

T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA DOKSORUBİSİN İLE OLUŞTURULMUŞ
KARDİYOTOKSİSİTE ÜZERİNE MELATONİN VE
TİMOKİNONUN ETKİLERİ**

**DENİZ YILDIZ PEHLİVAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sedat AKAR**

**ORTAK DANIŞMAN
Prof. Dr. Necip KUTLU**

2016 – İZMİR

T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA DOKSORUBİSİN İLE OLUŞTURULMUŞ
KARDİYOTOKSİSİTE ÜZERİNE MELATONİN VE
TİMOKİNONUN ETKİLERİ**

**DENİZ YILDIZ PEHLİVAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sedat AKAR**

**ORTAK DANIŞMAN
Prof. Dr. Necip KUTLU**

Bu tez İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2015- ÖNP-TIPF-0016 Proje numarası ile desteklenmiştir.

2016 – İZMİR

KABUL ve ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Fizyoloji Anabilim Dalı**
Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki
jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04/ 08/ 2016

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Necip KUTLU
(İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Nazan UYSAL HARZADIN
(Dokuz Eylül Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Nuran EKERBİÇER
(Celal Bayar Üniversitesi)

ONAY: Bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki
jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde değerli bilgileri, görüş ve önerileriyle yol gösterici olan, katkı ve yardımlarıyla tecrübelerini benden esirgemeyen ve bana her konuda destek olan, yüksek lisans eğitimim boyunca yetişmemde büyük katkıları olan tez danışmanım Prof. Dr. Sedat AKAR'a; çalışmamın nihai sonuca bağlanmasında her türlü yardımda bulunan ortak danışmanım Prof. Dr. Necip KUTLU, saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Ahmet KOYU ve Doç. Dr. Mustafa TÖZÜN'e; araştırmamda büyük titizlikle davranarak yapıcı eleştirilerde bulunan ve akademik anlamda destek veren, bilimsel düşünme yeteneğimi geliştiren değerli hocam Prof. Dr. Eser ÖZ OYAR'a; eğitimim sürecinde her konuda yardımlarını ve desteğini aldığım değerli çalışma arkadaşım Gülçin DURDAĞI'na; tez çalışmamı Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yapmama imkan sağlayan, tecrübe ve bilgileriyle bana yardımcı olan Prof. Dr. Mustafa ÖZBEK, tüm öğretim üyesi hocalarım ve araştırma görevlileri arkadaşlarıma; araştırmamın yürütülmesinde izin ve desteklerinden dolayı Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı çalışanlarına; 2015-ÖNP-TIPF-0016 nolu projenin gerçekleşmesi için destek sağlayan Kâtip Çelebi Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne; beni her zaman destekleyen, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen, bugünlere gelebilmemin en büyük mimarları olan sevgili annem Asye YILDIZ ve babam Davut YILDIZ'a; varlıklarıyla gurur duyduğum beni hiç yalnız bırakmayan kardeşlerim Cihan YILDIZ CANPOLAT, Hamit YILDIZ, Sibel YILDIZ OĞUZ ve Mine YILDIZ'a; hayat dolu, her zaman varlığıyla bana güç veren biricik eşim Ahmet PEHLİVAN ve çok sevgili Derya PEHLİVAN'a sonsuz şükran ve teşekkürlerimi sunarak bu tez çalışmamı onlara ithaf ediyorum.

Deniz YILDIZ PEHLİVAN
İZMİR, 2016

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	vii
Şekiller Dizini	x
Resimler Dizini	xi
Tablolar Dizini	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Doksorubisin	3
2.1.1. Kardiyak Morfoloji ve Fonksiyonlardaki Değişiklikler	3
2.1.2. Histopatolojik Değişiklikler	6
2.1.3. Doksorubisin Kardiyomiyopatisinin Mekanizmaları	7
2.1.3.1. Antrasiklinlerin Hücre İçi Etkileri	7
2.1.3.2. Serbest Radikal Hipotezi ve Oksidatif Stres	9
2.1.3.3. Apoptoz	11
2.1.4. Antrasiklin Kardiyotoksitesinin Tipleri	15
2.1.4.1. Akut Toksikite	17
2.1.4.2. Subakut Toksikite	17
2.1.4.3. Kronik Toksikite	17
2.1.4.4. Geç Toksikite	17
2.2. Melatonin	18
2.2.1. Melatoninin Biyosentez ve Metabolizması	18
2.2.2. Melatonin Sekresyonunun Düzenlenmesi	19
2.2.2. Melatonin Sekresyonunun Düzenlenmesi	21
2.2.3. Melatonin Reseptörleri	22
2.2.4. Melatoninin Etki Mekanizmaları	23
2.2.4.1. Oksidatif Stres Üzerine Etkisi	23

2.2.4.2. Apoptoz Üzerine Etkisi	24
2.2.4.3. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi	25
2.3. Nigella sativa (Çörek Otu)	26
2.3.1. Timokinon	27
2.3.1.1. Timokinonun Tıbbi Özellikleri	28
2.3.1.2. Timokinonun Etkileri	28
2.3.1.2.1. Antioksidan Etkisi	28
2.3.1.2.2. Antitümöral ve Antikanserojenik Etkisi	30
2.3.1.2.3. Analjezik ve Antienflamatuar Etkisi	31
2.3.1.2.4. Antihistaminik Etkisi	32
2.3.1.2.5. Antihiperlipitemik ve Antihiperkolesterolemik Etkisi	32
2.3.1.2.6. Antidiyabetik Etkisi	33
2.3.1.2.7. Antihipertansif Etkisi	34
2.3.1.2.8. Antibakteriyel, Antihelmintik Antifungal ve Antiviral Etkisi	35
2.3.1.2.9. Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkisi	37
2.3.1.2.10. Sınır Sistemi Üzerine Etkisi	38
2.3.1.2.11. Solunum Sistemi Üzerine Etkisi	38
2.3.1.2.12. Üriner Sistem Üzerine Etkisi	39
2.3.1.2.13. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi	40
2.3.1.2.14. İmmün Sistem Üzerine Etkisi	42
2.3.1.2.15. Hepatoprotektif Etkisi	42
2.3.1.2.16. Kemikler Üzerine Etkisi	44
2.3.1.2.17. Timokinon Toksisitesi	45
3. GEREÇ ve YÖNTEM	47
3.1. Deney Kurgusu	47
3.1.1. Deney Hayvanları	47
3.1.2. Laboratuar Koşulları	47
3.1.3. Deneklere Uygulanan Kimyasallar	48
3.1.4. Çalışma Planı	48
3.2. Analiz Yöntemleri	49
3.2.1. Anestezi ve Numunelerin Toplanması	49
3.2.2. Sayısal EKG Kayıtlarının Elde Edilmesi	50

3.2.3. Doku Takibi ve Dokuların Parafine Gömülmesi	51
3.2.4. Parafin Bloklardan Kesit Alma	52
3.2.5. Kesitlerin Boyanması	53
3.2.6. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi	54
3.2.7. İstatistiksel Analiz	60
4. BULGULAR	62
4.1. EKG Bulguları	62
4.2. Histolojik Bulgular	63
4.3. Biyokimyasal Bulgular	75
5. TARTIŞMA	78
5.1. Elektrokardiyografi Bulgularının Değerlendirilmesi	78
5.1.1. Doksorubisin İle Oluşturulan Kardiyotoksisitenin Elektrokardiyografik Etkileri	78
5.1.2. Melatoninin Elektrokardiyografik Etkileri	78
5.1.3. Timokinonun Elektrokardiyografik Etkileri	80
5.2. Histolojik Bulguların Değerlendirilmesi	80
5.3. Biyokimyasal Bulguların Değerlendirmesi	81
5.4. Genel Değerlendirme	83
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	85
ÖZET	86
ABSTRACT	87
KAYNAKLAR	88
EKLER	115
EK 1.	115
EK 2.	116
ÖZGEÇMİŞ	117

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

- AA: Arakidonik asit
AFMK: N1-asetil-N2-formil-5-metoksi knüramin
ALT: Alanin aminotransferaz
AMP: Adenozin monofosfat
AST: Aspartat aminotransferaz
ATP: Adenozin trifosfat
A-V: Atriyoventriküler düğüm
BUN: Kan üre nitrojeni
CCl₄: Karbon tetraklorür
CD: Kadmiyum
CIA: Kollojen kaynaklı artrit
CK-MB: Kreatin kinaz miyokardiyal bant
COX: Siklooksijenaz
CP: Siklofosfamid
CPK: Kreatin fosfokinaz
CsA: Siklosporin A
DNA: Deoksiribonükleik asit
DNR: Daunorubisin
DTQ: Ditimokinon
DXR: Doksorubisin
eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz
G6PD: Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz
GCS: Ganglion cervicale superius
GR: Glutasyon redüktaz
GSH-Px: Glutasyon peroksidaz
GSH-Rd: Glutasyon redüktaz
GSSG: Okside glutasyon
GST: Glutasyon –S- transferaz
H&E: Hematoksilen-Eosin

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini (Devamı)

- H₂SO₄: Sülfürik asit
HIF-1 α : Hipoksiyle indüklenmiş faktör
HIOMT: Hidroksiindol-O-metiltransferaz
IL-1: İnterlökin-1
IL-18: İnterlökin-18
IL-6: İnterlökin-6
ISP: İzoproterenol
i.p: İnterperitoneal
i.v: İntervenöz
LD₅₀: Letal doz 50
LDH: Laktat dehidrogenaz
LO: Lipooksijenaz
LT: Lökotrien
MCMV: Murin sitomegalo virüs
MDA: Malondialdehid
MEL: Melatonin
mPTP: Mitokondriyal permeabilite transisyon poru
mtDNA: Mitokondrial DNA
NAT: N-asetiltransferaz
NOS: Nitrik oksit sentaz
NPV: Nucleus paraventricularis
NS: Nigella sativa
NSC: Nucleus suprachiasmaticus
O₂⁻: Süperoksit radikali
OH⁻: Hidroksil radikali
OXPHOS: Oksidatif fosforilasyon
p.o: Oral
p53: Protein 53
PBS: Phosphate buffered saline

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini (Devamı)

- PG: Prostaglandin
PUFA: Poli doymamış yağ asidi
QTc: Düzeltilmiş QT
RA: Romatoid artrit
ROS: Reaktif oksijen türleri
SF: Serum fizyolojik
SHR: Spontan hipertansif sıçan
SKÇ: Suprakiazmatik çekirdek
SS: Standart sapma
SSG: Süperior servikal ganglion
STZ: Streptozotosin
TAS: Total antioksidan seviye
TBARS: Tiobarbiturik asit reaktif maddeleri
TBHP: Tersiyer bütül hidroperoksit
TBHQ: Tertbutül hidroquinon
THQ: Timohidrokinon
THY: Timol
TNF- α : Tümör nekrozis faktör alfa
TOS: Total oksidan seviyesi
TQ: Timokinon
TQRF: Zengin fraksiyonlu timokinon
TRH: Tractus retino hypothalamicus

Şekiller Dizini

Şekil 1: Doksorubisin ve daunorubisinin kimyasal yapıları	5
Şekil 2: Doksorubisin molekülünden süperoksit radikalının oluşumu	6
Şekil 3: Doksorubisinin mitokondriyal enzimler aracılığıyla serbest radikal oluşturması	13
Şekil 4: Melatoninin kimyasal yapısı	19
Şekil 5: Melatonin hormonunun biyokimyasal sentezi	20
Şekil 6: Pinealosit içerisinde gerçekleşen melatonin üretiminin kontrol mekanizması	21
Şekil 7: Nigella sativanın temel bileşenleri	27
Şekil 8: Timokinonun kimyasal yapısı	28
Şekil 9: Kayıtlarda elde edilen tipik bir sıçan EKG kaydı	51

Resimler Dizini

Resim 1: Dokсорubisin uygulanan ratta idrar renginin kırmızıya boyanması	3
Resim 2: Çörek otu bitkisi	26
Resim 3: Kontrol grubu sağ ventrikül doku görünümü	64
Resim 4: Kontrol grubu sağ ventrikül doku görüntüsü	65
Resim 5: DXR grubu sağ ventrikülde meydana gelen değişiklikler	65
Resim 6: DXR grubu sağ ventrikül dokusundaki patolojiler	66
Resim 7: DXR grubu sağ ventrikül doku değişiklikleri	66
Resim 8: DXR+MEL grubu sağ ventrikül doku görüntüsü	67
Resim 9: DXR+MEL grubu sağ ventrikül doku görünümü	67
Resim 10: DXR+TQ grubu sağ ventrikül dokusunda meydana gelen değişiklikler	68
Resim 11: DXR+TQ grubu sağ ventrikül dokusunun görünümü	68
Resim 12: DXR+TQ grubu sağ ventrikül dokusunun görünümü	69
Resim 13: Kontrol grubu sol ventrikül normal doku görünümü	70
Resim 14: DXR grubunda yaygın patoloji görüntüsü	71
Resim 15: DXR grubunda meydana gelen hasar görüntüsü	71
Resim 16: DXR grubunda görülen yaygın hasarın görüntüsü	72
Resim 17: DXR+MEL grubunun sol ventrikül görüntüsü	72
Resim 18: DXR+MEL grubu sol ventrikül doku görünümü	73
Resim 19: DXR+MEL grubu sol ventrikül dokusunun görüntüsü	73
Resim 20: DXR+TQ grubu sol ventrikül dokusunun görünümü	74
Resim 21: DXR+TQ grubu dokusunda meydana gelen değişikliğin görünümü	74
Resim 22: DXR+TQ grubu sol ventrikül doku görüntüsü	75

Tablolar Dizini

Tablo 1: Deneklerde kullanılan kimyasal maddeler ve uygulanan günler	48
Tablo 2: TAS ölçüm prosedürü	56
Tablo 3: TOS ölçümü	57
Tablo 4: Grupların EKG parametre değerleri	62
Tablo 5: Sağ kalp histopatolojik hasar derecelerine göre hayvanların dağılımı	63
Tablo 6: Sağ kalpteki histopatolojik hasar skorlarının ortalama değerleri	64
Tablo 7: Sol kalp histopatolojik hasar derecelerine göre hayvanların dağılımı	69
Tablo 8: Sol kalpteki histopatolojik hasar skorlarının ortalama değerleri	70
Tablo 9: Biyokimyasal parametre değerleri	77

1. GİRİŞ

Doksorubisin (DXR); hematolojik kanserler, solid tümörler ve yumuşak doku sarkomaları gibi birçok kanser tedavisinde kullanılan antrasiklin türevi bir antibiyotiktir. DXR'in en önemli yan etkilerinden biri kalp kasında oluşturduğu, kalp yetmezliği ve sonuçta ölüme kadar giden, harabiyettir.

İlacın kalp kası üzerindeki toksik etkilerinin oluşmasında oksidatif stres, mitokondriyal fonksiyonlarda bozulma, apoptoz, miyofibriler bozulma, hücre içi kalsiyum düzenlenmesinde bozukluk, nükleik asit ve protein sentezinin baskılanması ve kalbe özgü genlerin ifadesinde azalma gibi çeşitli mekanizmaların rol aldığı ileri sürülmüştür (1, 2). Bununla birlikte oksidatif stres, mitokondriyal fonksiyonlarda bozulma ve apoptoz en çok üzerinde durulan faktörlerdir (3). Reaktif oksijen türlerinde (ROS) artma, antioksidan ve sülfhidril gruplarında azalma ile lipit peroksidasyonda artış DXR kardiyomiyopatisinin oluşumunda oksidatif stresin anahtar rol oynadığını desteklemektedir (4).

DXR ile oluşturulan kardiyotoksisitenin önlenmesinde çeşitli antioksidan maddeler üzerinde çalışılmaktadır. Bugüne kadar denenmiş olan antioksidanlar arasında ön plana çıkanlardan biri pineal bez tarafından salgılanan melatonin (MEL)'dir. Güçlü antioksidan etkisinin yanı sıra mitotokondriyal enerji metabolizmasını düzenleyici (3) ve anti-apoptotik etkileri olduğu da bildirilmiştir (5).

DXR ile oluşturulan kardiyomiyopatiyi önlemek için farklı natural antioksidanlardan yararlanmayı hedefleyen araştırmalar devam etmektedir. Bu konuda etkili olabileceği öngörülen maddelerden bir tanesi timokinondur (TQ). Timokinon, çörek otu (*Nigella sativa*) yağında bulunan en önemli biyoaktif bileşendir. Çörek otu ve timokinonun çeşitli farmakolojik etkileri olduğu gösterilmiştir. Bunlardan bazıları antikanserojenik, antiülserojenik, antiinflamatuar ve antioksidan etkilerdir (6). Çeşitli ilaçlar (7, 8) ve iskemi-reperfüzyon (9) ile oluşturulmuş kalp hasarı üzerinde olumlu etkileri bildirilmekle beraber, timokinonun DXR'in neden olduğu toksisiteden kalbi koruyucu etkilerini bildiren çok az sayıda araştırma bulunmaktadır (10-12). Al-

Shabanah ve arkadaşları (10) timokinonun DXR kardiotoksisitesini, anti tümör etkisini azaltmaksızın, iyileştirebilecek güçlü bir kalp koruyucu madde olduğuna dair bulgular ortaya koymuşlardır. Nagi ve Mansour timokinonun güçlü süperoksit temizleyici ve lipit peroksidasyonunu baskılayıcı etkileriyle DXR ile oluşturulan kardiotoksisiteye karşı koruyucu rol oynayabileceğini bildirmişlerdir (11). Yeni bir çalışmada, DXR'in tek başına lösemi hücrelerini azalttığı dozlarda DXR ile birlikte timokinon uygulamasının kalp kası hücrelerinin canlı kalmasını sağladığı bulunmuş, aynı zamanda lösemi hücrelerinin apoptozunda artışla anti-kanser etkinin güçlendiği ileri sürülmüştür (12).

Bu çalışmada DXR ile oluşturulan kardiyotoksite üzerine timokinonun etkilerinin araştırılması ve bu etkilerin melatoninin daha iyi bilinen kalp hasarını önleyici etkisiyle karşılaştırılması amaçlandı.

DXR kanser tedavilerinde vazgeçilmez bir ilaçtır. Fakat kalp gibi hayati organları hasarlaması nedeniyle bu toksik etkisinin azaltılması gerekmektedir. Bu çalışmada olası ideal maddelerin bulunması hedeflenmiştir. Böylece ciddi yan etkileri nedeniyle kullanımı kısıtlanmış olan DXR'in kanser tedavisinde daha güvenli ve etkin bir şekilde kullanımı sağlanmış olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Doksorubisin

Doksorubisin (DXR) (veya adriamisin, 14-hidroksidaunorubisin) sitotoksik antibiyotikler sınıfından olan bir ilaçtır (13). Yapısında kuinon içeren bu antrasiklin antibiyotiğin molekül formülü $C_{27}H_{29}NO_{11}$ HCl, molekül ağırlığı 579,98 g/mol, yarılanma süresi 12-18,5 saattir. Plazma proteinlerine %70 oranında bağlanır, esas olarak karaciğerden safra yoluyla elimine edilmesinin yanında, bir kısmı da idrar ve dışkıyla vücuttan uzaklaştırılır. Feçesle atılan kısım değişmemiş ilaç şeklindedir. Böbreklerden itrahi ise ilaç uygulandıktan 1-2 gün sonra idrarın kırmızı boyanmasıyla kendini gösterir fakat bu durumun klinik açıdan önemi yoktur (14).



Resim 1: Doksorubisin uygulanan ratta idrar renginin kırmızıya boyanması

Sitotoksik antibiyotikler oral yolla alındığında gastrointestinal sistemden emilimleri çok azdır. Bunun yanında dokuları aşırı tahriş ettiklerinden intramusküler veya subkutan uygulanmazlar (15). Bu ilaçlar intravenöz uygulanarak sistemik etki yapar ve hızlı polifere olan hücrelerde deoksiribonükleik asit (DNA) sentezini engellerler.

DXR, kanser hücrelerindeki etkisini DNA çift sarmalına interkalasyon yapma ve topoizomeraz enzimi ve nükleik asit sentezini baskılama yolu ile DNA hasarına sebebiyet vererek gösterir. Antibiyotik vücuda girdiğinde hücreye hızla nüfuz eder ve perinükleer kromatinde yaygın lokalizasyon yapar. Bu durum nükleik asit sentezinin

ve mitotik aktivitenin hızlı inhibisyonu ve kromozom sapmalarının meydana gelişini doğrular niteliktedir. Bu etki mekanizmasının yanında doksorubisin, demir ile güçlü bir şekilde şelat oluşturup DNA'ya ve hücre membranlarına bağlanabilir; DNA'yı ve hücre membranlarını kolayca parçalayabilen serbest radikalleri üretebilir. Doksorubisin ayrıca protein sentezini de inhibe eder. İnterfaz da dahil hücre siklusunda etkilidir (15). Ashley ve Poulton DXR'ın sadece nükleer DNA'nın değil; aynı zamanda mitokondriyal DNA'nın yapısına da katıldığını bildirmişlerdir (16).

Antrasiklinler, insanlarda görülen kolon kanseri gibi çok az kanser türüne karşı yanıtız kalan, geniş spektrumlu antitümör ilaç sınıfıdır (17). Neoplastik hastalıklar için kemoterapideki bu ajanlar tedavi sonuçlarını iyileştirmek amacıyla yüksek dozlarda ve sıklıkla kullanılmaktadır. Fakat, antrasiklinler diğer tüm antikanser ajanlar gibi iki ucu keskin kılıçtır çünkü kullanıldıklarında tümör hücrelerinde direnç gelişmesine neden olabildikleri gibi sağlıklı dokular üzerinde toksik etki yapabilmektedir (1).

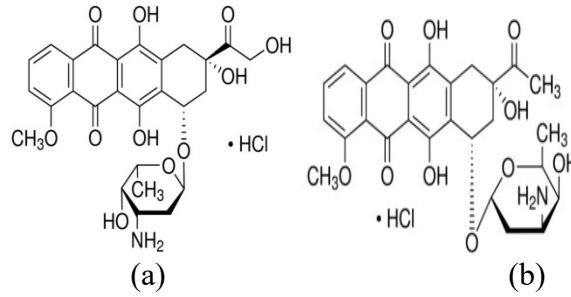
Efektif bir ajan olması nedeniyle birçok kanser tedavisinde önemli yere sahip olan DXR'ın akut yan etkileri bulantı, kusma, lökopeni (18), kemik iliği hipoplazisi, stomatitis, anemi ve saç dökülmeleriyle karakterize alopesidir (19). Bunların yanında, kalp, böbrek, kan ve testis (18), kemik iliği (20) gibi organlar üzerinde toksik yan etkiler göstermesi ilacın terapötik kullanımını kısıtlamaktadır (1, 21).

DXR kaynaklı kardiyotoksisite patogenezinin biyokimyasal mekanizması belirsizliğini korumakla beraber, kimyasal yapısıyla ilişkili olarak serbest oksijen radikallerinin oluşması (21-24), DNA sentezinin inhibisyonu, kalp böbrek ve karaciğerde lipid peroksidasyonu (19) ile protein oksidasyonuna (22) neden olarak toksik etki yarattığı düşünülmektedir. Patogenezde sorumlu tutulan serbest radikaller süperoksit (O_2^-), hidroksil radikalleri (OH^-) ve nitrik oksittir (NO). Serbest radikallerin indüklediği malondialdehit (MDA) gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin de olaya katkısı olduğu gösterilmiştir (25, 26).

Fizyolojik koşullar altında aerobik metabolizmanın ürettiği reaktif oksijen türleri dengeli olarak inhibe edilir ve organizmaya zarar vermeleri önlenir. Bahsi geçen olay, organizmada bulunan antioksidan savunma sistemleri tarafından gerçekleştirilerek patoloji önlenir. Serbest radikallerin oluşumu ile savunma sistemlerinin gücü arasındaki balans bozulmadığı sürece, organizma oluşan bu

radikallerden zarar görmez. Bu denge, antioksidan sistemlerin aleyhine bozulduğu zaman vücutta hasar meydana gelir ve oksidatif stres baş gösterir. Oksidatif stres başlıca lipidler olmak üzere DNA, protein ve karbonhidrat gibi tüm biyolojik moleküllerde meydana gelerek zarar oluşturabilir (21). Serbest radikallerin hücredeki en zararlı ve en önemli etkisi lipid peroksidasyonudur. DXR tedavisi oksidan sistemi arttırıp antioksidan sistemi azaltmak suretiyle oksidatif strese sebep olan en tipik özelliğiyle karşımıza çıkmakta ve araştırmacıları antioksidan arayışlarına yönlendirmektedir.

İlk kullanılan sitotoksik antibiyotik olan daunorubisin (DNR) 1960'ların başında pigment üreten toprak mantar türü *Streptomyces peucetius* kültüründen izole edilmiş (27) ve kısa süre sonra daunorubisinin hidroksi türevi olan doksorubisin bulunmuştur. Bakterilerden elde edilen ilk antrasiklin grubu antibiyotikler DNR ve DXR'dır (28).



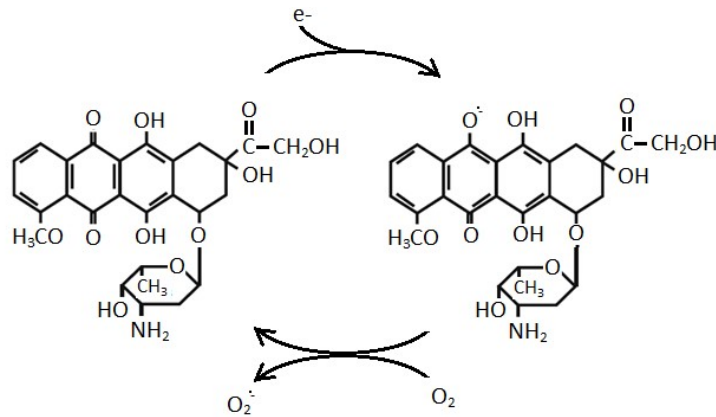
Şekil 1: Doksorubisin (a) ve daunorubisinin (b) kimyasal yapıları

DXR ve DNR'ın yapısı çok benzerdir. DXR, ilaca özgün kırmızı rengini veren parlak fluoresan tetrasiklik kromofor adriamisinon (antrakınon) ile ona glikozidik bağ ile bağlanmış bir amino şeker olan daunozaminden oluşur. 14. karbonunda bir hidroksil grubu taşımasıyla daunorubisinden farklılık gösterir. DXR kendine has yapısından dolayı, son derece lipofiliktir ve vücutta nispeten uzun yarı ömre sahiptir (29).

Adriamisin bazı murin kanserlere karşı daunorubisinden daha yüksek antitümör aktivite göstermekle beraber aynı zamanda daha iyi terapötik indekse sahiptir (29). Hala ispatlanılmış en geniş spektrumlu antineoplastik ilaçtır (17). Birçok antrasiklin antibiyotik geliştirilmiş olmasına karşın klinik bilgilerin büyük çoğunluğu doksorubisin ve daunorubisin üzerinde yoğunlaşmıştır.

Adriamisin faz spesifik olmayan bir ilaç olmasının yanında S fazındaki hücreler bu ilaca en duyarlı hücrelerdir. Adriamisinin plazmadan eliminasyonu üç fazda gerçekleşir. İlk 5 dakikada hızlı faz meydana gelirken, yaklaşık 60 dakika süren ikinci faz ve 30 saat süren üçüncü faz olmak üzere eliminasyonlarından bahsetmek mümkündür (30)

Adriamisinin kimyasal yapısındaki antrakinon (B) halkasının serbest radikal üretme potansiyeli vardır. B halkasının indirgenme reaksiyonlarına uğraması (bir elektron redüksiyonu) sonucu kısa ömürlü serbest semikinon radikalini meydana getirir. Bu radikal anaerobik şartlar altında oldukça stabildir fakat aerobik şartlarda iken eşleşmemiş elektronunu oksijene vererek süperoksit radikalini oluşturur (29, 31, 32). Oksijenin süperoksit indirgenmesi ile parental adriamisin molekülü yeniden oluşur. 'Redoks siklusu' olarak bilinen reaksiyonlar dizisi, adriamisinin oldukça düşük miktarının çok sayıda süperoksit radikalini oluşumunu katalizlemesi için yeterli olabileceğinden dolayı hücreler için zararlıdır (29). Bu durum göz önünde bulundurulduğunda, DXR kullanımı sonrası meydana gelen membran hasarının önemli nedeni olarak değerlendirilmektedir.



Şekil 2: Doksorubisin molekülünden süperoksit radikalini oluşumu

2.1.1. Kardiyak Morfoloji ve Fonksiyonlardaki Değişiklikler

Doksorubisin kardiyomiyopatisinde meydana gelen fonksiyon bozuklukları ve kardiyak morfoloji dilate kardiyomiyopatiyle benzerlik göstermektedir. Ventrikül

ve atriumların dilatasyonu iskemik ve iskemik olmayan dilate kardiyomiyopatilerden daha az yaygınlıkta oluşmalarına rağmen, 4 kalp odacığının tamamı da dilate olabilir (4). Öte yandan duvar trombüsü iki ventrikülde sıklıkla görülür (1). Ventriküler ejeksiyon fraksiyonu ve kontraktıl fonksiyonlar azalmıştır. Bunlara diastolik disfonksiyon eşlik eder (4). DXR tedavisinden sonra meydana gelebilen kalp hızı düzensizliği ve kontraktilite azalması, ilacın miyosit hasarı oluşturduğunun göstergesi olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.1.2. Histopatolojik Değişiklikler

DXR kaynaklı kalp hasarı, ciddi interstisyel ödem, fokal subendokardiyal fibrozis, kardiyomiyositlerde perinükleer vakuolleşme, miyokardiyal disorganizasyon ve dejenerasyon ile karakterizedir (13).

Miyokard interstisyumunda yama tarzında fibröz alanlar ve dağılmış halde vakuollü kardiyomiyositler vardır. Atrium hücreleri fibröz alanlara bitişik görülür. Fibröz alanlar yaygındır ve akut miyosit hasar alanları seyrek. İyileşmiş miyokardit alanlarda fibroblast çoğalması ve histiyosit infiltrasyonu vardır. Miyofibrillerin kısmi veya total kaybı ile miyositlerdeki vakuoler dejenerasyon doksorubisin kardiyotoksitesinin temel özellikleridir. Miyoflamentlerin kaybı ile, Z diskleri kalıntısı görülür. Miyosit vakuolleri biraraya gelerek birleşir ve membrana bağlı büyük boşluklar oluşturur (1, 4).

2.1.3. Doksorubisin Kardiyomiyopatisinin Mekanizmaları

Antrasiklinlerin tümör hücrelerindeki etki mekanizması tartışma konusudur. Bu mekanizmalar arasında;

- 1) Hücre içindeki ilacın büyük bir kısmı nükleustaki DNA çift sarmal yapısı içine interkalasyon yaparak makromolekül sentezi inhibisyonu;
- 2) ROS oluşumu sonucu DNA hasarı ve lipid peroksidasyonu;
- 3) DNA'ya bağlama ve alkilasyon;

- 4) DNA'ya çapraz bağlama;
- 5) DNA sarmalının açılmasına veya DNA iplikçiklerinin ayrışmasına, DNA helikaz enzim aktivitesinin artmasına yol açma;
- 6) Doğrudan membrana etki etme;
- 7) Topoizomeraz II nin inhibisyonu yoluyla DNA hasarını başlatma;
- 8) Topoizomeraz II'nin inhibisyonuna yanıt olarak apoptozun tetiklenmesi ileri sürülmektedir (1, 4, 33).

Antrasiklinler DNA ile etkileşime girer ve DNA'nın yapısını bozarak tek veya çift zincir kırıklarına neden olurlar. Dolayısıyla antrasiklinler teratojenik, karsinojenik ve mutajenik etki gösterirler (34).

Antrasiklinler yapılarında bulunan kuinon halkasının mitokondriyal enzimlerle etkileşmesiyle ROS oluşumuna yol açarlar (31, 35). Bu düşünceye paralel olarak, yüksek konsantrasyonda DXR'a maruz bırakılan kanser hücrelerinde ROS oluşmuş (36) bunun yanında DXR, +3 değerlikli demire bağlanarak hem DNA ile kompleks oluşturmuş hem de oksidasyonla yıkımını katalizlemiştir (37-39). DNA zincirleri çevresinde radikaller oluştuğu zaman, DNA hasarlanabilir ve zincirlerin kırılmasına neden olabilir (40).

Tümör hücreleri üzerinde DXR'ın terapötik etki mekanizmaları DXR'ın kardiyotoksisite mekanizmalarından farklıdır (1, 4). Bu da DXR'ın antitümör aktivitesini azaltmaksızın kalbi koruyacak tedavi protokollerinin bulunabileceği yönündeki umutları arttırmıştır.

DXR kardiyotoksisitesini açıklamada birçok mekanizma ileri sürülmesine rağmen, çalışmaların çoğu lipid peroksidasyonu (41, 42), ROS düzeylerinde artış ve oksidatif stresin tetiklenmesi (32, 43, 44), sülfhidril grupları ile antioksidan düzeylerinde azalma (42, 45, 46) DXR kaynaklı kardiyotoksisitenin patogenezinde anahtar rol oynadıklarını desteklemektedir.

Nükleik asit ve protein sentezinin inhibisyonu (47, 49), vazoaktif aminlerin salınımı (histamin, katekolaminler ve prostoglandinler) (50), adrenerjik fonksiyonlar ve adenil siklaz aktivitesinde değişiklik (51), mitokondrial anormallikler (52), lizozomal değişiklikler (41), sarkolemmal Ca^{+2} transportunda değişiklik (53), adenil siklaz, Na-K ATP_{az} ve Ca^{+2} - ATP_{az} aktivitelerinde değişiklik (54), miyokardiyal elektrolit dengesinin bozulması (55), mitokondriyal kreatin kinazın enzimatik

aktivitesi ve membrana bağlanmada bozukluk (56), nitrik oksit sentezini tetikleme, nitrik oksit ile peroksinitrit üretimi ve miyofibriller kreatin kinaz ve/veya metaloproteinazların nitrasyonu/inaktivasyonuna neden olma (57-59) durumları ileri sürülen diğer mekanizmalardır.

DXR, kendisine duyarlı transkripsiyonel düzenleyici proteinlerin fonksiyon ve ekspresyonunu etkilemek suretiyle kalbe özgü genlerin ekspresyonunu azalttığı düşünülmektedir (1).

Yapılan çalışmalar antrasiklinlerin vasküler hücreler ve kardiyomiyositlerde apoptozu indüklediğini göstermektedir (60-62). Antrasiklinlerin apoptoz aracılı etki ettikleri düşünülürse bu durum kardiyomiyositlerin kaybı ile sonuçlanarak kalp yetmezliğini körükleyebilecek önemli bir tablo oluşturabilir (1, 63, 64, 65, 66).

2.1.3.1. Antrasiklinlerin Hücre İçi Etkileri

Antrasiklin kardiyotoksitesinin muhtemel primer hedefleri olarak pek çok hücrel organel ileri sürülmüştür.

Antrasiklin kardiyotoksitesinde mitokondriyal membranın ana hedef yer olduğu düşünülmektedir (67). Mitokondriler eritrositler hariç insan vücudundaki tüm hücrelerde mevcut organellerdir ve enerji üretiminde çok önemli rol oynarlar. Bu hayati fonksiyonuna ek olarak; hem metabolizması, reaktif oksijen ve nitrojen türleri üretiminin homeostatik kontrolü, Ca^{+2} 'nin düzenlenmesi, hücrel metabolizma ve proliferasyon, hücre bölünmesi, programlanmış hücre ölümü (apoptoz), mitokondriyal dinamikler ile mitofajik fonksiyonların yürütülmesi gibi diğer kompleks süreçlere de katılırlar (68, 69).

Kalp dokusunda kalbin yüksek enerji ihtiyacını karşılayabilmek için bol bulunan mitokondriler, diğer dokulara kıyasla miyokardiyal hacmin yaklaşık %45'ini oluştururlar (70). Mitokondrilerin kardiyomiyositlerde yüksek oranda bulunması, mitokondriyal biyoenerjetikler ile miyokardiyal canlılık ve fonksiyonla yakından ilişkilidir. Bu sebeptir ki mitokondriyal fonksiyon bozukluğu son zamanlarda DXR'a bağlı kardiyotoksitesinin gelişiminde çok önemli bir unsur olarak kabul görmektedir (71). Bu düşünceyi desteklemek üzere yapılan çalışmada, DXR'ın

özellikle mitokondrileri hedef aldığı ve bu organelde plazmadakinden çok daha yüksek konsantrasyonda biriktiği kanıtlanmıştır (72).

Bu birikim iç mitokondriyal membranın negatif yüklü majör fosfolipid bileşeni olan kardiyolipine yüksek afiniteye sahip doksorubisinin katyonik doğasıyla ilişkilidir (73, 74). İç mitokondriyal membran DXR'ın birikimi için önemli bir bölge olduğundan, solunum zinciri DXR kaynaklı toksisite için potansiyel hedef olarak kabul edilebilir. DXR'ın kardiyolipine yüksek afinite göstererek bağlanması sonucunda irreversibl kompleks oluşur. Bunun sonucunda kardiyolipin, mitokondriyal solunum enzimleri için kofaktör görevinin yerine getiremez ve oksidatif fosforilasyon inhibe edilir (3).

Kalp kontraktıl fonksiyonunu devam ettirmek için muazzam miktarda enerji isteyen hayati bir organdır. Mitokondriyal solunum, solunum zinciri yoluyla bu enerjinin %90'nını Adenozin trifosfat (ATP) olarak oluşturmak ve kalbin enerji ihtiyacını karşılamaktan sorumludur. İç mitokondriyal membranda bulunan bu solunum zinciri, kompleks I (NADH dehidrogenaz), kompleks II (süksinat dehidrogenaz), kompleks III (sitokrom c redüktaz) ve kompleks IV (sitokrom c oksidaz) olmak üzere dört enzim kompleksi halinde gruplanmış bir seri elektron taşıyıcısından oluşur. Bu elektron taşıyıcılarla elektron transportu ve oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) meydana gelerek ATP sentezlenmiş olur (75). DXR'ın indüklediği kardiyotoksitenin önemli özelliklerinden biri kardiyak enerji homeostazisinde bozulma yapmasıdır (3). Yapılan çok sayıda çalışma DXR'ın, fosforilasyon basamaklarını veya respiratuar kompleksleri inhibe ederek mitokondriyal solunumu birden çok seviyede bozduğunu göstermiştir (76-79).

Tokarska-Schlattner ve arkadaşları (80) izole edilmiş perfüze rat kalbinde DXR'ın indüklediği akut kardiyak disfonksiyonun, enerji sensörü Adenozin monofosfat (AMP)'ın aktive ettiği protein kinaz yoluyla enerji sinyalizasyonunu bozabileceğini göstermişlerdir. Bu durum mitokondriyal fonksiyon bozukluğuyla ilişkilidir.

DXR kaynaklı kardiyotoksisite sırasında kardiyak yeniden modellenme meydana gelir ve metabolik substrat kullanımı yağ asitlerinden glikoza makas değiştirir. Bu durum ATP üretimindeki azalmaya adaptif bir yanıt olarak karşımıza çıkmaktadır (80, 81). Aerobik şartlarda ATP üretimi için primer substratın yağ

asitleri olduğu bilinmektedir. Gelişen kardiyak patogenezin ilk safhalarında, yağ asidi oksidasyonunda meydana gelen azalma glikoz kullanımında up-regülasyon oluşturarak kompanse edilir. DXR tedavisini takiben insanlarda, hayvan modellerinde ve hücre kültüründe yağ asidi metabolizmasının bozulduğu bulunmuştur (80, 82, 83).

DXR'ın hücre ölümünün indükleyicileri olan serbest radikalleri ürettiği bilinmektedir. ROS mitokondrial DNA (mtDNA) hasarına neden olmakta, bu şekilde ekstrensek apoptotik yolun aktivasyonuna yol açan transkripsiyonel faktörleri disregüle etmektedir. Bunlara ek olarak, kalsiyum metabolizmasını bozar, mitokondriyal redoks potansiyelini azaltan lipid peroksidasyonunu indükler, mitokondriyal permeabilite transisyon porları (mPTP)'nin açılmasına ve sitokrom c salınımına yol açar (84).

Akut miyokardiyal hasarda morfolojik olarak; mitokondride şişme, lizis, krista bütünlüğünün bozulması ve Ca^{+2} içeren mitokondri içi cisimlerin oluşumu görülür (85). Antrasiklinlere bağlı mitokondriyal toksisitenin ana metabolik etkisi ise Ca^{+2} içeriğinin artması ve ATP sentezinin inhibisyonudur (53).

2.1.3.2. Serbest Radikal Hipotezi ve Oksidatif Stres

En dış orbitallerinde en az bir ortaklanmamış elektronu bulunan atom, atom grubu veya moleküllere serbest radikaller denir. Bu serbest radikaller elektriksel yüklü olup, ortaklanmamış elektronları nedeniyle oldukça kararsız yapı gösterirler ve hücre membranı içinden geçerek vücuttaki nükleik asitler, proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve enzimler ile etkileşerek kararlı yapı kazanmak ister, bunun sonucunda organizmada yıkım oluştururlar (86).

Oksijen içeren herhangi bir serbest radikal reaktif oksijen türleri olarak anılır. En yaygın reaktif oksijen türleri süperoksit anyon radikali ve hidroksil radikalidir. Oksijen molekülüne bir elektron eklendiğinde, reaktif oksijen türlerinin en az reaktif olan, O_2^- meydana gelir. O_2^- oluştuktan sonra diğer serbest radikallerin oluşumuna sebep olarak, H_2O_2 oluşumuyla son bulacak bir reaksiyonlar zinciri başlamış olur.

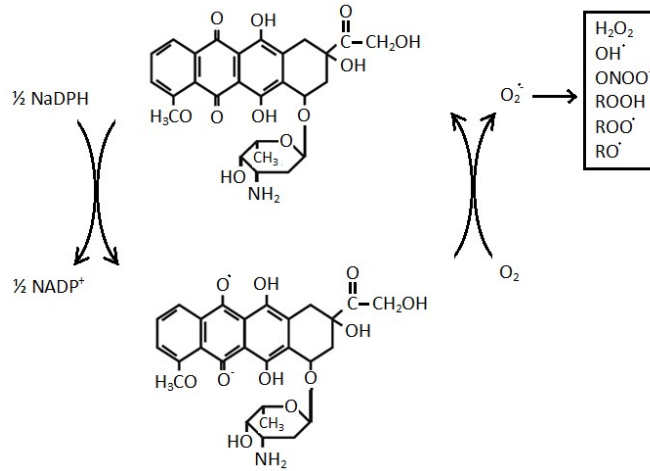
Kalp diğer dokularla kıyaslandığında yüksek oksijen tüketmesine rağmen rölatif olarak sınırlı antioksidan savunma sistemine sahiptir (87, 88). Serbest radikalleri nötralize eden katalaz ve süperoksit dismutaz enzimleri kalp kasında az bulunur. Detoksifikasyonu sağlayan glutatyon peroksidaz enzimi ise DXR uygulamasından sonra açığa çıkan serbest radikallerden etkilenir ve seviyesi düşer. Kalp kası daha az serbest radikal detoksifiye eden enzimler içerdiğinden hasara daha duyarlıdır. Ayrıca kalp dokusu bol miktarda mitokondri ihtiva ettiğinden DXR'ın indüklediği oksidatif hasardan oldukça fazla etkilenir. Bu durumda kalp ROS için hem kaynak hem de hedef yeri sayılabilir (32).

DXR kaynaklı doku hasarı farklı mekanizmalarla açıklanabildiği gibi başı çeken faktörlerin oksijen radikalleri olduğu düşüncesi hakimdir. Antrasiklinler redoks siklusunu etkiler ve bir molekül antrasiklin birçok serbest radikalın oluşumuna yol açar. DXR serbest radikalleri temelde iki yolla oluşturur;

(a) Enzimatik yol olarak: hücrel oxidoredüktazları kullanarak (complex I'in NADH ile NADH dehidrojenaz, NADPH ve sitokrom P-450 redüktaz, ksantin oksidaz veya endotelial nitrik oksit sentaz enzimleri)

(b) Non-enzimatik yol olarak: +3 değerlikli demir ile kompleksler oluşturarak (81, 89).

Doksozobisininin indüklediği oksidatif stres ROS üretmeye eğilimli olan kimyasal yapısı ile açıklanabilir. Sitotoksik antibiyotiğin yapısında bulunan antrakinin halkasının enzimatik olarak redüksiyonu söz konusudur. Antrakinin, flavin bağımlı redüktazlar tarafından elektron redüksiyonuna uğramakta ve bu redüksiyon sonucu serbest radikal olan semikinon radikali oluşmaktadır. NADH dehidrojenaz, sitokrom P-450 redüktaz ve ksantin oksidaz gibi bazı mitokondriyal enzimlerin, antrakinin halkasının semikinon serbest radikale dönüşümünü katalazladıkları bulunmuştur. Dolayısıyla bu enzimler ROS oluşumuna katkı sağlamaktadır (1, 90-93).



Şekil 3: Dokсорubisinin mitokondriyal enzimler aracılığıyla serbest radikal oluşturması

Kalpте mitokondri sayısı fazla olduğundan, mitokondriyal kompleks I de NADH dehidrogenaz enzimi bol bulunur. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda, kalpte ROS oluşumuna neden olan esas mekanizmanın DXR redoks siklusunu bu enzimden faydalanarak yaptığını düşündürmektedir. Bir molekül antrasiklin, birçok serbest radikal molekülü oluşturabildiğinden redoks döngüsünün bu tipi organizma için zararlı etkilere sebebiyet verir.

Oluşan semikinon daha sonra hidrokinona dönüştürülebildiği gibi, anaerobik şartlarda oldukça stabil olmasına rağmen aerobik koşullarda eşleşmemiş elektronunu moleküler oksijene vererek antrakınon formuna geri dönerek süperoksit radikalini oluşturabilmektedir (29, 31, 32). Süperoksit radikali, süperoksit dismutazla reaksiyona girer, bunun sonucunda bir elektron vererek moleküler oksijen ve hidrojen peroksit (H₂O₂) molekülleri oluşur. H₂O₂'nin redüksiyonu sonucu OH⁻ oluşur. Hidrojen radikalleri ve serbest radikaller mitokondriyal respiratuar siklusta defekt oluşumu, hücre zarında bulunan lipidlerin oksidasyonu, DNA yıkımı, sülfidril içeren enzimler ile kollajen ve hiyalürik asit fonksiyonlarında bozulmaya sebep olur (28, 94).

Antrasiklin serbest radikalleri, enzime bağımlı olmayan mekanizma olan demir ile etkileşime girerek de oluşabilirler. Kardiyomiyosit hasarındaki anahtar rolün antrasiklin kompleksleri ile metal iyonları arasında kurulan ilişki olduğu düşüncesi hakimdir. DXR demir (Fe⁺³) ve bakır (Cu) iyonlarıyla şelat oluşturur (95). Meydana

gelen DXR-metal kompleksi hidrojen peroksitten hidroksil radikallerinin oluşumunu katalize eder, aynı zamanda DNA'ya ve hücre membranına bağlanarak mikrozomal ve mitokondriyal lipidlerin hasarına neden olur (28, 96)

Araştırmacılar 20 yıldır, DXR'ın indüklediği kardiyomiyopatide demirin rolünü araştırmışlardır. Başlarda, etkin bir demir şölatörü olan EDTA analogu deksrazoksanın (ICRF-187), DXR kaynaklı kardiyotoksisiteye karşı köpekleri koruduğu gösterilmiştir (97). Sonralarda, DXR'ın antitümör aktivitesine önemli derecede müdahale etmeden, ilerlemiş meme kanseri için DXR kemoterapisi gören kadınlarda kardiyoprotektif etki oluşturabildiği gösterilmiştir (98).

Yapılan diğer çalışmalarda, DXR'a maruz kalan kardiyomiyositlerde katalaz enziminin düşük seviyelerde olduğu, antioksidan selenyuma bağımlı glutatyon peroksidaz-1 (GSH-Px-1)'in hızlı şekilde düştüğü ve bunun neticesinde sitozolik antioksidan Cu-Zn süperoksit dismutaz düzeylerinin düştüğü gösterilmiştir (99, 100). Bu durum DXR'ın serbest radikal oluşumuna neden olması yanında çeşitli antioksidan enzim seviyelerinde azalma yaptığını göstermektedir. DXR'ın çeşitli antioksidanların seviyelerini baskıladığı ve DXR'ın oksidatif strese katkıda bulunduğu gösterilmiştir (45, 99). Fogli ve arkadaşları (101) ise reaktif oksijen radikalleri ve nitrik oksidin aşırı üretimine bağlı kardiyak kontraktilitede azalma olduğunu ve antrasiklinlere bağlı NO sentezindeki bozukluğun kardiyotoksistide önemli rol oynadığını ileri sürmüşlerdir.

DXR doğrudan endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) redüktazın etki alanını azaltır (102), eNOS transkripsiyonunu indükler ve süperoksit oluşumunu artırır (103). Nitrik oksit sentazın aracılık ettiği miyokardiyal toksisite de bildirilmiştir (104).

DXR'ın kardiolipine bağlanması serbest radikallerin oluşumunu başlatan olayların felaket zincirini başlattığı görünmektedir. Bu bağlanma, DXR'ın kompleks I'ı inhibe etmesine ve serbest radikal oluşumuna neden olur (105). Oluşan serbest radikaller, kardiolipin ile membranların daha fazla lipid peroksidasyonuna ve mitokondriyal solunum zinciri gibi önemli mitokondriyal komponentlerin hasarlandığı mutasyonlar ile transkripsiyonel hatalara yol açabilen DNA hasarına neden olur. Bu durum, daha fazla oksidatif strese neden olur ve kardiyomiyositlerde hücre ölümüyle sonuçlanan kısır döngüyü doğurur (26, 106).

2.1.3.3. Apoptoz

Hücre ölümü, hücre hasarının son formudur ve organ disfonksiyonun doğrudan nedenidir. Apoptoz sözcüğü 1974'te Kerr ve arkadaşları (107) tarafından türetilen morfolojik bir terimdir. Kerr ve arkadaşları nekroz yapılarından tamamen farklı olan ölmüş hücrelerde morfolojik değişimler gözlemledik ve bu değişiklikler kendiliğinden meydana gelen hücre ölümünün bir formu ile ilişkili olduğu yorumunu yaptılar. Günümüzde, apoptozun temel mekanizması, fizyolojik ve genetik olarak düzenlenerek morfogenezisinde, normal hücre döngüsünde, hormona bağımlı organ atrofisinde ve immün sistem fonksiyonunda merkezi rol oynayan programlanmış hücre ölümünün bir formu olarak kabul edilmektedir (108). Bunun yanında, normal apoptozun pek çok hastalığın etiolojisinde rol oynadığı bildirilmiştir (109).

Programlanmış hücre ölümü (apoptoz) farklı morfolojik değişikliklerle karakterize edilen aktif bir süreçtir. Apoptoz sırasında kromozomal DNA genellikle nükleozomlar arasından kesilerek parçalara ayrılır. Kromatinler yoğunlaşır ve nükleus parçalara ayrılır fakat hücre içi organeller son aşamaya kadar morfolojik açıdan korunur. Sonrasında hücre büzülür ve zarla çevrilmiş parçalara ayrılır. Bu parçalara apoptotik cisimcikler denir. Söz konusu apoptotik hücre parçaları, plazma membranı tarafından kuşatılmıştır, hücre içeriği serbest bırakılmadığı için apoptotik cisimciklerin membranı intakt şekilde bozulmadan kalır ve makrofajlar veya komşu hücreler tarafından kolayca tanınarak hızlıca fagosite edilir. Buna göre apoptoz ile ölen hücreler dokular tarafından etkin şekilde yok edilmiş olur. Nekrozisin aksine, apoptoz inflamasyona neden olmaz, inflamatuvar yanıt plazma membran rüptürü ve hücre içi içeriklerin serbestlenmesinden dolayı meydana gelir. Nükleozomal birimlerde spesifik DNA fragmentasyonu apoptozun en karakteristik biyokimyasal özelliklerinden biridir. Apoptotik DNA fragmentasyonu, DNA kırıklarını in situ olarak tanımlamasını sağlayan (TUNEL yöntemi) DNA jel elektroforez gibi moleküler biyolojik tahliller kullanılarak tespit edilebilir (110).

Yapılan çalışmalarda kardiyomyositlerdeki apoptotik sinyalin iyi anlaşılmadığı görülmüştür. Fakat apoptotik sinyalin hücreler arasında benzerlik gösterdiği kabul edilmektedir. Tüm hücre tiplerine özgü apoptozun nihai efektörleri kaspazlar ve DNA_{az} larıdır. Bunlar ilkin apoptoza spesifik proteolizleri, daha sonra

çekirdekdeki DNA'nın parçalanmasını indükler. Ama kaspazın aktive ettiği DN_{az} (CAD)'ın kaspaz-3 tarafından aktive edildiği bilinmektedir (111).

Kaspazları aktive ederek apoptoza neden olan intrinsek ve ekstrinsek yollar, iki temel sinyalizasyon yolağını oluşturur. Ekstrinsek yolda, ölüm ligandları (FasL, TNF- α , TRAIL) hücre yüzey reseptörü Fas'a (ölüm reseptörü) bağlanır ve reseptör trimerizasyonu meydana gelir. Trimerizasyon ve aktivasyondan sonra, Fas reseptörü ile ilişkili ölüm alanı proteini (FADD) ile bir kompleks oluşturur. Oluşan kompleks başlatıcı kaspazların (örneğin, kaspaz-8) (klasik yol) aktivasyonuna yol açar ve efektör kaspaz 3 aktive olur (112).

İntrinsek yol, anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-X_L) ve pro-apoptotik proteinler olan (Bad, Bid, Bax, Bak, BH3-only, Nix..) Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından titizlikle düzenlenir. Pro-apoptotik proteinlerinin aktivasyonu ile mitokondriden sitokrom-c serbestleyen olaylar zinciri tetiklenir. Mitokondriden sitokrom-c serbestlenmesi sonucunda apoptoz-aktive edici faktör-1 (Apaf-1), sitokrom-c ve pro-kaspaz-9'dan oluşan apoptozom kompleksi oluşur ve sonuç olarak kaspaz-9'un aktivasyonu meydana gelir (1). Aktif kaspaz-9, pro-kaspaz-3'ten aktif kaspaz-3 oluşumuna sebep olur ve meydana gelen olaylar silsilesi apoptotik hücre ölümüyle son bulur.

DXR'ın hücre ölümünün önemli indükleyicileri olan serbest radikalleri ürettiği bilinmektedir. ROS mitokondrial DNA (mtDNA) hasarına neden olmakta ve bunun sonucunda ekstrinsek apoptotik yolun aktivasyonuna yol açan transkripsiyonel faktörleri disregüle etmektedir. Bunlara ek olarak, kalsiyum metabolizmasını bozar, mPTP'lerin açılmasına neden olur ve mitokondriden sitozole sitokrom-c salınımına yol açar (84).

DXR kaynaklı kardiyomyosit apoptozunun, protein 53 (p53) tümör baskılayıcı protein aktivasyonu ve artan ekspresyonu ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir (113, 114).

DXR'ın hem endotelial hücrelerde hem de kardiyomyositlerde apoptotik hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (60- 62, 115).

2.1.4. Antrasiklin Kardiyotoksitesinin Tipleri

Antrasiklin kardiyotoksitesinin akut, subakut, kronik ve geç dönem kardiyotoksisite olmak üzere 4 tipi tanımlanmıştır (28).

2.1.4.1. Akut Toksisite

Akut toksisite, antrasiklin tedavisi alan hastaların yaklaşık %0,4 -41' inde tedavinin ilk 24 saatinde meydana gelir. QRS voltajında azalma, QT intervalinde uzama, ST çökmesi, T dalgasında düzleşme, sinüs taşikardisi, atipik repolarizasyon bozuklukları, ventriküler ve supraventriküler ektopik atımlar, en sık görülen bulgulardır. Bunun yanında hastalar bulgu vermeyebilir, veriyorsa da antrasiklin tedavisinden birkaç saat veya hafta içerisinde kaybolabilir; uzun süreli kardiyak fonksiyon bozukluğu yaratmaz. QRS voltaj azalması gibi bazı değişiklikler nadir olarak kalıcılık gösterebilmektedir (28). Seyrek de olsa, akut toksisite ile birlikte sol ventrikül yetmezliği, perikard veya fatal olabilen perikardit-miyokardit sendromu meydana gelebilmektedir (116).

2.1.4.2. Subakut Toksisite

Nadir görülen toksisite çeşididir. Seyri akut reaksiyonlara göre yavaş ve daha az belirgindir. Antrasiklin uygulamasının son dozundan birkaç gün veya hafta sonra görülmekle beraber en sık bulgusu toksik miyokardit ve/veya perikardittir (28). Antrasiklin toksisitesinde en önemli toksisite subakut toksisitedir (116).

2.1.4.3. Kronik Toksisite

Hastaların % 0,4-23'ünde meydana gelir. Tedaviden birkaç hafta veya ay sonra genellikle sol olmak üzere, nadiren de her iki ventrikülü içeren ciddi kalp yetmezliği

gelişebilir. Efor dispnesi, egzersiz toleransında azalma, sağ kalp yetmezliği bulguları, kardiyomegali, sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunda azalma bulguları verir. Nadiren akciğer ödemi veya kardiyojenik şok olarak kendini gösterebilir (28).

2.1.4.4. Geç Toksikite

Antrasiklin tedavisinin tamamlanmasından sonraki birkaç yıl içinde meydana gelebildiği gibi 20 yıl sonrasında bile gelişebilmektedir. Nispeten daha düşük total dozlarda ($<480 \text{ mg/m}^2$) antrasiklin uygulanan hastalarda görülmüştür. Geç toksisite konjestif kalp yetmezliği, aritmi, ileti problemleri ve ani ölüm gibi klinik bulgularla kendini gösterir. Aritmi ve ileti bozuklukları nadiren asemptomatiktir. Ventriküler taşikardi antrasiklin kemoterapisi uygulanan hastaların %3'ünde 1 yıldan sonra görülürken, 2. derece AV blok, ventriküler fibrillasyon da kaydedilmiştir. Geç kardiyotoksisitenin sıklık ve şiddeti antrasiklin tedavisinden sonraki süre uzadıkça artmaktadır. Patogenezi bilinmemekle birlikte antrasiklinlerin miyokartta büyüme bozuklukları, miyosit kaybına neden olduğu ve böylelikle hemodinamik kalp rezervini tükettiği düşünülmektedir (28).

2.2. Melatonin

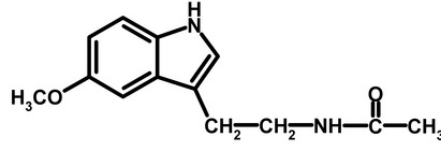
Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) ilk olarak 1958 yılında dermatolog Lerner ve arkadaşları tarafından sığır pineal bezinden izole edilmiştir (117, 118). Melatonin, melanin granüllerinin agregasyonuna neden olarak kurbağa deri renginde açılmaya sebep olduğu için bu ismi almıştır (119), 'karanlık hormonu' diye anılır.

Pineal bez beynin merkezinde, üçüncü ventrikülün arkasında yer alır (119). Pineal bez iki tip hücre içerir: hem hormon (en çok melatonin) hem peptit üreten pinealositler ve nöroglial hücreler (119, 120).

Melatonin bir indolamindir (119, 121). 232 molekül ağırlığına sahip olan melatonin sirkadiyan ritimde ve karanlıkta nöroendokrin bir organ olan pineal bez tarafından salgılanmaktadır (122). Pineal bezin yanı sıra retina, gastrointestinal sistem,

kemik iliği, lökositler, plateletler, eritrositler, deri ve diğer beyin alanları gibi çok sayıda farklı organ ve hücrelerin de melatonin sentezleme yeteneği vardır (123, 124).

Pineal hormonu melatonin sirkadyen ritm, nöroendokrin, kardiyovasküler ve bağışıklık işlevlerinin yanı sıra termoregülasyon gibi birçok biyolojik süreçte rol oynamaktadır (125).

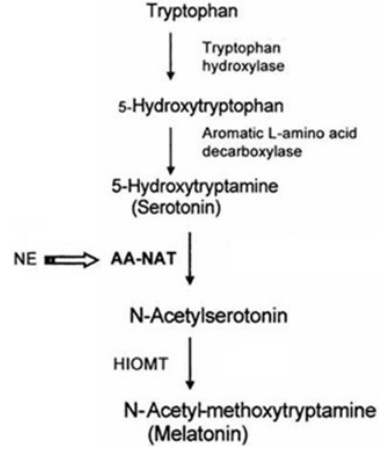


Şekil 4: N-asetil-5 metoksitriptamin (Melatonin)'in kimyasal yapısı

2.2.1. Melatoninin Biyosentez ve Metabolizması

Melatonin sentezi için öncelikle dolaşımdan hücre içine alınan triptofan, triptofan 5-hidroksilaz enzimi tarafından 5-hidroksitriptofan'a; 5-hidroksitriptofan ise L-aromatikaminoasit dekarboksilaz (dopadekarboksilaz) vasıtasıyla 5-hidroksitriptamin'e (serotonin) dönüştürülür. Serotonin, N-asetiltransferaz (NAT) ile Nasetilserotonin'e ve son olarak N-asetilserotonin, hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) enzimi tarafından melatonine dönüştürülür (122, 126, 127).

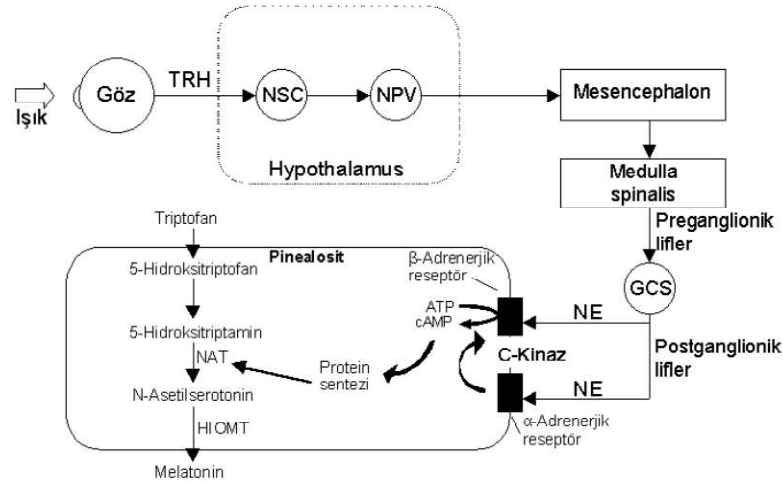
Yapılan deneysel çalışmalarda, hayvanlarda NAT enzim aktivitesinin, dolayısıyla melatoninin kan düzeyinin karanlıkta pik yaptığı gösterilmiştir. Bu periyod pineal bezi innerve eden sempatik sinir liflerinin spontan aktivitesinin ve bezde norepinefrin dönüşümünün en yüksek olduğu saatlere denk gelmektedir. Kısa süreli ışığa maruz kalındığında, sempatik aktivite baskılandığı için NAT enzim aktivitesi ve melatonin miktarı hızla düşer (123).



Şekil 5: Melatonin hormonunun biyokimyasal sentezi

Pineal bez, görme sisteminin bir uç organı olarak ritmik ışık mesajını canlıdaki her organa iletir. Işık uyarısı pineal beze karmaşık, çok nöronlu bir sistemle ulaşır. Retinadan başlayan ve suprakiazmatik çekirdekte (SKÇ) sonlanan ilk nöronal yolak “Retinohipotalamik traktus”tur. Retinal ışık reseptörleri, ışığı elektriksel uyarıya çevirerek suprakiazmatik çekirdeğe iletir. SKÇ’ten çıkan lifler pineal bez ve omuriliğin intermediolateral kolonuna gider ve buradan sempatik bir ganglion olan süperior servikal gangliona (SSG) ulaşır. SSG’dan çıkan postganglionik liflerde pineal beze ulaşarak kapiller boyunca bez içinde dağılırlar (127).

Pineal bez içerisinde, postganglionik sempatik sinir uçlarından norepinefrin salgılanmaktadır. Salınımı karanlıkta gerçekleşen norepinefrinin gün boyunca ve ışıkta salınımı durdurulur. Norepinefrinin pinealosit membranındaki β -adrenerjik reseptörlere bağlanarak bu reseptörleri uyarması ile hücre içinde önce adenilatsiklaz aktive olur ve cAMP artar. Daha sonra melatonin salgılanmasında hız kısıtlayıcı enzim olan NAT ve dolayısıyla melatonin sentezi artar. Pinealosit hücre membranlarında α -adrenerjik reseptörler de mevcut olup, β -adrenerjik uyarımı artırır (122, 128, 129).



Şekil 6: Pinealosit içerisinde gerçekleşen melatonin üretiminin kontrol mekanizması. (TRH): Tractusretinohypothalamicus, (NSC): Nucleussuprachiasmaticus, (NPV): Nucleus paraventricularis, (GCS): Ganglioncervicalesuperius

Sentezlendikten sonra depolanmayan melatonin molekül ağırlığının düşük olması, lipofilik ve hidrofilik olma özelliklerinden dolayı pinealositlerden pasif difüzyonla hızlı biçimde hücre dışına atılır. Üretilen melatonin direkt olarak kan dolaşımına geçer. Sonrasında organizmanın bütün biyolojik sıvılarına ve dokularına ulaşır. Melatoninin ayrıca anneden plasenta yolu ile fetusa ve sütle yeni doğanlara geçtiği bilinmektedir. (122, 127).

Kanda yarılanma süresi 10-40 dakika arasında olan melatonin başlıca karaciğerde ve ikinci derecede de böbreklerde metabolize olur. Karaciğerden ilk geçişte melatoninin %90'ı metabolize olur ve 6-hidroksimelatonine dönüştürülür. Bu madde sülfat veya daha az olarak glukuronik aside bağlanarak idrarla atılır. İdrardaki melatonin metaboliti, 6-sulfatoksi-melatonin'dir (122, 127).

2.2.2. Melatonin Sekresyonunun Düzenlenmesi

Melatonin sekresyonu gece boyunca yüksek, gün içinde düşüktür. Işığa maruz kalma melatonin sekresyonunu akut olarak baskılayabilir (130). Melatonin geceleri büyük bir artış gösterir ve bunun yanında melatonin düzeyinin yüksek kalma süresi karanlığın süresine bağlıdır. Karanlığın uzun sürdüğü kış aylarında bu süre daha uzundur. Pinealoktemi melatoninin gece yükselmesini önlemektedir (127,128).

Plazma melatonin konsantrasyonu gece saat 02.00 ile 04.00 arasında maksimum değerlere ulaşır. Erişkinde sekresyon genelde saat 21.00 - 22.00 arası başlayıp, saat 07.00 -09.00 arası sona erer (128). Plazma konsantrasyonu gündüz 0 - 20 pg /dl iken gece 50-200 pg /dl düzeyine yükselmektedir. Bir günde 30 mg melatonin üretilmekte ve bunun % 80'ni gece sentez edilmektedir (131) .

β -blokerlerin, β 1-adrenerjik reseptörler aracılığı ile melatonin salınımını azalttığı bilinmektedir (132).

2.2.3. Melatonin Reseptörleri

Farmakolojik ve kinetik gruplara ait, MT1 veya Mel1a yerleri ve MT2 veya Mel1b yerleri olmak üzere zara bağlı iki melatonin bağlanma yeri tanımlanmıştır. Ancak MT3 (M12) olarak adlandırılan üçüncü bir bağlayıcı bölgenin varlığı da kabul edilmektedir (119, 121, 133).

Hem MT1 hem de MT2 reseptörleri serebellumda, retinal yollarda ve ganglionik hücrelerde bulunmuştur (133). MT1 reseptör geni insanlarda kromozomun 4q35.1 lokalizasyonunda, MT2 reseptör geni ise 11q21-22 lokalizasyonunda tanımlanmıştır (128).

İnsanlarda melatonin reseptörleri beyin ve retina, kalp-damar sistemi, karaciğer ve safra kesesi, bağırsak, böbrek, bağışıklık hücreleri, adipositler, prostat ve meme epitelyal hücreleri, ovaryum/granüloza hücre, miyometriyum ve deri dahil olmak üzere birçok organda tespit edilmiştir (134).

Melatonin reseptörleri insan fetusunda da yaygın olarak bulunur. Ancak fetal pinealosit en erken gestasyonun 26. haftasından sonra melatonin sentezleme yeteneği kazanabilirler. Doğumdan sonraki 2-3 haftaya kadar melatoninin sirkadiyen salınımı gösterilememiştir (133).

2.2.4. Melatoninin Etki Mekanizmaları

2.2.4.1. Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

Melatoninin antioksidan özelliği genel olarak iki ana etki altında toplanabilir: ilki reseptörden bağımsız olarak oksidan maddeye elektron sağlaması yoluyla doğrudan süpürücü etki; ikincisi endojen antioksidan mekanizmaları reseptör bağımlı harekete geçirerek gösterdiği indirekt etkidir (129).

Serbest oksijen radikallerini ve serbest nitrojen radikallerini (RNS)'ni doğrudan temizleyebilme yeteneğinden ötürü, melatoninin temel fonksiyonunun canlı organizmaları oksidatif stresten korumak olduğu hipotezi ileri sürülmektedir (135).

Melatoninin hem direkt hem de indirekt radikal toplayıcı olarak antioksidan özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Yüksek derecede lipofilik özelliğe sahip olması, serbest radikal toplayıcısı olarak melatoninin en önemli avantajıdır. Melatonin serbest radikal toplayıcı etkisi için herhangi bir bağlanma bölgesine ve reseptöre ihtiyaç duymaz (136).

Melatonin en zararlı radikal olan hidroksil radikalini ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Melatoninin OH⁻ radikali ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüşür, bu radikal de ortamdaki O₂ radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterir (135, 136).

Melatoninin mannitol, glutatyon, E vitamini ve C vitamini gibi diğer antioksidanlardan çok daha yüksek verimlilik derecesi ile OH⁻'ı nötralize ettiği bildirilmiştir (137). C vitamini veya E vitamini klasik antioksidanlardan pek çok farklı yönü ile ayrılmaktadır. Bahsedilen klasik antioksidanlar, etki göstermelerinin ardından, savaştıkları oksidan maddelerden yalnızca biraz daha az zararlı prooksidan maddelere dönüşmektedirler. Melatoninde ise ara basamaklarda ve sonuçta oluşan ürünler ilk durumdaki gibi antioksidan etkilidir. Bu durum melatonine diğerlerinde olmayan çok önemli bir özellik kazandırmaktadır. Melatonin bu özelliğinden ötürü “terminal antioksidan” olarak tanımlanmaktadır (138).

Melatoninin bütün hücre ve hücre içi komponentlere kolaylıkla diffüze olabilmesi, serbest radikallere ulaşp onları zararsız hale getirebilmesi açısından

önemli bir özelliktir. Yüksek toksik güce sahip hidroksil radikallerini yok etmesinin yanı sıra melatonin, hidroksil radikalının prekursoru olan hidrojen peroksidi suya metabolize eden güçlü antioksidan enzim glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesini de uyarır (136).

Ayrıca melatonin indirekt antioksidan özelliğiyle antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz (GSH-Rd), katalaz ve glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) aktivitelerini de artırır (135).

Melatoninin H_2O_2 ile reaksiyonu sonucu N1-asetil-N2-formil-5-metoksi knüramin (AFMK) oluştuğu, AFMK'nın ise katalazla N1-asetil-5-metoksi knüramine dönüştürüldüğü ve antioksidan etkiye sahip bu metabolitlerin melatoninin süpürücü etkisini artırdığı bildirilmiştir (139).

Bugüne kadar melatoninin toksik özelliğe sahip olduğuna dair hiçbir rapor bulunmamakta olup, aksine bu hormonun çok iyi bir radikal temizleyicisi olduğu sonucuna varılmıştır (135).

2.2.4.2. Apoptoz Üzerine Etkisi

Apoptoz genel olarak hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan, organizmada homeostazı koruyan bir olaydır (140).

Melatoninin çeşitli ajanlarla oluşan apoptozu modüle edici rolü üzerine çalışmalar bildirilmiştir. Melatoninin apoptoz üzerindeki etkisi, antioksidan oluşu ve serbest radikalleri temizleme özelliğiyle ilgili gibi görünüyorsa da, son zamanlarda melatonin antiapoptotik etkisinin mitokondriyal geçiş poru ile doğrudan etkileşim yoluyla açıklanabilen yeni bir mekanizma ortaya koymuştur (141). Melatonin dolaylı olarak MTP açılışını inhibe eder ve MTP bağımlı sitokrom c salınımını, kaspaz 3 aktivasyonunu ve apoptoz ile hücre ölümü engeller (142).

Melatonin hem vivo hem de in vitro deneylerle belgelenmiş güçlü bir antioksidan ajandır. Periferik dokulardaki çalışmalar melatoninin apoptotik süreçleri antioksidan özellikleri ile de inhibe ettiğini ileri sürmüşlerdir (143). Melatoninin antimitotik ve antioksidan etkisiyle p53 geninin ekspresyonunu artırdığı

ileri sürülmektedir ve p53 eksikliği olan hücrelerin genetiksel olarak istikrarlı olmadıkları ve tümör oluşumuna daha yatkın oldukları görülmüştür (144).

2.2.4.3. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi

Liu ve arkadaşları (145) tarafından yapılmış bir çalışmada doksorubisinle oluşan kardiyak işlev bozukluğu, mikroskobik değişiklikler, apoptoz, özellikle de sol ventrikül fonksiyonu ve kalbin morfolojik çalışması üzerinde melatoninin koruyucu etkisi gösterilmiştir.

Öz ve arkadaşlarının (146) yaptığı çalışmada melatoninin lipid peroksidasyonu ile miyokardiyal lezyonları önleyerek, doksorubisinle indüklenmiş miyokardiyal lipid peroksidasyonu ile ilişkili kardiyotoksositeye karşı koruma sağladığı bildirilmiştir.

Siklosporin A (CsA) yaygın kullanılan immünsüpresif ilaçtır, ama terapötik kullanımının nefrotoksosite ve kardiyotoksosite gibi birçok yan etkisi vardır. 2006'da Rezzani ve arkadaşları (147) CsA kaynaklı kardiyotoksitenin önlenmesinde melatoninin etkilerini inceledikleri çalışmada, melatoninin antioksidan enzim düzeylerini belirgin derecede yükselterek oksidatif hasarı azalttığı ve kardiyak morfolojiyi düzelttiğini bildirilmişlerdir.

Bir başka çalışmada doksorubisin verilen grupta miyokardiyal GSH-Px ve SOD düzeylerinin azaldığı, MDA ve NO düzeylerinin yükseldiği gözlenmiş, melatoninin miyokardiyal GSH-Px düzeylerini ve SOD enzim aktivitesini yükselttiği, NO düzeyini azalttığı ve sonuç olarak ağır kardiyomiyopatiji önlediği saptanmıştır (148).

İzoproterenol (ISP), bir beta-adrenerjik agonisttir ve yüksek dozlarda akut miyokardiyal nekroz oluşturur. 2003'te Acikel ve arkadaşlarının (149) yaptıkları incelemede, sıçanlarda ISP tarafından indüklenen miyokardiyal infarktüse karşı melatoninin koruyucu etkiye sahip olduğu ve ISP ile beraber melatonin uygulamasının miyosit hasarı hafiflettiği bildirilmiştir.

2.3. Nigella sativa (Çörek Otu)

Çörek otu, Ranunculaceae (düğün çiçeğigiller) familyasına ait Nigella sativa (NS) türüdür. İngilizcede 'black cumin' ya da 'black seed', Arapça'da 'Habba-tu sawda olarak bilinir (150). Çörek otunun anavatanı Güney ve Doğu Avrupa ile Doğu Akdeniz ülkeleridir. Türkiye'de özellikle Burdur, Isparta, Antalya, Kütahya, Konya yörelerinde (151) ve birçok şehirde yetişen otsu, tek yıllık ince yapraklı bir bitkidir. Ülkemizde 12 Nigella türü yetişmektedir. Bunlardan Nigella sativa, Nigella Damascena ve Nigella Arvensis'in tohumları geleneksel tıpta ve baharat olarak geçmişten günümüze yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ülkemizde tarımı yapılan ve ticarete konu olan tek tür yalnızca Nigella sativadır. Bitkinin meyve kapsülü olgunlaşıp açılır ve içeriğindeki tohumlar havaya maruz kalarak kararır. Besin olarak kullanılan kısmı bitkinin kapsül içerisinde oluşan tohumdur (86, 152).

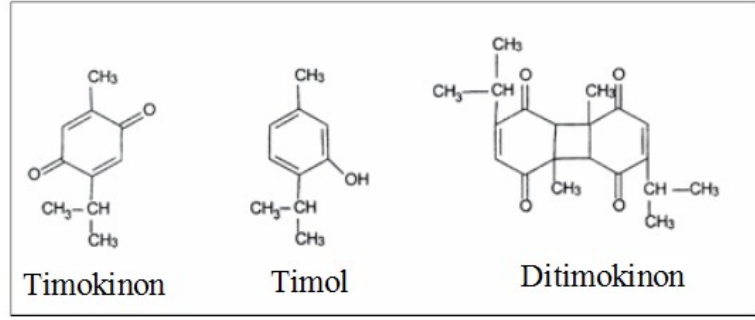
Nigella sativa 2000 yılı aşkın süredir hem mutfakta baharat olarak hem de doğal şifalı bir ilaç olduğu düşüncesiyle geleneksel tıpta çeşitli hastalıkların (baş ağrısı, ateş, enfeksiyonlar, grip, öksürük, astım, diyabet, obezite, hipertansiyon, inflamasyon, romatizma, gastrointestinal hastalıklar, dizanteri, gaz giderici, kurt düşürücü, ekzama, diüretik) tedavisinde kullanılmaktadır (153, 154, 155).



Resim 2: Çörek otu bitkisi

Çörek otunun yapısında sabit ve uçucu yağlar, proteinler, karbonhidratlar, aminoasitler, lifler, tanenler, saponinler, mineraller ve su bulunur. Sabit yağı doymamış (oleik asit, linoleik asit, eicodadienoik, araşidonik asit ve linolenik asit) ve

doymuş yağ asitleri (palmitik asit ve miristik asit), uçucu yağı ise d-limonen, nigellon, karvakrol, α ve β -pinen içermektedir. Uçucu yağda bulunan farmakolojik aktif bileşenler timokinon (TQ), ditimokinon (DTQ), timohidrokinon (THQ) ve timol (THY) izole edilmiştir (156, 157).

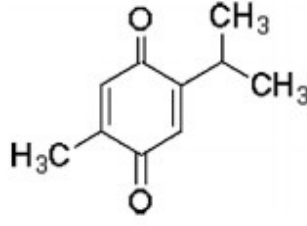


Şekil 7: Nigella sativanın temel bileşenleri

Çörek otu tohumu ve bileşenlerinin; antioksidan (153, 158), antiinflamatuvar ve analjezik (159, 160), gastroprotektif (161), antidiyabetik (162), antibakteriyel (86, 163), antiviral (164), antihelmintik (165, 166), antifungal (167), antikanserojenik (168), antitümöral (169), antiülserojenik (170), hipoglisemik (169, 171), antiastmatik (172) ve bağışıklık sistemini güçlendirici (86, 152, 173) gibi çok sayıda faydalı etkiye sahip oldukları ileri sürülmüştür. Bu farmakolojik özellikleri nedeniyle Nigella sativa ve içerisinde en fazla oranda bulunan komponent olan TQ pek çok bilimsel çalışmanın konusu olmuş ve olmaya devam etmektedir.

2.3.1. Timokinon

Timokinon; Nigella sativa bitkisinin uçucu yağında bulunan en önemli bileşen olup (174), koyu sarı renkli kristallere sahip uçucu bir monoterpen kinondur. Kimyasal formülü $C_{10}H_{12}O_2$ olarak gösterilen 2- izopropil-5 metil- 1,4 benzokinon yapısındaki bu maddenin molekül ağırlığı 164.201 g/mol dır (175).



Şekil 8: Timokinonun kimyasal yapısı

2.3.1.1. Timokinonun Tıbbi Özellikleri

Timokinonun antioksidan (176, 177), analjezik (159), antiinflamatuvar (178, 179, 180), antibakteriyel (163), antidiyabetik (181, 182), antihiperlipitemik (158, 179), gastroprotektif (170, 183, 184), hepatoprotektif (185, 186, 187), kardiyoprotektif (10, 11), antinefrotoksik (188, 189), antinörodejeneratif (190, 191), antikanserojenik (168, 169), immünomodülatör (86) ve kemik iyileşmesine yardımcı (192, 193) gibi birçok özelliği gösterilmiştir.

2.3.1.2. Timokinonun Etkileri

2.3.1.2.1. Antioksidan Etkisi

Serbest radikaller ortaktanmamış elektronları nedeniyle kararsız bir yapıya sahip olup, biyolojik yapılarda oluşan oksitleyici hasarlar özellikle kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalığın patofizyolojisi ile ilişki göstermektedir (194). Serbest oksijen radikalleri antioksidanlar olarak adlandırılan enzimlerin faaliyetleri ve mono enzimler tarafından dengelenmektedir. Normalde, serbest oksijen radikalleri ve antioksidanların üretimi arasında bir denge vardır, fakat vücut hastalıklardan veya yaşa bağlı faktörlerden etkilenmişse, denetlenmeyen oksidanlar hücrel değişiklikler ve kritik hastalıklara yol açar (195).

TQ'nun birçok farmakolojik etkiye sahip olması nedeniyle bugüne dek üzerinde çok sayıda çalışma yapılmakta fakat en çok antioksidan ve antikanserojenik etkileri araştırılmaktadır. TQ'nun serbest radikallere karşı antioksidan etkili olduğu (196), prooksidan etkisinin bulunmadığı (153) ve 5- hidroksieikozatetraenoik asit ile 5-lipoksijenaz sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (178).

Farklı mekanizmalar ile antioksidan özellik göstererek, süperoksit radikal anyonu (O_2^-) ve hidroksil (OH^-) radikallerini içeren birçok reaktif oksijen türlerinin yakalayıcısı olduğu ortaya konmuştur. Sentetik tertbutilhidroquinon (TBHQ) ve TQ'nun güçlü prooksidan ve antioksidan oldukları, (konsantrasyona bağımlı olarak) demire bağlı mikrozomal lipid peroksidasyonunu inhibe ettikleri ve TQ'nun süperoksit radikal süpürücüsü olarak TBHQ'dan daha güçlü olduğu belirtilmiştir (177).

TQ'nun polimorfonükleer lökositleri uyarak süperoksit radikallerinin (O_2^-) hasarlayıcı etkilerine karşı koruyucu etki gösterdiği bulunmuştur (11). Mansour ve arkadaşları TQ'nun güçlü serbest radikal ve süperoksit radikal yakalayıcısı olarak davrandığını (197), lipid peroksidasyonuna neden olan serbest oksijen radikallerini inhibe ettiğini rapor etmişlerdir (198).

Badary arkadaşlarının (158) ratlarda yaptıkları çalışmada DXR kaynaklı nöropati ve oksidatif strese TQ'nun güçlü antioksidan özellik göstererek nefropatiyi baskıladığını bildirmişlerdir.

Hepatotoksik ajan olan karbon tetraklorür (CCl_4) ile yapılan çalışmada çörek otu yağının lipid peroksidasyonu, MDA düzeyi ve karaciğer enzim düzeylerini düşürdüğü bunun yanında antioksidan savunma sistem aktivitelerini arttırdığı bulunmuştur (196).

Etanolün indüklediği akut gastrik ülserasyonlarda TQ tedavisinin malondialdehit (MDA) düzeyini azaltarak GSH düzeyini arttığı gösterilmiş bu durum TQ'nun antioksidan ve antiperoksidatif bir ajan olduğunu desteklemiştir (184).

Ratlarda iskemi/reperfüzyon uygulamasında çörek otu yağı ve TQ'nun serum LDH düzeylerini azaltarak, GSH ve SOD düzeylerini normal düzeylere getirdikleri

(183) ve TQ'nun rat kasındaki iskemik hasara karşı koruyucu etki gösterdiği (199) ortaya konmuştur.

Ratlarda streptozotosin (STZ) indüklü diyabetin sebep olduğu kalp ve beyindeki oksidatif stres araştırılmış, glutatyon –S- transferaz (GST), glutatyon ve katalazdaki düşüğe bağlı olarak oksidatif hasarın oluştuğu, CK-MB ve beyin monoaminlerindeki değişimlerin NS yağı ve TQ'nun antioksidan özellikleri sayesinde düzeldiği gösterilmiştir (200).

Al-Enazi (2007)'nin diyabetik gebe fareler üzerinde yaptığı çalışmada TQ'nun serbest radikalleri azaltarak embriyo malformasyonunu inhibe ettiği ve bunun yanında embriyo matürasyonunu arttırdığını gözlemlemiştir (201).

2.3.1.2.2 Antitümöral ve Antikanserojenik Etkisi

Kanser miyokard infarktüsünden sonra ikinci ölüm nedeni olarak kabul edilen, modern yaşamın en büyük tehditlerinden biridir. Hücrelerinin sürekli ve kontrolsüz olarak çoğalması olarak tanımlanan kanser, hücrelerin çoğalmasından, farklılaşmasından ve hücre döngüsünü kontrol eden genlerde meydana gelen değişikliklerden kaynaklanmaktadır (6).

İn vivo ve in vitro çalışmalar, hem NS yağı hem de tohumlarındaki aktif maddelerinin antitümör etkilere sahip olduğunu göstermektedir (86, 202). N. sativa tohumlarının uçucu yağının etkileri, insanlarda görülen farklı kanser hücreleri üzerinde araştırılmış ve yağın bu hücrelerde sitotoksik etki yarattığı bildirilmiştir (203).

İn vitro ve in vivo ortamda osteosarkoma üzerine yapılan bir çalışmada TQ'nun antitümör ve anti-anjiyojenik etkisi incelenmiştir. Sonuçlar, insanlardaki osteosarkoma hücrelerinde büyümeyi inhibe ettiği ve apoptoza neden olduğunu, altında yatan mekanizmanın NF-κB ve efektör moleküllerinin inhibisyonu yoluyla olabileceği gösterilmiştir (204).

Yapılan çalışmalar TQ'nun, kan kanseri (205), göğüs ve yumurtalık adenokarsinomu (206), hepatik kanser (207), kolon kanseri (208), pankreatik kanser (209), prostat kanseri (168), fibrosarkoma tümörleri (210), insan osteosarkomu (211) gibi pek çok kanser çeşidinde hücrelerin proliferasyonu üzerine inhibitör etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

2.3.1.2.3. Analjezik ve Antienflamatuar Etkisi

Abdel-Fattah ve arkadaşlarının (159) fareler üzerinde yaptıkları çalışmada TQ'nun ağrının erken ve geç safhalarında etkili olarak ağrıyı inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Sonuçlar NS yağı ve TQ'nun antinosiseptif etkilerini supraspinal μ_1 ve kapa opioid reseptör subgruplarının indirekt aktivasyonu yolu ile olduğunu göstermektedir.

İnflamasyon, siklooksijenaz (COX) ve lipooksijenaz (LO) olmak üzere başlıca iki enzim tarafından düzenlenir. COX katalizörlüğünde prostaglandinler (PG) sentezlenirken, LO katalizörlüğünde lökotrienler (LT) sentezlenir. Sentezlenen prostaglandinler ve lökotrienler alerji ve inflamasyonun aracıları olarak görev alırlar (86).

TQ'nun antienflamatuar özelliği ile ilgili yapılan çalışmalarda TQ ve çörek otu yağının siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzim inhibitörü oldukları ortaya konmuştur (172).

Hajhashemi ve arkadaşlarının (212) ratlar üzerinde yaptığı çalışmada çörek otu uçucu yağının potent antienflamatuar özelliğinin olduğunu göstermişlerdir.

El-Mahmoudy ve arkadaşlarının (213) yaptığı incelemede TQ'nun makrofajlardan salınan NO üretimini baskılayarak inflamasyonlu ve otoimmün hastalıkların tedavisinde yararlı etkileri olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Çörek otu yağının farmakolojik özelliğinden faydalanılarak artrit ve inflamatuvar hastalıklarda kullanılacak antienflamatuar bir madde olduğu bildirilmiştir (86).

2.3.1.2.4. Antihistaminik Etkisi

Vücut dokularından salgılanan histamin bronşiyal astım gibi hastalıklarla ilişkili alerjik reaksiyonlar oluşturabilmektedir (86). NS ve TQ'nun antihistaminik etkileri gösterilmiştir.

TQ'nun kobaydan izole edilen trakeal ve ileum düz kaslarında histamin ve serotoninin baskılayıcı etkilerini tamamen ortadan kaldırdığı ve antiallerjik etkisini histamin ve serotonin reseptörlerini non selektif bloke ederek gösterdiği öne sürülmüştür (214).

TQ'nun karbonil polimeri olan nigellonun, TQ'nun birçok farmakolojik özelliğine sahip olduğu ve rat peritoneal mast hücreleri üzerine uygulandığında histamin salınımını inhibe ettiği gözlenmiştir (215).

2.3.1.2.5. Antihiperlipitemik ve Antihiperkolesterolemik Etkisi

Ratlarda DXR tarafından indüklenen hiperlipitemik nöropati ve oksidatif stres üzerine timokinonun etkisi araştırılmıştır. DXR'ın intravenöz yoldan tek doz 6mg/kg verilmesi üzerine hipoalbuminemi, hipoproteinemi, serumda üre artışı, hiperlipitemi, idrarda protein albumin ve N-asetil- β -D glikozaminidaz atılımında artış ile ilişkili ciddi nefrotik sendrom meydana gelmiştir. DXR enjeksiyonundan 5 gün önce ve deney boyunca günde 10 mg/kg TQ verilmesi sonucu DXR kaynaklı proteinüri ve albuminüriyi anlamlı şekilde düşürdüğü saptanmış, nefrotik sendromla ilişkili hiperlipitemi ve proteinüri için TQ'nun koruyuculuğuna vurgu yapılmıştır (158).

Ragheb ve arkadaşlarının (179) tavşanlarda oluşturdukları ateroskleroz modelinde TQ'nun Siklosporin A (CsA) ve hiperlipiteminin neden olduğu aterogenezi azalttığı ve koruyucu bir ajan rolü gördüğü saptanmıştır.

Albino ratların kanlarında kolesterol, trigliserid, HDL ve LDL üzerine TQ'nun etkisi araştırılmış ve 1, 4, 7, 10 ve 14. günlerde 0.5, 1, 2, 4, 6 ve 8 mg/kg/gün dozajlarda intraperitoneal yoldan TQ uygulanmış ve timokinonun tüm parametrelerde anlamlı düşüşe neden olduğu, insan ve hayvanlarda terapötik etkileri olduğu öne sürülmüştür (216).

Hiperkolesterolemi ile indüklenen ratlarda TQ ve NS ekstraktı olan zengin fraksiyonlu timokinonun (TQRF) lipitler üzerindeki etkileri ve antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Sonuçlar TQRF ve TQ'nun hiperkolesterolemik ratların plazma ve karaciğer antioksidan kapasitesini iyileştirerek karaciğer antioksidan genlerinin ekspresyonunu arttırdığı kaydedilmiştir (217).

2.3.1.2.6. Antidiyabetik Etkisi

Diyabetes Mellitus insanlığın bilinen en eski hastalıklarından biridir. Hayvan deneylerinde yapılan çalışmalar TQ'nun hipoglisemik (169, 171) ve karaciğerdeki glukoneogenezi azaltarak antidiyabetik (182) etkileri olduğunu, insülin bağımlı olmayan diyabetes mellitusun tedavisinde terapötik olduğunu (150) göstermiştir.

Al-Enazi'nin STZ ile oluşturulan diyabetik gebe fareler üzerinde yaptığı çalışmada TQ'nun serbest radikalleri azaltarak embriyo malformasyonunu inhibe ettiği ve bunun yanında embriyo matürasyonunu arttırdığını saptamıştır (201).

STZ ile oluşturulan diyabet modelinde NS yağı ile yapılan tedavide yüksek serum glikoz konsantrasyonunun düştüğü ve düşük olan insülin konsantrasyonunun arttığı, glikoz düşüşünün ise pankreasın β hücrelerinin kısmi rejenerasyonu/poliferasyonuna bağlı olarak meydana gelmiş olabileceği belirtilmiştir (218).

Al-Hader ve arkadaşlarının (219) tavşanlar üzerinde yaptığı çalışmada NS yağı uçucu ekstresinin 50 mg/kg intraperitoneal yoldan uygulayarak açlıkta plazma glikoz seviyesinin %15 ila %23 oranında azaldığını göstermişlerdir.

Diyabetli tavşanlarda yapılan bir çalışmada NS ekstresinin serum glikoz ve MDA konsantrasyonunu azaltarak, GSH ve seruloplazmin konsantrasyonunu arttırdığı böylece lipit peroksidasyonunun neden olduğu karaciğer hasarını önlediği öne sürülmüştür (220).

Tek doz STZ (50 mg/kg/ip) uygulanarak diyabet oluşturulan ratlara STZ enjeksiyonundan 3 gün önce başlanarak 4 hafta süre ile intragastrik sonda ile 0,2 ml/kg/gün NS uçucu yağı verilmiş ve bulgular sonucu yağ ekstresinin oksidatif stresi

azaltarak pankreas beta hücre bütünlüğünü koruduğu ve diyabete karşı terapötik etkisinin olduğu düşünülmüştür (221).

TQ'nun insüline bağlı tip-1 diyabette STZ enjeksiyonundan sonra meydana gelen patojenik süreçleri engellemede etkin olabildiği, insüline bağlı olmayan diyabette ise NO ve TNF- α konsantrasyonlarını normalize ederek tip-2 diyabette iyileşmede etkili olabileceği belirtilmiştir (222).

Timokinonun total HbA_{1c} düzeyini anlamlı şekilde düşürdüğü bulunmuştur (182). Diyabetik ratlarda HbA_{1c} ile plazma glikoz düzeylerindeki artış ve insülin ile Hb düzeylerindeki azalmanın TQ tedavisinden sonra normal değerlere ulaştığı ve maksimum glikoz düşüşünün ise 80 mg/kg dozdaki TQ'da gerçekleştiği belirtilmektedir. Bununla birlikte glikolitik enzim olan hegnokinaz seviyesini arttırırken, glikoneojenik enzimler olan glukoz 6-fosfataz ve fruktoz 1,6-bifosfataz gibi karaciğer enzimlerinin seviyesini azaltarak dokular tarafından glikoz kullanımını arttırdığı ve insülin salınımını arttırma suretiyle glikoneogenezi azalttığına dikkat çekilmiştir (223).

2.3.1.2.7. Antihipertansif Etkisi

Spontan hipertansif sıçan (SHR)'lar üzerinde *Nigella sativa* tohumunun diklorometan ekstresinin diüretik ve hipotansif etkileri araştırılmıştır. Çörek otu ekstresi (0,6 ml/kg/gün) ile furosemidin (5 mg/kg/gün) 15 gün boyunca oral yoldan verilmesi sonucunda diürezin %16-30 oranında artış göstermesi yanında Cl⁻, Na⁺ ve K⁺ iyonları ile ürenin idrarda arttığı, arteriyel kan basıncının ise %22 oranında düştüğü gözlemlenmiştir. Çalışma sonuçları NS tohumunun spontan hipertansif sıçanlarda açığa çıkan hipotansif etkisinin kısmen onun diüretik aktivitesinden kaynaklanmış olabileceği yorumu yapılmıştır (224).

2.3.1.2.8. Antibakteriyel, Antihelmintik Antifungal ve Antiviral Etkisi

Antibakteriyel Etki

NS yağının *Pseudomonas pyocyaneanin* bazı suşları dışında hem Gram-pozitif ve Gram-negatif mikroorganizma büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (150).

Çörek otu yağının iki temel komponenti olan TQ ve THQ'nun *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel etkinliğinin araştırıldığı çalışmada *S.aureus* bakterisinin TQ'ya yüksek derecede duyarlılık gösterdiği ve TQ'nun 3 µg/ml dozunun bakteriyostatik, 6 µg/ml dozunun ise bakterisit etkili olduğu bildirilmiştir. *S.aureus*'a karşı THQ'nun bakteriyostatik ve bakterisit etkili olabilmesi için konsantrasyonlarının 400 µg/ml ve 800 µg/ml olması gerektiği ve bu miktarların TQ'nunkinden 100 kat daha fazla olduğu ifade edilmiştir. TQ ve THQ'nun antibiyotikler (ampisilin, tetrasiklin, gentamisin, sephaleksin, kloramfenikol ve siprofloksasin) ile kombinasyonunun *S. aureus*'da sinerjistik etki gösterdiği gösterilmiştir. Diğer Gram-negatif bakterilerin ise TQ ve THQ'ya daha az duyarlı oldukları bulunmuş ve minimum inhibitör konsantrasyonları ile minimum bakteriyel konsantrasyonlarının 200 ile 1600 µg/ml arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir (163).

Daha önceleri yapılan çalışmalarda THQ'nun Gram-pozitif bakteri (225) ve mayalara karşı aktif bir madde olduğu bulunmuştur (226).

NS tohumu dietil eter ekstraktının streptomisin ve gentamisin ile antibakteriyel sinerjik etki ve steptinomisine, eritromisin, tobramisin, doksisisiklin, kloramfenikol, nalidiksik asit, ampisilin, linkomisin ve sülfometaksozol-trimetoprim kombinasyonu ile additif antibakteriyel etki göstererek; fatal olmayan derialtı stafilokok enfeksiyonunda, enfeksiyonlu bölgeye enjekte edildiğinde enfeksiyonu başarılı şekilde eradike ettiği bildirilmektedir (227).

Antihelmintik Etki

Schistosomiasis mansoni ile enfekte farelerde NS yağı ile yapılan tedavi sonucu hem karaciğer hem de bağırsaklardaki yumurta sayısı azalarak bağırsak duvarındaki ölü kurtçuk sayısı artmıştır (166).

Üçüncü dünya ülkelerinde yaygın görülen tropikal bir hastalık olan Şistozomiyazis ile enfekte edilen fare hücrelerinde hem çörek otu ekstraktının hem de TQ'nun Şistozomiyazis'in sebep olduğu kromozomal bozuklara karşı potansiyel koruyucu maddeler oldukları ifade edilmiştir (165).

Antifungal Etki

Çörek otu tohumu ve TQ'nun eter ekstresinin 8 farklı türe karşı antifungal aktivitesi araştırılarak deri mantar enfeksiyonlarının tedavisinde çörek otunun kullanımı desteklenmiş ve antidermatofit ilaçlar için bir kaynak oluşturabileceği öne sürülmüştür (228).

İntravenöz yoldan Candida albicans verilerek enfekte edilen farelerin karaciğer, dalak ve böbreklerinde koloniler oluşturulmuş ve NS tohumunun sulu ekstresinin antifungal aktivitesi incelenmiştir. Farelerde enfeksiyon başladıktan 1 gün sonra başlanarak 3 gün süreyle muayene edilen farelerin bütün organlarında mantar büyümesini önlediği gösterilmiştir (167).

Antifungal ilaç olan Amfoterisin B ile TQ'nun Fusarium solaniye karşı antifungal aktiviteleri karşılaştırılmış ve TQ'nun daha etkin inhibisyon yaptığı bulunmuştur (229).

Antiviral Etki

Salem ve Hossain tarafından yapılan bir çalışmada murin sitomegalovirüs (MCMV) modeli kullanılarak NS tohum yağının antiviral etkisi incelenmiştir. MCMV'li farelere intraperitoneal yoldan NS yağı uygulanmasının, enfeksiyonun 3.gününde karaciğer ve dalaktaki virüs kümelerini dikkat çekecek düzeyde inhibe ettiğini göstermiştir (164).

2.3.1.2.9. Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkisi

El-Abhar ve arkadaşları (183) tarafından iskemi/reperfüzyon oluşturulan ratlardan elde edilen bulgularda NS yağı ve TQ'nun gastrik mukoza redoks durumunun korunması ile ilişkili olarak gastrik lezyonlara karşı gastroprotektif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Sıçanlarda asetik asit kaynaklı kolit üzerindeki timokinonun olası etkilerini araştırmak amacıyla yapılan bir başka çalışmada % 3 asetik asidin intrakolonik enjeksiyonu ile kolit indüklenmiştir. Çalışmada 3 gün süreyle oral yoldan thymoquinone (10 mg/kg) verilerek biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikler onarılmıştır. Bu sonuçlar, deneysel kaynaklı kolit ve olası mekanizmasına karşı timokinonun olumlu etkiler gösterdiği bulunarak koruyucu etkilerinin kısmen antioksidan etkisinden kaynaklı olabileceği ifade edilmiştir (230).

Yine ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada etanol ile indüklenen akut gastrik hasarın TQ tarafından engellenebildiği ve gastroprotektif etkisinin kısmen antioksidan özelliğiyle ilişkili olduğu işaret edilmiştir (184).

Ratlarda etanolün indüklediği ülser ve gastrik sekresyon üzerine NS yağının etkisi araştırılarak NS'nin glutatyon ve müsin seviyesinde anlamlı derecede artış, mide mukoza histamin içeriğinde azalma yaptığı saptanmıştır (161).

Etanolün indüklediği akut gastrik ülserlerin patogenezindeki reaktif oksijen türleri üzerine TQ ve NS yağının etkilerinin değerlendirildiği bir başka çalışmada mukozal hasarın önlendiği ve gastroprotektif etkilerinin radikal süpürücü etkilerinden kaynaklanabildiği raporlanmıştır (170).

Etanolün indüklediği akut gastrik mukozal hasarın NS ve TQ tarafından önlendiği ve ülserli dokunun hızla iyileştiği gözlenerek bu koruyuculuğun antihiperoksidatif, antioksidan ve antihistaminik etkileri ile sağlandığı öne sürülmüştür (162).

2.3.1.2.10. Sinir Sistemi Üzerine Etkisi

Rat hipokampusünde geçici önbeyin iskemi/reperfüzyon nöronal hasarına karşı TQ'nun nöroprotektif olduğu belirtilmiştir (190).

Sıçanlarda kronik toluen maruziyetinden sonra hipokampus nörodejenerasyonu üzerine NS ve TQ tedavisinin hipokampus nörodejenerasyonlarında morfolojik düzelme sağladığı ve tedavide katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (191).

Al- Naggar ve arkadaşları (231) tarafından NS tohum yağının santral sinir sistemi üzerine etkileri incelenmiştir. Tohumların sulu ve metanollü ekstresinin normal vücut sıcaklığında düşüş, hot-plate ve basınç testlerinde belirgin analjezik etki, genel davranış biçimlerinde değişiklik, SSS üzerine sedatif, antikonvülsan ve depresif etkinin yanında kas gevşetici olduğu belirtilmiştir.

2.3.1.2.11. Solunum Sistemi Üzerine Etkisi

Akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS)'nda TQ'nun etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışmada sıçanlara insan mide özsu (ph 1.2) verilerek ARDS oluşturulmuş ve TQ'nun insan gastrik özsuunun zararlı etkilerine karşı akciğer dokusunu koruduğu, bronkodilatasyon yapmaksızın oksijenasyonu iyileştirdiği kaydedilmiştir (232).

TQ'nun bronşiyal astım ile inflamasyon üzerine antienflamatuar ve immün stimülatör etkili olduğu bilinmekle beraber bu etkilerin altında yatan mekanizmalar ve faktörler bilinmemektedir. El Gazzar ve arkadaşları (233) tarafından yapılan bir çalışmada alerjik astımlı fare modelinde hava yolu inflamasyonu üzerinde TQ'nun etkisi incelenmiştir. Farelere intraperitoneal yoldan uygulanan TQ enjeksiyonunun hava yollarında eozinofil infiltrasyonu inhibe ederek alerjik hava yolu inflamasyonu azalttığını göstermektedir. Bu bilgiler ışığında akciğerlerde alerjik tepki sırasında TQ'nun potansiyel antienflamatuar rol oynadığı düşünülmektedir.

Bir diğerk çalışmada intraperitoneal verilen TQ'nun eozinofil infiltrasyonunu engelleyerek akciğerk eozinofillerinde artışa neden olmuş, havayolu inflamasyonunu inhibe etmiş ve antienflamatuar etki göstermiştir (234).

2.3.1.2.12. Üriner Sistem Üzerine Etkisi

İnsanlarda akciğerk, baş boyun, mide, mesane, testis ve over gibi birçok tümörlerin tedavisinde endike olan fakat başta kemik iliğı depresyonu-supresyonu, nefropati, hepatotoksisite ve nörotoksisite gibi önemli yan etkiler gösteren kemoterapötik ilaçlar sınıfında bulunan cisplatin'in yan etkilerini önlemek amacıyla fare ve sıçanlarda timokinonun etkileri araştırılmıştır. Cisplatinin tek doz enjeksiyonundan (sıçanlarda 5 mg/kg/iv ve farelerde 7-14 mg/kg/ip) 5 gün önce ve 5 gün sonra verilen TQ'nun (içme suyu içinde 50 mg/L) serum üre ve kreatin düzeylerinde belirgin azalmayla kombine olarak kreatin klirensi, böbrek ağırlığı ve poliüride belirgin iyileşme sağlandığı ve histolojik kesitlerin de bu iyileşmeyi doğruladığı saptanmıştır. Dolayısıyla TQ'nun cisplatin nefrotoksisitesini iyileştirmede ve terapötik indeksini desteklemede etkili olabildiğı yorumu yapılmıştır (235).

Erkek wistar albino ratlarda etilen glikolün neden olduğu böbrek taşları üzerine TQ'nun etkisi araştırılmış ve TQ'nun serum kalsiyum düzeyini anlamlı olarak arttırdığı, idrar oksalat düzeyini düşürdüğü böylece kalsiyum oksalat birikintilerinin daha az ve küçük olduğu belirlenerek düşük doz timokinonun böbrek taşlarının önlenmesi ve tedavisinde kullanılabileceğı ifade edilmiştir (236).

Sıçanlarda cıva klorür ile indüklenen proliferatif yanıt ile renal oksidatif hasarın TQ tarafından iyileştirilip iyileştirilemeyeceğı araştırılan çalışmada timokinonun antioksidan etkisinden dolayı inorganik cıva zehirlenmesinin neden olduğu akut böbrek yetmezliğinin önlenmesinde klinik değerli bir ajan olabileceğı kaydedilmiştir (237).

Sayed-Ahmed ve Nagi tarafından yapılan bir çalışmada gentamisinin indüklediğı nefrotoksisitede artmış kreatin, kan üre nitrojeni (BUN), tiobarbiturik asit reaktif maddeleri (TBARS) ve nitrat/nitrit düzeyleri TQ ile düşürülmüştür. Böbrek dokusunda azalmış olan glutatyon, glutatyon peroksidaz, katalaz ve ATP düzeyleri

ise TQ sayesinde artmıştır. Bu sonuçlar histopatolojik değerlendirmelerle de doğrulanmıştır (188).

Sıçanlarda arsenik tarafından indüklenen böbrek hasarına karşı TQ'nun anti-apoptotik ve antioksidan özellikleri aracılığıyla koruyucu rolünün araştırıldığı çalışma bulgularına göre TQ'nun oksidatif strese engel olabileceği, böbrekte arsenik kaynaklı toksisiteye karşı koruyucu bir rol oynadığı ve potansiyel olarak iyileştirici bir madde olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (238).

Çevresel ve endüstriyel kirletici olan ve oksidatif stresten sorumlu serbest radikalleri oluşturan kadmiyum, böbrekte çeşitli toksik hasarlara ve glomerular disfonksiyona yol açabilmektedir. Sıçan böbreklerinde Cd'nin indüklediği nefrotoksisitede TQ'nun böbrek hasarına, apoptoza ve oksidatif hasara karşı koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiş ve bu nefroprotektif etkisinin antioksidan ve anti-apoptotik özelliğinden kaynaklanmış olabileceği rapor edilmiştir (239).

2.3.1.2.13. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi

El-Tahir ve arkadaşlarının (240) ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada timokinonun doza bağımlı olarak kalp atışını azalttığı ve arteriyel kan basıncını düşürdüğü bulunmuştur.

Bir başka çalışmada TQ'nun arakidonik asit (AA) ile indüklenen trombosit kümeleşmesi ve kanın pıhtılaşması üzerine inhibe edici etkiler gösterdiği ve trombozisi iyileştirdiği bilinen aspirinden 30 kat daha güçlü olduğu bulunmuştur (241).

Siklofosfamid (CP) birçok kanser kemoterapisi ve immunsupresif protokollerde yaygın şekilde kullanılan farklı tiplerdeki tümörlere karşı antineoplastik aktiviteye sahip geniş spektrumlu bir ilaçtır. Nagi ve arkadaşlarının (8) CP kaynaklı kardiyotoksisiteye karşı TQ'nun etkilerini inceledikleri çalışmanın sonuçlarına göre TQ'nun CP kaynaklı kardiyotoksisiteyi azalttığı, kısmen de olsa mitokondriyal fonksiyon ile enerji üretiminde iyileşme yaptığı, antioksidan enzimlerin aktivitesini koruduğu ve oksidatif/nitrostatik stresi azaltma kabiliyeti olduğu öne saptanmıştır.

Siklosporin A, transplant cerrahisi ve otoimmün hastalıkların tedavisinde en sık kullanılan immunosuppressör ajandır. Fakat ilacın klinik kullanımını sınırlayan nefrotoksisite, hipertansiyon, hepatotoksisite ve kardiyotoksisite gibi büyük yan etkileri vardır. Uz ve arkadaşlarının 2008’de (7) yaptıkları çalışmada Siklosporin A’nın sebep olduğu kalp hasarına karşı NS yağı ile yapılan ön tedavinin kalpte lipid peroksidasyonunu azalttığı, hücrel protein oksidasyonunu ve antioksidan enzimleri iyileştirdiği, kardiyak histopatolojiyi normale döndürdüğü bulunmuştur.

Randhawa ve arkadaşlarının 2013’te (157) yaptıkları çalışmada izoproterenol tarafından oluşturulan miyokart hasarına karşı timokinonun antioksidan aktivitesi ve kalbi koruyucu etkisi ortaya konmuştur.

DXR, yumuşak doku sarkoması, mesane, meme, akciğer, mide, tiroit kanserleri olmak üzere birçok kanser tedavisinde kullanılan geniş spektrumlu antrasiklin grubu kemoterapötik bir ajandır. Fakat başta kardiyomiyopati, kalp krizi ve kardiyotoksisite olmak üzere çok ciddi yan etkiler meydana gelebilmekte ve bundan dolayı klinik kullanımını sınırlandırılmaktadır. Doksorubisinin (15 mg/kg/i.p) tek doz enjeksiyonundan 5 gün önce verilmeye başlanan ve deney boyunca içme suyu ile verilmeye devam edilen TQ (10 mg/kg/gün/oral)’nun potent süperoksit radikal süpürücüsü olduğu, lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve DXR kardiyotoksisitesine karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (11).

Al-Shabanah ve arkadaşları (10) tarafından farelerde yapılan benzer bir çalışmada DXR’ın antitümör aktivitesi ile kardiyotoksisitesi incelenmiştir. Tek doz DXR (20 mg/kg/ip) enjeksiyonundan 5 gün önce başlanan ve deney süresince içme suyuna karıştırılarak verilen TQ (8 mg/kg/oral)’nun, DXR’ın antitümör aktivitesini azaltmaksızın kardiyotoksisitesini iyileştirebilecek seçici sitoprotektif bir ajan olabileceği kaydedilmiştir.

DXR kaynaklı kardiyotoksisiteye karşı antioksidan etkinlikleri daha önce kanıtlanmış TQ ile endojen madde olan melatoninin koruyuculuklarını karşılaştırmak üzere bu çalışmayı planlamış bulunmaktayız.

2.3.1.2.14. İmmün Sistem Üzerine Etkisi

NS yağı ve TQ'nun etkileri incelenmiş ve her ikisinin yararlı immünomodülatör etkilerinin olduğu ve kazanılmış bağışıklık grubundan olan T hücreleri ile immün yanıtı aracılık eden killer hücrelerinin sayılarında artış yaptıkları belirtilmiştir. Yapılan in vitro çalışmalar NS yağ ekstresinin yılan ve akrep zehirlerinin hemolitik etkisini önlediğini, eritrositleri lipit peroksidasyonu, protein denatürasyonu, şekil değişikliği ve H₂O₂'nin neden olduğu osmotik frajiliteye karşı koruduğunu ve laringeal karsinoma hücrelerini lipopolisakarit veya kortizol tarafından indüklenen apoptozdan koruduğunu göstermiştir (86).

El-Mahmoudy ve arkadaşlarının (213) yaptığı çalışmada ise TQ'nun makrofajlardan salınan NO üretimini baskılayarak inflamasyonlu ve otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılabilir yararlı etkileri olabilen sitoprotektif bir ajan olduğu öne sürülmüştür.

El Gazzar ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda TQ'nun eozinofil infiltrasyonunu inhibe ettiği ve havayolu inflamasyonunu engelleyerek antiinflamatuvar etki gösterdiğini belirtmişlerdir (233, 234).

Yapılan bir başka çalışmada timokinonun böcek ilacı toksisitesinde oksidatif stresi azaltarak immün etkiyi güçlendirdiği ve iyileşmeyi desteklediği bildirilmiştir (242).

2.3.1.2.15. Hepatoprotektif Etkisi

Al-Gharably ve arkadaşlarının (185) tarafından farelerde yapılan çalışmada NS sulu suspansiyonunun CCL₄'ün neden olduğu toksikasyona karşı karaciğeri koruduğu gösterilmiştir.

Fareler üzerinde Mansour tarafından yapılan bir çalışmada içme suyuna karıştırılarak verilen TQ'nun (16 mg/kg), CCL₄ ve desferrioksamin tarafından indüklenen hepatotoksisiteye karşı serum ALT, AST, LDH ve hepatik MDA düzeylerini azaltmak ve serbest radikal üretimini inhibe etmek suretiyle antioksidan sitoprotektif etki gösterdiği rapor edilmiştir (198).

Tersiyer bütül hidroperoksit (TBHP) toksisitesine karşı ise timokinonun hücre içi GSH düzeyini koruyarak hepatoprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir (243).

Mansour ve arkadaşları (176) tarafından CCL₄'e bağlı hepatotoksisiteye karşı NS yağı bileşenleri olan timokinon, p-simen ve α -pimenin etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre CCL₄'e bağlı hepatotoksisiteye karşı p-simen ve α -pimenin etkili olmadığı, timokinonun ise 12,5 mg/kg/i.p. dozunun antioksidan olarak önemli rol oynayan protektif bir ajan olduğu bildirilmiştir. Fakat yüksek TQ dozunun karaciğer hasarına neden olan oksidatif stresi indüklediği ve ölümcül olabileceği bulunmuştur.

Etanolle oluşturulan hepatotoksisiteye karşı timokinonun antienflamatuar ve antioksidan özelliğiyle ilişkili olarak terapötik bir ajan olarak davrandığı öne sürülmüştür (187).

Farelere oral yoldan TQ verilmiş ve karaciğerde bulunan detoksifiye edici enzimler olan kinon redüktaz ve glutatyon transferazın aktiviteleri incelenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre TQ'nun her iki enzimin aktivitesini arttırdığı ve kimyasal karsinogenez ile toksisitesine karşı umut verici profilaktik bir ajan olduğu belirtilmiştir (207).

Nagi ve arkadaşları (244) tarafından farelerde asetaminofen kaynaklı hepatotoksisiteye karşı TQ'nun etkileri incelenmiş ve TQ'nun artmış oksidatif ve nitrosatif strese karşı direnci artırmanın yanı sıra mitokondrial enerji üretimini iyileştirdiği böylelikle asetaminofen kaynaklı karaciğer hasarına karşı fareleri korumada etkili olduğu gösterilmiştir.

Hüresel homeostazda değişiklik yaparak oksidatif hasara sebebiyet veren kadmiyum (Cd) hepatotoksitesini üzerine etkileri araştırılan TQ'nun antioksidan savunma sistemi üzerinde düzenleyici etkiye sahip olduğu ve kadmiyum hepatotoksitesini önlediği belirtilmiştir (245).

Aycan ve arkadaşları (246) tarafından sıçanlarda asetaminofenin neden olduğu hepatotoksisite modelinde karaciğer toksisitesine karşı TQ tedavisinin antioksidan sistemi upregüle ederek önemli tedavi edici etkiye sahip olabildiği saptanmıştır.

Kurşuna bağlı karaciğer hasarına karşı TQ'nun potansiyel koruyucu etkisi araştırılmıştır. Kurşun uygulanmasından sonra total antioksidan düzeyde azalma ve

karaciğer lipit peroksidasyonunda artış meydana gelmiştir. TQ takviyesinin karaciğer metal birikiminde anlamlı derecede azalma yapmaksızın kurşun kaynaklı toksisitenin olumsuz etkilerini düzelttiği ve klinik açıdan yararlı olabileceği rapor edilmiştir (247).

2.3.1.2.16. Kemikler üzerine Etkisi

Wistar ratlar üzerinde yapılan kollojen kaynaklı artrit (CIA) modelinde TQ'nun etkinliği araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar TQ'nun romatoid artrit (RA) patogenezinde etkili olduğu bilinen faktörleri ortadan kaldırdığı böylece inflamatuvar hastalıkların tedavisinde potansiyel değere sahip olabileceği bildirilmiştir (248). Budancamanak ve arkadaşlarının 2006 yılında (193) yaptıkları benzer çalışma sonuçları da TQ'nun CIA tedavisinde güvenilir ve etkili ajan olarak kullanılabilmesi ve romatizmal artrit tedavisinde yararlı olabileceği görüşünü desteklemektedir.

Kirui ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (192) femoral bozukluğu olan hayvan modellerinde timokinonun kemik iyileşmesinde rolü araştırılmıştır. Bulgular sonucu yaşamsal ve reproduktif organlarda yan etki göstermeksizin iyileşme süresinin kısaldığı, anatomik şekillenmenin daha düzgün olduğu vurgulanmıştır.

Patofizyolojik RA'nın sinyal yolları üzerinde TQ'nun in vitro ve in vivo etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmada TQ'nun RA patogenezinde ilgili olduğu bilinen bir dizi faktörü ortadan kaldırdığı, RA ve kemik erimesini azalttığı gösterilmiştir. Bundan dolayı eklem hastalıklarının önlenmesinde klinik açıdan değerli bir madde olduğu görüşü savunulmuştur (249).

MC3T3-E1 osteoblast hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve mineralizasyonu üzerine TQ'nun anabolik etkili olduğu ve osteogenezde yararlı etkilerinin olduğu belirlenmiştir (25).

NS ve TQ'nun antiosteoporotik etkileri incelenmiş ve interlökin-1, interlökin-6, transkripsiyon faktörü ve nükleer faktör κ B gibi inflamatuvar sitokinleri inhibe ettikleri gösterilmiş; NS ve TQ'nun çocuklar ile hamile kadınlarda önlem amaçlı gıda takviyesi olarak güvenli olduğu tespit edilmiştir (251).

Kara ve arkadaşları tarafından (252) yapılan histomorfometrik analizlerde TQ'nun sistemik kullanımının hızlı maxiller genişlemeyi ve kemik oluşumunu sağlamada etkili ve yararlı olabileceği belirtilmiştir.

Artritlik sıçanlarda vücut ağırlığı, kliniksel inflamasyon skoru, toplam ve farklı lökosit sayısı üzerine TQ'nun antiinflamatuvar etkili olduğu ve romatoid artritte etkili bir ilaç olarak araştırılabileceği ifade edilmiştir (253).

2.3.1.2.17. Timokinon Toksisitesi

Badary ve arkadaşları (171) tarafından TQ'nun akut ve subkronik oral uygulamalarda erkek Swiss albino fareler üzerinde hücre koruyucu özellikleri çalışılmıştır. Akut oral uygulamadan sonra letal doz 50 (LD₅₀) 2,4 g/kg olarak belirlenmiştir. Yüksek doz toksisite belirtileri hipoaktivite ve solunum sıkıntısı olmuştur. TQ (2 ve 3 gr/kg) uygulamasında yirmi dört saat sonra karaciğer, böbrek ve kalp dokularında GSH düzeyinde anlamlı derecede azalmanın yanında plazma üre ve kreatinin konsantrasyonları, alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH) ve kreatin fosfokinaz (CPK) enzim aktivitelerinde anlamlı derecede artış meydana gelmiştir. TQ farelere içme suyu ile subkronik olarak %0.01, %0.02 ve %0.03 konsantrasyonlarda 90 gün verildiğinde ise herhangi bir toksisite belirtisi veya mortalite görülmemiştir. TQ'nun ortalama günlük alım miktarı yaklaşık 30, 60 ya da 90 mg/kg/gün olmuştur. Vücut ve organ ağırlıklarında, besin ve su alımı ile idrar ve feçes çıkışında toksikolojik önemi olan herhangi bir değişiklik olmamıştır. Doku GSH, plazma, üre, kreatinin ve trigliserid ile ALT, LDH ve CPK enzim aktiviteleri de etkilenmemiştir. Histolojik incelemede gözle görünür ya da mikroskopik herhangi bir doku hasarı gözlemlenmemiştir. Fakat TQ açlık plazma glukozunda önemli bir azalmaya sebebiyet vermiştir. Sonuçlar farelerde TQ'nun akut oral toksisitesinin düşük olduğunu, subkronik olarak verildiğinde ise iyi tolere edileceğini göstermiştir.

Bamosa ve arkadaşları (216) tarafından yapılan çalışmada 8 mg/kg/ip TQ dozunun toksik olduğu bildirilmiştir. Mansour ve arkadaşlarının (176) çalışmasında

yüksek doz verilen timokinonun letal olabileceği ve LD₅₀ değerinin 90.3 mg/kg olduğu ifade edilmiştir.

LD₅₀ değerinin saptanması amacıyla yapılan bir başka çalışmada farelere ve ratlara oral ve intraperitoneal yoldan TQ verilmiştir. Belirlenen LD₅₀ değerinin anti-inflamatuar, anti-oksidan ve anti-kanser etkileri için kullanılan i.p dozlarında 10-15 kez, oral dozlarında 100-150 kez daha fazla olduğu bulunarak deney hayvanlarında özellikle oral yoldan alındığında güvenle kullanılabilir bir bileşik olduğu yorumu yapılmıştır (254).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Kurgusu

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu tez çalışması, Celal Bayar Üniversitesi (CBÜ) Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığınca 09/06/2015 tarihli ve 77.637.435-51 sayılı karar ile onaylanmıştır. Çalışmada kullanılan deney hayvanları, kimyasallar ve gerekli araç gereçler İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2015- ÖNP-TIPF-0016 nolu proje ile desteklenmiştir.

Çalışmada aynı jenerasyonda 8 haftalık, 230-350 gr ağırlıkları arasında değişen Wistar-Albino cinsi 32 adet erkek rat kullanıldı. Kullanılan hayvanlar CBÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilerek çalışma süresince aynı laboratuvar koşullarında tutuldu. Hayvanların bakımları, beslenmesi ve barındırılması aynı merkezde uyum sorunu yaşanmadan yapıldı.

3.1.2. Laboratuvar Koşulları

Denekler, deney süresince ortalama $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ oda ısısında ve 12 saatlik karanlık/aydınlık döngüsünün sağlandığı $\%40 \pm 20$ oranında nemlendirilen laboratuvar ortamında tutuldular. Sıçanlara içme suyu olarak çeşme suyu verildi ve tüm denekler standart yem ile beslendi. Sıçanların barındırılmasında standart Tip 3 kafesleri kullanıldı. Timokinon grubu hayvanlar ayrı ayrı kafeslere yerleştirilirken, diğer grup hayvanlar her kafese maksimum 3 hayvan olacak şekilde gruplandırılarak günlük takipleri yapıldı.

3.1.3. Deneklere Uygulanan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan Doksorubisin hidroklorid, Melatonin, Timokinon ve Sodyum pentobarbital Sigma-Aldrich firmasından, % 0,9'luk NaCl çözeltisi eczaneden temin edilmiştir.

3.1.4 Çalışma Planı

Bu tez çalışması bir kontrol ve üç deneme grubundan oluşturuldu. Deney hayvanları her grupta 8'er (n=8) hayvan olacak şekilde "Kontrol", "Doksohubisin", "Doksohubisin+Melatonin" ve "Doksohubisin+Timokinon" olarak belirlendi. Grupların homojen olmasına ve gruptaki hayvanların ağırlıklarının birbirine yakın olmasına dikkat edildi. Deney süreci her hayvan için bir hafta olarak belirlendi. Deney sırasında hayvanların bir kısmı öldüğü için çalışmadan çıkarılmıştır. Deney grupları ve uygulanan kimyasallar Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Deneklerde kullanılan kimyasal maddeler ve uygulanan günler

Gruplar	Uygulama yöntemleri	n	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün	7.gün
Kontrol	(i.v)	n=7	-	-	-	-	SF	-	-
DXR	(i.v)	n=6	-	-	-	-	DXR	-	-
DXR+MEL	(i.p)	n=7	MEL	MEL	MEL	MEL	MEL+DXR	MEL	MEL
DXR+TQ	(oral)	n=6	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ+DXR	TQ	TQ

Kontrol grubu (n=7): Bu gruptaki deney hayvanlarına herhangi bir kimyasal verilmeyip, sadece deneyin 5.gününde tek doz %0,9'luk NaCl (serum fizyolojik- SF) kuyruk veninden intravenöz (i.v) uygulandı.

Doksorubisin grubu (n=6): Bu gruptaki deney hayvanlarına deneyin 5. gününde 45 mg/kg/gün tek doz doksorubisin kuyruk veninden i.v uygulandı.

Doksorubisin+Melatonin grubu (n=7): Bu gruptaki deney hayvanlarına 7 gün boyunca 10 mg/kg/gün melatonin intraperitoneal (i.p) yoldan uygulandı. Melatonin enjeksiyonu akşamüstü saat 17: 00 dolaylarında yapıldı. Deneyin 5. gününde 45 mg/kg/gün, tek doz doksorubisin kuyruk veninden enjekte edildi. Doz ve uygulama süresi bakımından Öz ve arkadaşları referans alınmıştır (125).

Doksorubisin+Timokinon grubu (n=6): Bu gruptaki deney hayvanlarına etanol içerisinde çözdürülmüş ve phosphate buffered saline (PBS) ile tamponlanmış timokinon çözeltisi 50 mg/kg/gün pelet yeme karıştırılarak 7 gün boyunca oral (p.o) yoldan verildi. Deneyin 5. gününde 45 mg/kg/gün, tek doz doksorubisin kuyruk veninden uygulandı.

Uygulanacak ilaç dozlarının belirlenebilmesi için deney protokolünün başından itibaren deneklerin vücut ağırlıkları her gün tartıldı.

3.2. Analiz Yöntemleri

3.2.1. Anestezi ve Numunelerin Toplanması

Deney protokolünün son gününde (8. gün) hayvanlarının ağırlıklarına göre anestetik madde olan Nembutal (Sodyum pentobarbital) 50-60 mg/kg/ip uygulandı. Denekler anestezi olunca hipoterminin önlenmesi amacıyla alttan ısıtmalı tabla üzerine yatırılarak akapunktur iğnelerinden yapılmış özel EKG elektrodları deri altına yerleştirildi ve EKG kayıtları alındı. Deneklerin vücut sıcaklıkları deney süresince sabit tutuldu. Kayıt yapıldıktan sonra ratlar derin anestezi altındayken ayak

parmakları iyice sıkıştırılarak ağrı duyusunun (pedal ağrı refleksi) tam kaybolup kaybolmadığı kontrol edildi. Hayvanlardan yanıt gelmeyince anestezi derinliğine karar verildi ve diseksiyon masasına yatırılarak işlemlere başlandı. Vertikal abdominal insizyon ile karın ön duvarı açılarak sağ sternotomi ile toraks açıldı ve kalp dokusu çıkarıldı. Alınan kalp dokusu serum fizyolojik ile yıkanarak sağ ventrikül ve sol ventrikülün bir kısmı histolojik çalışmalar için %10 luk nötral formalin içinde fiske edildi. Sol ventrikülün kalan kısmı tartılarak 1'e 9 oranında fosfat tamponlu çözelti ile sulandırıldıktan sonra mekanik parçalayıcı ve sonikatör kullanılarak homojenize edildi. Dokular ileri parçalama işlemi için +4 C de 15000 g'de santrifüj edildi. Elde edilen çözeltinin süpernatant kısmı alınarak porsiyonlara ayrıldı ve analizin yapılacağı güne kadar -80 °C'de saklandı.

Alınan sağ ve sol ventrikül dokusundaki histolojik değişiklikler hematoksilin-eosin (H&E) ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Biyokimyasal parametrelerden total oksidan ve antioksidan seviyeleri (TOS, TAS), glutatyon, SOD ve aspartat aminotransferaz (AST) doku proteini hemolizat hemoglobin düzeyleri otoanalizörde spektrofotometrik yöntemle; MDA ve katalaz manuel olarak spektrofotometrik yöntemle çalışıldı. NO, hipoksiyle indüklenmiş faktör (HIF-1 α), kreatin kinaz miyokardiyal bant (CK-MB), tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), interlökin-1 (IL-1), interlökin- 6 (IL-6) ve interlökin-18 (IL-18) düzeyleri ELİSA testi ile ölçüldü.

3.2.2. Sayısal EKG Kayıtlarının Elde Edilmesi

Deneklerde EKG çekimi, DII derivasyonu olarak kaydedildi. Kayıt öncesinde hayvanlar anestezi edildi ve anestezinin etkisi altında iken cilt altına iğne elektrotlar yerleştirildi. Kayıt sırasında hipotermi önlenmesi amacıyla sıçanlar alttan ısıtmalı tabla üzerine yatırıldı ve vücut (rektal) sıcaklıkları deney boyunca $35,5 \pm 0,50$ °C civarında tutuldu.

Kayıtların bilgisayar ortamında sayısal olarak elde edilebilmesi için “PowerLab/SP8” biyoelektrik kayıt cihazı ve bu cihazla uyumlu Lab Chart 7 bilgisayar programı kullanıldı (ADInstruments, Australia). EKG kaydedilirken, elektrokardiyografin örneklem hızı 4000 örnekleme/sn olarak ayarlanarak her bir denek için yaklaşık 5'er dakikalık kayıtlar alındı.

Kayıtları takiben yapılan değerlendirmede aşağıdaki parametreler ölçüldü: a) QRS kompleksleri süresi: Q dalgasının başlangıcından S dalgasının izoelektrik hatta döndüğü yere kadar geçen süre, b) QT intervalı (süresi): QRS kompleksinin başlangıcı yani Q dalgasının başlangıç noktası, QT intervalinin başlangıcı olarak kabul edildi ve T dalgasının sonuna kadar olan mesafe olarak belirlendi, c) RR intervalı: Bir birini takip eden iki R dalgasının tepe noktaları arasındaki mesafe, d) PR intervalı (süresi): P dalgasının başlangıcından Q dalgasının başlangıcına kadar olan süre ölçüldü. QTc (Düzeltilmiş QT) intervali hesaplanırken Bazett'in formülü kullanılmıştır (Bazett Formülü: $QTc = QT / \sqrt{RR}$). EKG kayıtları incelenirken yaklaşık olarak 3.dakika içindeki kayıtlardan yapılan ölçümler değerlendirmeye alınmıştır; birbirini takip eden atımlardan 3-5 tanesinde yapılan ölçüm sonucu bulunan değerlerin ortalaması alınarak istatistiksel kıyaslamada kullanılmıştır.



Şekil 9: Kayıtlarda elde edilen tipik bir sıçan EKG kaydı, DII derivasyonu

3.2.3. Doku Takibi ve Dokuların Parafine Gömülmesi

Dokuların takip, kesit alma ve boyama işlemlerinin tümü İKÇ Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Deney hayvanlarından elde edilen kalp dokusu, sağ ve sol ventriküllere ayrıldı, tüm dokular %10'luk nötral formalin içerisinde 3-4 gün süreyle tespit edildi. Doku örneklerini içeren kasetler bütün bir gece akarsu altında yıkandı ve nemliliği

korunarak tespit solüsyonundan arındırılmaları sağlandı. Ertesi sabah, doku takip kasetleri giderek artan alkol konsantrasyonlarında (%60'lık,70'lik, 80'lik ve 90'lık etil alkollerde 30'ar dakika, %96'lık ve 100'lük alkolde ise 60'ar dakika) LEICA TP 1020 marka doku takip cihazında tutularak dehidratasyon işlemi gerçekleştirildi. Dehidratasyon işleminden sonra 1:1 oranında alkol: ksilen karışımında önce 30 dakika, daha sonra ksilende 2'şer kez 60'ar dakika tutularak dokunun şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. İnfiltrasyon işlemi, doku örnekleri 60 °C etüvde 1:1 oranında ksilen: parafin karışımında 30 dakika, parafinde 2 değişim 60'şar dakika tutularak gerçekleştirildi. Doku takip kasetleri; TP 1020 marka cihazdan çıkarıldı.

Doku gömülen basemoldlara eritilmiş parafin döküldü ve pens yardımıyla kesit yüzeyi alta gelecek şekilde dokular sırasıyla yerleştirildi. Basemoldun üzeri eritilmiş parafin ile tekrar dolduruldu ve kaset üzerine dokunun kimlik bilgileri kurşun kalemle kaydedildi. Bütün dokuların bloklama işlemi gerçekleştirildikten sonra LEICA EG 1150 marka doku gömme cihazının soğutucu kısmına konarak dokuların donması sağlandı. Yeterli sertliğe ulaşan bloklar, blok kabından çıkarılarak buzdolabında +4 °C'de saklandı.

3.2.4. Parafin Bloklardan Kesit Alma

Parafin bloklar sertleşmesi için bir gün önceden +4 °C buzdolabında tutuldu. Ertesi sabah buzdolabından çıkarılarak oda ısısında tutulan parafin bloğun kenarı bıçağa paralel ve kesit alınacak yüz bıçağa bakacak şekilde blok tutucuya yerleştirildi. Bloktaki parafin fazlası, LEICA RM 2245 marka rotatuar mikrotomda, doku örneği gelene kadar 10 µm kalınlığında trimlenerek uzaklaştırıldı. Doku örneği açığa çıktığında doku örnekleri 5 µm'lik ince kesitler alındı. Daha sonra suluboya fırçası yardımıyla benmari içindeki 40 °C'lik sıcak suya alınarak kırışıklıkların açılması sağlandı. Dokuların aktarılacağı lamlar üzerine doku kimlik bilgileri yazıldı ve lamlar 45°'lik açı ile su banyosuna daldırılarak açılan kesitler lam üzerine alındı. Daha sonra lamlar dik konumlandırılarak kurumaya bırakıldı. Lamlar üzerine yeterli

doku örneği alındıktan sonra kesit alınan parafin bloğun kesit yüzeyi sıcak parafin ile kapatıldı. Lamlara alınan kesitler bir gece 37 °C'lik etüvde tutularak parafinden arındırılmaları ve lama yapışmaları sağlandı.

3.2.5. Kesitlerin Boyanması

Deneklerden alınan doku kesitlerindeki yapısal farklılıkları gözlemlemek amacıyla Hematoksilen&Eosin boyaması yapıldı.

Hematoksilen- Eosin Boyaması

Kesit alma işlemi tamamlandıktan sonra deparafinizasyon işlemi için parafin bloktan lama alınmış 5 µm'lik örnek kesitler etüvde bir gece bekletildi. Etüvden alınan kesitler kimyasal deparafinizasyon işlemi için 30'ar dakika 2 değişim ksilende tutuldu. Kimyasal deparafinizasyondan sonra rehidratasyon işlemi için azalan alkol konsantrasyonlarında (%95'lik, 80'lik, 70'lik ve 60'luk etil alkol serilerinde) 2'şer dakika tutuldu. Rehidratasyon sonra 5 dakikalık akarsu yıkamaları gerçekleştirildi. Akarsudan sonra 6 dakika Hematoksilen boya (Merck) ile muamele edildi ve 5 dakikalık akarsuya bırakıldı. Bu işlemi takiben diferansiyasyon işlemi için asit alkol solüsyonuna 1-3 saniye batırılıp çıkarıldı ve yeniden 5 dakikalık akarsu yıkaması gerçekleştirildi. Daha sonra 5 dakika eosin boya (Merck) solüsyonunda tutuldu ve 3 dakikalık akarsu yıkaması gerçekleştirildi. Kesitler 1'er dakikalık sırasıyla %80 ve 95'lik alkol içinde tutulduktan sonra 1 saat ksilende bekletildi. Bu işlemler tamamlandıktan sonra kesitler üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı ve penset yardımıyla hava kabarcıkları çıkarıldı. İşlemler son bulduğunda hücrelerin çekirdekleri mavi-mor renk alırken stoplazma ve diğer doku kısımları pembe görüntü alarak ışık mikroskobu düzeyinde incelenecek duruma geldi. Boyanan preparatlar Olympus B×43 tipi kamera ataçmanlı ışık mikroskobunda (Olympus SC100) incelendi ve dijital fotoğraf makinesi ile kesitlerin fotoğrafları çekildi.

Doku örnekleri histopatolojik olarak; kas liflerinin disorganizasyonu, interstisyel ödem, interstisyel hemoraji, nükleer dejenerasyon, perinükleer vakuolizasyon, inflamatuvar hücre varlığı ve fibrozis bakımından değerlendirildi ve histopatolojik değişiklikler skorlandı. Her histopatolojik değişiklik 1 puan olarak değerlendirilirken; değişiklik olmayanlar 0 kabul edildi. Histopatolojik hasar derecesi ise parametrelerin toplam puanına göre değerlendirildi (0-2 puan: Hasar yok; 3-4 puan: Hafif derecede hasar var; 5-7 puan: Hasar var) (148).

3.2.6. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi

Tümör Necrosis Faktör Alfa Tayini

TNF- α antikoruna ile kaplı kuyucuklara kalp dokusu homojenatı pipetlendi ve 37 °C'de 90 dk inkübe edildi. Her kuyucuğa biotin işaretli antikor eklendi ve 37 °C'de 60 dk inkübe edildi daha sonra 3 kez 350 mikrolitre yıkama solüsyonuyla yıkama yapıldı. Avidin biotin peroksidaz kompleks eklenerek bir 30 dk 37 °C'de inkübe edildikten sonra 5 kez 350 mikrolitre yıkama solüsyonuyla yıkama yapıldı. Kromojen eklendi ve karanlıkta 37 °C'de 30 dk inkübe edildi. Süre sonunda H₂SO₄ kullanılarak reaksiyon sonlandırıldı. Elisa plate okuyucuda 450 nm'de absorbanslar okunup standart absorbans eğrisine göre konsantrasyon hesaplandı. ELİSA yöntemi için Biotek ELx808, USA marka yarı otomatik elisa cihazında rat IL-1 elisa kiti (YH-Biosearch, Shanghai, China, Referans No: YHB20151231775; Lot No: 20151231) kullanıldı.

Kreatin Kinaz Miyokardiyal Band Tayini

CK-MB antikoruna ile kaplı kuyucuklara kalp dokusu homojenatı pipetlendi. Her kuyucuğa biotin işaretli antikor ve streptavidin işaretli HRP enzimi eklenerek bir saat 37 °C'de inkübe edildikten sonra 5 kez 350 mikrolitre yıkama solüsyonuyla yıkama yapıldı. HRP enzimi için substrat eklendikten sonra 37 °C karanlıkta

inkübasyon sonrası H₂SO₄ kullanılarak reaksiyon sonlandırıldı. Elisa plate okuyucuda 450 nm'de absorbanslar okunup standart absorbans eğrisine göre konsantrasyon hesaplandı. ELİSA yöntemi için Biotek ELx808, USA marka yarı otomatik elisa cihazında rat CK-MB izoenzim elisa kiti (Shangai LZ Biotech Co, China, Referans No: YHB20151231776; Lot No: 20151231) kullanıldı.

İnterlökinlerin Tayini

IL-1, IL-18 ve IL-6 antikorları ile kaplı kuyucuklara kalp dokusu homojenatı pipetlendi. Her kuyucuğa biotin işaretli antikor ve streptavidin işaretli HRP enzimi eklenerek bir saat 37 °C'de inkübe edildikten sonra 5 kez 350 mikrolitre yıkama solüsyonuyla yıkama yapıldı. HRP enzimi için substrat eklendikten sonra 37 °C karanlıkta inkübasyon sonrası H₂SO₄ kullanılarak reaksiyon sonlandırıldı. Elisa plate okuyucuda 450 nm'de absorbanslar okunup standart absorbans eğrisine göre konsantrasyon hesaplandı. ELİSA yöntemi için Biotek ELx808, USA marka yarı otomatik elisa cihazında rat IL-1, IL-18 ve IL-6 elisa kitleri (YH-Biosearch, Shangai, China, Referans No: YHB20151231775; Lot No: 2015123; Biassay Technology Laboratory, Katalog No: E0117Ra; Lot No: 20151222; Biassay Technology Laboratory, Katalog No: E0135Ra; Lot No: 20151222) kullanıldı.

Nitrik Oksit Tayini

NO antikoruna ile kaplı kuyucuklara kalp dokusu homojenatı pipetlendi. Her kuyucuğa biotin işaretli antikor ve streptavidin işaretli HRP enzimi eklenerek bir saat 37 °C'de inkübe edildikten sonra 5 kez 350 mikrolitre yıkama solüsyonuyla yıkama yapıldı. HRP enzimi için substrat eklendikten sonra 37 °C karanlıkta inkübasyon sonrası H₂SO₄ kullanılarak reaksiyon sonlandırıldı. Elisa plate okuyucuda 450 nm'de absorbanslar okunup standart absorbans eğrisine göre konsantrasyon hesaplandı. ELİSA yöntemi için Biotek ELx808, USA marka yarı otomatik elisa cihazında rat NO elisa kiti (Yehua Biological Technology, Shanghai, China, Referans No: YHB20160612356; Lot No: 20160612) kullanıldı.

Hipoksi İle İndüklenen Faktör 1 α Tayini

HIF-1 α antikoruna ile kaplı kuyucuklara kalp dokusu homojenatı pipetlendi. Her kuyucuğa biotin işaretli antikor ve streptavidin işaretli HRP enzimi eklenerek bir saat 37 °C’de inkübe edildikten sonra 5 kez 350 mikrolitre yıkama solüsyonuyla yıkama yapıldı. HRP enzimi için substrat eklendikten sonra 37 °C karanlıkta inkübasyon sonrası H₂SO₄ kullanılarak reaksiyon sonlandırıldı. Elisa plate okuyucuda 450 nm’de absorbanslar okunup standart absorbans eğrisine göre konsantrasyon hesaplandı. ELİSA yöntemi için Biotek ELx808, USA marka yarı otomatik elisa cihazında rat HIF- 1 α elisa kiti (YH-Biosearch, Shanghai, China, Referans No: YHB20151231777; Lot No: 20151231) kullanıldı.

Total Antioksidan Seviye Tayini

Doku örneklerinde total antioksidan seviyesinin belirlenmesi, Architect C16000 (Abbott Diagnostic, USA) marka klinik kimya otoanalizörü kullanılarak kit (Rel Assay Diagnostics, Referans No: RL0017; Lot No: DR15056A) aracılığıyla ölçüldü. Ölçüm, numunelerdeki antioksidanların koyu mavi-yeşil renkli 2,2’-azino bis (3-etil benzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS) radikalini renksiz indirgenmiş ABTS formuna indirgemesi esasına dayanır. 660 nm’deki absorbans değişimi numunedeki total antioksidan düzeyle ilişkilidir. Ölçümde, kalp doku homojenatından elde edilen süpernatant kullanıldı.

Tablo 2: TAS ölçüm prosedürü

	Numune	Standart	Kör
Ölçüm tamponu	200 μ L	200 μ L	200 μ L
Numune	12 μ L		
Standart1 (1mmol /L)		12 μ L	
Standart2 (Deiyonize su)			12 μ L
İlk absorbans değeri için 660 nm’de başlangıç absorbanslar okundu ve değerler kaydedildi. Daha sonra işlemlere devam edildi.			
Renkli ABTS radikal çözeltisi	30 μ L	30 μ L	30 μ L

Karıştırma işlemi yapıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İkinci absorbanslar 660 nm’de okundu. Yukarıda belirtilen işlemler yapıldıktan sonra TAS sonuçları “mmol/g protein” olarak belirtildi.

Total Oksidan Seviye Tayini

Total Oksidan Seviye ölçümü Architect C16000 (Abbott Diagnostic, USA) marka klinik kimya otoanalizöründe doku örnekleri kullanılarak kit (Rel Assay Diagnostics, Ref No: RL0024; Lot No: NR130440) yardımıyla tayin edildi. Numunede bulunan oksidanlar, ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyonla yükseltir. Meydana gelen ferrik iyonu pH’sı düşük ortamda kromojenle renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak belirlenen renk yoğunluğu, numunede bulunan oksidan moleküllerin total miktarıyla ilişkilidir. Ölçümümüzde kalp doku homojenatından elde edilen süpernatant numunesi, standart olarak hidrojen peroksit çözeltisi kullanılmıştır. Kitin ölçüm prosedüründe belirtilen hazırlık ve dilüsyonlar yapıldıktan sonra Tablo 3’de verilen pipetleme ve işlemler gerçekleştirildi.

Tablo 3: TOS ölçümü

	Numune	Standart	Kör
Ölçüm tamponu	250 µL	250 µL	250 µL
Numune	37.5 µL		
Standart1 (Deiyonize H ₂ O)			37.5 µL
Dilüe standart2 (20 µM H ₂ O ₂)		37.5 µL	
İlk absorbans için 530 nm’de başlangıç absorbanslar okunarak kaydedildi. Akabinde aşağıdaki işlemler uygulandı.			
Prokromojen çözeltisi	12.5 µL	12.5 µL	12.5 µL

Karıştırılma işlemi uygulandıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İkinci absorbanslar 530 nm’de okundu. Tablo 3’de belirtilen işlemler uygulandıktan sonra TOS sonuçları “µmol /g protein” olarak bildirildi.

Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayini

Doku örneklerinde SOD aktivitesi, Randox Ransod marka SOD (Lot No: 358385; Ref No: SD125) kiti kullanılarak saptandı. Numuneler Ransod SOD kitinin Abbott Architect C16000 (Abbott Diagnostic, USA) marka klinik kimya otoanalizöründe çalışıldı.

Bu yöntemde süperoksit üretmek için ksantin ve ksantin oksidaz kullanılır. Tepkime sonucu meydana gelen süperoksit 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyumklorid 41 (INT) ile tepkimeye girer ve kırmızı formazon renk oluşumuna neden olur. Numunelerdeki SOD aktivitesi reaksiyonun inhibisyonuna göre belirlenir. INT seviyesinin düşmesini %50 oranında inhibe eden SOD ünite olarak ifade edilir ve 505 nm’de absorbans okuması yapılır. SOD aktivitesi doku için “U/mg protein” olarak hesaplandı.

Glutasyon Peroksidaz Aktivite Tayini

Dokuda GPx analizi için Randox Ransel marka GPx (Lot No: 360781; Ref No: RS505) kiti kullanılarak tayin edildi. Glutasyon peroksidaz aktivitesi, Paglia ve Valentine metoduna dayalı olarak saptanır. Glutasyon peroksidaz, kümen hidroperoksit ile glutasyonun oksidasyonu katalize eder. Kümen hidroperoksidin indirgenmesiyle oluşan okside glutasyon (glutasyonun yükseltgenmiş formu) (GSSG), glutasyon redüktaz (GR) ve NADPH varlığında NADPH’ın NADP⁺’ye yükseltgenmesiyle indirgenir. Enzim aktivitesi, spektrofotometrik olarak 340 nm’de absorbanstaki değişim izlenerek saptanır.

GPx standart eğrisi kullanılarak absorbansa karşılık gelen konsantrasyonlara göre Ransod GPx kiti kullanılarak Abbott Architect C16000 (Abbott Diagnostic, USA) marka otoanalizör üzerinden sonuçlar hesaplandı. GPx aktivitesi “U/mg protein” olarak hesaplandı.

Katalaz Tayini

Katalaz tayini, kinetik ölçüme dayalı Aebi metoduna dayanır. Bu enzim, hidrojen peroksidin su ve moleküler oksijen vermek üzere bozunmasını katalizler. Bu çalışmada katalaz aktivitesi, hidrojen peroksit konsantrasyonunda birim zamandaki azalmanın 240 nm'de spektrofotometrik olarak izlenmesiyle tayin edildi.

Dokuda katalaz aktivitesinin tayini için daha önceden hazırlanan homojenizatlar, 50mM fosfat tamponu (pH=7,0) ile 1: 5 oranında seyreltildi. 2,00 mL homojenizat üzerine 1,00 mL hidrojen peroksit çözeltisi (30mM) ilave edilip 15'er saniye aralıklarla 240 nm'deki absorbans değişimleri kaydedildi. Benzer işlemler kör denemeyele tekrarlandı ve aktivite hesabı, başlangıç ile 30. saniye absorbansları dikkate alınarak hemolizat için kullanılan formüle göre hesaplandı. Elde edilen değerler seyrelme faktörü ile çarpılıp protein miktarına bölünmesiyle "k/g protein" cinsinden aktivite birimi ifade edildi.

Aspartat Aminotransferans Tayini

Sıçanların AST düzeyleri Architect C16000 (Abbott Diagnostic, USA) marka klinik kimya otoanalizörü kullanılarak ölçüldü (Lot No: 91778UN15; Ref No: 7D81-21). Aspartat aminotransferaz enzimi; L-Aspartik asidin amin grubunu α -ketoglutarik aside taşıyarak glutamik asit ve oksalasetik asit oluşumunu katalizler. Ortamda yeterli miktarda α -ketoglutarat ve L-Aspartat varlığında AST, okzaloasetat ve L-Glutamat oluşumuna neden olur. Meydana gelen okzaloasetat NADH varlığında malat dehidrogenaz enzimi ile L-Malat'a indirgenir ve NAD açığa çıkar.

Bu kit NAD'ın 340 nm'deki azalan absorbansı ile AST değerini hesaplamaktadır. AST kiti yardımıyla dakikadaki absorbans değişiminden AST aktivitesi enzimatik yöntemle otoanalizör tarafından hesaplandı.

Malondialdehid Tayini

Lipid peroksidasyon son ürünlerinden olan malondialdehid, Draper ve Hadley yöntemine dayanan, tiyobarbitürik asit metodu kullanılarak saptandı. MDA, lipid peroksidasyonun güvenilir bir göstergesidir. Bu ürün, biyolojik materyallerde farklı

kovalent bağılı formlarda ve serbest halde bulunur. Asit veya bazla sıcakta muameleyle kovalent yapıdan ayrılması sağlanır. Polidoymamış yağ asidi (PUFA) peroksidasyonunun son ürünü olan MDA tayini, TBA ile reaksiyona girerek oluşturduğu renkli kompleksin spektrofotometrik olarak izlenmesine dayanır.

0,5 mL numune üzerine 2,5 mL %10'luk TCA eklenerek tüpler vortekste karıştırıldı. 15 dakika süreyle kaynar suda bekletilip hemen soğutma işlemi gerçekleştirildi. 5000 devir/dakika da 10 dakika santrifüjleme işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında her bir süpernatandan 2'şer Ml başka bir tüpe aktarıldı. Üzerine 1 mL %0,67'lik TBA eklenip vortekste karıştırma işlemi gerçekleştirildi.

Numuneler 15 dakika süreyle kaynar suda bekletilip hemen soğutulduktan sonra 532 nm'deki absorbansları kaydedildi. MDA miktarı, oluşan MDA-TBA kompleksinin en yüksek absorbansa özgül 532 nm'deki absorbans değerlerinden ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) yararlanılarak hesaplama işlemi gerçekleştirildi.

$$A = \epsilon \times l \times c \Rightarrow c = A / \epsilon \times l$$

$$c = \frac{A}{\epsilon \times l} = \frac{A \times \text{mol} \times 10^9 \times L \times 100 \text{ mL}}{1,56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \times L \times \text{cm} \times \text{mol} \times 1000 \text{ mL} \times \text{mgHb}} = A \times \frac{10^3 \text{ mol}}{1,56 \times \text{mgHb}}$$

$$c = \frac{A}{\text{g Hb}} \times 641 \times \text{seyrelme faktörü} = \text{nmol} / \text{mg Hb}$$

A : Absorbans; l : ışık yolu cm; ϵ : Molar soğurma katsayısı; c : konsantrasyon

Doku MDA miktarı “nmol/mg protein” cinsinden ifade edildi.

3.2.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızın EKG, biyokimyasal ve histolojik verilerinin tüm istatistiksel değerlendirmesi SPSS 22.0 (Statistical Package for Social Sciences) istatistik programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası farklılıkları değerlendirmek için Kruskal-Wallis varyans analizi yapıldıktan sonra anlamlı sonuç veren grupların hangi gruplar arasında olduğunu görmek için ikişerli karşılaştırmalarda non-parametrik

yöntem Mann-Whitney U testi uygulandı. Histolojik bulguların istatistiğinde ise Ki kare testi uygulandı. Ortalama ve standart sapmalar hesaplanarak p değerinin 0.05'ten küçük olduğu durumlar anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. EKG Bulguları

Tablo 4’de kontrol ve ilaç gruplarında ölçülen EKG parametrelerine ait sonuçlar ve istatistiksel değerlendirmeler özet şeklinde verilmektedir.

Tablo 4: Grupların EKG parametre değerleri

Gruplar	RR (sn)	QRS (sn)	PR (sn)	QT (sn)	QTc (sn)
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS
Kontrol	0,237±0,018	0,016±0,001	0,043±0,004	0,077±0,010	0,158±0,019
DXR	0,269±0,054*	0,026±0,007*	0,063±0,013*	0,129±0,021*	0,250±0,037*
DXR+Mel	0,307±0,093*	0,023±0,002*	0,065±0,018*	0,120±0,029*	0,217±0,027*†
DXR+TQ	0,352±0,076*†‡	0,022±0,005*†‡	0,057±0,013*†‡	0,124±0,035*	0,207±0,044*†
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, DXR: Dokсорubisin, Mel: Melatonin, TQ: Timokinon

*: Kontrol grubuna göre anlamlı (p<0,05)

†: DXR grubuna göre anlamlı (p<0,05)

‡: DXR+MEL grubuna göre anlamlı (p<0,05)

Kardiyotoksisite ajanı olarak kullandığım Dokсорubisin (DXR) enjekte edilen sıçanlardaki EKG parametre değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hem PR intervali hem de QRS süresi daha uzun bulundu. Buna paralel olarak QT ve QTc süreleri de uzadı (p<0,001). RR intervalinde de uzama, yani kalp hızında yavaşlama tespit edildi (p<0,01).

DXR+MEL grubu kontrol grubu ile mukayese edildiğinde PR intervali, QRS süresi, RR intervali, QT ve QTc sürelerinin hepsinde uzama meydana geldi (p<0,001).

Benzer şekilde, DXR+TQ grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında PR intervali, QRS süresi, RR intervali, QT ve QTc sürelerinde istatistiksel açıdan anlamlı uzama tespit ettim (p<0,001).

Melatonin ile yapılan “kardiyotoksisite tedavisi”nin EKG üzerine etkisinin olup olmadığı sorusu için DXR+MEL grubu ile DXR grubu EKG değerleri karşılaştırıldığında QT_c süresinin Melatonin (MEL) ile anlamlı derecede kısaldığı dikkat çekmektedir (p<0,05), diğer EKG parametrelerinde ise değişim olmamıştır.

Timokinonun etkisini görmek için DXR+TQ grubu DXR grubu ile kıyaslandığında hem PR intervali hem de QRS ve QTc süreleri daha kısa bulunurken ($p<0,05$), RR intervalinde anlamlı artış gözlemlendi ($p<0,001$).

DXR+TQ grubu deneklerde PR intervali ve QRS süresi, Melatonin grubuna göre anlamlı düzeyde kısalırken ($p<0,05$), RR intervalinde uzama meydana geldi ($p<0,05$). Bu sonuçlara göre timokinon kalp dokusu içinde hem A-V (atriyoventriküler) düğümde hem de ventrikül içinde kardiyotoksositeye bağlı oluşan ileti hızı değişikliğini melatonine göre daha çok kontrol değerlerine yaklaştırdı, ancak kalp hızını yavaşlattı.

4.2. Histolojik Bulgular

Grupların sağ ventrikül dokuları incelenerek hasar düzeylerine göre dağılımları Tablo 5'te gösterilmiştir. Kontrol grubunda normal histolojik yapı gösteren 6 (%85,7) hayvana karşılık sadece 1 (%14,3) hayvanda hafif derecede hasar tespit edilirken; DXR grubunda bulunan 6 (%100) hayvanın tamamında hasar tespit edildi. DXR+MEL grubundan 4 (%57,1) hayvan normal histolojiye sahipken, 2 (%28,6) tanesi hafif derecede hasarlı, 1 (%14,3) tanesi hasarlı sınıfına girdi. Ancak DXR+TQ grubunda bulunan 6 (%100) hayvanın tamamında hasar saptandı.

Tablo 5: Sağ kalp histopatolojik hasar derecelerine göre hayvanların dağılımı

GRUPLAR	HASAR YOK	HAFİF	HASAR	TOPLAM
	n (%)	HASAR n (%)	n (%)	n (%)
Kontrol	6 (85,7)	1 (14,3)	0 (0,0)	7 (100)
DXR	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (100)	6 (100)
DXR + MEL	4 (57,1)	2 (28,6)	1 (14,3)	7 (100)
DXR + TQ	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (100)	6 (100)
Toplam	10 (38,5)	3 (11,5)	13 (50)	26 (100)

Tablo 6'da sağ kalbin histolojik incelemesi sonucunda elde edilen hasar skorlarının ortalama değerleri verilmiştir. Kruskal-Wallis testinin sonucuna göre gruplar arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,001$). Kontrol grubunun ortalama değeri

($1,0 \pm 1,29$) DXR ($6,16 \pm 0,75$) ve DXR+TQ'nun ($5,83 \pm 0,98$) değerlerinden küçüktü ($p < 0,01$); ancak DXR+MEL grubu ($2,42 \pm 1,71$) ile karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$). DXR grubu DXR+MEL grubu ile mukayese edildiğinde istatistiksel açıdan anlamlı bulunurken ($p < 0,01$), DXR+TQ grubu ile arasında anlam tespit edilmedi ($p > 0,05$). DXR+TQ ile karşılaştırıldığında DXR+MEL grubu ortalamaları anlamlı derecede düşük bulundu ($p < 0,01$).

Tablo 6: Sağ kalpteki histopatolojik hasar skorlarının ortalama değerleri

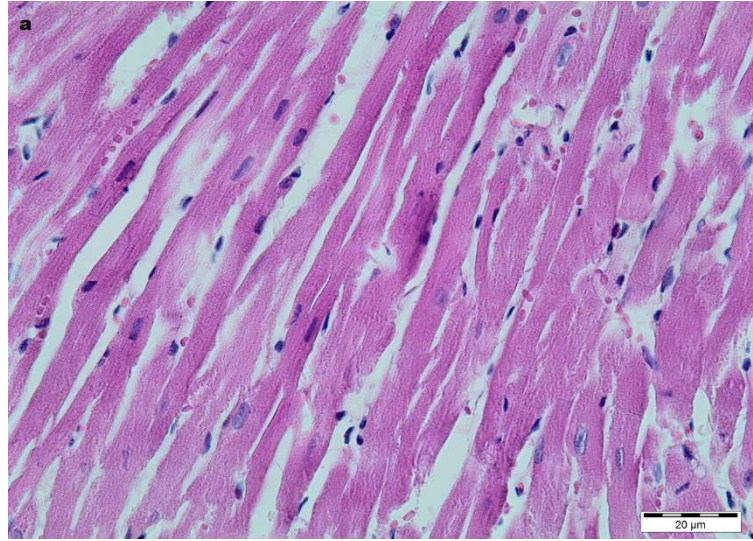
GRUPLAR	n	Mean \pm SS
Kontrol	7	$1,0 \pm 1,29$
DXR	6	$6,16 \pm 0,75^*$
DXR + MEL	7	$2,42 \pm 1,71^\dagger$
DXR + TQ	6	$5,83 \pm 0,98^{*\ddagger}$

Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, DXR: Doksorubisin, Mel: Melatonin, TQ: Timokinon

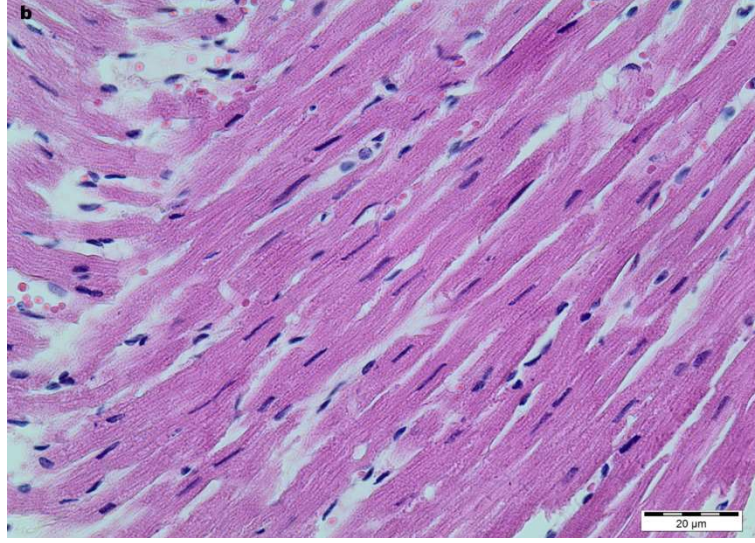
*: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$)

†: DXR grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$)

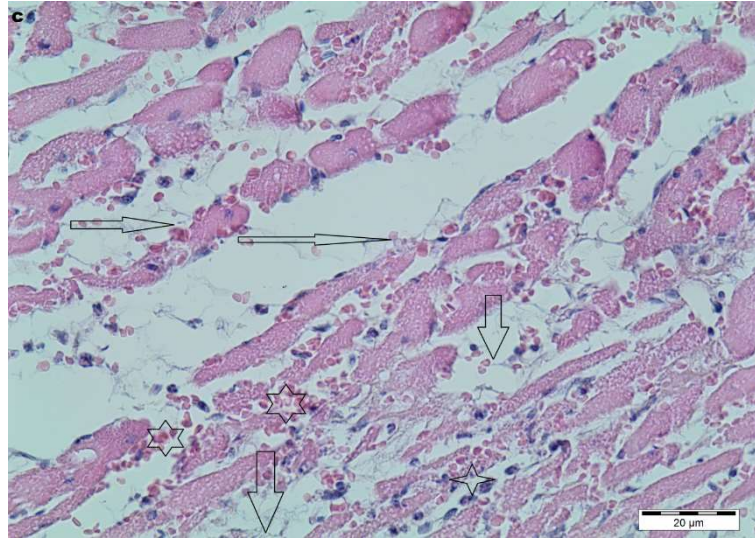
‡: DXR+MEL grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$)



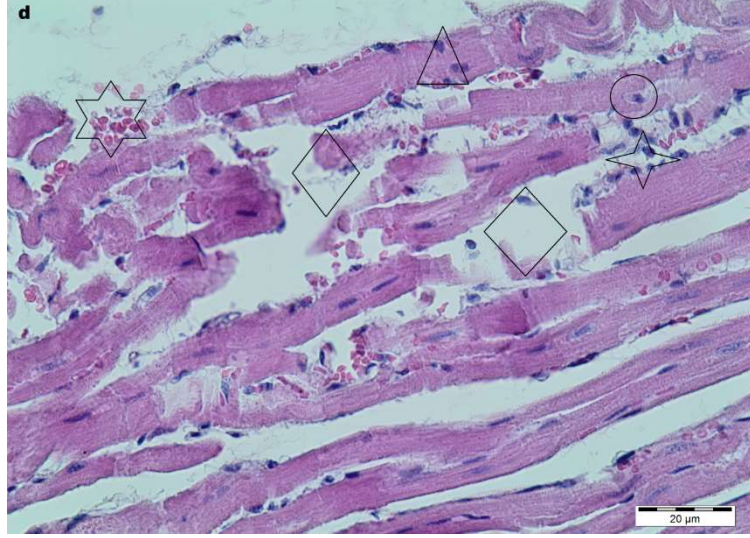
Resim 3: Kontrol grubu sağ ventrikül doku görünümü (H&E boyama X40; bar: 20µm)



Resim 4: Kontrol grubu sağ ventrikül doku görüntüsü (H&E boyama X40; bar: 20μm)

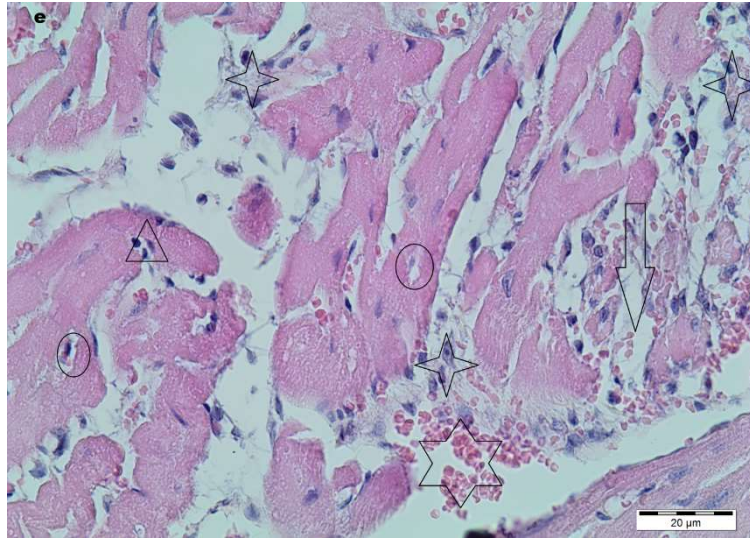


Resim 5: DXR grubu sağ ventrikülde meydana gelen değişiklikler (H&E boyama X40; bar: 20μm). \Rightarrow : interstisyel ödem \Downarrow : fibrözis , \star : interstisyel hemoraji



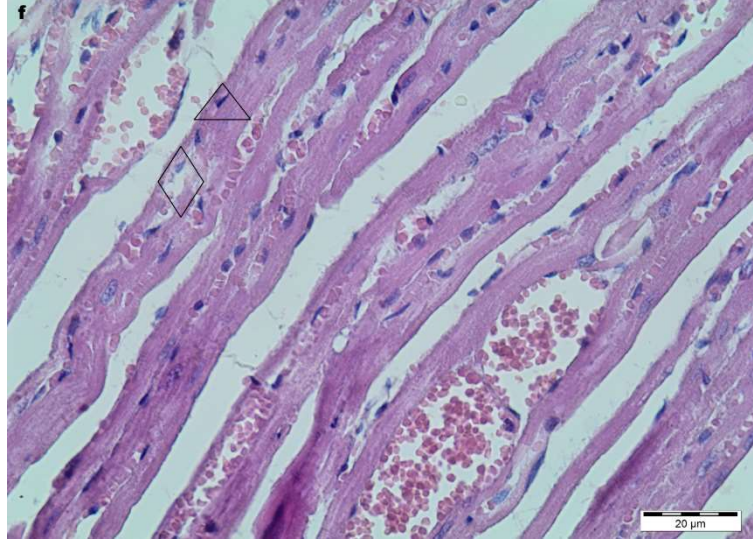
Resim 6: DXR grubu sağ ventrikül dokusundaki patolojiler (H&E boyama X40; bar: 20µm).

◇ : liflerde disorganizasyon , △ : nükleer dejenerasyon , ☆ : interstisyel hemoraji , ✧ : infiltrasyon ,
○ : perinükleer vakuolizasyon

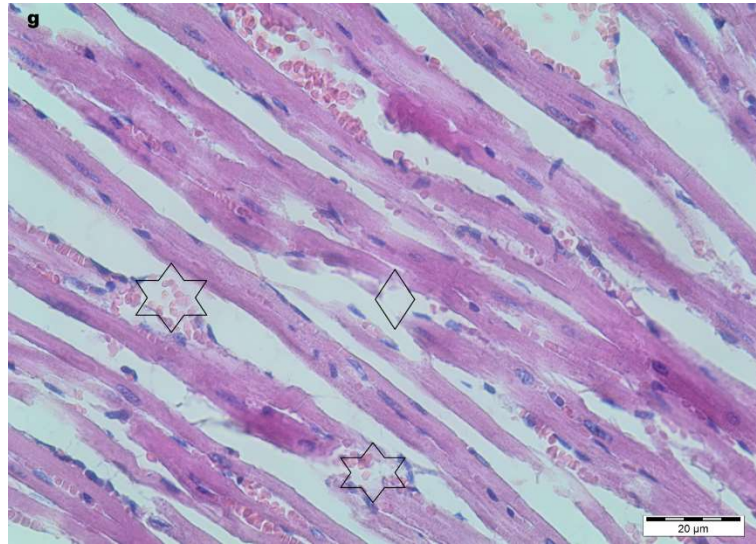


Resim 7: DXR grubu sağ ventrikül doku değişiklikleri (H&E boyama X40; bar: 20µm).

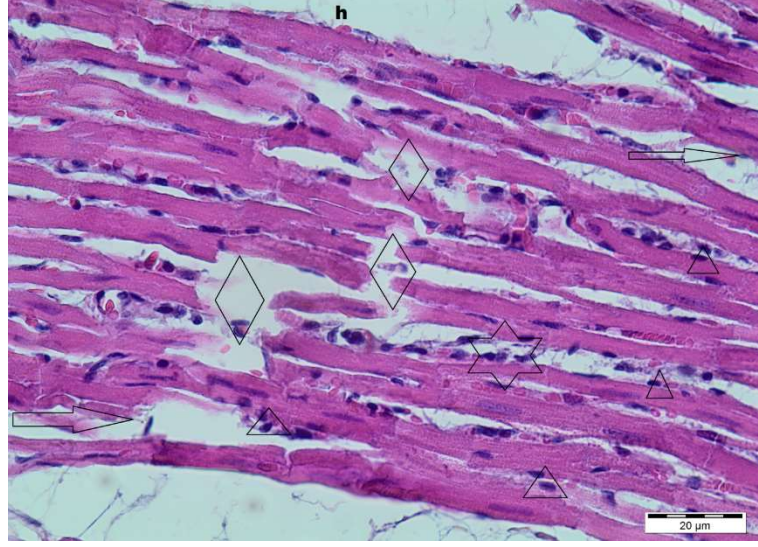
☆ : interstisyel hemoraji △ : nükleer dejenerasyon , ○ : perinükleer vakuolizasyon , ✧ : infiltrasyon
⇓ : fibrözis



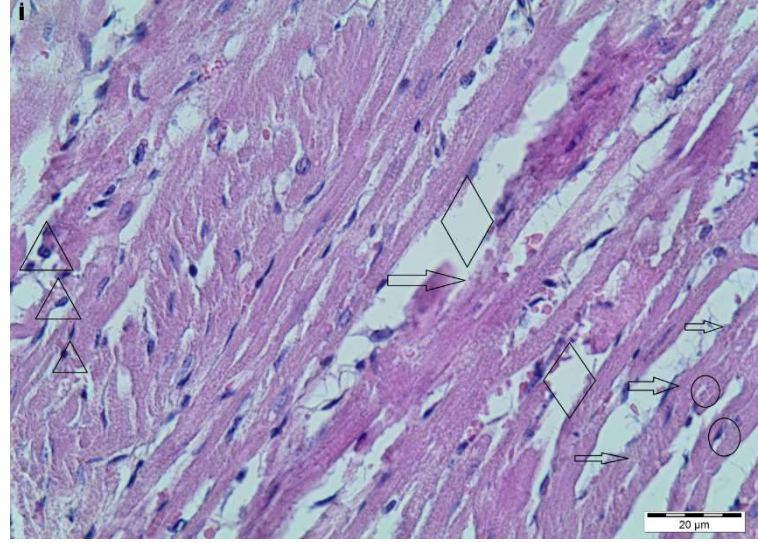
Resim 8: DXR+MEL grubu sağ ventrikül doku görüntüsü (H&E boyama X40-bar: 20μm)
◇ : liflerde disorganizasyon , △ : nükleer dejenerasyon



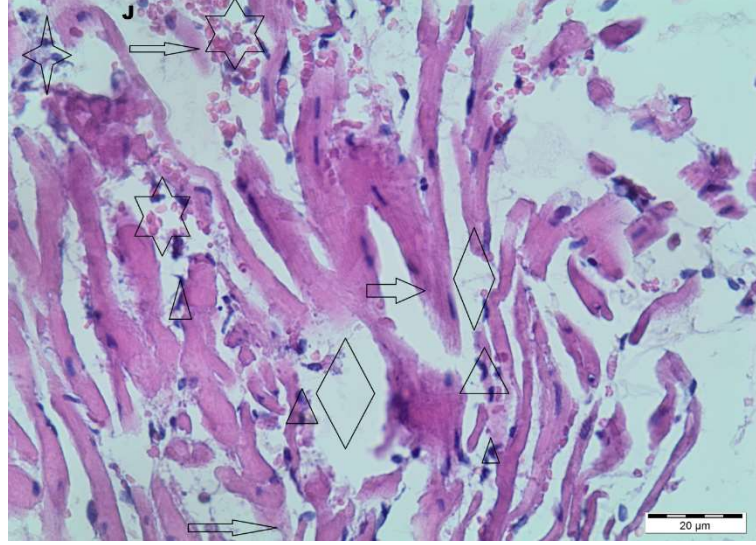
Resim 9: DXR+MEL grubu sağ ventrikül doku görünümü (H&E boyama X40- bar: 20μm)
◇ : liflerde disorganizasyon , ☆ : interstisyel hemoraji



Resim 10: DXR+TQ grubu sağ ventrikül dokusunda meydana gelen değişiklikler (H&E boyama X40-bar:20µm) ◇ : liflerde disorganizasyon , △ : nükleer dejenerasyon , ⇨ : interstisyel ödem , ☆ : interstisyel hemoraji



Resim 11: DXR+TQ grubu sağ ventrikül dokusunun görünümü (H&E boyama X40-bar: 20µm) ◇ : liflerde disorganizasyon , ⇨ : interstisyel ödem ; ○ : perinükleer vakuolizasyon ; △ : nükleer dejenerasyon



Resim 12: DXR+TQ grubu sağ ventrikül dokusunun görünümü (H&E boyama X40-bar: 20μm) ◇ : liflerde disorganizasyon △ : nükleer dejenerasyon ; ⇔ : interstisyel ödem ; ☆ : interstisyel hemoraji ; ✦ : infiltrasyon

Sol kalpteki histopatolojik hasarın derecesine göre hayvanların gruplar içi dağılımı Tablo 7’de gösterilmiştir. Buna göre kontrol grubunda bulunan hayvanların 6 (%85,7)’sında normal histolojik yapı gözlenirken, 1 (%14,3) tanesinde hafif hasar tespit edildi. DXR grubundan 1 (%16,7) hayvanının dokusunda hafif hasar bulunurken, 5 (%83,3) tanesinin hasarlı grupta olduğu gözlemlendi. DXR+MEL grubunda ise 1 (%14,3) hayvanda hasara rastlanmazken; 3 (%42,9)’ünün hafif, 3 (%42,9)’ünün hasarlı dokuya sahip olduğu saptandı. Öte yandan DXR+TQ grubunda bulunan 6 denekten 1 (%16,7)’i hafif hasarlı, 4 (%66,7)’ü hasarlı iken; 1 (%16,7) tanesinde normal histolojik doku gözlemlendi.

Tablo 7: Sol kalp histopatolojik hasar derecelerine göre hayvanların dağılımı

GRUPLAR	HASAR YOK n (%)	HAFİF HASAR n (%)	HASAR n (%)	TOPLAM n (%)
Kontrol	6 (85,7)	1 (14,3)	0 (0,0)	7 (100)
DXR	0 (0,0)	1 (16,7)	5 (83,3)	6 (100)
DXR + MEL	1 (14,3)	3 (42,9)	3 (42,9)	7 (100)
DXR + TQ	1 (16,7)	1 (16,7)	4 (66,7)	6 (100)
Toplam	8 (30,8)	6 (23,1)	12(46,2)	26 (100)

Deney gruplarına ait dokuların ışık mikroskopunda incelenmesi sonucu grupların hasar skorlaması yapılmış ve ortalama değerler Tablo 8’te verilmiştir. Skorlama sonucu yapılan istatistikte gruplar arası anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p<0,01$). Kontrol grubunun ortalama değeri ($0,85 \pm 1,06$) DXR ($5,33 \pm 1,03$), DXR+MEL ($4,00 \pm 1,63$) ve DXR+TQ ($4,66 \pm 2,50$) gruplarının ortalama değerlerinden küçük ve istatistiksel açıdan anlamlıdır (sırayla $p<0,01$; $p<0,01$; $p<0,05$). DXR+MEL ve DXR+TQ gruplarının ortalama değerleri DXR grubu değerlerinden düşük olmasına karşın gruplar arası istatistiksel anlamlılık tespit edilmedi ($p>0,05$).

Tablo 8: Sol kalpteki histopatolojik hasar skorlarının ortalama değerleri

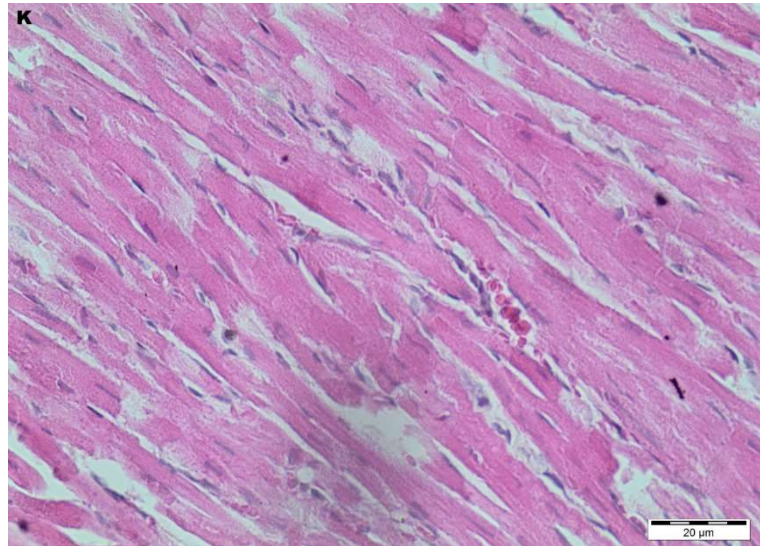
Gruplar	N	Mean \pm SS
Kontrol	7	$0,85 \pm 1,06$
DXR	6	$5,33 \pm 1,03^*$
DXR + Mel	7	$4,00 \pm 1,63^*$
DXR + TQ	6	$4,66 \pm 2,50^*$

Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, DXR: Doksorubisin, Mel: Melatonin, TQ: Timokinon

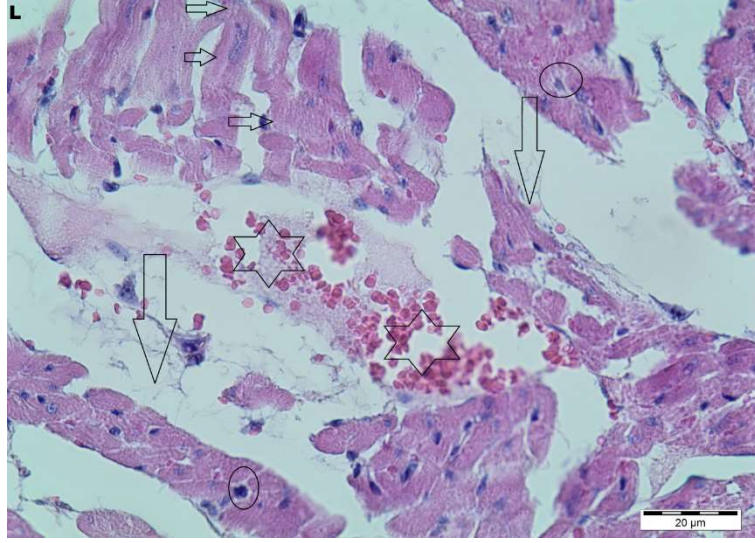
*: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

†: DXR grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

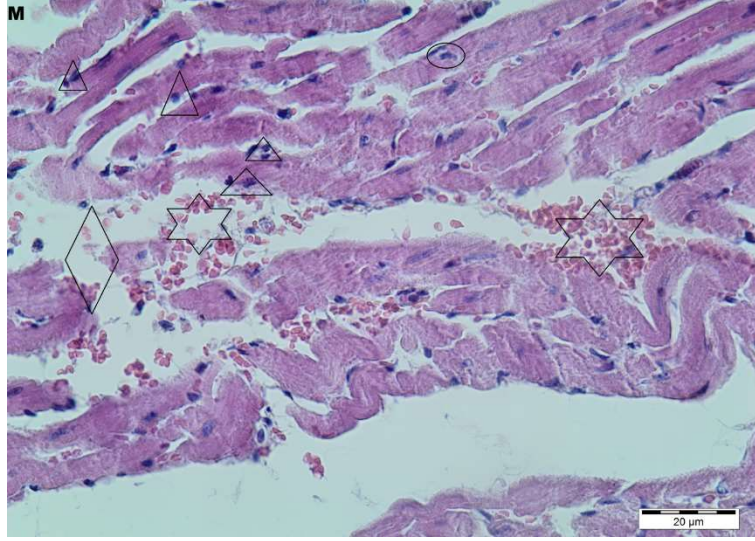
‡: DXR+MEL grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)



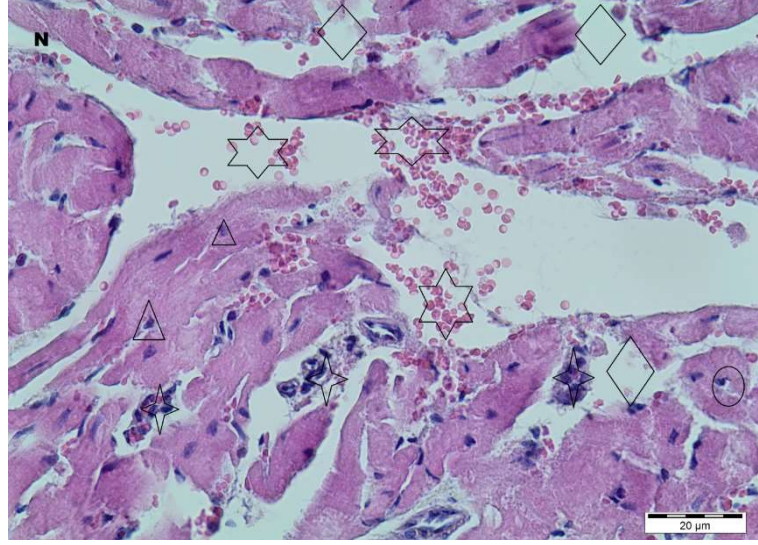
Resim 13: Kontrol grubu sol ventrikül normal doku görünümü (H&E boyama X40; bar: 20 μ m)



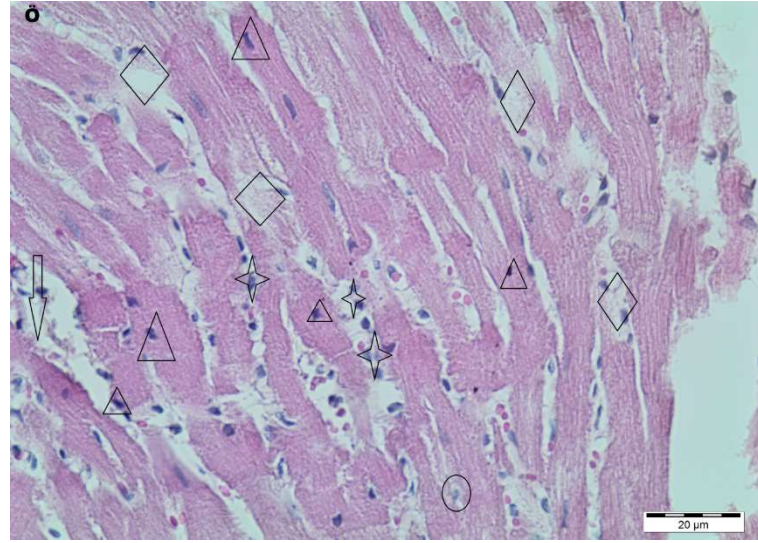
Resim 14: DXR grubunda yaygın patoloji görüntüsü (H&E boyama X40; bar: 20µm).
⇒ : interstisyel ödem ; ☆ : interstisyel hemoraji, ↓ : fibrözis, ○ : perinükleer vakuolizasyon



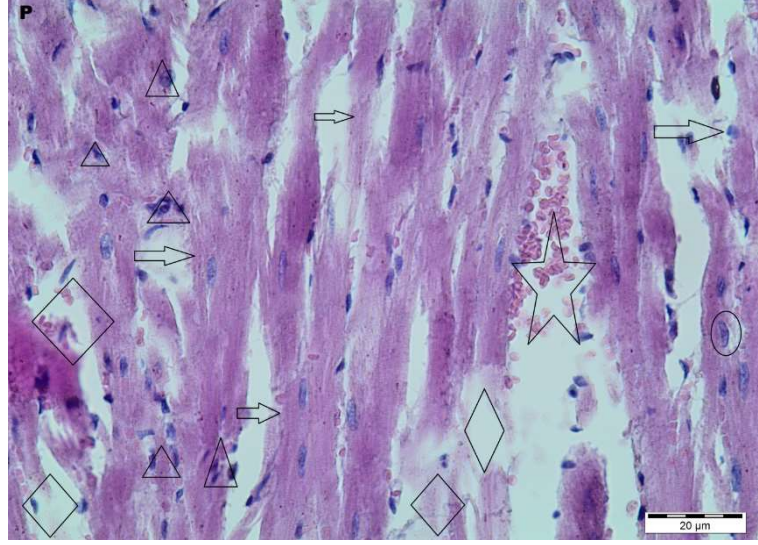
Resim 15: DXR grubunda meydana gelen hasar görüntüsü (H&E boyama X40; bar: 20µm)
△ : nükleer dejenerasyon ; ○ : perinükleer vakuolizasyon ; ◇ : liflerde disorganizasyon
☆ : interstisyel hemoraji



Resim 16: DXR grubunda görülen yaygın hasarın görüntüsü (H&E boyama X40; bar: 20µm)
△ : nükleer dejenerasyon ; ◇ : liflerde disorganizasyon , ○ : perinükleer vakuolizasyon ; ☆ : infiltrasyon ,
☆ : interstisyel hemoraji

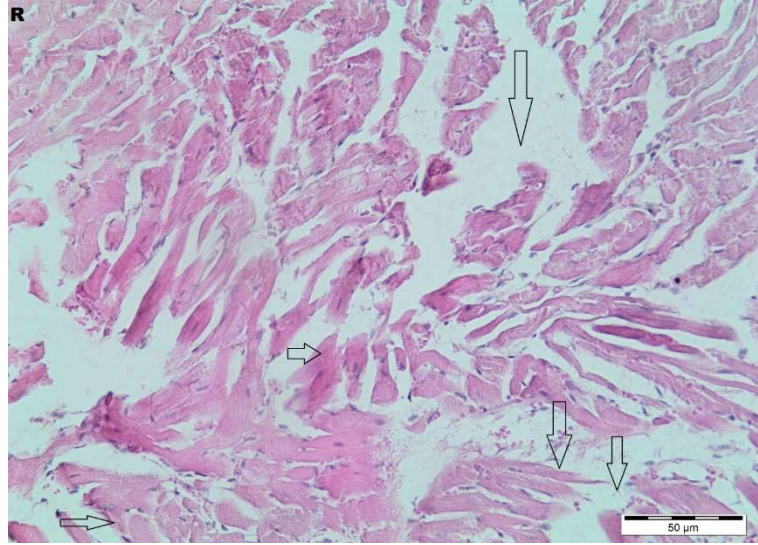


Resim 17: DXR+MEL grubunun sol ventrikül görüntüsü (H&E boyama, X40-bar: 20µm)
△ : nükleer dejenerasyon ; ○ : perinükleer vakuolizasyon ; ◇ : liflerde disorganizasyon , ☆ : infiltrasyon ,
⇓ : fibrözis

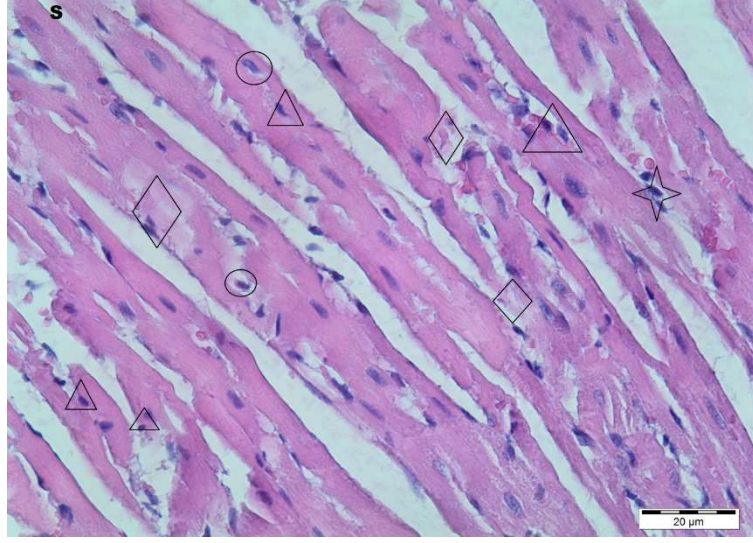


Resim 18: DXR+MEL grubu sol ventrikül doku görünümü (H&E boyama X40-bar: 20μm)

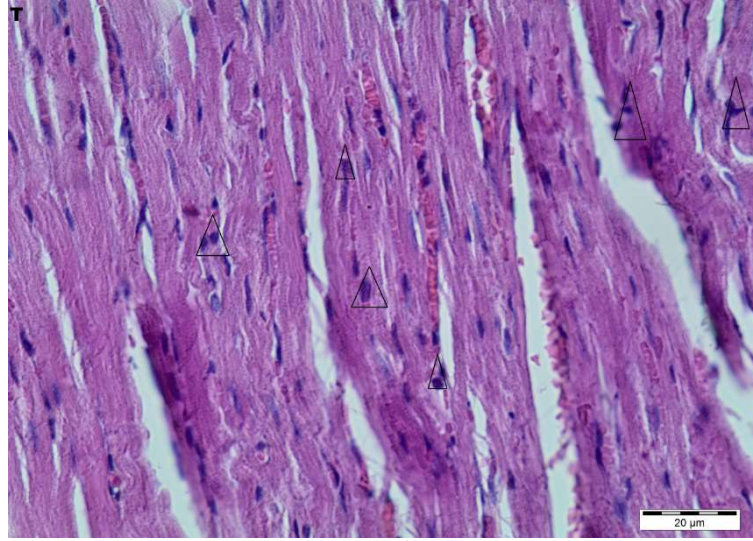
◇ : liflerde disorganizasyon ○ : perinükleer vakuolizasyon △ : nükleer dejenerasyon ; ⇒ : interstisyel ödem ; ☆ : interstisyel hemoraji



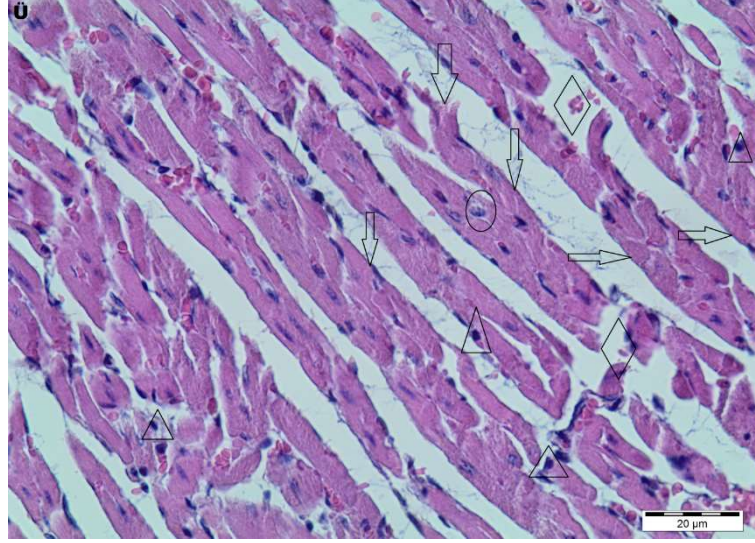
Resim 19: DXR+MEL grubu sol ventrikül dokusunun görüntüsü (H&E boyama, X20- bar: 50 μm) ⇒ : interstisyel ödem ; ⇩ : fibrözis



Resim 20: DXR+TQ grubu sol ventrikül dokusunun görünümü (H&E boyama X40- bar: 20µm). ○ : perinükleer vakuolizasyon ; △ : nükleer dejenerasyon ; ◇ : liflerde disorganizasyon ; ✦ : infiltrasyon



Resim 21: DXR+TQ grubu dokusunda meydana gelen değişikliğin görünümü (H&E boyama X40- bar: 20µm). △ : nükleer dejenerasyon



Resim 22: DXR+TQ grubu sol ventrikül doku görüntüsü (H&E boyama X40- bar: 20µm).
△ : nükleer dejenerasyon ; ↓ : fibrözis; ◇ : liflerde disorganizasyon ; ○ : perinükleer vakuolizasyon ;
⇐⇒ : interstisyel ödem

4.3. Biyokimyasal Bulgular

Kontrol ve deney gruplarında ölçülen biyokimyasal parametrelere ait sonuçlar ve istatistiksel değerlendirmeler Tablo 9'da görülmektedir. Kreatin kinaz miyokardiyal bant (CK-MB) düzeyleri bakımından incelendiğinde kontrol grubuna göre DXR grubunda anlamlı artış gözlenirken ($p<0,05$), DXR+MEL grubunda anlamlı düşüş ($p<0,05$) saptandı. DXR grubu ile karşılaştırıldığında hem DXR+MEL hem de DXR+TQ grubunda anlamlı azalma olduğu bulundu ($p<0,05$). Öte yandan DXR+MEL ile DXR+TQ gruplarının ikisinde de meydana gelen düşüşler arasında anlamlı farka rastlanmadı ($p>0,05$).

İnterlökin-1 seviyesi bakımından değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre sadece DXR grubunda artış meydana geldi ($p<0,01$). DXR grubuna göre karşılaştırıldığında ise hem DXR+MEL hem de DXR+TQ grubunda anlamlı azalma olduğu gözlemlendi ($p<0,01$). Buna karşın DXR+MEL ile DXR+TQ grupları arasında fark bulunmadı ($p>0,05$).

Kontrol grubuyla kıyaslandığında, DXR grubunun IL-6 seviyesinde anlamlı artış gözlenirken ($p<0,05$); DXR+MEL ve DXR+TQ grupları için fark tespit

edilmedi ($p>0,05$). DXR grubuyla kıyaslandığında DXR+MEL grubunda anlamlı düşüş meydana geldiği bulundu ($p<0,01$). Öte yandan, DXR+TQ ile DXR+MEL gruplarında IL-6 seviyesindeki düşüşler birbiriyle kıyaslandığında bu gruplar arasında da anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0,05$).

Proinflamatuvar sitokinlerden olan IL-18 seviyesi bakımından değerlendirildiğinde, kontrol grubu ortalamasına kıyasla DXR grubunda anlamlı artma ($p<0,01$); DXR+MEL grubunda anlamlı ($p<0,01$), DXR+TQ grubunda ise anlamlı olmayan azalma tespit edildi ($p>0,05$). DXR grubu ile karşılaştırıldığında, hem DXR+MEL hem de DXR+TQ gruplarında belirgin düşme saptandı ($p<0,01$). DXR+MEL grubunda meydana gelen azalma DXR+TQ grubundakinden daha fazla ve anlamlıydı ($p<0,05$).

Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA seviyesi, kontrol grubuna göre DXR ve DXR+TQ gruplarında yüksek bulundu. DXR grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,05$). DXR grubu ile mukayese edildiğinde DXR+MEL grubu ortalamasının anlamlı olarak azaldığı ($p<0,05$) gözlenirken; DXR+TQ grubunda meydana gelen azalmanın istatistiksel anlamlılık kaydedemediği gözlemlendi ($p>0,05$).

Kontrol, DXR, DXR+MEL ve DXR+TQ gruplarının NO değerleri sırasıyla $62,86\pm 8,942$; $91,54\pm 23,99$; $31,83\pm 4,38$ ve $60,28\pm 26,13$ olarak ölçüldü. Ancak sadece DXR ile DXR+MEL grupları arasında anlamlı bir fark vardı ($p<0,05$).

Endojen antioksidan olan ve süperoksiti hidrojen peroksite dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD) enzimi kontrol grubuyla kıyaslandığında hem DXR hem de DXR+MEL gruplarında anlamlı düşüş gösterdi (sırasıyla $p<0,05$; $p<0,01$), DXR+TQ grubunda ise anlamlı olmayan artış meydana geldi ($p>0,05$).

Tablo 9: Biyokimyasal parametre değerleri

	Kontrol (n=7) Ort±SS	DXR (n=6) Ort±SS	DXR+MEL (n=7) Ort±SS	DXR+TQ (n=6) Ort±SS
CK-MB (ng/mg protein)	7,29±1,77	11,73±2,80*	4,51±1,84*†	6,23±2,21†
HIF-1α (ng/mg protein)	2,27±0,28	2,56±1,35	1,62±0,59	2,19±0,90
AST (U/g protein)	1284,28±509,11	1457,50±316,30	1188,00±234,59	1485,0±293,86
TNF-α (pg/mg protein)	108,29±26,75	106,82±55,45	112,56±29,51	167,74±75,03
IL1 (pg/mg protein)	30,09±6,47	64,03±18,68*	22,30±5,12†	22,12±8,57†
IL6 (ng/g protein)	3,64±1,05	8,48±2,83*	2,55±0,84†	4,94±1,84‡
IL18 (pg/mg protein)	136,83±9,29	231,96±52,08*	62,96±11,59*†	107,84±34,31‡
MDA (nmol/mg protein)	242,33±32,77	315,57±63,57*	177,85±97,45†	267,16±109,41
NO (μmol/g protein)	62,86±8,942	91,54±23,99	31,83±4,38*†	60,28±26,13
SOD (U/mg protein)	8,90±1,22	6,93±1,41*	5,87±1,70*	9,28±2,58‡
GPx (U/mg protein)	1,66±0,83	1,57±0,39	1,06±0,40	1,20±0,24
CAT (k/g protein)	10,72±8,25	5,80±4,18	3,95±1,29	3,63±1,23
TAS (mmol/g protein)	0,11±0,03	0,12±0,03	0,08±0,04	0,15±0,07
TOS (μmol/g protein)	0,47±0,15	0,68±0,39	0,59±0,45	0,85±0,82

Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, DXR: Doksorubisin, Mel: Melatonin, TQ: Timokinon

*: Kontrol grubuna göre anlamlı (p<0,05);

†: DXR grubuna göre anlamlı (p<0,05),

‡: DXR+MEL grubuna göre anlamlı (p<0,05)

5. TARTIŞMA

5.1. Elektrokardiyografi Bulgularının Değerlendirilmesi

5.1.1. Doksorubisin İle Oluşturulan Kardiyotoksitenin Elektrokardiyografik Etkileri

Bu çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doksorubisin grubunun PR, QRS, QT ve QTc sürelerinin anlamlı olarak uzadığı görüldü. Ek olarak RR intervalinde gözlenen uzama, DXR'ın kalp hızını yavaşlattığını göstermektedir. Literatürde bulgularımı destekleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır. DXR verilen rat (255, 256, 257) ve farelerde (258) kontrollere göre kalp hızında anlamlı azalma bildirilmiştir. Yine ratlarda QRS (256, 259), PR (257) ve QT (255, 256, 257) süreleri ile farelerde QRS (260) ve QT (258, 261, 262) sürelerinde anlamlı uzama bildirilmiştir. Oldukça yeni bir çalışmada, Mantawy ve arkadaşları (263) ratlarda doksorubisin uygulamasının kontrollere göre anlamlı olarak kalp hızında azalma, QRS, PR, QTc sürelerinde artma yaptığını bildirmişlerdir.

RR intervalinin uzaması sinoatriyal (SA) düğüm fonksiyonunun etkilendiğini ortaya koymaktadır. DXR'ın PR ve QRS sürelerini uzatması sırasıyla hem atriyoventriküler (A-V) hem de ventrikül içi (intraventriküler) iletinin yavaşladığı anlamına gelmektedir. QT süresinin uzaması ise repolarizasyon süresinin uzaması anlamına gelir ve K^+ iyonunun hücre içinden dışına akımının geciktiğine işaret edebilir.

5.1.2. Melatoninin Elektrokardiyografik Etkileri

Çalışmamda DXR+MEL grubu ratların tüm elektrokardiyografik parametrelerinde kontrol grubuna göre anlamlı artış saptadım. Diğer bir ifadeyle PR, QRS, QT ve QTc süreleri uzarken kalp hızı azaldı. DXR+MEL grubunun EKG bulguları DXR grubu ile karşılaştırıldığında QTc dışında anlamlı farklılık

bulunamadı. QTc süresi, DXR grubununkine göre daha düşük olarak kaydedildi. Yaptığım detaylı literatür araştırması sonucunda kalp hızı dışında bulgularımı karşılaştırabileceğim doksorubisin ile oluşturulmuş kardiyotoksitenin yol açtığı EKG değişiklikleri üzerine melatoninin olumlu ya da olumsuz etkilerini bildiren önemli bir araştırmaya rastlayamadım. Aramamı doksorubisin dışında herhangi başka bir ajanla oluşturulan kardiyotoksiste üzerinde yaptığımda da sonuç değişmedi. Bu yüzden söz konusu bulguları tartışma imkanım olmamıştır. Mevcut bulgularım, DXR'ın neden olduğu elektrokardiyografik değişiklikler üzerine melatoninin önemli bir etkisi olmadığını göstermektedir.

Deney sonuçlarım hem DXR hem de DXR+MEL grubunun kontrole göre anlamlı olarak daha yüksek RR aralığına sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum her iki grupta da kalp hızının azaldığını göstermektedir. DXR'ın kalp hızını azaltıcı etkisi yukarıda tartışılmıştı. Melatoninin de kalp hızını yavaşlattığını bildiren çok sayıda çalışma vardır (264-268). Chuang ve arkadaşlarının (269) yaptığı çalışmada, doz bağımlı intravenöz uygulanan melatoninin sempatik inhibisyon ya da parasempatik stimülasyon yaparak bradikardiye sebep olduğunu bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada dolaşımında bulunan melatoninin kalp hızını kontrol eden baroreseptör refleksi modüle ederek kalp hızında düşüşe neden olduğu ve bu etkisini kan-beyin bariyerinin dışında lokalize olmuş postrema bölgesinde bulunan melatonin reseptörleri aracılığıyla gerçekleştiği ifade edilmiştir (270). Bu çalışmada sadece melatonin uygulanan grup olmadığı için DXR grubu ile DXR+MEL grubunun sonuçları karşılaştırılarak melatoninin kalp hızı üzerindeki etkisi hakkında fikir edinilebilir. Nitekim DXR ve MEL'in birlikte uygulanması tek başına DXR verilmesine göre RR süresini daha fazla uzatmış (sırasıyla 0.307 ± 0.093 sn ve 0.269 ± 0.054 sn), yani kalp hızında daha da düşüşe neden olmuştur. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

DXR+MEL grubu değerleri DXR grubu değerleri ile kıyaslandığında sadece QTc süresinde anlamlı değişim kaydedilmiştir. Bunun dışında DXR'ın neden olduğu elektrokardiyografik bulgular (QRS, PR, QT ve RR sürelerinde uzama) üzerine istatistiksel olarak anlamlı değişiklik yapamamıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında QTc intervali, DXR kardiyotoksitesine bağlı olarak 0.158 ± 0.019 saniyeden 0.250 ± 0.037 saniyeye uzamış iken Melatonin bu değeri 0.217 ± 0.027 sn

seviyesine düşürmüştür. Bu da Melatoninin repolarizasyon süresini kısalttığına işaret etmektedir.

5.1.3. Timokinonun Elektrokardiyografik Etkileri

Bu çalışmada DXR+TQ grubunun QRS, PR, QT ve QTc süreleri kontrol grubuna göre daha uzun, DXR grubuna göre daha kısa bulundu. Bu farklar DXR grubunun QT'si dışında istatistiksel olarak anlamlıydı. QRS ve PR bulguları TQ'nun kalpte A-V ve intraventiküler ileti süresini kısalttığına, yani "iyileştirdiğine" işaret edebilir. DXR'ın neden olduğu QTc süresindeki uzamanın TQ tarafından azaltılması da TQ'nun repolarizasyonu etkilediğini göstermektedir. Yaptığım detaylı literatür araştırması sonucunda kalp hızı dışında bulgularımı karşılaştırabileceğim herhangi bir kardiyotoksik ajanın yol açtığı EKG değişiklikleri üzerine TQ'nun etkilerini araştıran bir çalışma bulamadım. Bununla birlikte çalışmamın bulguları TQ'nun DXR ile oluşturulan EKG parametrelerindeki (RR süresi hariç) bozulmaları önleyebileceğini göstermektedir.

Diğer taraftan DXR+TQ grubunun RR süresi hem kontrol hem de DXR grubundan anlamlı olarak daha uzun bulundu (sırasıyla 0.352 ± 0.076 , 0.237 ± 0.018 ve 0.269 ± 0.054). Diğer bir ifadeyle DXR ve TQ'nun birlikte uygulanması tek başına DXR verilmesinin yol açtığı kalp hızındaki azalmayı daha da artırdığı söylenebilir. Ratlarda yapılan bir çalışmada, Cadmium uygulamasından sonra kalp hızında meydana gelen artışın Nigella sativa tarafından anlamlı olarak düşürüldüğü bildirilmiştir (271).

5.2. Histolojik Bulguların Değerlendirilmesi

Sağ kalp histolojik incelemesinde, DXR'ın kalp dokusunda anlamlı histolojik değişiklikler yaptığı saptandı. MEL uygulamasının bu değişiklikleri önlediği, TQ verilmesinin ise önlemediği görüldü. Sol kalpte DXR uygulamasının kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm deney gruplarında anlamlı doku hasarına yol açtığı

bulundu. DXR+MEL grubu ile DXR grubu kıyaslandığında arada oldukça büyük fark vardı ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Muhtemelen bu duruma standart sapmaların büyük olması neden olmuştur. DXR+TQ grubu ile DXR grubu arasında ise belirgin fark bulunamadı.

Melatoninin sağ ve sol kalpte birbirinden farklı etki göstermesi üzerine iki kalpten elde edilen hasar skorları cebirsel olarak toplanarak tüm kalpte ortalama değerler hesaplandı (bulgulara verilmedi). Bu değerler Kontrol, DXR, DXR+MEL ve DXR+TQ grupları için sırasıyla $1,85 \pm 1,21$, $10,50 \pm 2,42$, $6,42 \pm 2,87$ ve $10,5 \pm 2,94$ şeklindeydi. Bu değerler üzerinde yapılan analizde gruplar arasında anlamlılık saptandı ($p < 0,05$). Tüm grupların ortalama değerleri kontrol grubundan anlamlı olarak büyüktü ($p < 0,01$). DXR+MEL verilen grubun ortalama değeri hem DXR hem de DXR+TQ verilen gruplardan anlamlı olarak düşük bulundu.

Tüm bulgular bütüncül olarak değerlendirildiğinde DXR'ın kalpte oluşturduğu histopatolojik değişikliklerin MEL tarafından azaltıldığı ancak TQ'nun azaltıcı etkiye sahip olmadığı görüldü. Literatürde DXR ile oluşturulmuş kardiyotoksositeye karşı melatoninin koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (145, 146, 272).

5.3. Biyokimyasal Bulguların Değerlendirmesi

DXR grubunun ortalama CK-MB değeri kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu. CK-MB akut dönemde kardiyak hasarı gösteren bir izoenzimdir. DXR'la birlikte melatonin ve timokinon verilmesi DXR'ın neden olduğu artışı önlediği görüldü. Bu sonuçlar literatürle uygunluk göstermektedir. Ratlara uygulanan adriamisin, plazma CK-MB değerini çok artırırken adriamisinle birlikte melatonin verilmesi bu artışı önlemiştir (273). İsoproterenolle oluşturulan enfarktüste melatonin verilmesi benzer bir etki göstermiştir (266). Nagi ve arkadaşları (8) siklofosamid ile oluşturulan kardiyotoksitede TQ verilmesinin ilacın oluşturduğu CK-MB'deki artışı azalttığını bildirmişlerdir

Süperoksit radikali reaktif oksijen türüdür. ROS üretiminin artması oksidatif strese yol açar. ROS'lar proinflamatuvar araçları aktive eder. Kontrol grubuna

kıyasla, DXR grubunda proinflamatuvar sitokin düzeylerinin (IL-1, IL-6 ve IL-18) anlamlı şekilde arttığı görüldü. Melatonin ve timokinon verilmesi, DXR'ın sitokinleri artırıcı etkisini önlediği gözlemlendi. Bu bulgular literatürle paralellik göstermektedir. Daha önce yapılmış çalışmalarda, melatoninin serbest radikalleri süpürücü ve antioksidanları artırıcı etkilere sahip olduğu (274, 275) aynı zamanda sitokinleri ve inflamatuvar mediatörlerin ekspresyonunu baskıladığı rapor edilmiştir (276). Ojha ve arkadaşları (277) da timokinonun oksidatif stresi ve inflamasyonu azaltarak isoproterenolle oluşturulan miyokard hasarına karşı kalbi koruduğunu bildirmişlerdir.

Kontrol grubuna göre kıyaslandığında DXR grubunun MDA değeri anlamlı olarak yüksekti. MDA lipit peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkar ve serbest radikallerin neden olduğu hasarın önemli bir indikatörüdür. Serbest radikaller membran fosfolipitlerinin peroksidasyonuna yol açarak membran geçirgenliğinde değişime neden olmalarının yanı sıra, membran proteinlerinin SH gruplarını oksitlerler. DXR serbest radikalleri artırmak suretiyle membran fonksiyonlarını bozar ve kardiyotoksik etkiler oluşturur. Bu çalışmada, kardiyotoksik ajana ilaveten melatonin uygulamanın MDA'daki artışı önlediğini gördüm. Benzer sonuç isoproterenol ile oluşturulan miyokard enfarktüsünde de ortaya konmuştur (266). Öz ve arkadaşları kalp (146) ve (125) kalp dışı dokularda DXR'ın neden olduğu MDA artışının melatoninle azaltıldığını bildirmişlerdir. Anlamlı olmamakla birlikte, TQ'nun MDA seviyesini düşürdüğünü gözlemlendim. Timokinonun MDA düzeyini kontrol değerlerine yaklaştırmasına rağmen anlamlılık kaydedemesini, standart sapmaların büyük olmasına bağlamaktayım. Literatürde CCl₄ ve desferrioksamin (198), etanol (184) ve ISP (277) kaynaklı MDA seviyesindeki artışın TQ; CCl₄ (196) ve siklosporin A (7) kaynaklı artışına *Nigella sativa* uygulamalarıyla düştüğü bildirilmiştir.

Bu çalışmada DXR kontrol grubuna göre NO'da büyük artışa neden oldu (sırasıyla 91,54±23,99 ve 62,86±8,942) ancak bu fark, muhtemelen standart sapmalardan dolayı, istatistiksel olarak anlamlı değildi. Nitekim DXR grubundaki en küçük değeri çıkardığımda fark anlamlı hale geldi (97,50±21,28; p<0,05). Nitrik oksit reaktif bir radikaldir. Fizyolojik reaktif NO konsantrasyonları apoptotik süreci baskılayıcı olarak görülür. Artmış düzeyleri bu koruyucu etkiyi ortadan kaldırdığı

için pro-apoptotik etkiler ortaya çıkabilir. Ayrıca artmış reaktif NO'nun tiyollerle reaksiyona girmesiyle oluşan S-nitrosotiyoller apoptozisin potent uyarıcısıdır (278). Melatonin ve timokinonun antioksidan etkileriyle NO oluşumunu önlemeleri beklenir. Çalışmamda DXR+MEL ve DXR+TQ gruplarının NO değerleri sırasıyla; $31,83 \pm 4,38$ ve $60,28 \pm 26,13$ olarak ölçüldü. DXR ile birlikte melatonin verilmesi NO'yu DXR'a göre anlamlı olarak düşürdü. Melatonin NO sentaz (NOS) aktivitesini azaltarak NO oluşumunu önleyebilir (279). Bir in vitro çalışmada melatoninin NO süpürücü etkisi gösterilmiştir (280). Sadece DXR verilen gruba göre timokinon uygulanan grubun NO değerinde gözle görünür azalma tespit ettim fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Yukarıda anlatılan düzenlemeden sonra bu fark anlamlı hale geldi ($p < 0,05$). Literatürde timokinonun da melatonin gibi NOS aktivitesi ve NO düzeyini azalttığı bildirilmiştir (213, 222).

Süperoksiti hidrojen peroksite dönüştüren süperoksit dismutaz enzimi kontrol grubuyla kıyaslandığında hem DXR grubu hem de DXR+MEL grubunda anlamlı olarak düşüş gösterirken (sırasıyla $p < 0,05$; $p < 0,01$); DXR+TQ grubunda değişiklik meydana gelmemiştir ($p > 0,05$). DXR grubunda ortalama SOD değeri kontrole göre anlamlı olarak düşük bulundu. DXR, endojen antioksidan enzim olan SOD'un aktivitesini baskılayarak süperoksit radikal üretiminde artışa neden olur (281). Burada beklenmeyen sonuç doksorubisine ilaven melatonin verilmesinin SOD düzeyini düşürmesidir ($p < 0,05$). Bu durum melatoninin serbest radikalleri süpürücü etkisiyle SOD aktivitesinde artışa gerek bırakmamasına bağlı olabilir (282).

5.4. Genel Değerlendirme

Bu çalışmadan elde edilen elektrokardiyografik, biyokimyasal ve histolojik bulgular, kalpte DXR'ın çok iyi bilinen hasarlayıcı etkisinin çalışmamızda da ortaya çıktığını gösterdi.

Çalışma sonuçlarını protektif ajan olan melatoninin DXR kaynaklı kalp hasarını azalttığı görüldü. Melatoninin kalbi koruyucu etkisi birçok araştırmacı tarafından daha önce bildirilmiştir (145-149). Diğer taraftan özellikle histolojik bulgular göz önünde tutulduğunda DXR hasarına karşı timokinonun melatonin kadar

kardiyoprotektif etki göstermediđini buldum. Bu konuda çok sınırlı literatür bilgisi mevcut olup, bahsi geçen çalıřmalarda timokinonun DXR'a karřı kardiyoprotektif ajan olduđu bildirilmiřtir (10,11). Meydana gelen bu farkın gerek DXR, gerekse TQ doz ve uygulama sūrelerindeki farklılıklardan kaynaklanmıř olabileceđi gōrūřūnde yim.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1) Doksorubisin çok iyi bilindiđi üzere kardiyotoksik bir maddedir.
- 2) Melatonin doksorubisin hasarına karşı kalbi koruyucu bir etkiye sahiptir.
- 3) Timokinon en azından doksorubisinin kalpte oluşturduğu hasarı önleme eğilimindedir.
- 4) Bunun anlaşılabilmesi için doz çalışmaları yapılmalıdır.
- 5) Melatonin ve timokinonun birlikte etkilerinin araştırılması da faydalı olacaktır.

ÖZET

Bu çalışmanın amacı doksorubisinle oluşturulan kalp hasarına karşı timokinonun olası kalbi koruyucu etkisini araştırmak ve bunu melatoninin nispeten daha iyi etkisiyle karşılaştırmaktır.

Deneylede 8 haftalık, ağırlıkları 230-350 gr olan 32 adet Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Denekler dört gruba ayrıldı: Kontrol, Doksorubisin (DXR), Doksorubisin+Melatonin (DXR+MEL) ve Doksorubisin+Timokinon (DXR+TQ). Yedi gün boyunca DXR+MEL grubuna intraperitoneal olarak her gün 10 mg/kg melatonin, DXR+TQ grubuna pelet yeme eklenmek suretiyle her gün 50 mg/kg timokinona verildi. Deneyle 5. gününde tüm tedavi gruplarına kuyruk veninden tek doz DXR (45 mg/kg) kontrol grubuna ise serum fizyolojik enjekte edildi. Deneyle 8. gününde anestezi altında EKG kayıtları alındı. Hayvanlar dekapite edildikten sonra biyokimyasal ve histolojik incelemeler için kalp dokuları çıkarıldı. Elektrokardiyografik, biyokimyasal ve histolojik farklılıkları karşılaştırmak için verilerin Kruskal Wallis, Mann Whitney U ve Fisher Freeman Halton Exact (sadece histolojik bulguların istatistiksel analizinde) testleri kullanıldı.

Timokinon; DXR'ın uzattığı PR, QRS ve OTc sürelerini kısalttı oysaki melatonin sadece QTc süresini kısalttı. DXR'ın kalp dokusunda yol açtığı histopatolojik değişiklikler üzerinde melatoninin koruyucu etkisi vardı fakat timokinonun etkisi olmadı. DXR kalp dokusunda CK-MB, IL-1, IL-6, IL-18, MDA ve NO düzeylerini artırırken SOD'u azalttı. Melatonin CK-MB, IL-1, IL-6, IL-18, MDA, NO ve SOD düzeylerini düşürdü. Timokinon ise sadece CK-MB, IL-1 ve IL-18'de azalmaya neden oldu.

Sıçanlarda doksorubisinin kalpte neden olduğu hasar üzerinde melatoninin koruyucu bir etkisi vardır. Bu etki timokinonda zayıftır. Timokinonun olası dozla ilişkili etkileri ileri araştırmaları gerektirir. DXR kardiyotoksitesisi üzerinde her iki kimyasalın birlikte etkilerinin araştırılmasının da bu konuda faydalı olacağını düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: Doksorubisin, kardiyotoksitesite, melatonin, timokinon

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the possible cardioprotective effect of thymoquinone (TQ) on doxorubicin (DXR) cardiotoxicity and to compare it with the relatively well-known effect of melatonin (MEL).

Wistar albino male rats aged 8 weeks (weight 230-350 gr) were used in this study. The animals divided into four groups: Control, DXR, DXR+MEL ve DXR+TQ. Melatonin (10 mg/kg per day, intraperitoneally) and thymoquinone (50 mg/kg per day, added in feed pellet) were given to DXR+MEL and DXR+TQ groups, respectively, for seven days. On the fifth day of the experimental period, a single dose of 45 mg/kg DXR in all treatment groups and saline solution in the control group is injected intravenously through the tail veins of the animals. On the 8th day ECGs are recorded under anesthesia. Then the animals were decapitated and their cardiac tissues were isolated for biochemical and histological examinations. To compare the electrocardiographic, biochemical and histological differences among the groups Kruskal Wallis, Mann Whitney U and Fisher Freeman Halton Exact (only for statistical analysis of histological findings) tests were used.

Thymoquinone shortened the PR and QRS intervals and the corrected QT (QT_c) time which were prolonged by DXR whereas melatonin shortened only the QT_c time. Melatonin had a protective role on the histopathological changes in cardiac tissue induced by DXR'in but thymoquinone had not. DXR increased CK-MB, IL-1, IL-6, IL-18, MDA and NO levels but decreased SOD in cardiac tissue. Melatonin decreased CK-MB, IL-1, IL-6, IL-18, MDA, NO and SOD levels. However Thymoquinone caused a decrease only in CK-MB, IL-1 and IL-18.

Melatonin has a protective effect on DXR-induced cardiotoxicity. This effect is weak for thymoquinone. The possible dose related effect of thymoquinone requires further researches. We also suggest to investigate the combined effects of both chemicals on DXR-induced cardiotoxicity will be useful on this subject.

Key words: Doxorubicin, cardiotoxicity, melatonin, thymoquinone

KAYNAKLAR

1. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis* 2007; 49: 330-352.
2. Raj S, Franco VI, Lipshultz SE. Anthracycline-induced cardiotoxicity: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2014; 16: 315.
3. Govender J, Loos B, Marais E, Engelbrecht AM. Mitochondrial catastrophe during doxorubicin-induced cardiotoxicity: a review of the protective role of melatonin. *J Pineal Res* 2014; 57: 367-380.
4. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology* 2010; 115: 155-162.
5. Dobsak P, Siegelova J, Eicher JC, et al. Melatonin protects against ischemia-reperfusion injury and inhibits apoptosis in isolated working rat heart. *Pathophysiology* 2003; 9: 179-187.
6. Güllü EB, Avcı G. Timokinon: *Nigella Sativa*'nın biyoaktif komponenti. *Kocatepe Veteriner Dergisi* 2013; 6: 51-61.
7. Uz E, Uz B, Selcoki Y, ve ark. Cardioprotective effects of *Nigella sativa* oil on cyclosporine A-induced cardiotoxicity in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103: 574-580.
8. Nagi MN, Al-Shabanah OA, Hafez MM, Sayed-Ahmed MM. Thymoquinone supplementation attenuates cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2011; 25(3): 135-142.
9. Seif AA. *Nigella sativa* attenuates myocardial ischemic reperfusion injury in rats. *J Physiol Biochem* 2013; 69: 937-944.
10. Al-Shabanah OA, Badary OA, Nagi MN, et al. Thymoquinone protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity without compromising its antitumor activity. *J Exp Clin Cancer Res* 1998; 17: 193-198.

11. Nagi MN and Mansour MA. Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. *Pharmacol Res* 2000; 41: 283-289.
12. Brown RK, Wilson G, Tucci MA, Benghuzzi HA. The effects of thymoquinone and Doxorubicin on leukemia and cardiomyocyte cell lines. *Biomed Sci Instrum* 2014; 50: 391-396.
13. Gokcimen A, Cim A, Tola HT, ve ark. Protective Effect of N-Acetylcysteine, Cafeic Acid and Vitamin E on Doxorubicin Hepatotoxicity. *Human & Experimental Toxicology* 2007; 26: 519-525.
14. <http://www.bccancer.bc.ca/HPI/DrugDatabase/DrugIndexPro/Doxorubicin.htm>.
15. <http://www.sabailac.com.tr/tr/products>.
16. Ashley N, Poulton J. Mitochondrial DNA is a direct target of anti-cancer anthracycline drugs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009; 378 (3): 450-455.
17. Weiss RB. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol* 1992; 19: 670–686.
18. Gokcimen A, Cim A, Tola HT, ve ark. Protective Effect of N-Acetylcysteine, Cafeic Acid and Vitamin E on Doxorubicin Hepatotoxicity. *Human & Experimental Toxicology* 2007; 26: 519-525.
19. Park E, Kim S, Lee M, et al. Protective Effect of Nacetylcysteine and Selenium against Doxorubicin Toxicity in Rats. *Journal of Veterinary Science* 2003; 4 (2): 129-136.
20. Dziegel P, Murawska-Cialowicz E, Jethon Z, et al. Melatonin Stimulates the Activity of Protecive Antioxidative Enzymes in Myocardial Cells of Rats in the Course of Doxorubisin Intoxication. *Journal of Pineal Research* 2003; 35: 183-187.
21. Ayla S, Oktar H, Tanrıverdi G, ve ark. Doksorubisin Nedenli Sıcan Hepatotoksisitesine Nikotinamidin Koruyucu Etkisi. *Anadolu Universitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi* 2009; 10 (1): 229-238.

22. Yağmurca M, Bas O, Mollaoğlu H. Protective Effects of Erdosteine on Doxorubicin-induced Hepatotoxicity in Rats. *Archives of Medical Research* 2007; 38: 380-385.
23. Hirai T, Okumura K, Nishimoto Y, et al. Upregulation of Renal eNOS by High-Sodium Diet Facilitates Hypertension in Doxorubicin-Treated Rats Through Enhanced Oxidative Stress. *Toxicology* 2006; 225 (2-3): 81-89.
24. Iqbal M, Dubey K, Anwer T, et al. Protective Effects of telmisartan Against Acute Doxorubicin – Induced Cardiotoxicity in Rats. *Pharmacological Reports* 2008; 60: 382-390.
25. Narin F, Demir F, Akgun H, ve ark. Doksorubisin ile Olusturulmus Deneysel Kardiyotoksisite ve Kardiyotoksisite Uzerine L-triptofan Etkisi. *Erciyes Tıp Dergisi* 2005; 27(1): 7-16.
26. Singal PK, Iliskovic N, Li T, et al. Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *Faseb J* 1997; 11: 931–936.
27. Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Kelly J, Stohs SJ. Adriamycininduced hepatic and myocardial lipid peroxidation and DNA damage, and enhanced excretion of urinary lipid metabolites in rats. *Toxicology* 1995; 95: 1-9.
28. Durmaz T, Özdemir Ö, Bozkurt E. Antrasiklin kardiyotoksisitesi. *TGKD* 2009; 13 (1): 25-34.
29. Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N. Adriamycin-induced heart failure. mechanism and modulation. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2000; 207: 77–85.
30. Kıyak MV. Doksorubisin Ekstravazasyon Hasarında Pentoksifilinin Etkisi, Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif Ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Edirne 2007: 49.
31. Bachur NR, Gee MV, Friedman RN. Nuclear catalyzed antibiotic free radical formation. *Cancer Res* 1982; 42: 1078–1081.
32. Doroshow JH. Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase. *Cancer Res* 1983; 43: 4543–4551.

33. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, et al. Anthracyclines. Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 185-229.
34. Adıyaman MŞ. Doksorubisin İle Oluşturulmuş Deneysel Kardiyotoksisite Üzerine Alıç'ın Etkisi, Uzmanlık tezi, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ 2011: 74.
35. Sinha BK, Katki AG, Batist G, et al. Adriamycin-stimulated hydroxyl radical formation in human breast tumor cells. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 793-796.
36. Kalyanaraman B, Joseph J, Kalivendi S, et al. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. *Mol Cell Biochem* 2002; 234/235: 119–124.
37. Eliot H, Gianni L, Myers C. Oxidative destruction of DNA by the adriamycin-iron complex. *Biochemistry* 1984; 23: 928-936.
38. Muindi JR, Sinha BK, Gianni L, et al. Hydroxyl radical production and DNA damage induced by anthracycline-iron complex. *Febs Lett* 1984; 172: 226-230.
39. Muindi J, Sinha BK, Gianni L, et al. Thiol-dependent DNA damage produced by anthracycline-iron complexes. The structure-activity relationships and molecular mechanisms. *Mol Pharmacol* 1985; 27: 356-365.
40. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 1033-1077.
41. Singal PK, Segstro RJ, Singh RP, et al. Changes in lysosomal morphology and enzyme activities during the development of adriamycin-induced cardiomyopathy. *Can J Cardiol* 1985; 1: 139-147.
42. Odom AL, Hatwig CA, Stanley JS, Benson AM. Biochemical determinants of Adriamycin toxicity in mouse liver, heart and intestine. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 831–836.
43. Kalyanaraman B, Perez-Reyes E, Mason RP. Spin-trapping and direct electron spin resonance investigations of the redox metabolism of quinone anticancer drugs. *Biochim Biophys Acta* 1980; 630: 119-130.

44. Singal PK, Siveski-Iliskovic N, Hill M, et al. Combination therapy with probucol prevents adriamycin-induced cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 1055-1063.
45. Doroshow JH, Locker GY, Baldinger J, Myers CE. The effect of doxorubicin on hepatic and cardiac glutathione. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1979; 26: 285–295.
46. Olson RD, MacDonald JS, Van Boxtel CJ, et al. Regulatory role of glutathione and soluble sulfhydryl groups in the toxicity of Adriamycin. *J Exp Ther* 1980; 215: 450–454.
47. Billingham ME, Mason JW, Bristow MR, Daniels JR. Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep* 1978; 62: 865–872.
48. Arena E, D'Alessandro N, Dusonchet L, et al. Repair kinetics of DNA, RNA and proteins in the tissues of mice treated with doxorubicin. *Arzneimittel forschung* 1979; 29: 901-902.
49. Monti E, Prosperi E, Supino R, et al. Free radical-dependent DNA lesions are involved in the delayed cardiotoxicity induced by adriamycin in the rat. *Anticancer Res* 1995; 15: 193-197.
50. Bristow MR, Sageman WS, Scott RH, et al. Acute and chronic cardiovascular effects of doxorubicin in the dog: the cardiovascular pharmacology of drug-induced histamine release. *J Cardiovasc Pharmacol* 1980; 2: 487–515.
51. Tong J, Ganguly PK, Singal PK. Myocardial adrenergic changes at two stages of heart failure due to Adriamycin treatment in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1991; 260: 909–916.
52. Gosalvez M, Van Rossum GD, Blanco MF. Inhibition of sodium-potassium-activated adenosine 5V-triphosphatase and ion transport by adriamycin. *Cancer Res* 1979; 39: 257-261.
53. Singal PK, Pierce GN. Adriamycin stimulates low-affinity Ca⁺² binding and lipid peroxidation but depresses myocardial function. *Am J Physiol* 1986; 250: 419-425.
54. Singal PK, Panagia V. Direct effects of adriamycin on the rat heart sarcolemma. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1984; 43: 67-77.

55. Olson HM, Young DM, Prieur DJ, et al. Electrolyte and morphologic alterations of myocardium in adriamycin-treated rabbits. *Am J Pathol* 1974; 77: 439-454.
56. Tokarska-Schlattner M, Wallimann T, Schlattner U. Multiple interference of anthracyclines with mitochondrial creatine kinases: Preferential damage of the cardiac isoenzyme and its implications for drug cardiotoxicity. *Mol Pharmacol* 2002; 61: 516-523.
57. Weinstein DM, Mihm MJ, Bauer JA. Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294: 396-401.
58. Mihm MJ, Yu F, Weinstein DM, et al. Intracellular distribution of peroxynitrite during doxorubicin cardiomyopathy: Evidence for selective impairment of myofibrillar creatine kinase. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 581-588.
59. Pacher P, Liaudet L, Bai P, et al. Potent metalloporphyrin peroxynitrite decomposition catalyst protects against the development of doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Circulation* 2003; 107: 896-904.
60. Wang L, Ma W, Markovich R, et al. Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I. *Circ Res* 1998; 83: 516-522.
61. Sawyer DB, Fukazawa R, Arstall MA, et al. Daunorubicin-induced apoptosis in rat cardiac myocytes is inhibited by dexrazoxane. *Circ Res* 1999; 84: 257-265.
62. Kotamraju S, Konorev EA, Joseph J, et al. Doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and cardiomyocytes is ameliorated by nitron spin traps and ebselen. Role of reactive oxygen and nitrogen species. *J Biol Chem* 2000; 275: 33585-33592.
63. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 1998; 82: 1111-1129.
64. Narula J, Haider N, Virmani R. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 1996; 335: 1182-1189.

65. Narula J, Pandey P, Arbustini E, et al. Apoptosis in heart failure: Release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8144-8149.
66. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M. Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 380–386.
67. Szewczyk A, Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 101–127.
68. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Heart mitochondria: Gates of life and death. *Cardiovasc Res* 2008; 77: 334–343.
69. Cardinali DP, Pagano ES, Scacchi Bernasconi PA, et al. Melatonin and mitochondrial dysfunction in the central nervous system. *Horm Behav* 2013; 63: 322–330.
70. Marin-Garcia J, Michael JG, Gordon WM. Mitochondrial pathology in cardiac failure. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 17–26.
71. Sokolove PM. Interactions of adriamycin aglycones with mitochondria may mediate adriamycin cardiotoxicity. *Int J Biochem* 1994; 26: 1341–1350.
72. Tokarska-Schlattner M, Dolder M, Gerber I, et al. Reduced creatine-stimulated respiration in doxorubicin challenged mitochondria: particular sensitivity of the heart. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1767: 1276–1284.
73. Goormaghtigh E, Chatelain P, Caspers J, et al. Evidence of a complex between adriamycin derivatives and cardiolipin: possible role in cardiotoxicity. *Biochem Pharmacol* 1980; 29: 3003–3010.
74. Goormaghtigh E, Huart P, Brasseur R, et al. Mechanism of inhibition of mitochondrial enzymatic complex I-III by adriamycin derivatives. *Biochim Biophys Acta* 1986; 861: 83–94.
75. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Energy metabolism in heart failure. *J Physiol* 2004; 555: 1–13.
76. Gosalvez M, Blanco M, Hunter J, et al. Effects of anti-cancer agents on the respiration of isolated mitochondria and tumor cells. *Eur J Cancer* 1974; 10: 567–574.

77. Vidal RF, Eksborg S, Sundberg M, et al. Doxorubicin and daunorubicin-induced energy deprivation and nucleotide degradation in isolated cardiomyocytes. *Toxicology* 1996; 114: 1–10.
78. Jeyaseelan R, Poizat C, Wu HY, et al. Molecular mechanisms of doxorubicin-induced cardiomyopathy. Selective suppression of Reiske iron-sulfur protein, ADP/ATP translocase, and phosphofructokinase genes is associated with ATP depletion in rat cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1997; 272: 5828–5832.
79. Sayed-Ahmed MM, Shouman SA, Rezk BM, et al. Propionyl-L-carnitine as potential protective agent against adriamycin-induced impairment of fatty acid beta-oxidation in isolated heart mitochondria. *Pharmacol Res* 2000; 41: 143–150.
80. Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, Silva R, et al. Acute Toxicity of Doxorubicin on Isolated Perfused Heart: Response of Kinases Regulating Energy Supply. *AJP Physiol. Heart Circulatory* 2005; 289: 37-47.
81. Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, Zuppinger C, et al. New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: the critical role of cellular energetics. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 41: 389–405.
82. Abdel-Aleem S, El-Merzabani MM, Sayed-Ahmed M, et al. Acute and chronic effects of adriamycin on fatty acid oxidation in isolated cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 789–797.
83. Kitagawa K, Takeda K, Saito K, et al. Differences in fatty acid metabolic disorder between ischemic myocardium and doxorubicin-induced myocardial damage: assessment using BMIPP dynamic SPECT with analysis by the Rutland method. *J Nucl Med* 2002; 43: 1286–1294.
84. Zhang YW, Shi J, Li YJ. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Arch Immunol Ther Exp* 2009; 57: 435–445.
85. Jennings RB, Ganote CE. Mitochondrial structure and function in acute myocardial ischemia. *Circ Res* 1976; 38 (5 suppl I): 180-191.
86. Salem ML. Immunomodulatory and immunotherapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International Immunopharmacology* 2005; 5(13-14): 1749-1770.

87. Quiles JL, Huertas JR, Battino M, et al. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology* 2002; 180: 79–95.
88. Kaiserova H, Simunek T, Sterba M, et al. New iron chelators in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol* 2007; 7: 145–150.
89. Minotti G, Cairo G, Monti E. Role of iron in anthracycline cardiotoxicity. New tunes for an old song? *Faseb J* 1999; 13: 199-212.
90. Bachur NR, Gordon SL, Gee MV. NADPH cytochrome P-450 reductase activation of quinine anticancer agents to free radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 954–957.
91. Berlin V, Haseltine WA. Reduction of Adriamycin to a semiquinone-free radical by NADPH cytochrome P-450 reductase produces DNA cleavage in a reaction mediated by molecular oxygen. *J Biol Chem* 1981; 256: 4747–4756.
92. Davies KJ, Doroshov JH. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. 1. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *J Biol Chem* 1986; 261: 3060–3067.
93. Olson RD, Mushln PS. Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *Faseb J* 1990; 4: 3076–3086.
94. Cummings J, Willmott N, Smyth J. The molecular pharmacology of doxorubicin in vivo. *Eur J Cancer* 1991; 27: 532-535.
95. Curran CF, Narang PK, Reynolds RD. Toxicity profile of dexrazoxane (Zinecard, ICRF-187, ADR-529, NSC-169780), a modulator of doxorubicin cardiotoxicity. *Cancer Treat Rev* 1991; 18: 241-252.
96. Robison TW, Giri SN. Effects of chronic administration of doxorubicin on heart phospholipase A₂ activity and in vitro synthesis and degradation of prostaglandins in rats. *Prostaglandins Leukotriens Med* 1987; 26: 59-74.
97. Herman EH, Ferrans VJ, Myers CE, et al. Comparison of the Effectiveness of (±)-1,2-Bis (3,5-dioxopiperazinyl-1-yl) propane (ICRF-187) and N-Acetylcysteine in preventing chronic doxorubicin cardiotoxicity in beagles. *Cancer Res* 1985; 45: 276-281.
98. Speyer JL, Green MD, Kramer E, et al. Protective effect of the bispiperazinedione ICRF-187 against doxorubicin-induced cardiac toxicity in women with advanced breast cancer. *N Engl J Med* 1988; 319: 745-752.

99. Siveski-Iliskovic N, Hill M, Chow DA, et al. Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circulation* 1995; 91: 10-15.
100. Li T, Danelisen I, Singal PK. Early changes in myocardial antioxidant enzymes in rats treated with adriamycin. *Mol Cell Biochem* 2002; 232: 19–26.
101. Fogli S, Nier P, Breschi ML. The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage. *Faseb J* 2004; 18: 664-675.
102. Vasquez-Vivar J, Martasek P, Hogg N, et al. Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from Adriamycin. *Biochemistry* 1997; 36: 11293–11297.
103. Kalivendi SV, Kotamraju S, Zhao H, Joseph J, Kalyanaraman B. Doxorubicin-induced apoptosis is associated with increased transcription of endothelial nitric-oxide synthase. Effect of antiapoptotic antioxidants and calcium. *J Biol Chem* 2001; 276: 47266–47276.
104. Garner AP, Paine MJ, Rodriguez-Crespo I, et al. Nitric oxide synthases catalyze the activation of redox cycling and bioreductive anticancer agents. *Cancer Res* 1999; 59: 1929-1934.
105. Doroshow JH, Davies KJ. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *J Biol Chem* 1986; 261: 3068–3074.
106. Ogura R, Sugiyama M, Haramaki N, et al. Electron spin resonance studies on the mechanism of adriamycin-induced heart mitochondrial damages. *Cancer Res* 1991; 51: 3555–3558.
107. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
108. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284: 555-556.
109. Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993; 341: 1251-1254.

110. Didenko VV, Hornsby PJ. Presence of double-strand breaks with single-base 3' overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. *J Cell Biol* 1996; 135: 1369-1376.
111. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391: 43-50.
112. Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 255-260.
113. L'ecuyer T, Sanjeev S, Thomas R, et al. DNA damage is an early event in doxorubicin-induced cardiac myocyte death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: 1273-1280.
114. Liu J, Mao W, Ding B, et al. ERKs/p53 signal transduction pathway is involved in doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells and cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295: 1956-1965.
115. Arola OJ, Saraste A, Pulkki K, et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Res* 2000; 60: 1789-1792.
116. Erdogan Kutanis E. Çocukluk Çağı Akut Lösemilerinde Geç Dönem Antrasiklin Kardiyotoksitesinin Ekokardiyografi, Elektrokardiyografi ve 24 Saatlik Holter Monitörizasyonu ile Değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı İstanbul Bakırköy Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Kliniği Pediatrik Kardiyoloji. İstanbul 2009: 113.
117. Yazıcı C, Köse K. Melatonin: The Antioxidant Power of Darkness. *Health Sciences* 2004; 13 (2): 56-65.
118. Reiter RJ, Tan D, Terron P, Flores LJ, Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochimica Polonica* 2007; 54: 1-9.
119. Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997; 336: 186-195.
120. Moller M, Baeres FM. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res*. 2002; 309 (1): 139-150.
121. Altun A, Vardar A, Altun BU. Melatonin and the cardiovascular system. *Anadolu Kardiyol Derg* 2001; 1: 283-288.

122. Kuş İ, Sarsılmaz M. Pineal bezin morfolojik yapısı ve fonksiyonları. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi 2002; 22: 221-226.
123. Özgüner F, Özcankaya R, Delibaş N, Koyu A, Çalışkan S. Melatonin ve Klinik Önemi. S.D.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 1995, 2 (4): 1-6.
124. Hardeland R, Poeggeler B. Melatonin beyond its classical functions. Open Physiol 2008;1:1–23.
125. Öz E, İlhan MN. Effects of melatonin in reducing the toxic effects of doxorubicin. Molecular and Cellular Biochemistry 2006; 286 (1-2): 11-15.
126. Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. Experientia 1989; 45 (10): 922-932.
127. Palaoğlu ÖS, Beşkonaklı E. Pineal Bez ve Yaşlanma. Turkish Journal of Geriatrics Geriatri 1998; 1: 13-18.
128. Çam A, Erdoğan MF. Melatonin. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2003; 56: 103-112.
129. Topal T, Öter Ş, Korkmaz A. Melatonin ve kanserle ilişkisi. Genel Tıp Derg 2009; 19 (3): 137-143.
130. Brainard GC, Hanifin JP, Greeson JM, et al. Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. The Journal of Neuroscience 2001; 21 (16): 6405-6412.
131. Mollaoğlu H, Özgüner MF. Yaşlanma sürecinde melatoninin rolü. S.D.Ü. Tıp Fak. Derg 2005; 12 (3): 52-56.
132. Touitou Y. Human aging and melatonin. Clinical relevance. Experimental Gerontology 2001; 36: 1083-1100.
133. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. Frontiers in Neuroendocrinology 2004; 25: 177-195.
134. Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: Biologicalrole and clinical relevance. Biomed Pharmacother 2006; 60: 97-108.
135. Vielma JR, Bonilla E, Chacín-Bonilla L, et al. Effects of melatonin on oxidative stress, and resistance to bacterial, parasitic, and viral infections: a review. Acta tropica 2014; 137: 31-38.

136. Namıduru ES, Meram İ, Tarakçıoğlu M. Melatonin. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2001; 2: 139-146.
137. Tamura H, Takasaki A, Taketani T, et al. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle [Review]. *Endocrine journal* 2013; 60 (1): 1-13.
138. Korkmaz A, Reiter RJ, Topal T, et al Melatonin: An established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med* 2009; 15: 43–50.
139. Şener G. Karanlığın Hormonu: Melatonin. *Marmara Eczacılık Dergisi* 2010; 14: 112-120.
140. Coşkun G. ve Özgür H. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 2011; 20 (3): 145-158.
141. Andrabi SA, Sayeed I, Siemen D, Wolf G, Horn TFW. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. *The Faseb Journal* 2004; 18: 869-871.
142. Jou MJ, Peng TI, Reiter RJ, et al. Visualization of the antioxidative effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. *J. Pineal Res* 2004; 37: 55–70.
143. Leon J, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res* 2005; 38: 1-9.
144. Schernhammer ES, Schulmeister K. Melatonin and cancer risk: does light at night compromise physiologic cancer protection by lowering serum melatonin levels? *British Journal of Cancer* 2004; 90: 941-943.
145. Liu X, Chen Z, Chua CC, et al. Melatonin as an effective protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2002; 283 (1): 254-263.
146. Öz E, Erbaş D, Sürücü HS, Düzgün E. Prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity by melatonin. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2006; 282: 31–37.

147. Rezzani R, Rodella LF, Bonomini F, et al. Beneficial effects of melatonin in protecting against cyclosporine A-induced cardiotoxicity are receptor mediated. *Journal of pineal research* 2006; 41 (3): 288-295.
148. Demir F, Narin F, Akgün H, et al. Dokсорubisin ile oluşturulmuş deneysel kardiyotoksosite üzerine melatoninin etkisi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2004; 47: 260-268.
149. Acikel M, Buyukokuroglu ME, Aksoy H, Erdogan F, Erol MK. Protective effects of melatonin against myocardial injury induced by isoproterenol in rats. *Journal of pineal research* 2003; 35 (2): 75-79.
150. Khan MA, Chemical composition and medicinal properties of *Nigella sativa* Linn. *Int. Immunopharmacol* 1999; 1 (7): 15-35
151. Baytop T. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Geçmişte ve Bugün (II. Baskı), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1999: 480.
152. Kaya MS, Kara M, Özbek H. Çörek otu (*Nigella sativa*) tohumunun insan hücrel bağışıklık sisteminin CD3+, CD4+, CD8+ hücreleri ve toplam lökosit sayısı üzerine etkileri. *Genel Tıp Derg* 2003; 13 (3): 109-112.
153. Burits M, Bucar F. Antioxidant Activity of *Nigella sativa* Essential Oil. *Phytother Res* 2000; 14: 323–328.
154. Al-Rowais NA. Herbal medicine in the treatment of diabetes mellitus. *Saudi Med J* 2002; 23: 1327– 1331.
155. Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother Res* 2003;17: 299-305.
156. Ghosheh OA, Houdi AA, Crooks PA. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa* L.). *J. Pharm. Biomed. Anal* 1999; 19: 757-762.
157. Randhawa MA, Alghamdi MS, Maulik SK. The effect of thymoquinone, an active component of *Nigella sativa*, on isoproterenol induced myocardial injury. *Pak J Pharm Sci* 2013; 26 (6): 1215-1219.
158. Badary OA, Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Hamada FMA. The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicology* 2000; 143 (3): 219-226.

159. Abdel-Fattah AFM, Matsumoto K, Watanabe H. Antinociceptive effects of *Nigella sativa* oil and its major component, thymoquinone in mice. *European Journal of Pharmacology* 2000; 400: 89-97.
160. Al-Ghamdi MS. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *Journal of Ethnopharmacology* 2001; 76: 45–48.
161. El-Dakhkhny M, Barakat M, El-Halim M, Aly SM. Effects of *Nigella sativa* oil gastric secretion and ethanol-induced ulcer in rats. *J Ethnopharmacol* 2000; 72: 299-304.
162. Kanter M, Coskun O, Uysal H. The antioxidative and antihistaminic effect of *Nigella Sativa* and its major constituent thymoquinone on ethanol-induced gastric mucosal damage. *Arc Toxicol* 2006; 80: 217-224.
163. Halawani E. Antibacterial activity of thymoquinone and thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and their interaction with some antibiotics. *Advances in Biological Research* 2009; 3 (5-6): 148-152.
164. Salem ML, Hossain MS. Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22: 729-740.
165. Aboul-Ela EI. Cytogenetic studies on *Nigella sativa* seeds extract and thymoquinone on mouse cells infected with schistosomiasis using karyotyping. *Mutat Res* 2002; 516: 11 – 17.
166. Mahmoud MR, El-Abhar HS, Saleh S. The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. *J Ethnopharmacol* 2002; 79: 1-11.
167. Khan MA, Ashfaq MK, Zuberi HS, Mahmood MS, Gilani AH. The in vivo antifungal activity of the aqueous extract from *nigella sativa* seeds. *Phytother Res* 2003; 17: 183-186.
168. Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, et al. Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 7782-7788.
169. Badary OA. Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 1999; 67: 135–142.

170. Kanter M, Demir H, Karakaya C, Özbek H. Gastroprotective activity of *Nigella sativa* L oil and its constituent, thymoquinone against acute alcohol-induced gastric mucosal injury in rats. *World Journal of Gastroenterology* 2005; 11 (42): 6662-6666.
171. Badary OA, Al-Shabanah OA, Nagi MN, Al-Bekairi AM, Almazar MMA. Acute and subchronic toxicity of thymoquinone in mice. *Drug Develop Res* 1998; 44 (2-3): 56-61.
172. El Mezayen R, Marecki JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC. Antiinflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *Int Immunopharmacol* 2006; 6: 1135-1142.
173. Wu D, Meydani M, Leka LS, et al. Effect of dietary supplementation with black currant seed oil on the immune response of healthy elderly subjects. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 536-543.
174. Hosseinzadeh H, Parvardeh S. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. *Phytomedicine* 2004; 11: 56-64.
175. Demirci F, Berber H, İşcan G. Biyokatalizörler yardımıyla p-simen'den timokinon ve benzeri biyoaktif metabolitlerin üretimi, Temel Bilimler Araştırma Grubu (TBAG), Eskişehir, 2008: Proje No: 106T117.
176. Mansour MA, Ginawi OT, El-Hadiyah T, et al. Effects of volatile oil constituents of *Nigella sativa* on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone, *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2001; 110: 239-251.
177. Badary OA, Taha RA, Gamal El-Din AM, Abdel-Wahab MH. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol* 2003; 26 (2): 87-98.
178. El-Dakhkhny M, Madi NJ, Lembert N, Ammon HP. *Nigella sativa* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *J. Ethnopharmacol* 2002; 81: 161– 164.

179. Ragheb A, Attia A, Elbarbry F, Prasad K, Shoker A. Attenuated combined action of cyclosporine a and hyperlipidemia on atherogenesis in rabbits by thymoquinone. *eCAM* 2009; 1-9.
180. Chehl N, Chipitsyna G, Gong Q, Yeo CJ, Arafat HA. Anti-inflammatory effects of the *Nigella sativa* seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells. *HPB (Oxford)* 2009; 1 (5): 373-381.
181. El-Mahmoudy A, Shimizu Y, Shiina T, Matsuyama H, Nikami H, Takewaki T. Macrophage-derived cytokine and nitric oxide profiles in type I and type II diabetes mellitus: Effect of thymoquinone. *Acta Diabetol* 2005; 42: 23-30.
182. Fararh KM, Shimizu Y, Shima T, et al. Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. *Research in Veterinary Science* 2005; 79: 219-223.
183. El-Abhar HS, Abdallah DM, Saleh S. Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. *J. Ethnopharmacol* 2003; 84: 251– 258.
184. Arslan SO, Gelir E, Armutçu F, ve ark. The protective effect of thymoquinone on ethanol-induced acute gastric damage in the rat. *Nutrition Research* 2005; 25: 673-680.
185. Al-Gharably N, Badary O, Nagi MN, et al. Protective effect of thymoquinone against carbontetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Res Commun Pharmacol Toxicol* 1997; 2: 41-50.
186. Nagi MN, Alam K, Badary OA, et al. Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. *Biochem Mol Biol Int* 1999; 47: 153-159.
187. Alsaf MA. Effect of thymoquinone on ethanol-induced hepatotoxicity in Wistar rats. *J of Med Sci* 2007; 7 (7): 1164-1170.
188. Sayed-Ahmed MM, Nagi MN. Thymoquinone supplementation prevents the development of gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34 (5-6): 399-405.

189. Ulu R. Sisplatin Nefrotoksitesinde Thymoquinone'nin Koruyucu Etkisinin Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Nefroloji Bilim Dalı, Elazığ 2011: 26.
190. Al-Majed AA, Al-Omar FA, Nagı MN. Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus *European Journal of Pharmacology* 2006; 543: 40-47.
191. Kanter M. Nigella sativa and Derived Thymoquinone Prevents Hippocampal Neurodegeneration After Chronic Toluene Exposure in Rats. *Neurochem Res* 2008; 33: 579-588.
192. Kırui PK, Cameron J, Benghuzzi HA Tucci, et al. Effects of sustained delivery of thymoquinone on bone healing of male rats. *Biomed Sci Instrum* 2004; 40: 111-116.
193. Budancamanak M, Kanter M, Demirel A, et al. Protective effects of thymoquinone and methotrexate on the renal injury in collagen-induced arthritis. *Arch Toxicol* 2006; 80: 768-776.
194. Maxwell SR. Antioxidant vitamin supplements: update of their potential benefits and possible risks. *Drug Saf* 1999; 21: 253–266.
195. Kuhn MA. Oxygen free radicals and antioxidants. *Am J Nurs* 2003; 103: 58-62.
196. Kanter M, Coskun Ö, Budancamanak M. Hepatoprotective effects of Nigella sativa L and Urtica dioica L on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6684-6688.
197. Mansour MA, Nagı MN, El-Khatib AS, Al-Bekairi AM. Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action. *Cell Biochem Funct* 2002; 20: 143–151.
198. Mansour MA. Protective effects of thymoquinone and esferrioxamine against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in mice. *Life Sciences* 2000; 66 (26): 2583-2591.

199. Hosseinzadeh H, Taiari S, Nassiri-Asl M. Effect of thymoquinone, a constituent of *Nigella sativa* L. on ischemia–reperfusion in rat skeletal muscle, *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2012; 385 (5): 503–508.
200. Hamdy NM, Taha R. Effects of nigella sativa oil and thymoquinone on oxidative stress and neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacology* 2009; 8: 127-134.
201. Al-Enazi MM. Effect of thymoquinone on malformations and oxidative stress-induced diabetic mice. *Pak. J Biol Sci* 2007; 10 (18): 3115-3119.
202. Khan MA, Chen HC, Tania M, Zhang DZ. Anticancer activities of nigella sativa (black cumin), *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2011; 8 (5): 226-232.
203. Islam SN, Begum P, Ahsan T, Huque S, Ahsan M. Immunosuppressive and cytotoxic properties of *Nigella sativa*. *Phytother Res* 2004; 18: 395-398.
204. Peng L, Liu A, Shen Y, et al. Antitumor and anti-angiogenesis effects of thymoquinone on osteosarcoma through the NF- κ B pathway. *Oncol Rep* 2013; 29 (2): 571-578.
205. El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Wani AA. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null yeloblastic leukemia HL-60 cells. *Int. J Cancer* 2005; 117: 409-417.
206. Shorieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *Int J Oncol* 2003; 22: 107-113.
207. Nagi MN, Almakki HA. Thymoquinone supplementation induces quinone reductase and glutathione transferase in mice liver: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Phytother Res* 2009; 23: 1295-1298.
208. Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, et al. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *Int J Oncol* 2004 ; 25 (4): 857-866.

209. Torres MP, Ponnusamy MP, Chakraborty S, et al. Effects of Thymoquinone in the Expression of Mucin 4 in Pancreatic Cancer Cells: Implications for the Development of Novel Cancer Therapies *Mol Cancer Ther* 2010; 9: 1419-1431.
210. Badary OA, Gamal El-Din AM. Inhibitory effects of thymoquinone against 20-methylcholanthrene-induced fibrosarcoma tumorigenesis. *Cancer Detect Prev* 2001; 25: 362-368.
211. Roepke M, Diestel A, Bajbouj K, et al. Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer Biol Ther* 2007; 6 (2): 160-169.
212. Hajhashemi V, Ghannadi A, Jafarabadi H. Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and antiinflammatory drug. *Phytother Res* 2004; 18: 195– 199.
213. El-Mahmoudy A, Matsuyama H, Borgan MA, et al. Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. *Intl J Immunopharmacol* 2002; 2: 1603-1611.
214. Al-Majed AA, Daba MH, Asiri YA, et al. Thymoquinone-induced relaxation of guinea-pig isolated trachea. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2001; 110: 333– 345.
215. Chakravarty N. Inhibition of histamine release from mast cells by nigellone. *Ann Allergy* 1993; 70: 237-242.
216. Bamosa AO, Ali BA, Al-Hawsawi ZA. The effect of thymoquinone on blood lipids in rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 2002; 46 (2): 195-201.
217. Ismail M, Al-Naqeep G, Wei Chan K. Nigella sativa thymoquinone-rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in hypercholesterolemic rats. *Free Radical Biology & Medicine* 2010; 48: 664–672.
218. Kanter M, Meral I, Yener Z, Özbek H, Demir H. Partial regeneration/proliferation of the cells in the islets of langerhans by Nigella sativa L. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Tohoku J Exp Med* 2003; 201: 213-219.

219. Al-Hader A, Aqel M, Hasan Z. Hypoglycemic effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds. *Int J Pharmacog* 1993; 31: 96-100.
220. Meral I, Yener Z, Kahraman T, Mert N. Effect of *N sativa* on glucose concentration, lipid peroxidation, anti-oxidant defence system and liver damage in experimentally induced diabetic rabbits. *J Vet Med* 2001; 48: 593-599.
221. Kanter M, Akpolat M, Aktas C. Protective effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds on beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats: a light and electron microscopic study. *J Mol Hist* 2009; 40: 379–385.
222. El-Mahmoudy A, Shimizu Y, Shina T, et al. Macrophage-derived cytokine and nitric oxide profiles in type I and type II diabetes mellitus: effect of thymoquinone. *Acta Diabetol* 2005; 42: 23-30.
223. Pari L, Sankaranarayanan C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Life Sciences* 2009; 85: 830- 834.
224. Zaoui A, Cherrah Y, Lacaille-Dubois M, et al. Diuretic and hypotensive effects *Nigella sativa* in the spontaneously hypertensive rat. *Therapie* 2000; 55: 379-382.
225. El-Fataty HM. Isolation and structure assignment of an antimicrobial principle from the volatile oil of *Nigella sativa* L. seeds. *Pharmazie* 1975; 30: 109–111.
226. Toama MA, El-Alfy TS, El-Fataty HM. Antimicrobial activity of the volatile oil of *Nigella sativa* Linnaeus seeds. *Antimicrob Agents and Ch* 1974; 6 (2): 225-226.
227. Hanafy MS and Hatem ME. Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). *J Ethnopharmacol* 1991; 34: 275-278.
228. Aljabre SHM, Randhawa MA, Akhtar N, et al. Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 101: 116-119.
229. Akhtar N, Alakloby OM, Aljabre SHM, Alqurashi ARM, Randhawa MA. Comparison of antifungal activity of thymoquinone and amphotericin b

- against *Fusarium solani* in vitro. *Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences)* 2007; 8 (2): 137-143.
230. Mahgoub AA. Thymoquinone protects against experimental colitis in rats. *Toxicology Letters* 2003; 143: 133-143.
231. Al-Naggar TB, Gomez-Serranillos MP, Carretero ME, Villar AM. Neuropharmacological activity of *Nigella sativa* L. extracts. *J Ethnopharmacol* 2003; 88: 63-68.
232. Işık AF, Katib I, Bayram I, Ozbek H. A new agent for treatment of acute respiratory distress syndrome: thymoquinone. An experimental study in a rat model. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 2005; 28: 301–305.
233. El Gazzar M, El Mezayen R, Marecki JC, et al. Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *International Immunopharmacology* 2006; 6: 1135-1142.
234. El Gazzar M, El Mezayen R, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC. Downregulation of leukotriene biosynthesis by thymoquinone attenuates airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760 (7): 1088-1095.
235. Badary OA, Nagi MN, Al-Shabanah OA, et al. Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75 (12): 1356-1361.
236. Hadjzadeh MAR, Mohammadian N, Rahmani Z, Rassouli FB. Effect of thymoquinone on ethylene glycol-induced kidney calculi in rats. *Urol J* 2008; 5 (3): 149-55.
237. Fouda AM, Daba MH, Dahab GM, Sharaf El-Din OA. Thymoquinone ameliorates renal oxidative damage and proliferative response induced by mercuric chloride in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103: 109-118.
238. Sener U, Uygur R, Aktas C, Uygur E, et al. Protective effects of thymoquinone against apoptosis and oxidative stress by arsenic in rat kidney. *Ren Fail* 2016; 38 (1): 117-123.
239. Erboga M, Kanter M, Aktas C, et al. Thymoquinone Ameliorates Cadmium-Induced Nephrotoxicity, Apoptosis, and Oxidative Stress in Rats is

- Based on its Anti-Apoptotic and Anti-Oxidant Properties. *Biol Trace Elem Res* 2016;170 (1): 165-72.
240. El Tahir KE, Ashour MM, Al-Harbi MM. The cardiovascular actions of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in rats: elucidation of the mechanism of action. *Gen Pharmacol* 1993; 24: 1123-1131.
241. Enomoto S, Asano R, Iwahori Y, et al. Hematological studies on black cummin oil from the seeds of *Nigella sativa* L. *Biol Pharm Bull* 2001; 24 (3): 307-310.
242. Mohany M, El-Feki M, Refaat I, Garraud O, Badr G. Thymoquinone ameliorates the immunological and histological changes induced by exposure to imidacloprid insecticide. *J Toxicol Sci* 2012; 37 (1): 1-11.
243. Daba MH, Abdel-Rahman MS. Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Lett* 1998; 95: 23–29.
244. Nagi MN, Almakki HA, Sayed-Ahmed MM, Al-Bekairi AM. Thymoquinone supplementation reverses acetaminophen-induced oxidative stress, nitric oxide production and energy decline in mice liver. *Food and Chemical Toxicology* 2010; 48: 2361–2365.
245. Zafeer MF, Waseem M, Chaudhary S, Parvez S. Cadmium-induced hepatotoxicity and its abrogation by thymoquinone. *J Biochem Mol Toxicol* 2012; 26 (5): 199-205.
246. Ayçan İÖ, Tüfek A, Tokgöz O, et al. Thymoquinone treatment against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Int J Surg* 2014; 12 (3): 213–218.
247. Mabrouk A, Bel Hadj Salah I, Chaieb W, Ben Cheikh H. Protective effect of thymoquinone against lead-induced hepatic toxicity in rats. *Environ Sci Pollut Res Int* 2016; 23 (12): 12206-12215.
248. Umar S, Zargan J, Umar K, et al. Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats. *Chem Biol Interact* 2012; 197 (1): 40-46.
249. Vaillancourt F, Silva P, Shi Q, et al. Elucidation of molecular mechanisms underlying the protective effects of thymoquinone against rheumatoid arthritis. *J Cell Biochem* 2011; 112 (1): 107-117.

250. Wirries A, Schubert AK, Zimmermann R, et al. Thymoquinone accelerates osteoblast differentiation and activates bone morphogenetic protein-2 and ERK pathway. *Int Immunopharmacol* 2013; 15 (2): 381-386.
251. Shuid AN, Mohamed N, Mohamed IN, et al. Nigella sativa: A Potential Antiosteoporotic Agent. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; : 1-6.
252. Kara MI, Erciyas K, Altan AB, et al. Thymoquinone accelerates new bone formation in the rapid maxillary expansion procedure. *Arch Oral Biol* 2012; 57 (4): 357-363.
253. Faisal R, Chiragh S, Popalzai AJ, Rehman KU. Anti inflammatory effect of thymoquinone in comparison with methotrexate on pristane induced arthritis in rats. *J Pak Med Assoc* 2015; 65 (5): 519-25.
254. Al-Ali A, Alkhawajah AA, Randhawa MA, Shaikh NA. Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of Nigella sativa, in mice and rats. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2008; 20: 252-257.
255. Elberry AA, Abdel-Naim AB, Abdel-Sattar EA, et al. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology* 2010; 48: 1178–1184.
256. Jensen RA, Acton EM, Peters JH. Doxorubicin Cardiotoxicity in the Rat: Comparison of Electrocardiogram, Transmembrane Potential, and Structural Effects. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1984; 6 (1): 136-200.
257. Xin YF, Zhou GL, Deng ZY, et al. Protective effect of *Lycium barbarum* on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Phytotherapy Research* 2007; 21 (11): 1020-1024.
258. Naidu MU, Kumar KV, Mohan IK, Sundaram C, Singh S. Protective effect of *Gingko biloba* extract against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Indian J Exp Biol.* 2002; 40 (8): 894-900.
259. Kelishomi RB, Ejtemaemehr S, Tavangar SM, et al. Morphine is protective against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rat. *Toxicology* 2008; 243 (1-2): 96-104.

260. Jiang B, Zhang L, Wang Y. Tanshinone IIA sodium sulfonate protects against cardiotoxicity induced by doxorubicin *in vitro* and *in vivo*. Food and Chemical Toxicology 2009; 47 (7): 1538-1544.
261. Van Acker S.A, Kramer K, Grimbergen J.A, et al. Monohydroxyethylrutoside as protector against chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity. British Journal of Pharmacology (1995) 115, 1260-1264.
262. Van Acker SA, Kramer K, Voest EE, et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity monitored by ECG in freely moving mice A new model to test potential protectors. Cancer Chemother Pharmacol 1996; 38: 95-101.
263. Mantawy EM, El-Bakly WM, Esmat A, Badr AM, El-Demerdash E. Chrysin alleviates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis. European Journal of Pharmacology 2014; 728: 107-118.
264. Mulchahey JJ, Goldwater DR, Zemlan FPA. Single blind, placebo controlled, across groups dose escalation study of the safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of the melatonin analog h-methyl-6-chloromelatonin. Life Sciences 2004; 75: 1843–1856.
265. Gilbert SS, Van Den Heuvel CJ, Dawson D. Daytime melatonin and temazepam in young adult humans: equivalent effects on sleep latency and body temperatures. Journal of Physiology 1999; 514: 905–914.
266. Patel V, Upaganlawar A, Zalawadia R, Balaraman R. Cardioprotective effect of melatonin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats: A biochemical, electrocardiographic and histoarchitectural evaluation. Cardiovascular Pharmacology. European Journal of Pharmacology 2010; 644: 160-168.
267. Burgess HJ, Sletten T, Savic N, Gilbert SS, Dawson D. Effects of bright light and melatonin on sleep propensity, temperature, and cardiac activity at night. Journal of Applied Physiology 2001; 91: 1214-1222.
268. Bosnian H, Dormehl IC, Hugo N, Redelinghuys IF, Theron JJ. The effect of intravenous administration of melatonin on cardiovascular parameters of the baboon (*Papio ursinus*). J Pineal Res 1991; 11: 179–181.

269. Chuang JI, Chen SS, Lin MT. Melatonin decreases brain serotonin release, arterial pressure and heart rate in rats. *Pharmacology* 1993; 47 (2): 91-97.
270. Campos LA, Cipolla-Neto J, Michelini LC. Melatonin modulates baroreflex control via area postrema. *Brain and Behavior* 2013; 3(2): 171–177.
271. Demir H, Kanter M, Coskun O ve ark. Effect of Black Cumin (*Nigella sativa*) on Heart Rate, Some Hematological Values, and Pancreatic β -Cell Damage in Cadmium-Treated Rats. *Biological Trace Element Research* 2006; 110: 152-162.
272. Xu M and Ashraf M. Melatonin Protection Against Lethal Myocyte Injury Induced by Doxorubicin as Reflected by Effects on Mitochondrial Membrane Potential. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 75–79.
273. Othman AI, El-Missiry MA, Amer MA, Arafa M. Melatonin controls oxidative stress and modulates iron, ferritin, and transferrin levels in adriamycin treated rats. *Life Sciences* 2008; 83: 563–568.
274. Galano A, Tan DX, Reiter RJ. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J Pineal Res* 2013; 54 (3): 245-257.
275. García JJ, López-Pingarrón L, Almeida-Souza P, et al. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review. *J Pineal Res* 2014; 56 (3): 225-237.
276. Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res* 2013; 54 (1): 1-14.
277. Ojha S, Azimullah S, Mohanraj R, et al. Thymoquinone protects against myocardial ischemic injury by mitigating oxidative stress and inflammation. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015; 1-12.
278. Yücel D, Şeneş M, Topkaya BÇ, Zengi O. Oxidative/Nitrosative stress in chronic heart failure: A critical review. *Turk J Biochem* 2006; 31 (2): 86–95.

279. Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 1997; 60: 2255-2271.
280. Noda Y, Mori A, Liburdy R, Packer L. Melatonin and its precursors oxide. *J. Pineal Res* 1999; 27: 159-163.
281. Sarvazyan NA1, Askari A, Huang WH. Effects of doxorubicin on cardiomyocytes with reduced level of superoxide dismutase. *Life Sci* 1995; 57 (10): 1003-1010.
282. Agarkov AA, Popova TN, Matasova LV. The effect of melatonin on the antioxidant status of rats with type II diabetes mellitus. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry* 2012; 6 (3): 231–236.

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Mardin'in Savur ilçesinde doğdum. İlk ve ortaokulu Mardin'in Kızıltepe ilçesinde tamandıktan sonra 2004 yılında Kızıltepe Anadolu Lisesi'nden mezun oldum. 2005 yılında Selçuk Üniversitesi Hemşirelik bölümünde eğitimime başladım. 2009 senesinde mezun olduktan sonra 2010 yılında İzmir Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesine hemşire ünvanı ile atandım. Yine aynı yıl Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne atanarak iki sene görev yaptım. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. Atatürk Üniversitesi'nden mezun olmadan, 2013 yılında İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'na yüksek lisans kabul edildim. 2014 senesinin Şubatından bu yana aynı bölümde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmakta ve eğitimimi sürdürmekteyim.