

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

RADYOTERAPİYE BAĞLI KARDİYAK HASARIN ÖNLENMESİNDE
AMİFOSTİN VE MELATONİN'İN ETKİLERİ

THE EFFECTS OF AMIFOSTINE AND MELATONIN AGAINST
RADIOTHERAPY INDUCED CARDIAC TOXICITY

Uzmanlık Tezi

Dr. Zümrüt BAHAT

TRABZON, 2004

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

RADYOTERAPİYE BAĞLI KARDİYAK HASARIN ÖNLENMESİNDE
AMİFOSTİN VE MELATONİN'İN ETKİLERİ

THE EFFECTS OF AMIFOSTINE AND MELATONIN AGAINST
RADIOTHERAPY INDUCED CARDIAC TOXICITY

Uzmanlık Tezi

Dr. Zümrüt BAHAT
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Melek YAVUZ

TRABZON, 2004

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇİNDEKİLER.....	I
ÖNSÖZ.....	III
KISALTMALAR.	IV
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Radyoterapiye Bağlı Normal Doku Hasarının Mekanizması...	2
2.2 Radyoprotektörler ve Amifostin.....	3
2.3 Melatonin.....	5
2.4 Radyoterapiye Bağlı Kardiyak Hasar.....	6
3. MATERYAL ve METOD.....	9
3.1 Denekler.....	9
3.2 Araştırma Protokolü.....	9
3.3 Radyoterapi tekniği.....	10
3.4 Langendorff perfüze sıçan kalbi.....	11
3.5 Biyokimyasal Belirleyici.....	13
3.6 Patolojik İnceleme.....	13
3.7 İstatistiksel Yöntem.....	14
4. BULGULAR.....	15
4.1 Langendorff perfüze sıçan kalbi.....	15
4.2 Biyokimyasal Belirleyici.....	18
4.3 Patoloji.....	19
4.3.1 Işık Mikroskobu.....	19

4.3.2 Elektron mikroskop.....	21
5. TARTIŞMA.....	22
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	28
7. ÖZET.....	30
8. İNGİLİZCE ÖZET.....	32
9. KAYNAKLAR.....	34

ÖNSÖZ

Radyasyon Onkolojisi eğitimim boyunca bilgi, görgü ve deneyimlerinden yararlandığım bütün hocalarıma, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Ali Aydın Yavuz'un şahsında saygı ve şükranlarımı sunarım. Eğitimim süresince ve özellikle de medikal onkoloji rotasyonum sırasında eğitimime katkıda bulunan Tıbbi Onkoloji B.D.'nden Prof. Dr. Fazıl Aydın, Yrd. Doç. Dr. Halil Kavgacı ve Yrd. Doç. Dr. Feyyaz Özdemir'e teşekkür ederim.

Çalışmamın planlama ve yürütülmesinde destek ve yardımlarını gördüğüm Sayın Doç. Dr. Melek Yavuz'a, çalışmamın yürütülmesinde yardım ve desteklerini esirgemeyen Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Nuri İhsan Kalyoncu'ya, Dr. Cunay Ülkü'ye, Patoloji Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Ümit Çobanoğlu'na, Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Caner Kayahan'a, Dr. Ahmet Alver'e, sevgili ailemin her bireyine, bitanecik anneciğime ve babacığıma, ayrıca yaşamının ve çalışmamın her aşamasında verdiği desteklerden dolayı sevgili ablam Yrd. Doç. Dr. Elif Bahat'a teşekkürlerimi belirtmekten onur duyarım.

Dr. Zümrüt BAHAT

KISALTMALAR

ARG	Amifostin + radyoterapi grubu
BHT	Bütillenmiş hidroksi toluen
H ₂ O	Su
İ.p.	İntraperitoneal
İzKDB	İzoproterenol uygulanması sonrası koroner diyastolik basınç
İzKH	İzoproterenol uygulanması sonrası kalp hızı
İzKSB	İzoproterenol uygulanması sonrası koroner sistolik basınç
KAG	Kontrol amifostin grubu
KDP	Koroner diyastolik basınç
KG	Kontrol grubu
KH	Kalp hızı
KMG	Kontrol melatonin grubu
KRG	Kontrol radyoterapi grubu
KDB	Koroner diyastolik basınç
KSB	Koroner sistolik basınç
MDA	Malondialdehit
MRG	Melatonin + radyoterapi grubu
OH [•]	Hidroksil radikali

Ort.İzKDB	İzoproterenol uygulanması sonrası ortalama koroner diyastolik basınç
Ort.İzKH	İzoproterenol uygulanması sonrası ortalama kalp hızı
Ort.İzKSB	İzoproterenol uygulanması sonrası ortalama koroner sistolik basınç
Ort.KDB	Ortalama koroner diyastolik basınç
Ort.KH	Ortalama kalp hızı
Ort.KSB	Ortalama koroner sistolik basınç
OsO ₄	Osmium tetroxide
RT	Radyoterapi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOD	Süper oksit dismutaz
TBA	Tiyo barbiturik asit

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Radyoterapi (RT) bir çok kanserin tedavisinde standart tedavi olarak kullanılmaktadır. RT uygulamalarında, kanserin bulunduğu lokalizasyona göre kalp radyoterapi alanına girebilir. RT fraksiyon dozu, toplam doz ve tedavi alanına giren kalp volümüne bağlı olarak geç dönemde, perikardiyal fibrozis, miyokardiyal nekrozlar ve fonksiyon bozuklukları gelişebilir.

RT'nin normal dokudaki olumsuz etkilerini önlemek amacıyla bir çok madde araştırılmıştır. Amifostin de bunlardan biridir ve çeşitli organlarda RT'ye bağlı zararların önlenmesinde kullanılmaktadır.

Melatonin ise pineal bir hormondur ve kuvvetli bir serbest radikal tutucusudur. Çeşitli toksik ajanların kalpte oluşturduğu oksidatif hasara karşı koruyucu olarak preklinik çalışmalarda kullanılmıştır. Ancak kalp ışınlamasının zararları üzerine etkisi çalışılmamıştır.

Bu çalışmada RT'nin kalp üzerindeki olumsuz etkilerini önlemede amifostin ve melatoninin karşılaştırmalı olarak etkisinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Radyoterapiye Bağlı Normal Doku Hasarın Mekanizması:

1895 yılında Alman fizikçi Wilhelm Conrad Roentgen X ışınlarını keşfetmiş ve ardından ilk kez 1896'da tıbbi amaçla kullanılmıştır. X ışınlarının tanı amacıyla kullanılmaya başlanmasından 4 ay sonra ise çalışanlardan birinin saçlarının dökülmesi dikkat çekmiştir. Becquerel'in yelek cebinde radyum preparatı taşıması sonrası cildinin o bölgesinde bir yara oluşmuş ve çok zor iyileşmiştir. Bu gözlemler, iyonlaştırıcı radyasyonların zararlı etkilerinin araştırılması konusunda başlangıç sayılabilir (1).

Radyasyonun biyolojik etkisi temelde DNA'ya verilen hasarın sonucudur. Bu ise direkt ya da indirekt etki ile olabilir. Direkt etkide, foton enerjisinin transferi sonucunda fırlayan elektron DNA molekülünü doğrudan etkileyerek hasara yol açar. İndirekt etkide ise, fırlayan elektron ilk aşamada ortamdaki moleküllerle etkileşime girerek serbest radikalleri oluşturur ve bunlar DNA'da hasar yapar. Klinik RT'de kullanılan iyonizan radyasyon hasarının büyük ölçüde indirekt yoldan olduğu kabul edilmektedir. İndirekt radyasyon hasarında, öncelikle su (H_2O), RT'nin etkisiyle hidroksil radikaline ($OH^\bullet$) dönüşür. Oluşan $OH^\bullet$ DNA hasarına yol açar. Canlının su içeriği ile radyasyon duyarlılığı arasındaki açık ilişki de bunu desteklemektedir (1, 2).

Radyasyonun canlılardaki etkinliği, ışınlama sırasında oksijenin varlığı ile artmaktadır. Oksijen varlığında radyasyonun zarar verici etkisi 2.5-3 kat artabilir. Buna oksijen etkisi adı verilir. Bunun sebebi serbest radikallerin oksijen molekülleri ile reaksiyona girmeleridir. Bu reaksiyonlar sonucunda gerek hidrojen ve gerekse önemli bazı organik moleküllerin ciddi hasar verici peroksit radikalleri oluşur. (1-3).

RT'ye bağılı oluşan serbest radikaller lipid peroksidasyonuna neden olur. Lipid peroksidasyonun bir ürünü olan malondialdehit (MDA), ortamdaki serbest radikal miktarı ile doğru orantılıdır. Serbest radikallere bağılı doku hasarını inceleyen çalışmalarda, hasarın biyokimyasal belirteci olarak doku MDA düzeyi kullanılmaktadır (4-6).

2.2 Radyoprotektörler ve Amifostin:

Radyasyonun zararlı etkilerinden canlıları korumak amacıyla radyoprotektör adı verilen çeşitli maddeler araştırılmıştır. RT'de amaç, tümöre tümör dokusunu öldürecek dozu verirken evre normal dokuları korumak, ve böylece en az morbidite ile optimal terapötik sonuç almaktır (7). Radyoprotektörlerin koruyucu etkisi oksijen etkisiyle paralellik gösterdiğinden radyoprotektörlerin etkilerini çoğunlukla ortamdaki serbest radikalleri temizleyerek yaptığı söylenebilir (1).

1948'de sisteinin radyoprotektör etkisi olduğu keşfedilmekle birlikte, toksik etkilerinin fazla olması sebebiyle uygun bir radyoprotektör olarak kabul edilmemiştir (8). Sisteinin radyoprotektör etkisinin keşfinden sonra, Walter Reed Askeri Araştırma Enstitüsü radyoprotektör etkiye sahip olabilecek diğer maddeleri araştırmaya başlamıştır. Dört binden fazla madde test edilmiş ve bunlar arasında WR-2721 (amifostin, ethyl®) kabul edilebilir bir toksisite ile radyoprotektör etkiye sahip bulunmuştur (1). Hem radyoprotektör hem de kemoterapötik ilaçlara karşı sitoprotektör etki gösterir. Amifostin bir pro-ilacıdır. İçerdiği thiol grubu fosforilize halde bulunduğundan hücre içine geçemez. Aktif metaboliti olan WR-1065'e dönüşebilmesi için defosforile olmalıdır. Bu defosforilizasyon plazma membranına bağılı bulunan alkalın fosfotaz enzimiyle gerçekleşebileceği gibi, düşük pH'da non-enzimatik hidrolizle de olabilir (9). WR-1065 yapısında disulfid ve serbest thiol grubu bulundurmasıyla radyoprotektör etkisini gösterir (10). WR-1065 daha sonra WR-33278'e metobolize olur. WR-33278 radyoprotektör etkiye sahip olmakla birlikte bu etki WR-1065'in radyoprotektör etkisine göre daha azdır (9). Amifostinin radyoprotektör etkinliği

çoğunlukla ortamdaki serbest radikalleri temizlemesinden ileri gelmektedir. Ancak hasar görmüş moleküle hidrojen atomu vererek tamir ettiği ve oto-oksidasyon yaparak hücre içi hipoksiye sebep olup, bu şekillerde de radyoprotektör etki gösterdiği bilinmektedir (11). Ayrıca topoisomeraaz 2 enzimini katalizasyon yoluyla inaktive ederek DNA hasarının tamiri için zaman kazanılmasını sağladığı sanılmaktadır (12).

WR-1065 ve WR-33278, serbest radikalleri ortamdan temizlemek için, oksijenle kompetitif yarışa girer. Bu nedenle ortamdaki oksijen basıncı amifostinin radyoprotektör etkinliği açısından önemlidir. Radyoprotektör etki, oksijen düzeyinin orta seviyede olduğu yani solunan havanın % 20-50 oksijen içerdiği düzeyde en yüksektir. Oksijen basıncı yüksek ortamlarda oksijenin aşırı fazlalığı nedeniyle, oksijen ile WR-1065 arasındaki denge bozularak radyoprotektör etki azalacaktır. Oksijen basıncının düşük olduğu ortamlarda ise, oksijenin azlığı kendi başına bir radyoprotektör olduğundan ve böyle bir ortamda daha az serbest radikal meydana geleceğinden bu serbest radikallerin WR-1065 tarafından temizlenmesinin önemi azalacaktır (9).

Amifostin normal hücrede radyoprotektör etki gösterirken, tümör hücresinde radyoprotektör etki göstermez. Çünkü, amifostini aktif hale getiren alkalın fosfataz enzimi tümör dokusunda normal dokuya oranla düşüktür. Örneğin akciğer kanserlerinde, normal hücreler tümör hücrelerine oranla 275 kat daha fazla alkalın fosfataz enzimi içerirler (10). Tümör hücreleri hipovasküler olmaları nedeniyle doku hipoksisine maruz kalırlar. Bunun sonucunda anabolik metabolizmaları normal hücrelere göre daha fazla olup bulundukları ortamın pH'sı düşük olur. Alkalın fosfataz enziminin etkinliği düşük pH'da düşük olduğundan tümör hücrelerinin mikro çevresinde daha az WR-1065 oluşur (12). Ayrıca normal hücreler amifostinin aktif metaboliti olan WR-1065'i aktif taşıma ile hücre içine iletirken bu olay tümör hücrelerinde pasif taşıma ile olur. Bunun sonucunda amifostinin verilışinden kısa süre sonra RT uygulanırsa tümör hücresi içine daha az WR-1065 girer. Böylelikle ortamdaki normal hücrelere tümör hücrelerine oranla WR-1065 daha fazla miktarda geçerek radyoprotektör etki gösterir (10). Genel olarak amifostinin RT'den 15- 30 dakika önce uygulanması önerilmektedir (9).

Amifostin değişik normal dokularda farklı radyoprotektör etki gösterir. Örneğin merkezi sinir sisteminde amifostin kan-beyin bariyerini geçemediği için radyoprotektör etki gösteremez (9). Amifostin özellikle tükürük bezinde iyi bir koruma gösterir. Tükürük bezi fonksiyonlarının korunması ağız kuruluğunu azaltır. Baş-boyun kanserlerinde, profilaktik olarak kullanılan amifostinin radyasyonun akut etkisi olan oral mukoziti ve geç dönemde de ağız kuruluğunu azalttığı gösterilmiştir (13-15). Bağırsak ışınlamalarında mukozayı korur (16). Ayrıca kemik ışınlamalarında kemik büyümesini de koruduğu gösterilmiştir (17). Kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanıldığında ise hematotoksisite, nefrotoksisite, kardiyotoksisite, hepatotoksisite, katarakt ve alopesi oluşumunu azalttığı bilinmektedir (1, 12, 18, 19). Kalp ışınlamalarında ise RT'in kronik hasarından kalbi koruduğunu gösteren iki preklinik çalışma vardır (20, 21).

2.3 Melatonin:

Melatonin pineal bezden salgılanan bir hormon olup kimyasal formülü N-asetil-5-metoksitripamindir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla bu hormonun çok kuvvetli bir antioksidan olduğu ve serbest radikalleri temizlediği bulunmuştur (22). Melatonin hidroksil serbest radikaline elektron vererek inaktive eder. Melatoninin hidroksil radikali temizleme kapasitesi glutatyondan 5 kez mannitolden de 15 kez fazladır (23). Direkt serbest radikalleri temizleme özelliğinin yanı sıra bazı endojen antioksidan savunma mekanizmalarını da düzenler. Melatonin, hidrojenperoksiti hidrojene metabolize eden glutatyon peroksidaz enziminin aktivitesini arttırır (24,25). Bu sırada glutatyon okside hale gelir. Glutatyonu tekrar deoksile etmek için glutatyon redüktaz enzimi görev yapar. Glutatyon redüktaz enziminin aktivitesi de melatoninle artar (25). Ayrıca melatoninin askorbik asit ve α -tokoferol gibi diğer antioksidanlar ile sinerjistik olarak etkileşmesi antioksidan özelliğini arttırır (26). Melatonin hem hidrofilik hem de lipofilik yapısı nedeniyle vücudun her yerine ulaşarak organizmayı oksidatif strese karşı korur (27).

Melatoninin bu güçlü antioksidan özelliğinin keşfinden sonra toksik etkilerini serbest radikaller oluşturarak yapan ajanlara karşı koruyuculuğu araştırılmıştır. Toksisitesini serbest radikaller ile yapan bir çok toksik ajan bilinmektedir. Bu ajanlar

uygulandıklarında dokularda oluşturdıkları serbest radikaller lipid peroksidasyonu yapar. Dokularda lipid peroksidasyon ürünü olan MDA artar. Melatonin, etanol, kadminyum ve fosfin gibi bazı toksik ajanlardan organizmayı antioksidan özelliği sayesinde korur (22, 28-29). Kemoterapötik ilaçlardan bazıları da serbest radikal oluştururlar. Bu kemoterapötiklerden biri olan doksorubisin ile yapılan çalışmalarda melatoninin doksorubisine bağlı kardiyomyopatiden organizmayı koruduğu gösterilmiştir (30, 31). Doksorubisine bağlı serbest radikallerin etkisiyle beyin, kalp ve böbrekte oluşan lipid peroksidasyon ürünleri melatonin varlığında azalmaktadır (32). Tümör hücre kültürlerinde ve tümör hücreleri ekilen hayvanlarda doksorubisin ile birlikte melatonin verildiğinde antitümöral etkinin azalmayıp aksine arttığını gösteren çalışmalar vardır (33, 34). Tamoksifen ile birlikte melatonin verildiğinde de antitümöral etkinin arttığı tespit edilmiştir (35). Böylece kanser tedavilerinde melatoninin tedavinin yan etkilerine karşı tedavinin etkinliğini azaltmadan kullanılması gündeme gelmiştir. Melatoninin kalp ışınlamasının zararları üzerine etkisi ise çalışılmamıştır.

2.4 Radyoterapiye Bağlı Kardiyak Hasar:

1960`lardan önce kalp RT`ye nispeten dirençli bir organ olarak kabul ediliyordu. Sabrazés ve Rieviere, izole edilmiş kurbağa kalbini yüksek dozlarda X ışını ile ışınlamışlar ve RT sonrası ile RT uygulama esnasında izole edilmiş kurbağa kalbinde fonksiyonel bir değişiklik bulamamışlardır (36). Takip eden hayvan deneylerinde de bunu destekleyen sonuçlar çıkmıştır ve RT uygulamalarında kalbe zarar verilmediği düşünülmüştür (37-43). Bu nedenle RT dozları yüksek, gözlem süreleri ise kısa tutulmuştur. RT`ye bağlı kardiyak hasarı inceleyen ilk sistematik deney Steward ve Fajardo tarafından yapılmıştır. Bu deneyde 16-20 Gy ya da daha fazla kardiyak RT uygulanan tavşanlarda kardiyak hasar saptanmıştır (44). Takiben yapılan hayvan deneylerinde ışık mikroskobu ve elektron mikroskop ile kardiyak hasar gösterilmiştir (45-46).

RT`ye bağlı kardiyak hasarlar arasında en sık görüleni akut perikardittir. Perikard hücreleri RT`ye miyokard hücrelerinden daha duyarlıdır. Bu hücrelerde, düşük

dozlarda bile morfolojik hasar meydana gelebilir. RT hasarından sorumlu hedef hücreler perikard ve epikardı döşeyen mezotel hücreleridir. Işınlamadan birkaç saat sonra tavşan kalbinde perikardın tüm tabakalarında geçici ama yaygın iltihap oluşur (panperikardit). Ancak bu inflamasyon birkaç günde kaybolur. 10-12 haftalık latent periyottan sonra fibröz eksuda oluşmaya başlar. Latent periyodun süresi RT dozundan bağımsızdır. Biriken perikardiyal sıvı proteinden zengindir. Perikarditin şiddeti, benign karakterde olan geçici perikarditten kardiyak konstrüksiyona yol açabilen yoğun skleroza kadar değişebilir. Geçici perikardit zamanla tamamen rezorbe olur. Genellikle asemptomatiktir ve rutin akciğer grafilerinde tesadüfen tespit edilir. Kalıcı perikardiyal sıvı birikimi (kalıcı efüzyon) ise fibröz perikardit şeklinde başlayıp göğüs ağrısı, ateş ve perikardiyal sürtünme sesi semptomları verir. Bunu perikardiyal sıvı birikimi takip eder. Radyolojik olarak saptanması için en az 250 ml sıvı birikimi gereklidir. Işınlamadan önce çekilmiş olan grafilere oranla kalbin transfer çapının 1.5cm veya daha fazla artmış olması ve özellikle kalbin sol tarafında daha belirgin olmak üzere kalbin küresel bir şekil alarak sınırlarının düzleşmesiyle saptanır. Perikardiyal sıvının saptanmasında ekokardiyografi en duyarlı yöntem olup 100ml, ve hatta bazen daha az sıvı birikimini belirleyebilir. Ayrıca dinamik ekokardiyografi ile sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu da ölçülebilir. Kardiyak tamponat ise aşırı sıvı birikimi sonucunda kalbin sağ tarafına dökülen venöz kanın azalması ve buna bağlı kardiyak çıkışın azalması sonucu oluşur. Akciğer grafisi ve ekokardiyografik verilere ek olarak juguler venin genişlemesi, alternan nabız (inspirasyonda sistolik basıncın düşmesi), EKG'de voltaj düşmesi ve kardiyak kateterizasyonda karakteristik basınç paterni ile saptanabilir. Acil olarak perikardiyosentez ya da perikardiyotektomi gerekebilir. Konstrüktif perikardit ise perikardiyum ve epikardiyumun yoğun fibrozu sonucunda kalp etrafında sert bir tabaka oluşumunun sonucudur. RT'den yıllar sonra gelişebilen nadir bir komplikasyondur. Konstrüksiyon sağ kalbi dolduran venöz dönüşü bozarak venlerde şişme ve kardiyak çıkışın azalmasına yol açar. Ekokardiyografi ve bilgisayarlı tomografi ile perikardiyal kalınlaşma, ileri vakalarda ise kalsifikasyonlar tespit edilir. Yapışmış olan perikardiyumun her iki tabakasının cerrahi olarak çıkarılması gerekmektedir. Ancak bu cerrahi işlemin başarısı kardiyak tamponata bağlı perikardiyotektomiye göre azdır.

Radyasyona bağılı miyokardit ise uzun bir latent periyottan sonra yavaş gelişen bir durumdur. Öncelikle noktasal miyokardiyal dejenerasyonla başlar. Miyositler arasında septalar oluşturan yaygın interstisyel fibrozise yol açan geniş fokal dejenerasyonlarla sonlanır. Miyokard hücreleri morfolojik değişiklikler açısından ileri derecede dirençlidirler. Bu hücrelerde ancak çok yüksek dozlarda radyasyon etkisi ile yapısal hasarlar oluşturulabilir. Miyositler RT'den doğrudan etkilenmezler. Miyosit hasarının miyokardiyal kapillerdeki hasara bağılı olduğu düşünülmektedir. Kapiller hasar miyokardit öncesi elektron mikroskop ile saptanabilir. Koroner damarlar ise RT'ye en duyarlı yapılardır. Radyasyonun kalpteki akut ve kronik etkileri, büyük ölçüde bu yapılardaki hasarlar tarafından belirlenir. Endotel hücre membranında düzensizlik, sitoplazmik şişme, tromboz ve kapiller duvarın yıkımı görülebilir. Bu değişiklikleri rejenerasyon sonucu oluşan proliferatif yanıt izler. Fakat bu yanıt, kapiller kaybı karşılama da genellikle yetersiz kalır. Sonuçta miyosit/kapiller oranı %50 azalır. Kapiller yoğunlukta bu azalmayla birlikte stromal bağ dokusu yoğunluğu artar. Bunların sonunda da RT'nin miyositler üzerindeki etkisi, kalp kasının çizgili yapısının kaybolması ve sarkoplazmanın homojen hale gelmesi, nukleuslarda piknozis ve miyokardiyal nekrozlar şeklinde patolojik olarak izlenir (2, 3).

Kalbin %50'sinden fazlasının ışınlandığı durumlarda kardiyak hasarın oluşması için eşik RT dozu 20 Gy iken RT alanına giren kalp dokusu azaltıldığında kardiyak hasarın oluşması için daha yüksek dozlar gerekir. Kalbin α/β oranı düşüktür. Bu nedenle fraksiyonasyon anlamlı bir kardiyak koruma sağlar. Radyasyona bağılı kardiyomiyopati ise yoğun ve yaygın fibrozis oluşmasına bağılıdır. Lezyonlar yıllar geçtikçe yavaşça büyür ve sonunda kardiyak fonksiyonlarda bozulma ile sonlanır. Kalbin büyük kısmı RT alanına giren ve yaklaşık 30 Gy toplam doz alan Hodgkin lenfomalı hastalarda kardiyak fonksiyonlarda azalma görülmüştür. Kalbin korunan kısmının arttırılması ile semptom insidansı hızla düşer (1).

Bu çalışmada amaç, amifostin ve melatoninin kardiyoprotektif etkilerini karşılaştırmalı olarak araştırmaktır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Denekler:

Araştırmada 36 adet, ağırlıkları 170-310 gr arasında olan Spraque-Dawley sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar normal laboratuvar şartlarında tutulmuş, herhangi bir özel diyet uygulaması veya içme suyu kısıtlaması yapılmamıştır.

3.2 Araştırma Protokolü:

RT'ye bağlı kardiyak hasarın önlenmesinde amifostin ve melatonin'in etkilerinin araştırılması için 36 sıçan her grupta altı adet olmak üzere altı gruba ayrıldı.

1. Grup (melatonin + radyoterapi grubu : MRG): Sıçanlara eter ile anestezi yapıldıktan sonra intraperitoneal (i.p.) 10 mg/kg melatonin enjekte edildi. Kardiyak RT alan tespiti için vücut maskesi ile stabilizasyon sağlandıktan sonra simülasyon yapıldı (Şekil 1). Melatonin enjeksiyonundan 30 dakika sonra kalbe 20 Gy RT uygulandı.

2. Grup (amifostin + radyoterapi grubu : ARG): Sıçanlara eter ile anestezi yapıldıktan sonra i.p. 200 mg/kg amifostin enjekte edildi. Kardiyak RT alan tespiti için vücut maskesi ile stabilizasyon sağlandıktan sonra simülasyon yapıldı. Amifostin enjeksiyonundan 30 dakika sonra kalbe 20 Gy RT uygulandı.

3. Grup (kontrol radyoterapi grubu : KRG): Sıçanlara eter ile anestezi yapıldıktan sonra i.p. %0,9 serum fizyolojik enjekte edildi. Kardiyak RT alan tespiti için vücut maskesi ile stabilizasyon sağlandıktan sonra simülasyon yapıldı. Serum fizyolojik enjeksiyonundan 30 dakika sonra kalbe 20 Gy RT uygulandı.

4. Grup (kontrol melatonin grubu : KMG): Sıçanlara eter ile anestezi yapıldıktan sonra i.p. 10 mg/kg melatonin enjekte edildi. Kardiyak RT alan tespiti için vücut maskesi ile stabilizasyon sağlandıktan sonra RT için simülasyon yapıldı. Ancak RT uygulanmayarak melatonin için kontrol grubunu oluşturdular.

5. Grup (kontrol amifostin grubu : KAG): Sıçanlara eter ile anestezi yapıldıktan sonra i.p. 200 mg/kg amifostin enjekte edildi. Kardiyak RT alan tespiti için vücut maskesi ile stabilizasyon sağlandıktan sonra RT için simülasyon yapıldı. Ancak RT uygulanmayarak amifostin için kontrol grubunu oluşturdular.

6. Grup (kontrol grubu : KG): Sıçanlara eter ile anestezi yapıldıktan sonra i.p. %0,9 serum fizyolojik enjekte edildi. Kardiyak RT alan tespiti için vücut maskesi ile stabilizasyon sağlandıktan sonra RT için simülasyon yapıldı. Ancak RT uygulanmayarak kontrol grubunu oluşturdular.

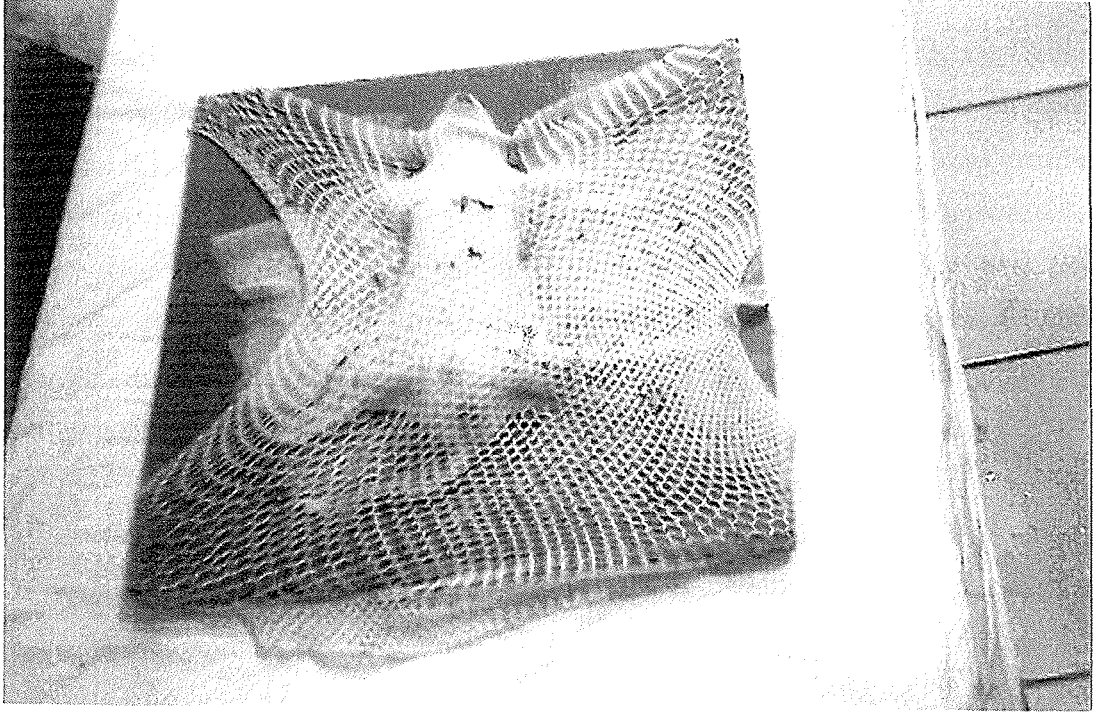
3.3 Radyoterapi tekniği:

Sıçanlara Co 60 teleterapi cihazı (Alcyon,GE) ile RT uygulandı. RT, Dalloz F. ve arkadaşlarının daha önce tanımlamış oldukları teknikle yapıldı (47). Bu tekniğe göre 5 x 5 cm`lik bir alan açıldı. 7 cm kalınlıkta ve ortasında 1.5 cm`lik bir delik bulunan kurşun blok döküldü. Böylelikle hedef alan içine kalp alınarak diğer dokular korundu. Kaynak ile sıçan cildi arasındaki mesafe 80 cm`e ayarladı. Tedavi derinliği 2 cm olarak belirlendi.

RT`nin akut etkilerinin belirlenmesi için, i.p. melatonin, amifostin veya serum

fizyolojik uygulandıktan 24 saat sonra Langendorff perfüze sıçan kalbi yöntemi ile kalp fonksiyonu, lipid peroksidasyonu, ve ışık ve elektron mikroskop incelemesiyle de patolojik hasar tespit edildi.

Şekil 1 : Kalp ışınlaması esnasında sıçanın pozisyon ve sabitlenmesi



3.4 Langendorff perfüze sıçan kalbi:

Deneyler Langendorff tekniğine uygun olarak yapıldı. Çalışma grubundaki hayvanlara i.p. üretan 1.5 g/kg olarak verilerek anestezi uygulandı. Denekler anestezi öncesi i.p. yoldan heparinize (1000 IU/kg) edildiler. Deneklerin anestezinin cerrahi safhasına girip girmediği pupil ve kornea refleksleri ile saptandı. Daha sonra linea alba üzerinden, abdominal bölgeden toraksa doğru yapılan bir insizyonla cilt açıldı ve toraksa girildi.

Abdominal aorta süratle kanatıldı. Aort 5/0 ipekle askıya alınıp sabitlendiği segmentin distalinden kesildi. Kalp hızlı bir şekilde çevre dokulardan temizlenip buz ile soğutulmuş Krebs-Henseleit solüsyonu (Mm/l ; 118.00 NaCl, 4.70 KCl, 2.52 CaCl₂, 1.66 MgSO₄, 24.88 NaHCO₃, 1.18 KH₂PO₄, 5.55 glukoz ve 2.00 Na-Piruvat) ile perfüze edildi. Perfüzyon, multikanal yavaş perfüzyon pompası aracılığı ile (Cole Palmer Masterflex Pump) yapıldı. Koroner perfüzyon akımı 6-6.5 ml/dk değerinde sabit tutuldu. Koroner damar yatağındaki değişiklikleri gözlemleyebilmek için kanülün alt ucunun aortadan sol ventriküle girmemesine özen gösterildi. Böylece aort yoluyla sol ventriküle geçmeyen besleyici solüsyon koroner arterlere ve oradan da sinüs koronaris yoluyla atıldı. Koroner perfüzyon basıncındaki değişiklikler aorta içine yerleştirilen basınç transüderi (PT 300-A Commat Ltd) ile kaydedildi. Basınç ileticisinin kalibrasyonu cıvalı manometre (F.C. Palmer) aracılığı ile yapıldı. EKG kayıtları üç platin iğne elektrot kullanılarak MP100 sistemi aracılığı ile Biopac sisteminde kaydedildi.

Deney protokolü başlamadan stabilizasyon için 20-30 dk beklendi. Tüm 6 gruptaki sıçanların bir saatlik kalp hızları, koroner diyastolik basınç ve koroner sistolik basınçlarının normal kayıtları alındı. Ardından 100 µl izoproterenol (1mg/ml) kanal sisteminden verildi ve bir saatlik bipolar elektrogram ve koroner basınç kayıtları alındı. Normal kalp hızı (KH), koroner diyastolik basınç (KSB) ve koroner sistolik basınçlarının (KSB) ortalama değerleri ile izoproterenol uygulanması sonrası kalp hızı (İzKH), koroner diyastolik basınç (İzKDB) ve koroner sistolik basınçlarının (İzKSB) ortalama değerleri hesaplandı. Bu değerler istatistiksel hesaplamalarda ortalama kalp hızı (Ort.KH), ortalama koroner diyastolik basınç (Ort.KDB), ortalama koroner sistolik basınç (Ort.KSB); izoproterenol uygulanması sonrası ortalama kalp hızı (Ort.İzKH), ortalama koroner diyastolik basınç (Ort.İzKDB) ve ortalama koroner sistolik basınç (Ort.İzKSB) olarak kullanıldı. Daha sonra işlem sonlandırılarak, sıçan kalbinin yarısı biyokimyasal belirleyicinin tayini için, diğer yarısı da patolojik inceleme için ayrıldı.

İzoproterenol (izoprenalin) beta-adrenerjik reseptörleri etkileyen en güçlü sempatomimetik ilaçtır. Belirgin vazodilatör etkisi vardır. Beta-1 ve beta-2 adrenerjik reseptörlerin her ikisine de aynı derecede güçlü etki eder. Etkinliği selektif değildir.

İzoproterenol uygulanması ardından kalpte pozitif inotropik etki beklenir. Kalbin bu pozitif inotropik etki altında ne kadar hızlandığı ise kalp fonksiyonu göstergesi olarak kullanılmaktadır (48). Deneyde izoproterenol 1mg/ml de hazırlandı ve preparata kanall sisteminden 100 µl verildi.

3.5 Biyokimyasal Belirleyici:

Langendorff perfüze sıçan kalbi incelemesinin hemen ardından sıçan kalbi ikiye bölünerek yarısı hızlıca donduruldu ve biyokimyasal olarak incelenene kadar dondurulmuş halde tutuldu. Kalp dokusundaki MDA miktarı Uchiyama ve Mihara tarafından tarif edilen yöntemle tayin edildi (49). Dokular %1.15 KCl, % 0.001 bütillenmiş hidroksi tolüen (BHT) ve %0.7 oranında sodyum dodesil sülfat (SDS) bulunan çözeltide homojenize edildi. 0.5 ml homojenata 3 ml %1'lik H_3PO_4 ve 0.5ml %67'lik tiyo barbiturik asit (TBA) eklenerek vortekslendi. Kaynar su banyosunda 1 saatlik inkübasyondan sonra örneklerin absorbansı 532nm de spektrometrede okundu. Tetrametroksipropan standart olarak kullanıldı ve sonuçlar nmol/ml olarak hesaplandı. Supernatandaki protein tayini Lawry metoduna göre yapıldı. Sonuçlar nmol/mgprotein olarak ifade edildi.

3.6 Patolojik İnceleme:

Kalp bütün olarak çıkarıldıktan hemen sonra bir yarısı ışık mikroskopik değerlendirme için %10'luk formaldehid içine kondu. Materyal rutin takip işleminden geçerek parafin bloklara gömüldü ve 4-5 mikron kalınlığında kesitler hazırlandı. Kesitler hematoxilen-eozin ve fibrozisi değerlendirme açısından Masson-trikrom boya yöntemleri ile boyandı.

Elektron mikroskop değerlendirme için kalp dokusundan alınan 1-2 mm çapında örnekler %3'lük glutaraldehid tespitinden sonra %2'lik osmium tetroxide (OsO_4) ile post fiksasyona bırakıldı. Rutin takip işlemlerinden sonra epon içine gömüldü. Hazırlanan

ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanarak JEOL 1010 model elektron mikroskopta incelendi.

3.7 İstatistiksel Yöntem:

İstatiksel hesaplamalarda SPSS bilgisayar programı, nonparametrik değerlerde Fisher'in kesin ki-kare testi, parametrik değerlerde ise Kruskal Wallis analizi ile Mann Whitney U testi kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Değerler ortalama olarak belirtildi.

4. BULGULAR

MRG'da ortalama kalp ağırlığı 267 ± 23 mg, ARG'da 248 ± 16 mg, KRG'da 253 ± 29 mg, KMG'da 242 ± 14 mg, KAG'da 252 ± 3 mg, KG'da 247 ± 51 mg idi.

Gruplar arasında sıçan kalp ağırlık değerleri açısından anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 1).

Tablo 1 : Grupların sıçan kalp ağırlık değerleri

Sıçan kalp ağırlıkları (ortalama mg cinsinden)	
MRG	267
ARG	248
KRG	253
MKG	242
AKG	252
KG	247
p	>0.05

4.1 Langendorff perfüze sıçan kalbi:

MRG'da ortalama 228 ± 11 atım/sn, ARG'da 208 ± 5 atım/sn, KRG'da 212 ± 35 atım/sn, KMG'da 206 ± 52 atım/sn, KAG'da 164 ± 44 atım/sn, KG'da 240 ± 43 atım/sn idi.

MRG'da ortalama koroner diyastolik basınç 116 ± 25 mmHg, ARG'da 75 ± 26 mmHg, KRG'da 67 ± 40 mmHg, KMG'da 76 ± 31 mmHg, KAG'da 52 ± 34 mmHg, KG'da 77 ± 35 mmHg idi.

MRG'da ortalama koroner sistolik basınç 140 ± 25 mmHg, ARG'da 89 ± 29 mmHg, KRG'da 90 ± 42 mmHg, KMG'da 89 ± 32 mmHg, KAG'da 66 ± 37 mmHg, KG'da 87 ± 37 mmHg idi.

İzoproterenol uygulanması ardından MRG'da ortalama kalp hızı 316 ± 20 atım/sn, ARG'da 265 ± 35 atım/sn, KRG'da 291 ± 19 atım/sn, KMG'da 259 ± 76 atım/sn, KAG'da 257 ± 51 atım/sn, KG'da 345 ± 34 atım/sn idi.

İzoproterenol uygulanması ardından MRG'da ortalama koroner diyastolik basınç 97 ± 38 mmHg, ARG'da 57 ± 18 mmHg, KRG'da 61 ± 28 mmHg, KMG'da 71 ± 27 mmHg, KAG'da 42 ± 23 mmHg, KG'da 56 ± 9 mmHg idi.

İzoproterenol uygulanması ardından MRG'da ortalama koroner sistolik basınç 120 ± 34 mmHg, ARG'da 74 ± 22 mmHg, KRG'da 85 ± 39 mmHg, KMG'da 85 ± 29 mmHg, KAG'da 58 ± 31 mmHg, KG'da 66 ± 11 mmHg idi.

KRG ve KG arasında ortalama kalp hızı değerleri ortalama koroner diyastolik basınç değerleri ve ortalama koroner sistolik basınç değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık yoktu ($p > 0.05$). İzoproterenol uygulanması ardından ise ortalama koroner diyastolik ve sistolik basınç değerleri arasında yine istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olmamakla birlikte ($p > 0.05$) ortalama kalp hızı değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık mevcuttu. KRG'nun izoprotenole yanıt olarak kalp hızı değerlendirildiğinde (291 atım/sn), KG (345 atım/sn) kadar hızlanmadığı gözlemlendi ($p < 0.05$) (Tablo 2).

Tablo 2 : KRG ve KG'larının Langendorff perfüze sıçan kalbi parametre değerleri

	KRG	KG	p
Ort.KH	212	240	>0.05
Ort.KDB	67	77	>0.05
Ort.KSB	90	87	>0.05
Ort.İzKH	291	345	<0.05
Ort.İzKDB	61	56	>0.05
Ort.İzKSB	85	66	>0.05

Diğer grupları bu açıdan değerlendirdiğimizde, ARG'nin (274atım/sn) ise tıpkı KRG gibi izoprotenole yanıt olarak KG kadar hızlanmadığı gözlemlendi ($p<0.05$) (Tablo 3). MRG (316 atım/sn) ile KG arasında istatistiksel açıdan bir fark yoktu ($p>0.05$) (Tablo 4). Sempatomimetik izoproterenol uyarısına cevaben ortalama kalp hızı KG 'da en yüksek iken KRG ve ARG'da ise düşük idi. MRG 'da ise KRG ve KG'nun arasında bir değerde ölçüldü.

Tablo 3 : ARG ve KG'larının Langendorff perfüze sıçan kalbi parametre değerleri

	ARG	KG	p
Ort.KH	208	240	>0.05
Ort.KDB	75	77	>0.05
Ort.KSB	89	87	>0.05
Ort.İzKH	265	345	<0.05
Ort.İzKDB	57	56	>0.05
Ort.İzKSB	74	66	>0.05

Tablo 4 : MRG ve KG'larının Langendorff perfüze sıçan kalbi parametre değerleri

	MRG	KG	p
Ort.KH	228	240	>0.05
Ort.KDB	116	77	>0.05
Ort.KSB	140	87	>0.05
Ort.İzKH	316	345	>0.05
Ort.İzKDB	97	56	>0.05
Ort.İzKSB	120	66	>0.05

4.2 Biyokimyasal Belirleyici:

MRG'da ortalama MDA 3.68 ± 0.92 nmol/mgprotein, ARG'da ortalama MDA 3.30 ± 1.18 nmol/mgprotein, KRG'da ortalama MDA 3.43 ± 0.52 nmol/mgprotein, KMG'da ortalama MDA 3.37 ± 0.46 nmol/mgprotein, KAG'da ortalama 3.82 ± 0.69 nmol/mgprotein, KG'da ortalama MDA 3.20 ± 0.52 nmol/mgprotein idi.

MRG, ARG, KRG, KMG, KAG ve KG arasında sıçan kalp MDA değerleri açısından anlamlı bir farklılık yoktu ($p > 0.05$) (Tablo 5).

Tablo 5 – Grupların sıçan kalp MDA değerleri

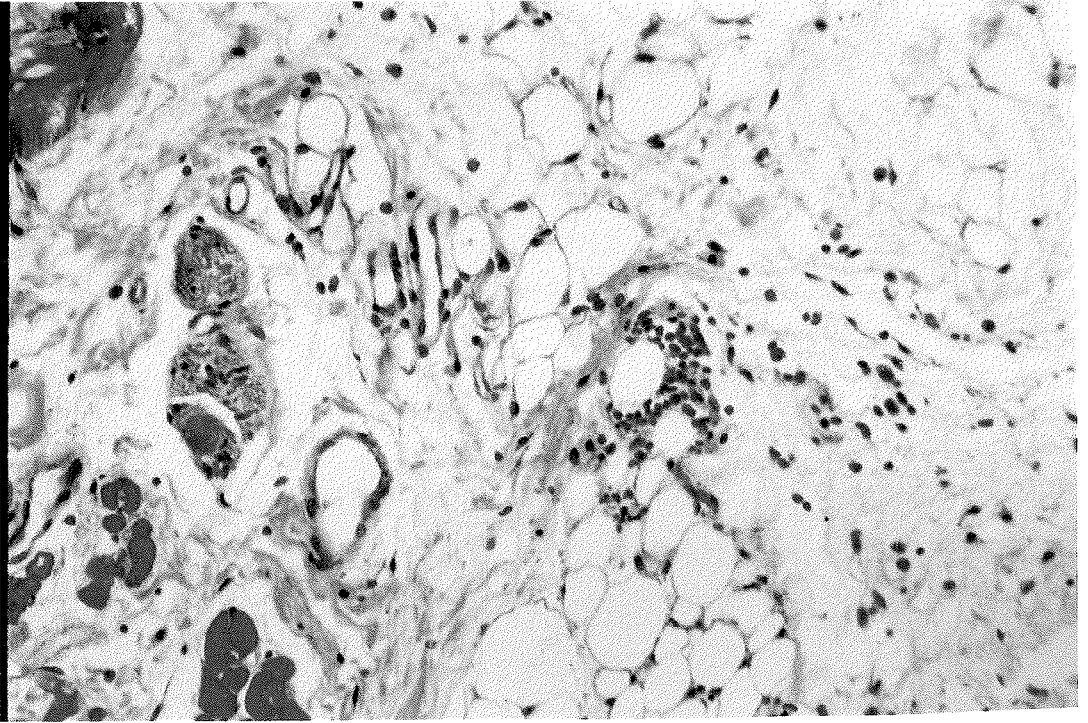
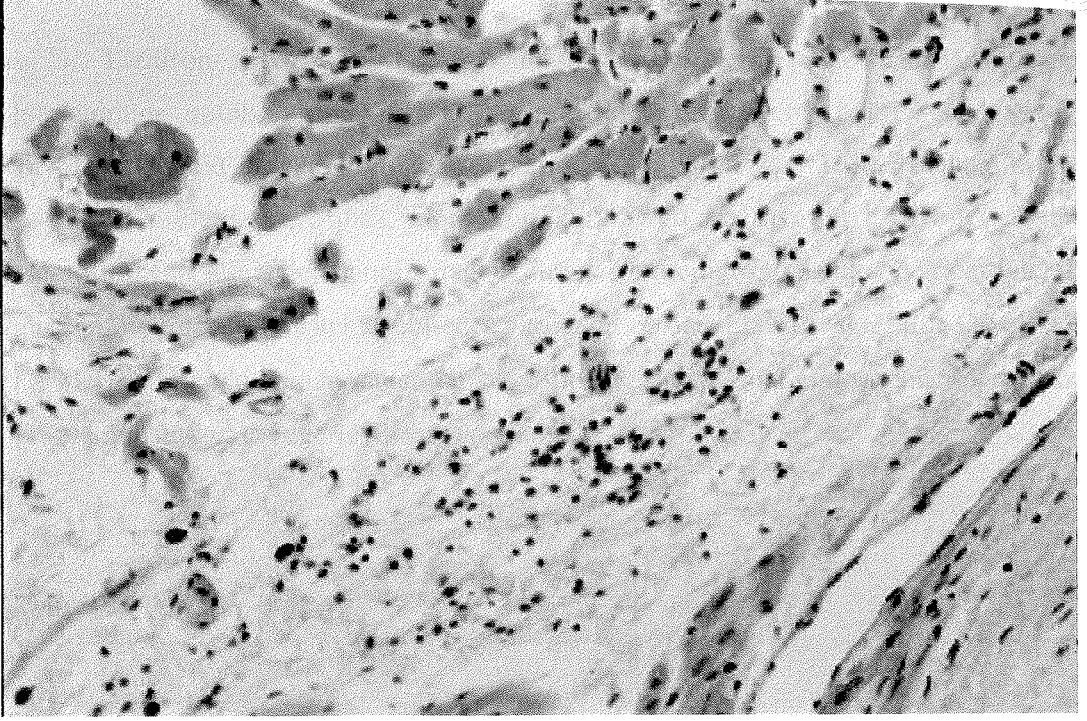
	MDA (ortalama nmol/mgprotein cinsinden)
MRG	3.68
ARG	3.30
KRG	3.43
MKG	3.37
AKG	3.82
KG	3.20
p	>0.05

4.3 Patoloji:

4.3.1 Işık Mikroskobu:

Işık mikroskobu ile kalp örnekleri perikard, miyokard ve koroner damarlar açısından incelendi. Perikardda iltihap, ödem ve fibroz araştırıldı. KRG da perikardda %50`ye ulaşan fokal iltihap alanlarına rastlandı. RT uygulanmayan KG`da ise fokal iltihap alanı görülmedi. RT uygulanan gruplar (MRG, ARG, KRG) arasında perikardda %50- %60 arasında fokal iltihap alanları mevcuttu (Şekil2). Ancak gruplar arasında istatistiksel açıdan bir fark yoktu ($p>0.05$). RT uygulanmayan gruplarda (KMG, KAG, KG) ise fokal iltihap alanları görülme sıklığı %0- %20 arasında idi. Bu gruplar arasında da fokal iltihap alanları görülme sıklığı açısından bir fark yoktu ($p>0.05$). Ancak RT uygulanan gruplarla (MRG, ARG, KRG) RT uygulanmayan gruplar (KMG, KAG, KG) arasında fokal iltihap alanları görülme sıklığı açısından fark bulundu ($p<0.05$). Miyokard iltihap, intersisyal fibroz, miyofibrillerin birbirinden ayrılması, miyokardiyal dejenerasyon, miyokardiyal nekroz, çizgili kas yapısının kaybı, kas liflerinde vaküol ve kapiller dilatasyon açısından değerlendirildi. Bu histolojik görünümünün hiçbirine rastlanmadı. Dolayısıyla RT uygulanan gruplarla (MRG, ARG, KRG) RT uygulanmayan gruplar (KMG, KAG, KG) arasında miyokard değişiklikleri açısından fark yoktu ($p>0.05$). Koroner damarlarda endotel hücre membranında düzensizlik, sitoplazmik şişme, tromboz ve kapiller duvarın yıkımı araştırıldı. Bu histolojik görünümünün hiçbirine rastlanmadı. Dolayısıyla RT uygulanan gruplarla (MRG, ARG, KRG) RT uygulanmayan gruplar (KMG, KAG, KG) arasında koroner damar değişiklikleri açısından bir fark yoktu ($p>0.05$).

Şekil 2: HE X 200 ve Masson trikrom X 200. Perikardda lenfoplazmositer iltihabi hücreler



4.3.2 Elektron mikroskop:

Elektron mikroskop incelemesinde, tüm gruplarda değerlendirilen kalp kası hücrelerinde mitokondrial yapıların normal olduğu, ve ödeme bağlı genişleme, krista kaybı, kristaloid oluşumu gibi özel patolojik bulgular içermediği saptandı. Benzer şekilde hücrelerde myofibril yapılarının korunduğu ve myofibril kaybı, parçalanma, vakuolizasyon gibi dejeneratif değişiklikler içermediği gözlemlendi. Ayrıca interstisyel alanlarda fibrozisi destekleyebilecek kollajen artışı mevcut değildi. Örneklerle ait kesitlerin tümünde damar yapısı temsil edilmediği için damar endotel hücreleri hakkında gruplar arasında bir değerlendirme yapılamadı.

5. TARTIşMA

Amifostin özellikle tükrük bezinde iyi bir koruma sağlayarak ağız kuruluğunu azaltır. Baş-boyun kanserlerinin RT'sinde profilaktik olarak kullanılan amifostinin radyasyonun akut etkisi olan oral mukoziti ve geç dönemde de ağız kuruluğunu azalttığı gösterilmiştir (13-15) .

Barsak ışınlamalarında da amifostinin uygulanmasının barsak mukozasını koruduğu gösterilmiştir. Ben-Josef ve ark.'nın bir çalışmasında radyasyonun geç etkilerinden olan rektal hasarın önlenmesinde amifostinin etkilerini değerlendirilmiş ve 1500-2500 mg amifostin uygulanmasının rektal hasar semptomlarını azalttığını bildirilmiştir (16).

Kemik ışınlamalarında, RT ncesi amifostin uygulanmasının kemik büyümesini koruduğu gösterilmiştir (17).

Ayrıca amifostinin hepatotoksisite oluşumunu azalttığı da bilinmektedir. Symon ve ark. karaciğer ışınlamalarında amifostin uygulanmasının hepatositleri RT hasarından koruduğunu göstermişlerdir (12).

RT'ye bağlı kronik dönemde oluşan kardiyak hasara karşı amifostinin koruyucu etkileri de araştırılmıştır. Kruse ve ark. alışmalarında amifostinin, kardiyak RT'den 6 ay sonra incelenen sıçan kalplerinde, RT'ye bağlı gelişen histopatolojik değişiklikleri (interstisyel ve perikardiyal fibrozis) ve kardiyak fonksiyonlardaki bozulmayı önlediğini göstermişlerdir (20). Tokatlı ve ark. da RT'ye bağlı kronik dönemde oluşan kardiyak

hasarı önlemede amifostinin rolünü incelemişlerdir. RT'ye bağlı gelişen miyokardiyal dejenerasyonu, koruyucu olarak amifostin alan grupta anlamlı olarak az olduğunu gözlemişlerdir (21).

Bizim çalışmamızda ise KRG ve KG arasında biyokimyasal belirteç olarak MDA ve patolojik açıdan ise elektron mikroskop incelemeleri değerlendirildiğinde istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0.05$). Işık mikroskobu incelemelerinde KRG'da perikardda fokal iltihap alanları gözlemledik. Literatürde akut dönemde RT'nin perikard üzerine etkilerini inceleyen 3 ayrı çalışmada da fokal iltihap alanları saptanmıştır (45-46, 50). Bizim çalışmamız da perikarda RT'ye bağlı iltihap alanlarının gözlenmesi literatürle uyumludur. Ancak, amifostinin kalbi RT hasarından koruması açısından çalışmamızı değerlendirdiğimizde, ARG ile KRT arasında perikardda fokal iltihap görülme sıklığı açısından bir fark olmadığını gördük. Çalışmamızda RT'nin akut etkilerinden korunma açısından amifostinin perikardiyal fokal iltihap gelişimini engellemede koruyuculuğunun olmadığı sonucuna vardık.

Kalp fonksiyonları açısından incelediğimizde KRG ve KG arasında ortalama kalp hızı değerleri, ortalama koroner diyastolik basınç değerleri ve ortalama koroner sistolik basınç değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0.05$). İzoproterenol uygulanması ardından ise ortalama koroner diyastolik basınç değerleri ve ortalama koroner sistolik basınç değerleri arasında yine anlamlı bir farklılık olmamakla birlikte ($p>0.05$), ortalama kalp hızı değerleri arasında anlamlı bir farklılık mevcuttu. KRG'nun (291 atım/sn), izoprotenole yanıt olarak kalp hızı değerlendirildiğinde, KG (345 atım/sn) kadar hızlanmadığı gözlemlendi. Langendorff perfüze sıçan kalbi ile değerlendirdiğimiz kalp fonksiyonları açısından RT'ye bağlı akut kardiyak hasar, izoprotenole yanıt olarak kalp hızındaki artışın düşmesi şeklinde gözlemlendi. ARG ve KG değerlendirildiğinde, ARG'nun tıpkı KRG gibi izoprotenole yanıt olarak KG kadar hızlanmadığı gözlemlendi. Çalışmamızda RT'nin akut etkilerinden korunma açısından, semptomimetik uyarana yanıt olarak kalp hızındaki artış değerlendirildiğinde amifostinin koruyuculuğunun olmadığı sonucuna ulaşıldı.

Literatürde, antioksidan maddelerin organizmayı toksik ajanlardan koruduğunu gösteren bir çok çalışma mevcuttur (28,51).

Antioksidan özelliği sayesinde melatonin organizmayı etanol, kadminyum ve fosfin gibi bazı toksik ajanlardan korur. El-Sokkary ve ark. kronik etanola mağruz kalan Spraque-Dawley sıçanlarında melatonin uygulamışlardır. Daha önce antioksidan maddelerin etanol toksisitesini lipid peroksidasyonunu azaltarak hepatik yağ birikimini kısmen giderdiği bilinmekteydi (28). Kronik etenola maruz bırakılan Spraque-Dawley sıçanlarına melatonin uyguladıklarında, beyin, kalp, testis ve akciğerlerde etanol toksisitesi sonucu oluşan lipid peroksidasyon ürünlerinin azaldığını görmüşlerdir (28). Karbownik ve ark. kadminyumun lipid peroksidasyonu yoluyla beyin, kalp ve akciğerde oluşturduğu hasarı melatoninle azaltmanın mümkün olduğunu bildirmişlerdir. Kadminyum toksisitesi lipid peroksidasyonu ile oluşmaktadır. Kadminyum uygulanan hamsterlere melatonin uygulanmasının ise beyin, kalp ve akciğerde oluşan lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermişlerdir (22). Hsu ve ark. zararlı böceklerden tarlaları korumak amaçlı kullanılan fosfin toksisitesini azaltmak için melatonin uygulanmasının yararını incelemişlerdir. Böbrek ve kalp, toksisiteye bağlı olarak artan lipid peroksidasyon ürünü MDA, melatonin uygulananıyla anlamlı olarak düşmüştür. Antioksidanlardan dokuları koruyan antioksidan enzimler ise, etanole bağlı azalırken, etanolla birlikte melatonin uygulandığında artmışlardır (29).

Kemoterapotik ilaçlar kanser tedavisinde sıklıkla uygulanırlar. Ancak bu ilaçlar aynı zamanda organizmaya toksik etki de gösterirler. Bunlardan bazıları toksisitesini serbest radikal oluşturarak sağlar. Morishima ve ark. doksorubisine bağlı kardiyak hasarın önlenmesinde melatoninin etkisini araştırmışlardır (30). Melatonin ve doksorubisin birlikte uyguladıklarında, sadece doksorubisin uygulanan Spraque-Dawley sıçanlara göre, kalbin vücut ağırlığına oranı artmıştır. Arteryal kan akımında, kardiyak fonksiyonları gösteren sol ventrikül fraksiyonel kısalımında anlamlı olarak bir fark olmamakla birlikte, lipid peroksidasyonu doksorubisin uygulanan grupta, melatoninle birlikte doksorubisin uygulanan gruba oranla anlamlı bir yükselme tespit edilmiştir.

Elektron mikroskobisiyle kalbi incelediklerinde ise melatoninle birlikte doksorubusin uyguladıkları grup kontrol grubuyla neredeyse ayırt edilemezken kadar benzeşirken, tek başına doksorubisin uyguladıkları grupta belirgin miyokardial lezyonlar görülmüştür (30). Xu. ve ark da doksorubusin kardiyotoksisitesine karşı melatonin uygulamışlardır. Doksorubusin tek başına verildiğinde vücut ağırlığında kontrol grubuna göre düşmeye sebep olurken, doksorubisine melatonin eklenmesi bu düşüşü azaltmamıştır. Doksorubisine bağlı sol ventiküler sistolik ve diyastolik basınçların, arteryel sistolik ve diyastolik basınçların ve kalp hızının düştüğü görülmüştür. Ancak doksorubisinle birlikte melatonin uygulandığında sol ventiküler sistolik ve diyastolik basınçların, arteryel sistolik ve diyastolik basınçların ve kalp hızının düşmediğini saptayarak melatonin kalp fonksiyonlarını doksorubisinin toksik etkisinden koruduğu sonucuna ulaşmışlardır (31).

Agapito ve ark. doksorubisine bağlı serbest radikallerin etkisiyle beyin, kalp ve böbrekte oluşan MDA ile temsil ettikleri lipid peroksidasyon ürünlerinin melatonin varlığında azaldığını göstermişlerdir (32).

Tümör hücre kültürlerinde ve tümör hücreleri ekilen hayvanlarda doksorubisin ile birlikte melatonin verildiğinde antitümöral etkinin arttığını gösteren çalışmalar kanser tedavisinde melatoninin güvenle kullanılabileceğini ön görmektedir. Granzotto ve ark. sıçan lösemi P 388, meme adenokarsinom MCF-7, kolon karsinom LoVo ve normal meme epitelyal HBL-100 hücre kültürlerinde melatoninin, doksorubusin sitotoksisitesi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Melatonin sıçan lösemi P 388 hücre kültüründe doksorubusin direncini, doza bağımlı olarak arttırmıştır (33). Wahap ve ark. Ehrlich asitli karsinom hücre kültürü ekilmiş Swiss albino farelerinin bir grubuna doksorubusin uygulayıp, dokdorubusin ve melatonin uyguladıkları diğer grupla karşılaştırmışlardır. Doksorubisinin tek başına uygulandığı grupta MDA artarken, melatonin doksorubisine eklendiğinde MDA miktarı düşmüştür. Antitümöral etkinliği değerlendirmek amacıyla sağ kalan hayvanların yüzdesi ve ortalama yaşam süreleri karşılaştırıldığında, doksorubusinle birlikte melatonin uygulamasının, tek başına melatonine oranla hem sağ

kalan hayvanların yüzdesinde hem de ortalama yaşam süresinde artış sağladığı izlenmiştir (34). Kothari ve ark.'nın yaptıkları çalışmada ise tamoksifen ile birlikte melatonin verildiğinde antitümöral etkinin arttığı gösterilmiştir (35).

RT hasarına karşı melatoninin koruyucu etkisini inceleyen çalışmalar da mevcuttur. Yavuz ve ark. büyümekte olan sıçanlarda, RT'ye bağlı epifizyel hasarı ve bu hasarı önlemede melatoninin etkilerini incelemiştir. RT öncesi koyucu olarak melatonin uygulanan sıçanlarda epifizyel hasarın ve buna bağlı olarak kemik kısalığının daha az olduğunu göstermişlerdir (50). Vijayalaxmi ve ark. tüm vücut RT'sinden sonra sağ kalım oranlarını araştırmışlar ve RT öncesi melatonin uygulanan farelerde sağ kalım oranlarının daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (52). Koç ve ark. ise, radyoprotektör olarak melatonin kullanımı ardından yapılan ışınlamalarda, melatonin uygulanmayan sıçanlara oranla MDA, süper oksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksitaz enzim seviyelerinin daha yüksek olduğunu saptamışlardır (53).

Bizim çalışmamızda ise KRG ve KG arasında biyokimyasal belirteç olarak MDA, patolojik açıdan ise elektron mikroskop incelemeleri değerlendirildiğinde gruplar istatistiksel olarak farklı olmadığından, RT'ye bağlı akut kardiyak hasar değerlendirilmesinde yararlanılamamıştır. Patolojik olarak ışık mikroskopu incelemelerinde KRG da perikardda fokal iltihap alanlarına rastlandı. Ancak MRG ile KRT arasında perikardda fokal iltihap görülme sıklığı açısından bir fark yoktu. Dolayısıyla melatoninin RT'nin akut etkilerinden korunma açısından, perikardiyal fokal iltihap görülmesi ile akut koruyuculuğunun değerlendirilemeyeceği sonucuna ulaşıldı.

Kalp fonksiyonları değerlendirildiğinde KRG'nun izoprotenole yanıt olarak kalp hızı 291 atım/sn iken, KG 345 atım/sn olup daha fazla hızlanması ve iki grup arasındaki farkın anlamlı idi. Böylelikle Langendorff perfüze sıçan kalbi ile kalp fonksiyonları açısından RT'ye bağlı akut kardiyak hasar, izoprotenole yanıt olarak kalp hızındaki artışın düşmesi şeklinde gözlemlendiğini saptamıştık. Melatoninin koruyuculuğunu bu açıdan değerlendirdiğimizde, MRG ile KG arasında istatistiksel açıdan bir fark yoktu.

Sempatomimetik izoproterenol uyarısına yanıt olarak ortalama kalp hızı KG 'da en yüksek iken KRG ve ARG'da düşük seviyede idi. MRG 'da ise KG ve KRG arasında bir değerde ölçüldü. Sempatomimetik uyarana yanıt olarak kalp hızındaki artış değerlendirildiğinde MRG'nun KG'dan istatistiksel açıdan farklı olmayıp hatta KG'na en yakın değerde olması gözlemi ile, melatoninin RT'nin akut etkilerinden kalbi koruduğu sonucuna ulaşıldı.

RT'ye bağlı akut olarak perikardda iltihap görülmesi iyi bilinen klinik bir durum olup sonuçlarımız literatürle uyumludur. RT sonrası melatoninin ve amifostinin belirgin radyoprotektör etkisi ortaya çıkmadı. RT'ye bağlı kronik kardiyak toksisite modelinde melatonin ve amifostinin radyoprotektör etkisini inceleyen uzun süreli çalışmalarda, patolojik olarak radyoprotektör etkinin gözlenebileceği öngörülebilir.

Bu çalışmada RT'nin akut kardiyotoksik etkisini fonksiyonel, biyokimyasal ve patolojik yöntemlerle inceledik. Kalp fonksiyonları dikkate alındığında, melatoninin RT'den 20-30 dak. önce uygulandığında izoproterenol stresi altında kalbin hızlanma fonksiyonunu koruduğu gözlemlendi. Her ne kadar RT uygulanmayan grubun kalp hızı değerlerine ulaşmasa da ARG'nun tersine KG'dan anlamlı olarak farklılığı da bulunamadı. Böylece melatoninin RT'nin akut kardiyak yan etkilerine karşı radyoprotektör olarak etkili olduğu gösterildi. Ancak aynı radyoprotektör etki amifostin için geçerli değildi. RT'ye bağlı kronik kardiyak toksisite ile ilgili melatonin ve amifostinin radyoprotektör etkisini inceleyen çalışmalar devam etmektedir. Melatoninin insanlarda klinik olarak da radyoprotektör etkiliğini gösteren yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Radyoterapiye bağı akut kardiyak hasar, Langendorff perfüze sıçan kalbi düzeneğı ile kalp fonksiyonlarının değeriendirilmesinde, izoprotenole yanıt olarak kalp hızındaki artışın RT alan sıçanlarda daha düşük olması şeklinde gözlendi. Patolojik olarak ise ışık mikroskobu incelemelerinde, perikardda fokal iltihap alanları şeklinde tespit edildi.
2. Langendorff perfüze sıçan kalbi düzeneğı ile kalp fonksiyonlarının değeriendirilmesinde ortalama kalp hızı değeri, ortalama koroner diyastolik basınç değeri ve ortalama koroner sistolik basınç değeri ile RT'ye bağı akut kardiyak hasar belirtileri gösterilemedi..İzoproterenol uygulanması sonrası ortalama koroner diyastolik basınç değeri, ortalama koroner sistolik basınç değeri incelemeleri ile RT'ye bağı akut kardiyak hasar belirtileri gösterilemedi. Biyokimyasal belirteç olarak MDA düzeyleri değeriendirmeleri ile RT'ye bağı akut kardiyak hasar belirtileri gösterilemedi. Patolojik açıdan ise elektron mikroskop incelemeleri ile RT'ye bağı akut kardiyak hasar belirtileri gösterilemedi.
3. Langendorff perfüze sıçan kalbi düzeneğı ile kalp fonksiyonlarının değeriendirilmesinde, izoprotenole yanıt olarak kalp hızındaki artışın KG değerielerine ulaşmaması, patolojik olarak ise ışık mikroskobu incelemelerinde, perikardda fokal iltihap alanları izlenmesine bakılarak RT'nin akut etkilerinden kalbi korunma açısından amifostinin koruyuculuğı olmadığı gösterildi.
4. Langendorff perfüze sıçan kalbi düzeneğı ile kalp fonksiyonlarının değeriendirilmesinde, MRG'da izoprotenole yanıt olarak kalp hızındaki artışın

KG değerlerinden farklı olmamasına bakılarak RT`nin akut etkilerinden kalbin korunması açısından melatoninin koruyuculuğu olduğu gösterildi.

5. Patolojik olarak ise ışık mikroskobu incelemelerinde, perikardda fokal iltihap alanları izlenmesine bakılarak RT`nin akut etkilerinden kalbi korunma açısından melatoninin koruyuculuğunun olmadığı gözlendi.
6. Radyoterapiye bağlı kronik kardiyak toksisite ile ilgili melatonin ve amifostinin radyoprotektör etkisini inceleyen çalışmalara ve melatoninin insanlarda klinik olarak da etkinliğini gösteren yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

8. ÖZET

RADYOTERAPİYE BAĞLI KARDİAK HASARIN ÖNLENMESİNDE AMİFOSTİN VE MELATONİN'İN ETKİLERİ

RT'ye bağı kardiyak hasar iyi bilinen bir klinik durumdur. Serbest radikalleri temizleyen bir radyoprotektör olan amifostinin normal hücreleri iyonizan radyasyondan koruduğı bir çok dokuda gösterilmiştir. Kronik dönemde de amifostinin kardiyoprotektör etkisi gösterilmiştir. Bir diğ serbest radikal temizleyicisi olan melatonin de normal hücreleri iyonizan radyasyondan koruduğı kalp hariç bir çok dokuda gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı amifostin ve melatoninin radyasyona bağı akut kardiyak hasara karşı kardiyoprotektör etkisini değerlendirmektir.

Sıçan kalpleri: 1. kardiyak fonksiyonlar, 2. oksidatif hasarın biyokimyasal belirteci, 3. patolojik değişiklikler açısından incelenerek gerçekleştirildi. Sıçanlar her grupta altı sıçan olacak şekilde altı gruba ayrıldı. Grup 1'e 10 mg/kg melatonin, grup 2'ye 200 mg/kg amifostin, grup 3'e serum fizyolojik enjekte edildi. Simülasyon yapıldıktan sonra, grup 1, 2 ve 3'e enjeksiyonu takip eden 30 dak. içinde 20 Gy kardiyak RT tek fraksiyonda uygulandı. Grup 4'e 10 mg/kg melatonin , grup 5'e 200 mg/kg amifostin, grup 6'ya serum fizyolojik enjekte edildi. Ancak simülasyon yapıldıktan sonra, grup 4, 5 ve 6'ya enjeksiyonu takiben kardiyak RT

uygulanmayarak, kontrol grupları olarak bırakıldılar. Kardiyak fonksiyonları değerlendirmek için Langendorff perfüze sıçan kalbi metodu uygulandı. Kalp hızı, koroner sistolik ve diyastolik basınçlar ölçüldü. Sempatomimetik uyaran olan izoproterenol enjeksiyonunu takiben kalp hızı, koroner sistolik ve diyastolik basınçlar tekrar ölçüldü. Oksidatif hasara bağlı biyokimyasal belirteci değerlendirmek için sıçanların kalp dokusunda bulunan MDA değerleri ölçüldü. Patolojik değişiklikleri incelemek için sıçan kalp dokusu ışık mikroskobu ve elektron mikroskobu ile değerlendirildi.

Sempatomimetik uyaran izoproterenole bağlı artan kalp hızı RT sebebiyle, KG değerlerine göre düşüktü. Işık mikroskobunda ise fokal perikardiyal iltihap alanlarına rastlandı. Ancak RT sonrası kalp hızı, koroner sistolik ve diyastolik basınçlar, sempatomimetik uyaran izoproterenol enjeksiyonu sonrası koroner sistolik ve diyastolik basınçlar, MDA değerleri, elektron mikroskop değerlendirilmesi değişmedi. RT öncesi amifostin uygulanması izoproterenole enjeksiyonu sonrası kalp hızındaki RT'ye bağlı düşmeyi ve ışık mikroskobunda gözlenen fokal perikardiyal iltihap alanlarına rastlanmasını değiştirmede. RT öncesi melatonin uygulanması ışık mikroskobunda gözlenen fokal perikardiyal iltihap alanlarına rastlanmasını değiştirmede. Ama RT öncesi melatonin uygulanmasıyla sempatomimetik uyaran izoproterenol sonrası artan kalp hızında RT nedeniyle düşme olmadı.

Bu çalışma sonucunda RT öncesi uygulanan amifostinin akut kardiyak hasarı engellemediği ancak melatonin uygulamasının kardiyak hasarı önleyebileceği düşünülmektedir.

9. SUMMARY

THE EFFECTS OF AMIFOSTINE AND MELATONIN AGAINST RADIOTHERAPY INDUCED CARDIAC TOXICITY

Radiation induced cardiac injury is well known clinical entity. The radioprotectant free-radical scavenger amifostine has been demonstrated to protect normal cells from ionizing radiation in many tissues. In chronic phase, cardioprotective effects of amifostine has been demonstrated as well. The another free-radical scavenger melatonin has been demonstrated to protect normal cells from ionizing radiation in many tissues also, but cardiac tissue. The aim of this study was to investigate the acute cardioprotective effects of amifostine and melatonin against radiation induced cardiac injury.

We evaluated heart of rat: 1. cardiac functional change, 2. biochemical determination of oxidative damage, 3. pathological changes. Rats were divided into six groups that each group containing six rats. Group 1 was injected 10 mg/kg of melatonin, group 2 was injected 200 mg/kg of amifostine, group 3 was injected sodium chloride 0.9%. After simulation, following a 30 min-period 20 Gy cardiac irradiation was given to groups 1, 2 and 3 in single fraction. Group 4 was injected 10

mg/kg of melatonin, group 5 was injected 200 mg/kg of amifostine, group 6 was injected sodium chloride 0.9%. But after simulation, cardiac irradiation was not given to groups 4, 5 and 6 and they are reserved as control groups. To evaluate cardiac functional change, method of Langendorff perfused rat heart is performed. Heart rate, coronary systolic and diastolic pressures were measured. Following isoproterenol injection as a sympathomimetic stimulant, heart rate, coronary systolic and diastolic pressures were measured again. To evaluate biochemical determination of oxidative damage, MDA was measured in cardiac tissue of rats. To evaluate pathological changes, cardiac tissue of rats were examined by light microscope and electron-microscope.

RT resulted in decrease of increased heart rate by sympathomimetic stimulant isoproterenol injection and pericardial focal inflammation areas in hearts of rat by light microscope according to KG. But RT did not result changes at heart rate, coronary systolic and diastolic pressures, coronary systolic and diastolic pressures by sympathomimetic stimulant isoproterenol injection, MDA levels, electron microscopic evaluation. Amifostine administration prior to RT not changed in decrease of increased heart rate by isoproterenol injection and evaluation of pericardial focal inflammation areas in hearts of rat by light microscope. Melatonin administration prior to RT not changed in evaluation of pericardial focal inflammation areas in hearts of rats by light microscope as well. However there was not decrease of increased heart rate by sympathomimetic stimulant isoproterenol injection caused by RT that were pretreated with melatonin.

The data obtained in this study suggest that amifostine administration prior to RT not prevent cardiac damage, but melatonin administration prior to RT may be beneficial to prevent cardiac damage.

10. KAYNAKLAR

1. Hall Eric J: Radiobiology for the radiologist. Fifth ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2000, pp. 5, 12-14, 91-92, 136-139, 356
2. Özalpan A: Temel radyobiyoloji. Birinci baskı. Haliç Üniversitesi yayınları, İstanbul, 2001, s. 30-35
3. Awwad Hasan K: Radiation oncology: Radiobiological and physiological perspectives. First ed. Kluwer Academic Pub., Dordrecht, 1990, pp. 64-66, 449-455
4. Pierro DD, Tavazzi B, Lazzario G, Giardini B: Malondialdehyde is a biochemical marker of peroxidative damage in the isolated reperfused rat heart. Molecular and Cellular Biochemistry. 116: 193-196, 1992.
5. Cordis GA, Bagehi D, Maulik N, Das DK: High-performance liquid chromatographic method for simultaneous detection of malonaldehyde, acetaldehyde, formaldehyde, acetone and propionaldehyde to monitor the oxidative stress in heart. Journal of Chromatography A. 661: 181-191, 1994.
6. Agapito MT, Antolin Y, Del Brio MT: Protective effect of melatonin against adriamycin toxicity in the sıçan. J Pineal Res. 31: 23-30, 2001.

7. Dopps J, Barrett A, Ash D: Practical Radiotherapy Planning. Third ed. Oxford University Press, New York, 1999, p. 1
8. Patt HM, Tyree EB, Straube RL, Smitt DE: Cysteine protection against X-irradiation. *Science*. 110:213-214, 1949.
9. Lindegarrd JC, Grau C: Has the outlook improved for amifostine as a clinical radioprotector. *Radiotherapy and Oncology*. 57:113-118, 2000.
10. Castiglione f, Giantranco P, Gridelli C: The potential role of amifostine in the treatment of non small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 29:57-66, 2000.
11. Kataoka Y, Murley JS, Khodarev NN: Activation of the nuclear transcription factor kB (NFkB) and differential gene expression in U87 glioma cells after exposure to the cytoprotector amifostine. *Int. J. Radiat Oncol Biol Phys*. 53: 180-189, 2002.
12. Symon Z, Levi M, Enslinger WD: Selective radioprotection of hepatocytes by systemic and portal vein infusions of amifostine in a rat liver tumor model. *Int. J. Radiat Oncol Biol Phys*. 50: 473-478, 2001.
13. Wasserman T, Mackowiak JJ, Briezel DM: Effect of amifostine on patient assessed clinical benefit in irradiated head and neck cancer. *Int. J. Radiat Oncol Biol Phys*. 48: 1035-1039, 2000.
14. Antonadou D, Pepelassi M, Puglisi M: Prophylactic use of amifostine to prevent radiochemotherapy-induced mucositis and xerostomia in head and neck cancer. *Int. J. Radiat Oncol Biol Phys*. 52; 739-747, 2002.
15. Rudat V, Meyer J, Momm F: Protective effect of amifostine on dental health after radiotherapy of the head and neck. *Int. J. Radiat Oncol Biol Phys*. 48: 1339-1343, 2000.

16. Josef EB, Han S, Tobi M: a pilot study of topical intrarectal application of amifostine for prevention of late radiation rectal injury. *Int. J. Radiat Oncol Biol. Phys.* 53: 1160–1164, 2002.
17. Damron TA, Margulies B, Biskup D: Amifostine before fractionated irradiation protects bone growth in rats better than fractionation alone. *Int. J. Radiat Oncol Biol. Phys.* 50: 479-483, 2001.
18. Janhnukainen K, Janhnukainen T, Salmi TT: Amifostine protect against early but not late toxic effects of doxorubicin in infant rats. *Cancer Reseach.* 61: 6423-6427, 2001.
19. Herman EH, Zhang J, Chadwick DP: Comparison of the protective effects of amifostine and dexrazone against the toxicity of doxorubicin in spontaneously hypertensive rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 45: 329-334, 2000.
20. Kruse JJ, Strootman EH, Wondergem J: Effects of amifostine on radiation-induced cardiac damage. *Acta Oncol* 42(1): 4-9, 2003.
21. Tokatli F, Uzal C, Doganay L: The potential cardioprotective effects of amifostine in irradiated rats. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 58(4): 1228-34, 2004.
22. Karbownik M, Gitto E, Lewinski A: Induction of lipid peroksidation in hamster organs by the carcinogen cadmium: amelioration by melatonin. *Cell Biol Toxicology.* 17: 33-40, 2001.
23. Reiter RJ, Tang L, Garcia JJ: Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci.* 60(25): 2255-71, 1997.
24. Pablos MI, Chuang JI, Reiter RJ: Time course of melatonin-induced increase in glutathione peroksidase activity in chick tissues. *Biol Signals.* 32: 69-75, 1995.

25. Pablos MI, Reiter RJ, Ortiz GG: Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in the brain of chick and their inhibition by light. 55: 69-75, 1998.
26. Poeggeler B, Reiter RJ, Hardeland R: Redox Report. 2: 179-184, 1996.
27. Shida CS, Castrucci AM, Lamy-Freund MT: High melatonin solubility in aqueous medium. J Pineal Res. 16(4):198-201, 1994.
28. El-Sokkary G, Reiter RJ, Tan DX: Inhibitory effect of melatonin on products of lipid peroxidation resulting from chronic ethanol administration. Alcohol and Alcoholism. 34(6): 842-850, 1999.
29. Hsu CH, Chi bc, Liu MY: Phosphine-induced oxidative damage in rats: role of glutathione. Toxicology. 179: 1-8, 2002.
30. Morishima I, Matsui H, Mukawa H. Melatonin, a pineal hormone with antioxidant property, protects against adriamycin cardiomyopathy in rats. Life Sci. 63: 7; 511-521, 2000.
31. Xu MF, Ho S, Quian ZM: Melatonin protects against cardiac toxicity of doxorubicin in rat. J Pineal Res. 31: 301-307, 2001.
32. Agapito MT, Antolin Y, Del Brio MT: Protective effect of melatonin against adriamycin toxicity in the rats. J Pineal Res. 31: 23-30, 2001.
33. Granzotto M, Rapozzi V, Decorti G: Effects of melatonin on doxorubicin cytotoxicity in sensitive and pleiotropically resistant tumor cells. J Pineal Res. 31: 206-213, 2001.

34. Wahab MHA, Akoul EMS, Abdel-Aziz H: Modulatory effects of melatonin and vitamin E on doxorubicin-induced cardiotoxicity in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. *Tumor*. 86: 157-162, 2000.
35. Kothari A, Borges A, Ingle A: Combination of melatonin and tamoxifen, as a chemoprophylaxis against N-nitrose-N-methylurea-induced rat mammary tumors. *Cancer Lett*. 111: 59-66, 1997.
36. Sabrazés J, Rieviere P : Recherches sur l'action biologique des rayons X C R Acad Sci. 124: 979-982, 1897.
37. Warthin A S , Pohle E A: The effect of roentgen rays on the heart I. The microscopic changes in the heart muscle of rats and rabbits following a single exposure. *JAMA* 89: 1825-1829, 1927.
38. Warthin A S , Pohle E A: The effect of roentgen rays on the heart II. The microscopic changes in the heart muscle of rats and rabbits following a series of exposure. *JAMA*. 89: 1825-1829, 1927.
39. Leach J E, Sugiura K: The effects of high voltage roentgen ray on the heart of adult rats. *Amer J Roentgenol* 45: 414-425, 1941.
40. Leach J E, Sugiura K: Late effects of high voltage roentgen rays on the heart of adult rats. *Amer J Roentgenol*. 48: 81-87, 1942.
41. Desjardins A V: Action of roentgen rays and radium on the heart and lungs. *Am J Roentgenol*. 27: 153-176, 1932.
42. Warren S: Effects of radiation on the cardiovascular system. *Arch Path*. 34: 1070-1079, 1942.

43. Stone H L, Bishop V S and Guyton A C: Progressive changes in cardiovascular function after unilateral heart irradiation. *Am J Physiology*. 206: 289-293, 1964.
44. Stewart JR, Fajardo LF, Cohn KE: Experimental radiation-induced heart disease in rabbits. *Radiology*. 91: 814-817, 1968.
45. Lauk S, Kiszal Z, Buschmann J: Radiation-induced heart disease in rats. *Int. J. Radiat Oncol Biol. Phys.* 11: 801-808, 1985.
46. Schultz SH: Radiation- induced heart disease: review of experimental data on dose response and pathogenesis. *Int. J. Radiat Oncol Biol Phys.* 61: 149-160, 1992.
47. Dalloz F, Maingon P, Cottin Y: Effects of combined irradiation and doxorubicin treatment on cardiac function and antioxidant defenses in the rat. *Free Radic Biol Med.* 26: 785-800, 1999.
48. Kayaalp SO: Tıbbi Farmakoloji. Cilt: 2. Dördüncü baskı. Feryal Matbaacılık, Ankara 1988, s. 1498-9.
49. Mihara M, Uchiyama M: Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 86(1): 271-8, 1978.
50. Fajardo L F, Steward J R: Experimental radiation induced heart disease. I. Light microscopic studies. *Am J Pathol.* 59: 299-310, 1970.
51. Mansouri A, Demeilliers C, Amsellem S: Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial DNA in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. *J Pharmacol Exper Ther.* 298(2): 737-43, 2001.

52. Vijayalaxmi, Meltz ML, Reiter RJ: Melatonin and protection from whole-body irradiation: survival studies in mice. *Mutat Res.* 425(1): 21-7, 1999.
53. Koc M, Taysi S, Bunyukoglu ME. Melatonin protects rat liver against irradiation-induced oxidative injury. *J Ra* 44: 211-5, 2003