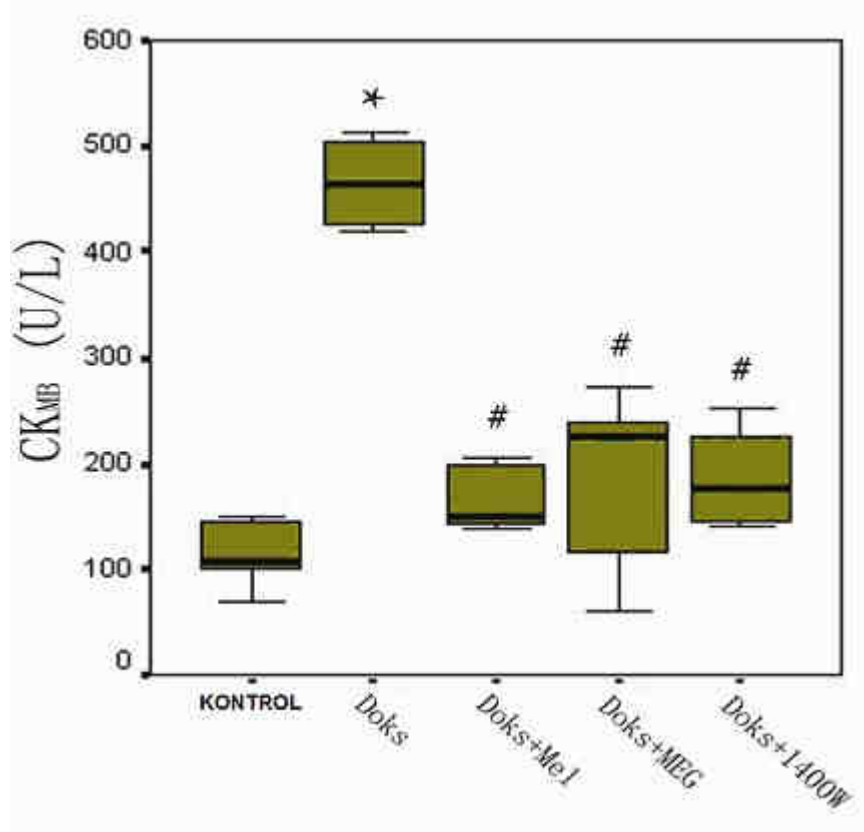
* p< 0.01 Kontrol grubuna göre anlamlı azalma veya artma

p< 0.05 Deney gruplarında DOKS+Her grubuna göre anlamlı azalma veya artma

Δ p< 0.05 DOKS+MEL grubuna göre DOKS+1400w grubunda anlamlı azalma veya artma

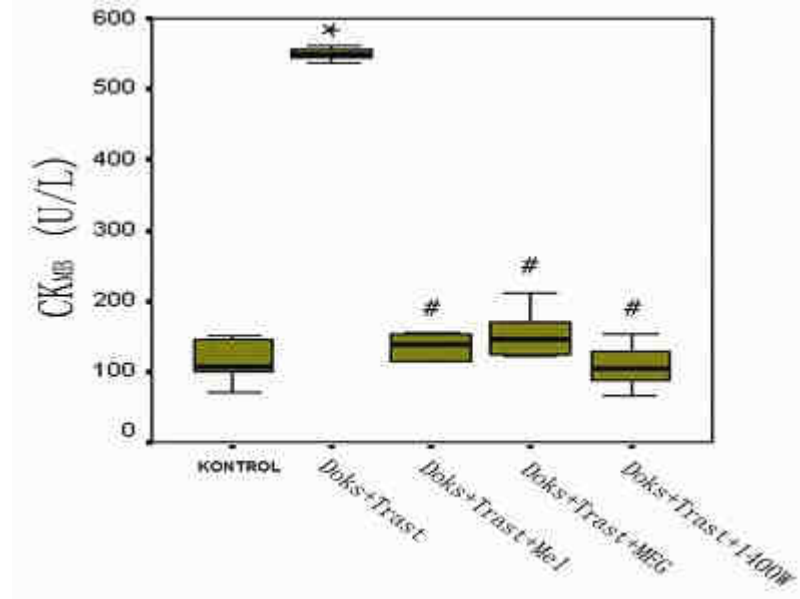
4.3. Biyokimyasal parametrelerin incelenmesi:

Serumda CKMB düzeyleri incelendiğinde Kontrol grubuna göre sadece DOKS kontrol grubunda anlamlı artma dikkati çekti ($p < 0.01$).



Şekil 4.10. Kontrol ve DOKS kollarında serum CKMB düzeyleri

Kontrol grubu olan DOKS ile tedavi kolları olan DOKS+MEL, DOKS+MEG, DOKS+1400W karşılaştırıldığında tedavi kollarında CKMB düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı dikkati çekti (464.00 ± 45.99 vs 165.00 ± 29.92 , 182.00 ± 87.12 , 186.50 ± 50.80 U/L, $p < 0.05$). Tedavi kolları birbirleri ile kıyaslandığında fark saptanmadı ($p > 0.05$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.11. Kontrol, DOKS ve TRAST kollarında serum CKMB düzeyleri

Serumda CKMB düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna göre karşılaştırılan gruplarda anlamlı artma dikkati çekti ($p < 0.01$). Kontrol grubu olan DOKS+TRAST ile tedavi kolları olan DOKS+TRAST+MEL, DOKS+TRAST+MEG, DOKS+TRAST+1400W karşılaştırıldığında tedavi kollarında CKMB düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı dikkati çekti (549.00 ± 12.53 , 135.40 ± 20.32 , 155.60 ± 37.65 , 108.17 ± 30.63 U/L, $p < 0.05$). Tedavi kolları birbirleri ile kıyaslandığında fark saptanmadı ($p > 0.05$) (Şekil 4.11).

Tablo 4.4. DOKS gruplarında serum CKMB düzeyleri (Ortalama $\pm$ Standart Sapma)

Gruplar	CK _{MB} (U/L)
Kontrol	115,00 $\pm$ 33,75
DOKS	464,00 $\pm$ 45,99 *
DOKS+MEL	165,00 $\pm$ 29,92 #
DOKS+MEG	182,00 $\pm$ 87,12 #
DOKS+1400w	186,50 $\pm$ 50,80 #

* $p < 0.05$ Kontrol grubuna göre anlamlı azalma veya artma

$p < 0.05$ Deney gruplarında DOKS grubuna göre anlamlı azalma veya artma

Tablo 4.5. DOKS ve TRAST gruplarında serum CKMB düzeyleri (Ortalama±Standart Sapma)

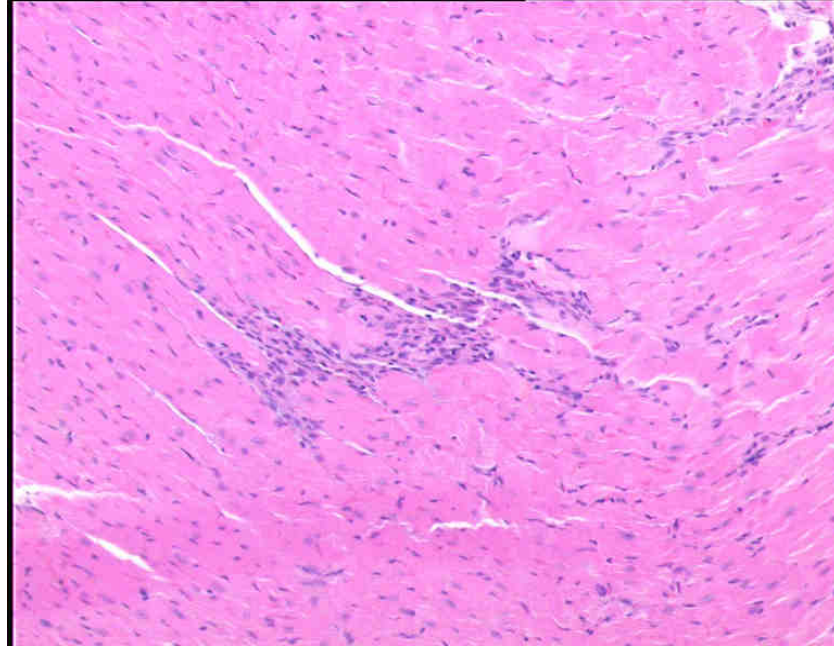
Gruplar	CK _{MB} (U/L)
Kontrol	115,00±33,75
DOKS+TRAST	549,00±12,53 *
DOKS+ TRAST +MEL	135,40±20,32 #
DOKS+ TRAST +MEG	155,60±37,65 #
DOKS+ TRAST +1400w	108,17±30,63 #

* p< 0.05 Kontrol grubuna göre anlamlı azalma veya artma

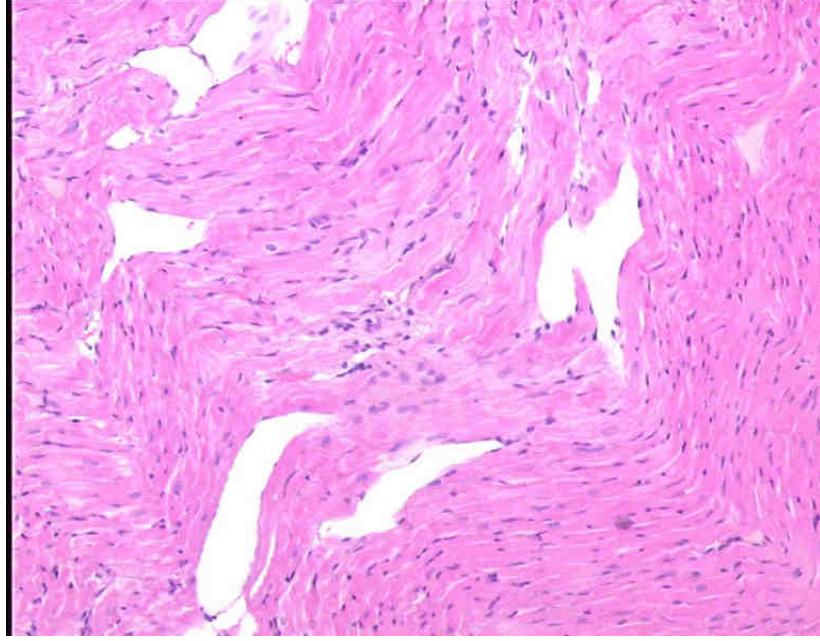
p< 0.05 Deney gruplarında DOKS+TRAST grubuna göre anlamlı azalma veya artma

4.4. Histopatolojik inceleme:

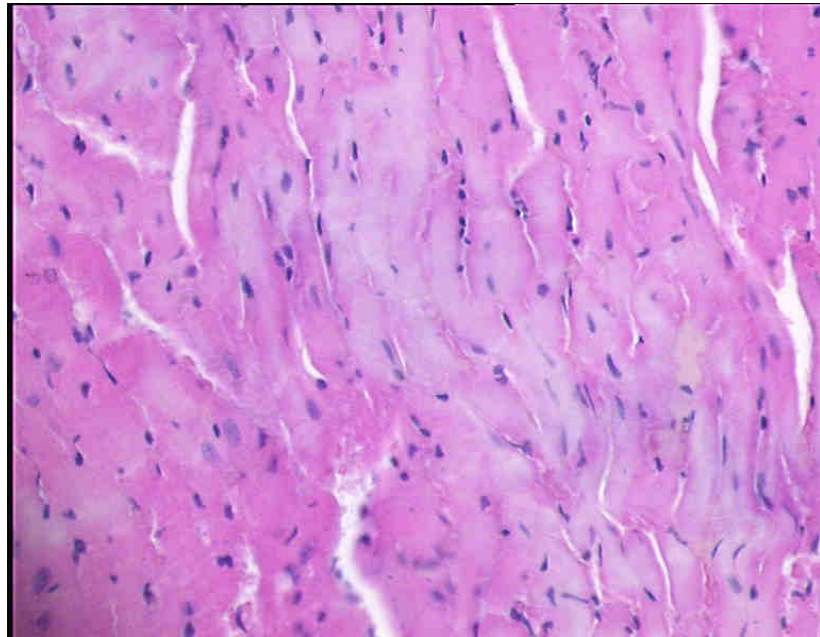
Toksisite grupları olan DOKS ve DOKS+TRAST gruplarına ait ratların kalp örneklerindeki morfolojik görünüm benzerdi. Bu gruplardaki en çarpıcı ve diğer tedavi gruplarında görülmeyen bulgu inflamatuvar hücre infiltrasyonu odakları ve kalp dokusunda tek lif nekrozu odaklarının görülmesiydi (Resim 4.1, 4.2, 4.3). Ayrıca, bu örneklerde interstisyel ödem (Resim 4.4), kas liflerinde disorganizasyon (Resim 4.5) ve vakuolizasyon da izlendi.



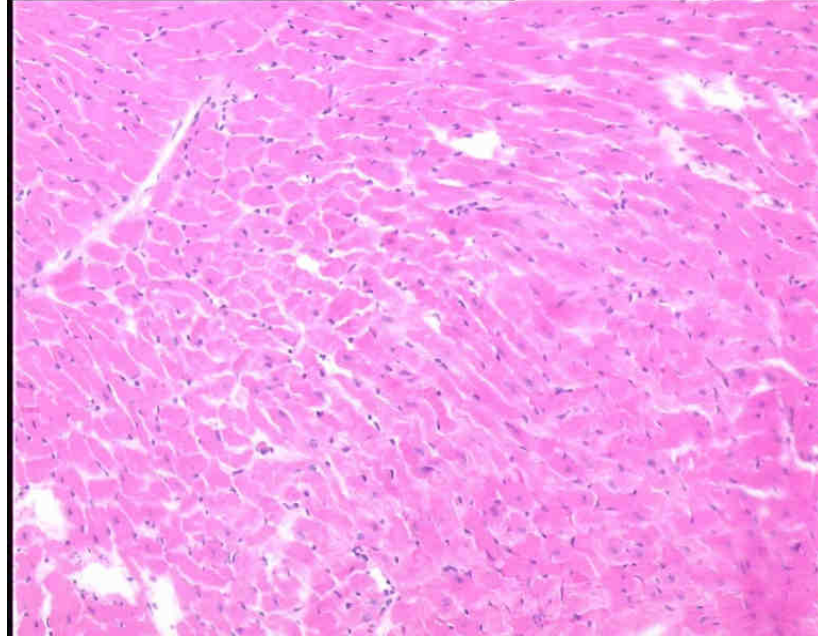
Resim 4.1. DOKS grubuna ait kalp örneğinde inflamatuvar hücre infiltrasyonu odağı.



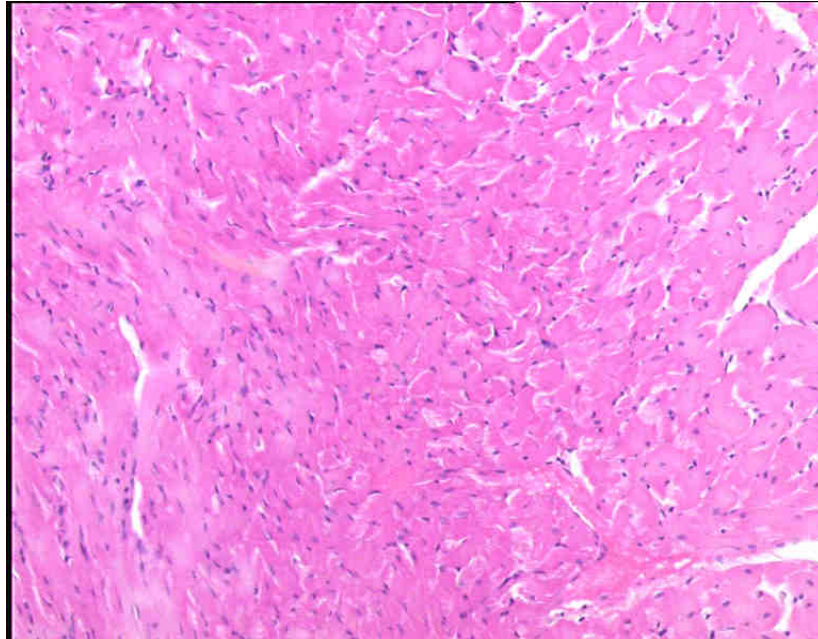
Resim 4.2. DOKS+TRAST grubuna ait kalp örneğinde inflamatuvar hücre infiltrasyonu odağı.



Resim 4.3. DOKS+TRAST grubuna ait ratın kalp örneğinde tek lif nekrozu.



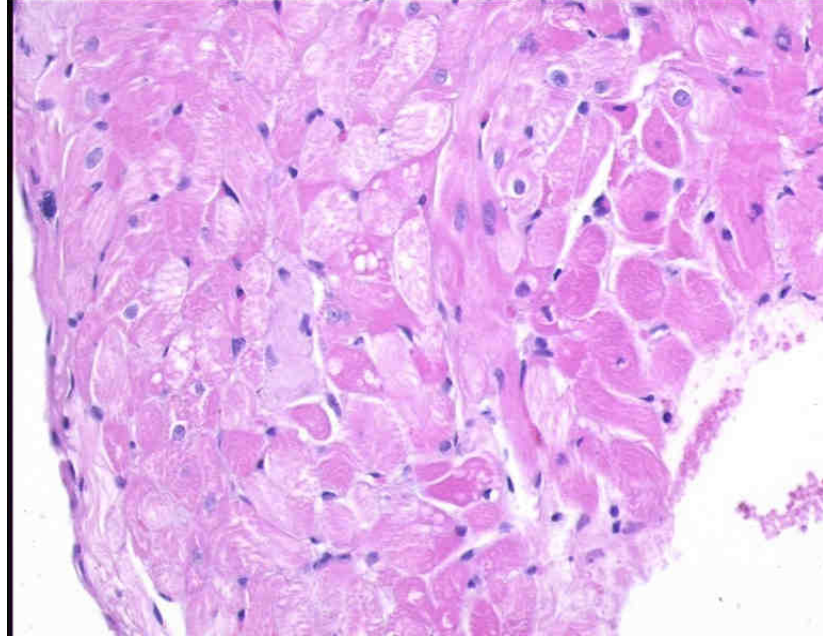
Resim 4.4. DOKS+TRAST grubuna ait ratın kalp örneğinde interstisyel ödem.



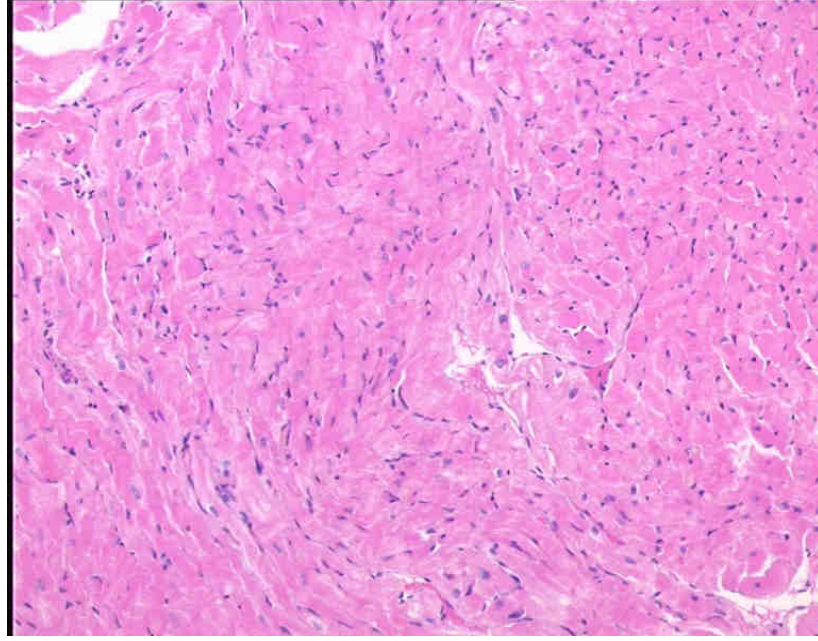
Resim 4.5. DOKS grubuna ait ratın kalp dokusunda kas liflerinde disorganizasyon.

Tedavi grubu olan DOKS+MEL, DOKS+MEG, DOKS+1400W, DOKS+TRAST+MEL, DOKS+TRAST+MEG, DOKS+TRAST+1400W gruplarına ait

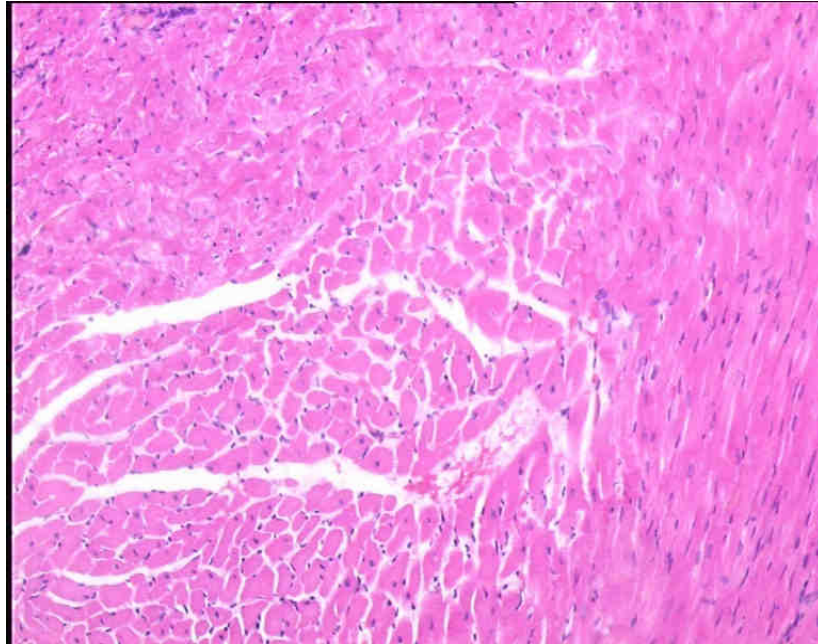
ratların kalp örneklerinde, nekroz ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu haricindeki diğer bulgular görüldü. Vakuolizasyon (Resim 4.6), kas liflerindeki disorganizasyon (Resim 4.7) ve interstisyel ödem (Resim 4.8) toksisite gruplarında görülen bulgulara göre daha hafif görünümdeydi. Kontrol grubuna ait kalp örnekleri normal görünümdeydi (Resim 4.9).



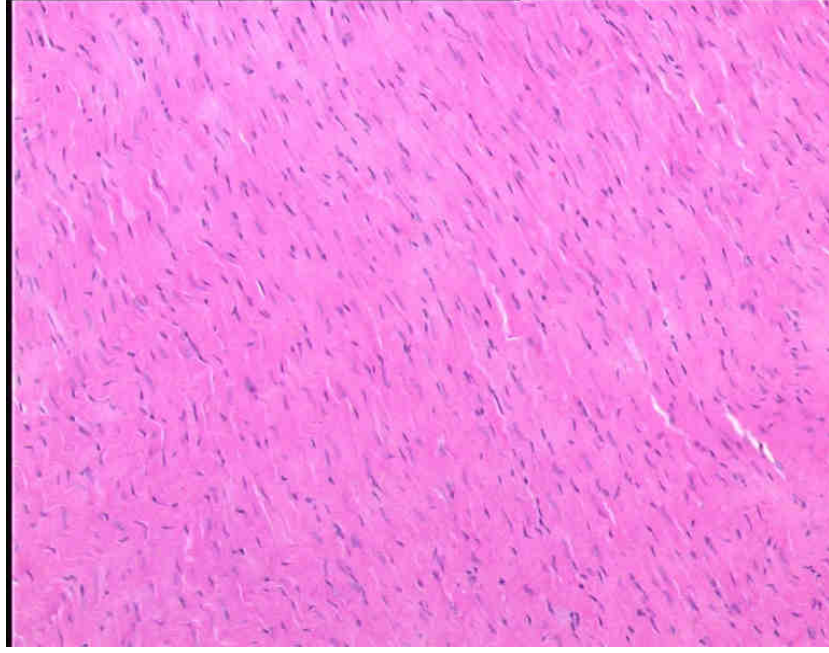
Resim 4.6. DOKS+1400w grubundaki rata ait kalp dokusunda kas liflerinde vakuolizasyon.



Resim 4.7. DOKS+MEL grubundaki rat kalbinde kas liflerindeki hafif düzeyde disorganizasyon.

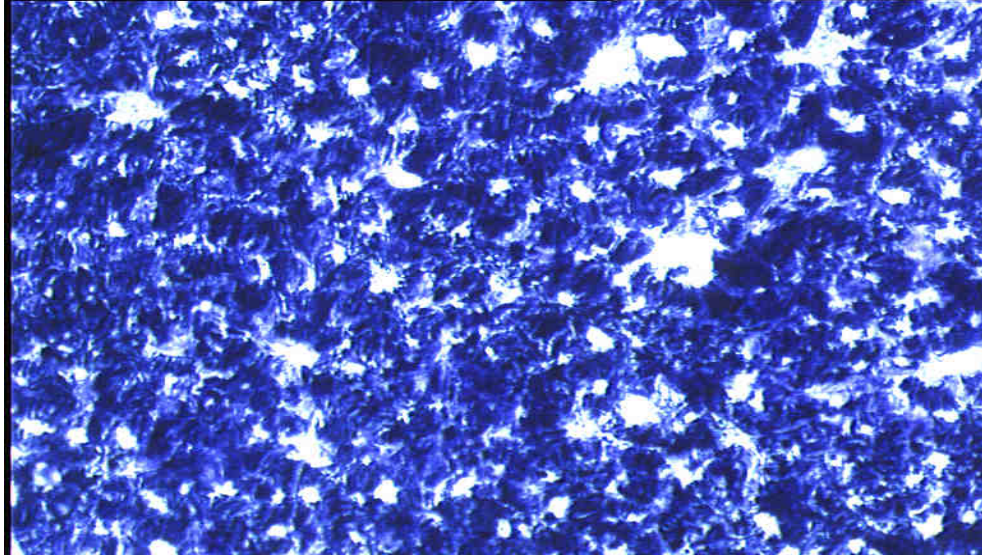


Resim 4.8. DOKS+1400w grubundaki rat kalbinde kas liflerindeki hafif düzeyde interstisyel ödem.

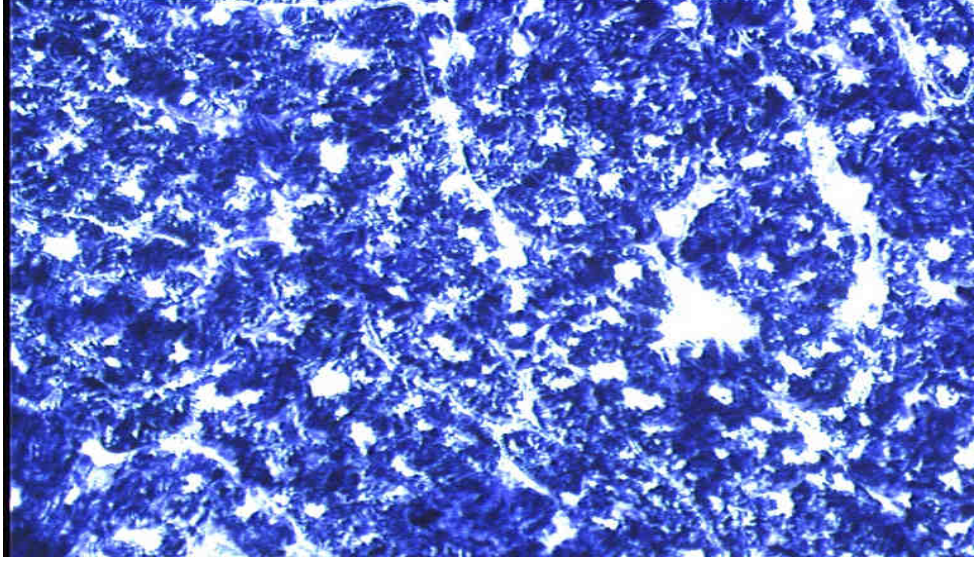


Resim 4.9. Kontrol grubuna ait normal kalp dokusu örneği.

Histokimyasal yöntemle yapılan süksinik dehidrogenaz boyamasında doku mitokondri yükünde gruplar arasında belirgin bir fark görülmedi (Resim 4.10 (tedavi alan grup) ve resim 4.11 (tedavisiz toksisite grubu)).



Resim 4.10. Süksinik dehidrogenaz (mitokondri boyası) boyamasıyla DOKS+MEL grubunda doku mitokondri düzeyi.



Resim 4.11. Süksinik dehidrogenaz (mitokondri boyası) boyamasıyla DOKS+TRAST grubunda doku mitokondri düzeyi.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada ratlarda DOKS veya DOKS+TRAST kullanılmak suretiyle deneysel kardiyotoksisite oluşturuldu. Tedavi kollarında uygulanan MEL, MEG ve 1400w bu kardiyotoksisite modelinde etkili bulundu. Tedavi kollarında kalp dokusunda MDA düzeylerinde azalma, SOD, GPx düzeylerinde artma ve serum CKMB düzeylerinde belirgin azalma saptandı. Histopatolojik incelemede tedavi gruplarında toksisite gruplarından farklı olarak kalp dokusunda inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve miyokard nekrozu saptanmazken interstisyel ödem, kas liflerinde disorganizasyon ve vakuolizasyon daha hafif düzeyde saptandı. Ratların klinik durum değerlendirilmesinde DOKS kardiyotoksitesini oluşturulan grup ile tedavi uygulanan gruplar karşılaştırıldı ve tedavi gruplarındaki ratların genel klinik iyilik hallerinin belirgin olarak daha iyi olduğu görüldü. Doku MDA, SOD, GPx ve serum CKMB düzeyleri ve genel klinik gözlem bulguları tedavi uygulanan ratlarda daha iyi saptanmasına rağmen, DOKS ve TRAST toksisitesini oluşturulan ve tedavi edilen ratlarda %25'e varan mortalite görüldü. Bu bulgu DOKS ve TRAST kardiyotoksitesinde kullanılan MEL, MEG ve 1400w'nin biyokimyasal ve hücresel düzeyde etkili oldukları halde mortaliteyi mutlak sürette azaltamadığını gösterdi.

Öz E. ve arkadaşlarının DOKS kardiyotoksitesine yönelik yaptıkları çalışmada MEL'nin oksidatif stresi azaltmak suretiyle kardiyotoksisite üzerine olumlu etkilerini ortaya koymuştur (72). Ballı E. ve arkadaşları bu verileri destekleyerek ratlarda oluşturulan DOKS kardiyotoksitesinde MEL'nin olumlu etkileri olabileceği vurgulamıştır (73). Kim C. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 25mg/kg DOKS verilmek suretiyle kardiyotoksisite oluşturulan ratlarda %86 oranında mortalite saptanırken MEL ile tedavi edilen kolda mortalitenin %20'ye gerilediğini saptadı ve MEL ile tedavi edilen ratların kontrol grubuna göre ağırlıklarını daha iyi korudukları vurgulanmıştır (74). Bizim çalışmamız Öz E, Ballı E, Kim C ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaları desteklemektedir. DOKS grubu ve DOKS+MEL grupları kıyaslandığında MEL ile tedavi edilen grupta kalp MDA düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı saptandı. Bu bulgu MEL'in DOKS sonucu oluşan lipid peroksidasyonu üzerine olumlu etkileri olduğunu gösterdi. Bunun yanında CKMB düzeylerinin MEL ile tedavi edilen grupta belirgin olarak azaldığı görüldü ve kardiyotoksitenin azaldığı anlaşıldı. Bu veriler kalp dokusunun patolojik incelenmesiyle desteklendi ve toksisite grubuyla kıyaslandığında MEL alan grupta kalp dokusundan inflamatuvar

hücre infiltrasyonu ve nekrozun görülmediği anlaşıldı. Bu bulguların klinik verilere de yansıdığı saptandı. Sakrifikasyona kadar geçen süre içinde DOKS+MEL grubunda ratların genel klinik durumunun kötü olma oranı %12,5 iken toksisite grubunda %50 olarak değerlendirildi. Bu olumlu klinik gözlem bulgularının mortaliteye yansımadağı görüldü. Hem tedavi hem de toksisite grubunda hiç mortalite gözlenmedi. Mortalitenin saptanmaması deneyin gözlem süresinin 84 saat ile sınırlandırılmış olması olarak değerlendirilebilir ve daha uzun süreli kronik toksisite çalışmaları ile ortaya konulması önerilebilir. Literatürde DOKS ve TRAST'ın birlikte kullanımıyla oluşturulan kardiyotoksisite modeli ve bu toksisiteyi önlemeye yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. TRAST'ın hangi mekanizmalar yoluyla DOKS kardiyotoksitesini arttırdığı bilinmemektedir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada DOKS toksisitesiyle DOKS+TRAST toksisite modeli kıyaslandığında kalp MDA düzeylerinin DOKS+TRAST toksisitesinde daha artmış olduğu saptandı. Bu bulgu TRAST'ın DOKS'in neden olduğu lipid peroksidasyonunu arttırmak suretiyle kardiyotoksitenin artmasına neden olduğunu gösterdi. DOKS toksisitesine göre DOKS+TRAST toksisitesinde SOD ve GPx düzeylerinin istatistiksel anlamlı olacak şekilde düşük çıkması TRAST'ın DOKS ile birlikte kullanıldığında SOR üretimini arttırdığını gösterdi. MEL tedavi grubunda DOKS+TRAST'a bağılı oluşan kardiyotoksitenin azaldığı gözlemlendi ve kalp MDA düzeylerinde düşme, kalp SOD ve GPx düzeylerinde artma saptandı. Bu veriler serum CKMB düzeyiyle destekledi. Patolojik incelemelerde MEL alan grupların kalp örnekleri DOKS+TRAST ile kardiyotoksisite oluşturulan kontrol grubuyla kıyaslandığında nekroz ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu saptanmadığı görüldü. MEL alan grupta kontrol grubundan daha az oranda myokarda vakuolizasyon ve kas liflerinde disorganizasyon tespit edildi.

İngilizce literatürde 1400w'nin DOKS ve DOKS+TRAST kardiyotoksitesini üzerinde etkisini ortaya koyan hayvan çalışması henüz bildirilmemiştir. Bu yönüyle çalışmamız bir ilki temsil etmektedir. Cohen RI ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada 1400w'nin endotoksemi oluşturulmuş ratlarda kalp dokusunda sarkoplazmik retikulumdaki kalsiyum kanallarını stabilize ettiği ve miyokard kontraktilesini koruduğı bildirilmiştir (75). Barker JU ve arkadaşları 1400w'nin ratlarda deneysel iskemi modelinde çizgili kaslarda enflamasyon ve doku nekrozunda azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (76). Bizim çalışmamızda 1400w'nin deneysel DOKS ve DOKS+TRAST kardiyotoksitesini üzerinde olumlu etkileri olduğu gözlemlendi. 1400w alan gruplar (DOKS+1400w ve DOKS+TRAST+1400w) almayan toksisite gruplarıyla (DOKS veya DOKS+TRAST)

kıyaslandığında kalp MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düşme sağlandı ($p<0,05$). Bu bulgular 1400w alan grupların kalp dokusunda GPx ve SOD enzimlerinde artma ile desteklendi. 1400w tedavi gruplarında serum CKMB düzeyinde anlamlı azalma saptandı ($p<0,05$), patolojik incelemelerde tedavi grubunda inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve myokard nekrozu gözlenmedi. Bütün bu bulgular 1400w'nin DOKS veya DOKS+TRAST kardiyotoksisitesinde iNOS inhibisyonu yoluyla etkili olduğunu gösterdi. Bu bulgular DOKS ve DOKS+TRAST kardiyotoksisitesinin önlenmesinde iNOS inhibisyon yolağının önemli olduğunu düşündürdü.

MEG hem iNOS inhibisyonu hem de peroksinitrit süpürücüsü olarak etki eden önemli bir antioksidan ajandır. Oksidatif strese neden olan temel moleküllerden ikisini birden bloke ederek etki gösterir. Bu nedenle çalışmamızda MEG'in etkinliği de araştırıldı. Lancel ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada endotoksinle miyokardiyal disfonksiyon ve inflamasyon oluşturulan ratlarda MEG'i tedavi edici ajan olarak kullanarak, MEG'in kalpte peroksinitrit akümüasyonunu engellediğini göstermiştir. Endotoksinin neden olduğu miyokardiyal kontraktıl disfonksiyonun düzeldiği saptanmıştır (77). Bu çalışmada araştırmacı MEG'in nükleer faktör kappa B inhibitör protein I – kappa B'nin yıkımını azaltmak suretiyle, plazma TNF alfa seviyeleri ve mikrovasküler endoteliyal hücre lökosit aktivasyonunu azaltarak etki ettiğini göstermiştir. Soejima ve arkadaşları yanık sonrası ve duman inhalasyonu sonrası koyunlarda oluşturulan kardiyak disfonksiyonda MEG'in kardiyak depresyonu azalttığını göstermiştir (78). Panas ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada proinflamatuvar sitokinlerin (interlökin 1 beta, tümör nekrozis faktör alfa ve interferon gamma) miyokardın kontraktıl fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilediğini göstermiş ve MEG gibi iNOS inhibisyonu yapan ajanların myokard fonksiyonları üzerine olumlu etkileri olduğunu vurgulamıştır (79). MEG'in DOKS veya DOKS+TRAST kardiyotoksisitesi üzerine olan etkisini araştıran bir makale henüz ingilizce tıp literatüründe yayınlanmamıştır. MEG, oluşturduğumuz kardiyotoksisite modelinde, iNOS enzimini inhibe ederek ve oluşan peroksinitrit moleküllerini süpürerek oksidan hasarı azalttığı ve bu mekanizma üzerinden etkili olduğu görüldü. Bizim çalışmamız da Lancel S ve Soejima K'nin ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmaları destekler nitelikte bulgular saptandı. MEG alan gruplar (DOKS+MEG veya DOKS+TRAST+MEG) almayan toksisite gruplarıyla (DOKS veya DOKS+TRAST) kıyaslandığında kalp MDA düzeylerinde düşme daha belirgindi. Bu bulgular MEG alan grupların kalp dokusunda GPx ve SOD enzimlerinde artma ile

desteklendi. MEG tedavi gruplarında serum CKMB düzeyinde anlamlı azalma saptandı, patolojik incelemelerde tedavi grubunda inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve myokard nekrozu gözlenmedi. Bütün bu bulgular MEG'in DOKS veya DOKS+TRAST kardiyotoksisitesinde iNOS inhibisyonu ve peroksinitritin süpürülmesi yoluyla etkili olduğunu gösterdi. Bu bulgular DOKS ve DOKS+TRAST kardiyotoksisitesinin önlenmesinde iNOS inhibisyon yolağının ve peroksinitritlerin süpürülmesinin önemli olduğunu düşündürdü.

DOKS kardiyotoksisitesinde oluşturduğumuz kardiyotoksisite modelinde görülen oksidatif stresin kalp MDA, SOD ve GPx parametrelerine bakılarak değerlendirildiği bu deneysel çalışmada, öngörülen hasar mekanizması (SOR, iNOS aktivasyonu ve peroksinitrit oluşumu) bir "şeytan üçgeni" olarak adlandırılabilir. Üçgenin birinci ayağı üretilen SOR'lerdir ve kendi başlarına hücrede hasar oluşturabilirler. Antioksidan moleküller bu basamakta üretilen SOR'leri süpürerek etki gösterirler. Bununla birlikte fizyopatolojik süreçte iNOS enzim aktivasyonu ve yüksek düzeylerde nitrik oksit üretimi ortaya çıkarsa, antioksidanların etkinliği azalmaktadır. Nitrik oksitin SOR'lere afinitesi hemen tüm antioksidanlar ve SOD enziminden daha yüksektir. Bu nedenle, SOR'leri süpürerek etki eden antioksidanların tedavi etkinliği çoğu zaman bu mekanizma nedeni ile kısıtlanmaktadır.

Fizyolojik rollerinden çok patolojik etkiler ortaya çıkaran iNOS inhibisyonu ile peroksinitrit oluşumunun önlenmesi önemlidir. Çünkü peroksinitritler pekçok çalışma ile gösterilmiştir ki, doku hasarına neden olan asıl moleküllerdir. Üretimlerinin önlenmesi iki basamakta olabilir. Birincisi iNOS inhibisyonu ile substrat düzeyinde blokajdır. Bu çalışmada 1400W, MEG ve MEL'in bu düzeyde etki gösterdiği görüldü ve sonuçlar olumlu olarak değerlendirildi. Bu ve benzeri iNOS inhibitörlerinin inhibisyon oranı yüksek olmakla birlikte tüm iNOS enzimlerini bloke edemeyeceği öngörüsü ile ortaya çıkan peroksinitritlerin hasara katkısı yadsınamaz. Bu çalışmada kullanılan MEG ve MEL aynı zamanda güçlü birer peroksinitrit süpürücüsüdür. Çalışmadaki yararlı etkilerini büyük olasılıkla bu "şeytan üçgeni"nin her iki bacağına etki ederek gösterdikleri ifade edilebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

DOKS yaygın olarak kullanılan bir antineoplastik ajandır. Diğer ajanlarda da olduğu gibi DOKS'a ait yan etkilerin ve özellikle kardiyotoksik etkilerin önemli bir klinik sorun teşkil ettiği bilinmektedir. Bu nedenle DOKS kardiyotoksitesine karşı önlemlerin araştırıldığı çalışmalar yaygın olarak literatürde yer almaktadır. DOKS'un kardiyotoksik etkisine aracılık eden mekanizma artmış SOR üretimi, iNOS aktivasyonu ve sonuçta peroksinitritlerin üretilmesidir. SOR'leri ve peroksinitritler, başta membran lipidleri ve yapısal hücre proteinleri olmak üzere tüm biyomoleküllere saldırarak (oksidatif saldırı) hücrede hasara neden olmaktadır.

Bu çalışmada incelenen DOKS+TRAST kombinasyonunun hasarı arttırdığı gösterildi. Bununla birlikte hasar mekanizmasının aynı olduğu ve TRAST'ın henüz tespit edilemeyen bir yol ile DOKS'a ait kardiyotoksiteyi potansiyelize ettiği ortaya çıktı. Bu aynı zamanda klinik olarak da gözlenen bir durumdur. TRAST, DOKS'ın kardiyomyosit içerisine girişini artırıyor ve/veya SOR üretimine indirek etki ediyor olabilir. Bu bir başka çalışmanın konusudur. Ancak çalışmada kullanılan terapötik ajanların, bu kombinasyona ait hasarı da azalttığı gösterildi. Bu nedenle hasar mekanizmasının benzer olduğu söylenebilir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, MEL, MEG ve 1400w'nin gerek DOKS gerekse DOKS+TRAST kombinasyonu kaynaklı kardiyotoksitede kullanılabileceğini ortaya koydu. Potansiyel fayda sağlayacak olan bu iki ilacın daha uzun ve sınırlı dozlarının üzerinde kullanılmalarını, belki de uygun dozlarda kombine olarak kullanılmalarını sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Shan K, Lincoff AM, Young JB. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Ann Intern Med* 1996;125:47.
2. Olson RD, Mushlin PS: Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypothesis. *FASEB J* 4: 3076-3086,1990
3. Russel J. Reiter, Dun-Xian Tan, Carmen Osuna, Eloisa Gitto. Actions of Melatonin in the Reduction of oxidative Stress. *J Biomed Sci* 2000;7:444–458
4. Benz CC, O'Hagan RC, Richter B, et al. HER2/neu and the Ets transcription activator PEA3 are coordinately upregulated in human breast cancer. *Oncogene* 15: 1513-1525,1997.
5. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science* 235: 177-182, 1987.
6. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17: 2639-2648, 1999
7. D Slamon, B Leyland-Jones, et al. "Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2" *NEJM*, 344(2001): 783-82
8. Ewer MS, Gibbs HR, Swafford J, et al. Cardiotoxicity in patients receiving Trastuzumab (Herceptin): primary toxicity, synergistic or sequential stress, or surveillance artifact? *Semin Oncol* 1999;26:96.
9. Horan, P. G.; McMullin, M. F.; McKeown, P. P. Anthracycline cardiotoxicity. *Eur. Heart J.* 27:1137–1138; 2006.
10. Weiss RB: The anthracyclines: Will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol* 19:670-686, 1992
11. Doroshow, J. H. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat-heart. *Cancer Res.* 43:460–472; 1983.[6]
12. Vasquezvivar, J.; Martasek, P.; Hogg, N.; Masters, B. S. S.; Pritchard, K. A.; Kalyanaraman, B. Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin. *Biochemistry* 36:11293–11297; 1997

13. Lebrecht, D.; Kokkori, A.; Ketelsen, U. P.; Setzer, B.; Walker, U. A. Tissue-specific mtDNA lesions and radical-associated mitochondrial dysfunction in human hearts exposed to doxorubicin. *J. Pathol.* 207:436–444; 2005.
14. Solem, L. E.; Henry, T. R.; Wallace, K. B. Disruption of mitochondrial calcium homeostasis following chronic doxorubicin administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 129:214–222; 1994.
15. Kotamraju, S.; Chitambar, C. R.; Kalivendi, S. V.; Joseph, J.; Kalyanaraman, B. Transferrin receptor-dependent iron uptake is responsible for doxorubicin-mediated apoptosis in endothelial cells - role of oxidant-induced iron signaling in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277:17179–17187; 2002.
16. Pietras, RJ, Arboleda, J, Reese, DM, et al. HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* 1995; 10:2435.
17. Cobleigh, MA, Vogel, CL, Tripathy, D, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999; 17:2639.
18. Seidman, A, Hudis, C, Pierri, MK, et al. Cardiac dysfunction in the TRAST clinical trials experience. *J Clin Oncol* 2002; 20:1215.
19. Keefe, DL. Trastuzumab-associated cardiotoxicity. *Cancer* 2002; 95:1592.
20. Esteva, FJ, Valero, V, Booser, D, et al. Phase II study of weekly docetaxel and Trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20:1800.
21. Ferguson, C, Clarke, J, Herity, NA. Ventricular tachycardia associated with Trastuzumab. *N Engl J Med* 2006; 354:648.
22. Levine, MN. TRAST cardiac side effects: only time will tell. *J Clin Oncol* 2005; 23:7775.
23. Ewer, MS, Vooletich, MT, Durand, JB, et al. Reversibility of TRAST-related cardiotoxicity: new insights based on clinical course and response to medical treatment. *J Clin Oncol* 2005; 23:7820.
24. Perik, PJ, de Vries, EG, Gietema, JA, et al. Serum HER2 levels are increased in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2006;
25. Chien, KR. Herceptin and the heart--a molecular modifier of cardiac failure. *N Engl J Med* 2006; 354:789.

26. Pang SF, Allen AE. Extra-pineal melatonin in the retina: Its regulation and physiological function. *Pineal Res Rev* 4:55–95;1986.
27. Tan DX, Manchester RJ, Reiter RJ, Qi W, Zhang M, Weintraub ST, Cabrera J, Sainz RM, Mayo JC. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: Its origin and significance. *Biochim Biophys Acta* 1472:206–214;1999.
28. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Hanes MA, Farley NJ. High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sci* 65:2523–2529;1999.
29. Skinner DC, Malpoux B. High melatonin concentrations in third ventricular fluid are not due to Galen vein blood recirculating through the choroid plexus. *Endocrinology* 140:4399–4405;1999.
30. Ianas O, Olivescu R, Badescu I. Melatonin involvement in oxidative processes. *Rom J Endocrinol* 29:117–123;1991.
31. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J* 1:57–60;1993.
32. Ianas, O., Olivescu, R., Badescu, I.: Melatonin Involvement in Oxidative Processes. *Rom. J. Endocrinol.*, 29:117-23, 1991.
33. Hardeland, R., Balzer, I., Poeggeler, B., Fuhrberg, B., Uria, H., Behrmann, G., Wolf, R., Meyer, T.J., Reiter, R.J.: On the Primary Function of Melatonin in Evolution: Mediation of Photoperiodic Signals in a Unicell, Photooxidation and Scavenging of Free Radicals. *J. Pineal Res.*, 18:104-11, 1995.
34. Tan, D.X. Manchester, L.C., Reiter, R.J., Qi, W., Karbownik, M., Calvo, J.R.: Significance of Melatonin in Antioxidative Defense System: Reactions and Products. *Biol. Signals Recept.*, 9:137-59, 2000.
35. Reiter, R.J., Tang, L., Garcia, J.J., Munoz-Hoyos, A.: Pharmacological Actions of Melatonin in Oxygen Radical Pathophysiology. *Life Sci.*, 60:2255-71, 1997.
36. Reppert, S.M., Weaver, D.R., Godson, C.: Melatonin Receptors Step into the Light: Cloning and Classification of Subtypes. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 17:100-2, 1996.
37. Reiter, R.J.: The Indoleamine Melatonin as a Free Radical Scavenger, Electron Donor, and Antioxidant, In Vitro and In Vivo Studies. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 398:307-13, 1996.
38. Borg, D.C.: Oxygen Free Radical and Difuse Injury. In: Tan, M., Samson, F., eds. *Oxygen Free Radical and Tissue Injury*. Boston, Birkhauser, 1993, 12-53.

39. Poeggeler, B., Reiter, R.J., Hardeland, R., Sewerynek, E., Melchiorri, D., Barlow-Walden, L.R.: Melatonin, a Mediator of Electron Transfer and Repair Reactions, Acts Synergistically with the Chain Breaking Antioxidant Ascorbate, Trolox and Glutathione. *Neuroendocrinol. Lett.*, 17:87-91, 199
40. Tan, D.X., Manchester, L.C., Reiter, R.J., Qi, W., Karbownik, M., Calvo, J.R.: Significance of Melatonin in Antioxidative Defense System: Reactions and Products. *Biol. Signals Recept.*, 9:137-59, 2000.
41. Zang, L.Y., Cosma, G., Gardner, H., Vallynathan, V.: Scavenging of Reactive Oxygen Species by Melatonin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1425:467-77, 1998.
42. Hardeland, R., Reiter, R.J., Poeggeler, B., Tan, D.X.: The Significance of the Metabolism of the Neurohormone Melatonin: Antioxidant Protection and Formation of Bioactive Substances. *Neurosci. Biobehav. Res.*, 17:347-57, 1993.
43. Marshall, K.A., Reiter, R.J., Poeggeler, B., Aruoma, O.I., Halliwell, B.: Evaluation of the Antioxidant Activity of Melatonin In Vitro. *Free Radical Biol. Med.*, 21:307-15, 1996.
44. Chan, T.Y., Tang, P.L.: Characterization of the Antioxidant Effects of Melatonin and Related Indoleamines In Vitro. *J. Pineal Res.*, 20:187-91, 1996.
45. Poeggeler, B., Saarela, S., Reiter, R.J., Tan, D.X., Chen, L.D., Manchester, L.C., Barlow-Walden, L.R.: Melatonin – A Highly Potent Endogenous Scavenger and Electron Donor: New Aspects of the Oxidation Chemistry of This Indole Assessed In Vitro. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 738:419-20, 1994.
46. Chan, T.Y., Tang, P.L.: Characterization of the Antioxidant Effects of Melatonin and Related Indoleamines In Vitro. *J. Pineal Res.*, 20:187-91, 1996.
47. Dellegar, S.M., Murphy, S.A., Bourne, A.E., Di Cesare, J.C., Purser, G.H.: Identification of Factors Affecting the Rate of Deactivation of Hypochlorous Acid by Melatonin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 257:431-39, 1999.
48. Pieri, C., Marra, M., Moroni, F., Recchioni, R., Marcheselli, F.: Melatonin, a Peroxyl Radical Scavenger More Efficient than Vitamin E. *Life Sci.*, 55:PL271-76, 1994
49. Noda, Y., Mori, A., Liburdy, R., Packer, L.: Melatonin and Its Precursors Scavenge Nitric Oxide. *J. Pineal Res.*, 27:159-63, 1999.
50. Cuzzocrea, S., Costantino, G., Mazzon, E., Micoli, A., De Sarro, A., Caputi, A.P.: Beneficial Effects of Melatonin in a Rat Model of Splanchnic Artery Occlusion and Reperfusion. *J. Pineal Res.*, 28:52-63, 2000.

51. Cuzzocrea, S., Tan, D.X., Costantino, G., Mazzon, E., Caputi, A.P., Reiter, R.J.: The Protective Role of Endogenous Melatonin in Carrageenan-induced Pleurisy in the Rat. *FASEB J.*, 13:1930-38, 1999.
52. Antolin, I., Obstet, B., Burkhardt, S., Hardeland, R.: Antioxidatif Protection in a High-Melatonin Organism: The Dinoflagellate *Gonyaulax Polyedra* is Rescued from Lethal Oxidative Stress by Strongly Elevated, but Physiologically Possible Concentrations of Melatonin. *J. Pineal Res.*, 23:182-90, 1997.
53. Mao, G.D., Thomas, P.D., Lopashuck, G.D., Poznansky, M.J.: Superoxide Dismutase (SOD)-Catalase Conjugates. *J. Biol. Chem.*, 268:416-620, 1993.
54. Barlow-Walden, L.R., Reiter, R.J., Abe, M., Pablos, M., Menendez-Pelaez, A., Chen, L.D., Poeggeler, B.: Melatonin Stimulates Brain Glutathione Peroxidase Activity. *Neurochem. Int.*, 26:447-502, 1995.
55. Okatani, Y., Okamoto, K., Hayashi, K., Wakatsuki, A., Tumura, S., Sagara, Y.: Maternal-fetal Transfer of Melatonin in Pregnant Women Near Term. *J. Pineal Res.*, 25:129-34, 1998.
56. Harris, E.D.: Regulation of Antioxidant Enzymes. *FASEB J.*, 6:2675-83, 1992.
57. Jain, A., Martensson, J., Stole, E., Auld, P.A.M., Meister, A.: Glutathione Deficiency Leads to Mitochondrial Damage in Brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88:1913, 1991
58. Pierrefiche, G., Laborit, H.: Oxygen Radicals Melatonin and Aging. *Exp. Gerontol.*, 30:213-27, 1995.
59. Steinhilber, D., Brungs, M., Werz, O., Weisenberg, I., Danielsson, C., Kahlen, J.P.: The Nuclear Receptor for Melatonin Represses 5-lipoxygenase Gene Expression in Human B-Imphocytes. *J. Biol. Chem.*, 270:7037-40, 1995.
60. Pozo, D., Reiter, R.J., Calvo, J.R., Guerrero, J.M.: Physiological Concentration of Melatonin Inhibit Nitric Oxide Synthase in Rat Cerebellum. *Life Sci.*, 55:PL455-PL60, 1994.
61. Garvey, E. P., Oplinger, J. A., Furfine, E. S., Kiff, R. J., Laszlo, F., Whittle, B. J. R., and Knowles, R. G. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *Biol. Chem.* 1997;272:4959–4963
62. Alderton, W. K., Cooper, C. E., and Knowles, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, 357: 593–615, 2001

63. Cuzzocrea, C., Zingarelli, B., Hake, P., Salzman, A.L. and Szabo, C. Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radical Biology & Medicine*. 1998;3:450-459
64. Frei, B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med* 1994; 97:5S.
65. Sies, H. Oxidative stress: introductory remarks. In: *Oxidative Stress*, Sies, H (Ed), Academic Press, Orlando 1985. p.1.
66. Landmesser, U, Spiekermann, S, Dikalov, S, et al. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 2002; 106:3073.
67. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1):265-75.
68. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2):351-8.
69. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34(3):497-500
70. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70(1):158-69.
71. Xifu L., Xinhua G., Zhaoming L., Xinyan L et al. Neuregulin-1/erbB-Activation Improves Cardiac Function and Survival in Models of Ischemic, Dilated, and Viral Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. Vol. 48, No. 7, 2006
72. Oz, E. Ilhan, MN. Effects of melatonin in reducing the toxic effects of doxorubicin. *Mol Cell Biochem*. 2006 Jun;286(1-2):11-5. Epub 2006 Apr 20.
73. Balli E, Mete UO, Tuli A, Tap O, Kaya M. Effect of melatonin on the cardiotoxicity of doxorubicin. *Histol Histopathol*. 2004 Oct;19(4):1101-8.
74. Kim C, Kim N, Joo H, Youm JB, Park WS, Cuong DV, Park YS, Kim E, Min CK, Han J. Modulation by melatonin of the cardiotoxic and antitumor activities of adriamycin. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005 Aug;46(2):200-10.
75. Cohen, RI. Wilson, D. Liu, SF. Nitric oxide modifies the sarcoplasmic reticular calcium release channel in endotoxemia by both guanosine-3',5' (cyclic)

- phosphate-dependent and independent pathways. *Crit Care Med.* 2006 Jan;34(1):173-81.
76. Barker JU, Qi WN, Cai Y, Urbaniak JR, Chen LE. Addition of nitric oxide donor S-nitroso-N-acetylcysteine to selective iNOS inhibitor 1400W further improves contractile function in reperfused skeletal muscle. *Microsurgery.* 2005;25(4):338-45.
77. Lancel S, Tissier S, Mordon S, Marechal X, Depontieu F, Scherpereel A, Chopin C, Neviere R. Peroxynitrite decomposition catalysts prevent myocardial dysfunction and inflammation in endotoxemic rats. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Jun 16;43(12):2348-58.).
78. Soejima K, Schmalstieg FC, Traber LD, Szabo C, Salzman A, Traber DL. Role of nitric oxide in myocardial dysfunction after combined burn and smoke inhalation injury. *Burns.* 2001 Dec;27(8):809-15.
79. Panas D, Khadour FH, Szabó C, Schulz R. Proinflammatory cytokines depress cardiac efficiency by a nitric oxide-dependent mechanism. *Am J Physiol.* 1998 Sep;275(3 Pt 2):H1016-23.