

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

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

**GÜLÇİN DURDAĞI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Eser ÖZ OYAR**

**ORTAK DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa ÖZBEK**

2017 – İZMİR

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

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

**GÜLÇİN DURDAĞI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Eser ÖZ OYAR**

**ORTAK DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa ÖZBEK**

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

2017 – 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: 04/01/2017

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Eser ÖZ OYAR
(İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Ahmet KOYU
(İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi)

Üye: Doç. Dr. Gökhan CESUR
(Adnan Menderes Üniversitesi)

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

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde engin bilgileri, görüş ve önerileriyle yol göstericim olan, yüksek lisans eğitimim boyunca katkı ve yardımlarıyla ilerlememi sağlayan, her anlamda desteğini hissettiğim saygı değer tez danışmanım Prof. Dr. Eser ÖZ OYAR'a; Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet KOYU'ya; çalışma sürecinde tecrübe ve bilgilerini benimle paylaşarak çalışmamın ilerlemesine büyük katkı sağlayan ortak danışmanım Prof. Dr. Mustafa ÖZBEK'e, yardımlarını benden esirgemeyen saygı değer hocalarım Doç. Dr. Selen BAHÇECİ ve Doç. Dr. Mustafa TÖZÜN'e; eğitimim süresince her konuda yardımını ve desteğini aldığım, değerli dostum ve çalışma arkadaşım Arş. Gör. Deniz YILDIZ PEHLİVAN'a; araştırmamın yürütülmesinde izin ve desteklerinden dolayı Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı çalışanlarına; 2015-ÖNP-TIPF-0016 nolu projenin gerçekleşmesi için destek veren Kâtip Çelebi Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne; gelişmem ve yetişmemde sonsuz katkıları olan, bu günlere gelebilmemde emeklerinin karşılığını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim değerli aileme ve hayatımın her alanında yanımda olan sevgili yol arkadaşımaya sonsuz saygı ve şükranlarımı sunar, teşekkür ederim.

Gülçin DURDAĞI

İZMİR, 2017

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	2
2.1. Doksorubisin	2
2.1.1. Tanımı, Klinik Kullanımı ve Biyokimyasal Yapısı	2
2.1.2. Etki Mekanizması	2
2.1.3. Metabolizması ve Farmakokinetikleri	4
2.1.4. Oluşturduğu Yan Etkiler	5
2.1.4.1. Doksorubisin ve Kardiyotoksisite	6
2.1.4.1.1. Doksorubisin Kardiyotoksisitesinin Klinik Tipleri	7
2.1.4.2. Histopatolojik Değişiklikler	8
2.1.4.3. Doksorubisinle Serbest Radikal Oluşumu ve Oksidatif Stres	9
2.1.4.4. Apoptoz	10
2.2. Melatonin	11
2.2.1. Melatoninin Biyosentez ve Metabolizması	12
2.2.2. Melatonin Salınımının Düzenlenmesi	14
2.2.3. Melatonin Reseptörleri	14
2.2.4. Melatoninin Etki Mekanizmaları	15
2.2.4.1. Oksidatif Stres Üzerine Etkisi	15
2.2.4.2. Apoptoz Üzerine Etkisi	16
2.2.4.3. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi	17
2.3. Adrenomedullin	18

2.3.1. Tarihçe	18
2.3.2. Moleküler Özelliği	18
2.3.3. Biyosentezi ve Metabolizması	19
2.3.4. Dokulardaki Dağılımı	20
2.3.4.1. Adrenomedullin Peptidinin Dağılımı	20
2.3.4.2. Adrenomedullin mRNA'sının Doku Ekspresyonu	21
2.3.5. Plazma Seviyesini Etkileyen Faktörler	22
2.3.5.1. İnflamatuvar Sitokinler	22
2.3.5.2. Hümorale Faktörler	22
2.3.5.3. Mekanik ve Metabolik Etkiler	22
2.3.6. ADM Reseptörleri	23
2.3.7. Adrenomedullin ve Vasküler Etkileri	24
2.3.8. Adrenomedullin ve Kardiyovasküler Sistem	25
2.3.9. Adrenomedullinin Kardiyovasküler Hastalıklardaki Rolü	25
2.3.9.1. Hipertansiyon	26
2.3.9.2. Ateroskleroz	26
2.3.9.3. Akut Miyokardiyal İnfarktüs	26
2.3.9.4. Kalp Yetmezliği	27
2.3.10. Adrenomedullin ve Oksidatif Stres	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM	29
3.1. Deney Kurgusu	29
3.1.1. Deney Hayvanları	29
3.1.2. Laboratuvar Koşulları	29
3.1.3. Uygulanan Kimyasallar	29
3.1.4. Çalışma Planı	30
3.2. Analiz Yöntemleri	31
3.2.1. Anestezi ve Numunelerin Toplanması	31
3.2.2. Sayısal EKG Kayıtlarının Eldesi	32
3.2.3. Doku Takibi ve Dokuların Parafine Gömülmesi	33
3.2.4. Parafin Bloklardan Kesit Alma	33
3.2.5. Kesitlerin Boyanması	34
3.2.6. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi	35

3.2.7. İstatistiksel Analiz	39
4. BULGULAR	40
4.1. EKG Bulguları	40
4.2. Histoloji Bulguları	40
4.3. Biyokimya Bulguları	59
5. TARTIŞMA	62
5.1. Elektrokardiyografi Bulgularının Değerlendirilmesi	62
5.2. Histoloji Bulgularının Değerlendirilmesi	63
5.3. Biyokimya Bulgularının Değerlendirmesi	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
ÖZET	68
ABSTRACT	69
KAYNAKLAR	70
EKLER	93
EK 1.	
EK 2.	
ÖZGEÇMİŞ	95

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

- AANAT: Aralkilaminn N-asetiltransferaz
ADM: Adrenomedullin
AFMK: N1-asetil-N2-formil-5-metoksi knüramin
AMBP-1: Adrenomedullin bağlayıcı protein-1
Ang II: Anjiotensin II
ANP: Atriyal natriüretik peptit
AST: Aspartat aminotransferaz
ATP: Adenozin trifosfat
A-V: Atriyoventriküler düğüm
Ca⁺⁺ : Kalsiyum
cAMP: Siklik adenozin monofosfat
CAT: Katalaz
cGMP: Siklik guanozin monofosfat
CGRP: Kalsitonin gen ilişkili peptit
CK-MB: Kreatin kinaz miyokardiyal bant
CRLR: Kalsitonin reseptörü benzeri reseptör
CsA: Siklosporin A
DNA: Deoksiribonükleik asit
DXR: Doksorubisin
EKG: Elektrokardiyografi
eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz
ET-1: Endotelin-1
FADD: Fas reseptörü ile ilişkili ölüm alanı proteini
Fe⁺ : Demir
G6PD: Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz
GCS: Süperior servikal ganglion
GR: Glutasyon redüktaz
GSH-Px: Glutasyon peroksidaz
GSH-Rd: Glutasyon redüktaz

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini (Devamı)

- GSSG: Okside glutatyon
H&E: Hematoksilen-Eosin
H₂O₂: Hidrojen peroksit
H₂SO₄: Sülfürik asit
HIF-1 α : Hipoksiyle indüklenebilir faktör
HIOMT: Hidroksiindol-O-metiltransferaz
IF- γ : İnterferon gama
IL-1: İnterlökin-1
IL-1 α : İnterlökin-1 alfa
IL-1 β : İnterlökin-1 beta
IL-6: İnterlökin-6
IL-18: İnterlökin-18
i.p: İnterperitoneal
ir-ADM: İmmünoreaktif-ADM
ISP: İzoproterenol
i.v: İntravenöz
K⁺: Potasyum
LPS: Lipopolisakkarit
MDA: Malondialdehit
MEL: Melatonin
mPTP: Mitokondriyal permeabilite transisyon poru
MTP: mikondriyal geçiş poru
mtDNA: Mitokondrial DNA
NAD: Nikotinamid adenin dinükleotit
NAT: N-asetiltransferaz
NO: Nitrik oksit
NOS: Nitrik oksit sentaz
NPV: Paraventrikular nukleus
NSC: Suprakiazmatik nukleus
O₂: Moleküler oksijen

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini (Devamı)

- O₂^{·-}: Süperoksit radikali
OH[•]: Hidroksil radikali
p53: Protein 53
PAMP: Proadrenomedullin N-terminal 20 peptit
PAN: Puromisin amino nükleotit
PKA: Protein kinaz A
ProADM: Proadrenomedullin
PUFA: Poli doymamış yağ asidi
QTc: Düzeltilmiş QT
RAMP: Reseptör aktivite düzenleyeci protein
RNA: Ribonükleik asit
RCP: Reseptör komponent protein
ROS: Reaktif oksijen türleri
SF: Serum fizyolojik
SOD: Süperoksit dismutaz
SS: Standart sapma
SSG: Süperior servikal ganglion
TAS: Total antioksidan seviye
TGF- β 1: Dönüştürücü büyüme faktörü- β 1
TNF- α : Tümör nekroz faktör alfa
TNF- β : Tümör nekroz faktör beta
Tn-I: Troponin-I
TOS: Total oksidan seviyesi
TPA: Doku plazminojen aktivatörü
TRH: Retino-hipotalamik-traktus
VIP: vazoaktif intestinal peptid

Şekiller Dizini

Şekil 1: Doksorubisinin yapısı

Şekil 2: Doksorubisinin moleküler oksijen ile etkileşime girip süperoksit iyonu ve hidrojen peroksit oluşumuna neden olarak DNA zincirinde kırılmalara yol açması

Şekil 3: Melatoninin kimyasal yapısı

Şekil 4: Melatoninin pinealositlerde sentez ve salgılanması

Şekil 5: Pinealosit içerisinde melatonin üretimini kontrol mekanizması

Şekil 6: Melatoninin antioksidan fonksiyonu

Şekil 7: Adrenomedullin molekülünün yapısı

Şekil 8: ADM Reseptörleri

Şekil 9: Adrenomedullinin vazodilatasyon mekanizmaları

Resimler Dizini

- Resim 1:** Kontrol grubu sol ventrikül normal doku görünümü
- Resim 2:** Kontrol grubu sol ventrikül normal doku görünümü
- Resim 3:** DXR grubunda meydana gelen hasar görüntüsü
- Resim 4:** DXR grubunda meydana gelen hasar görüntüsü
- Resim 5:** DXR grubunda meydana gelen hasar görüntüsü
- Resim 6:** DXR grubunda meydana gelen hasar görüntüsü
- Resim 7:** DXR grubunda meydana gelen hasar görüntüsü
- Resim 8:** : DXR+MEL grubu sol ventrikül dokusunun görünümü
- Resim 9:** DXR+MEL grubu sol ventrikül dokusunun görünümü
- Resim 10:** DXR+MEL grubu sol ventrikül dokusunun görünümü
- Resim 11:** DXR+ADR grubu dokusunda meydana gelen değişim
- Resim 12:** DXR+ADR grubu dokusunda meydana gelen değişim
- Resim 13:** DXR+ADR grubu dokusunda meydana gelen değişim
- Resim 14:** DXR+ADR grubu dokusunda meydana gelen değişim
- Resim 15:** Kontrol grubu sağ ventrikül doku görünümü
- Resim 16:** Kontrol grubu sağ ventrikül doku görünümü
- Resim 17:** DXR grubu sağ ventrikülde meydana gelen patolojiler
- Resim 18:** DXR grubu sağ ventrikülde meydana gelen patolojiler
- Resim 19:** DXR grubu sağ ventrikülde meydana gelen patolojiler
- Resim 20:** DXR grubu sağ ventrikülde meydana gelen patolojiler
- Resim 21:** DXR grubu sağ ventrikülde meydana gelen patolojiler
- Resim 22:** DXR+MEL grubu sağ ventrikül doku görüntüsü
- Resim 23:** DXR+MEL grubu sağ ventrikül doku görüntüsü
- Resim 24:** DXR+MEL grubu sağ ventrikül doku görüntüsü
- Resim 25:** DXR+ADR grubu sağ ventrikül dokusunda meydana gelen değişimler
- Resim 26:** DXR+ADR grubu sağ ventrikül dokusunda meydana gelen değişimler
- Resim 27:** DXR+ADR grubu sağ ventrikül dokusunda meydana gelen değişimler
- Resim 28:** DXR+ADR grubu sağ ventrikül dokusunda meydana gelen değişimler
- Resim 29:** DXR+ADR grubu sağ ventrikül dokusunda meydana gelen değişimler
- Resim 30:** DXR+ADR grubu sağ ventrikül dokusunda meydana gelen değişimle

Tablolar Dizini

Tablo 1: Adrenomedullinin dokulardaki dağılımı

Tablo 2: Kullanılan kimyasal maddeler ve uygulama günleri

Tablo 3: Grupların EKG parametre değerleri

Tablo 4: Hayvanların sol kalpte oluşan histopatolojik hasar derecesine göre dağılımı

Tablo 5: Sol kalpteki histopatolojik hasar skorlarının ortalama değerleri

Tablo 6: Hayvanların sağ kalpte oluşan histopatolojik hasar derecesine göre dağılımı

Tablo 7: Sağ kalpteki histopatolojik hasar skorlarının ortalama değerleri

Tablo 8: Dokuda ölçülen biyokimyasal parametre değerleri

1. GİRİŞ

Doksorubisin (DXR); kemoterapide kullanılan ilk antrasiklin antibiyotiktir (1). DXR'ın en ciddi yan etkisi serbest radikallere bağılı olarak ortaya çıkan kalıcı ve doza bağımlı kardiyotoksik etkidir (2).

İlacın kalp kasında toksik etkiler oluşturmasının altında yatan nedenlerin serbest radikal oluşumu, antioksidan enzimlerde azalma, lipid peroksidasyonunda artma, mitokondriyal işlev bozukluğu, apopitoz, miyofibriler bozukluk, protein sentezinin inhibisyonu ve kalbe özgü genlerin ekspresyonunda azalma gibi mekanizmalar olduğu ileri sürülmüştür (3-6).

DXR ile indüklenen kardiyomiyopatiye karşı koruma sağlamak amacıyla değişik antioksidanlar üzerinde araştırmalar yapılmaktadır. Şimdiye dek çalışılmış ve önem görmüş antioksidanlardan biri de pineal bez hormonu melatonin (MEL)'dir. Potent antioksidan özelliğinin yanında mitokondriyal enerji metabolizmasını düzenlediği (7) ve anti-apopitotik özellikte olduğu dile getirilmiştir (8).

DXR ile uyarılan kardiyotoksisiteyi engellemek adına değişik doğal antioksidanlardan faydalanmayı amaçlayan çalışmalar sürmektedir. Bu hususta etkili olabileceği düşünülen ajanlardan biri de adrenomedullin (ADM)'dir. Vazoaktif etkilerinden farklı olarak ADM'nin endotel hücrelerinde apopitozu önlediği gösterilmiştir (9). Yine endotel hücreleri (10), damar düz kas hücreleri (11) ve podositlerde (12) oksidatif strese bağılı hasardan hücreleri koruduğu bildirilmiştir. ADM'in oksidatif stresi baskılayarak kalp hasarını da önleyebileceği ileri sürülmüştür (13). Ayrıca kalp kası hücrelerini iskemi/reperfüzyon hasarından anti-apopitotik etkiyle koruduğu bulunmuştur (14). Ek olarak adrenomedullinin kalp kası hücrelerinde DXR ile oluşturulan apopitozu cAMP-bağımlı bir mekanizma ile baskıladığı rapor edilmiştir (15).

Çalışmamızda DXR ile oluşturulan kardiyotoksisite üzerine adrenomedullinin etkilerinin incelenmesi ve bu etkilerin melatonin gibi iyi bilinen bir antioksidan ile kardiyak hasarı önleyici etkisi açısından kıyaslanması hedeflenmiştir.

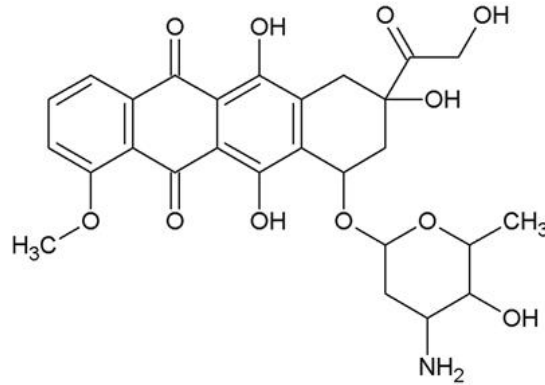
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Doksorubisin

2.1.1. Tanımı, Klinik Kullanımı ve Biyokimyasal Yapısı

Doksorubisin (DXR, 14-hidroksidaunorubisin), ticari olarak adriamisin diye de anılan antrasiklin türevidir, geniş spektrumlu antitümöral etkiye sahip, antibiyotik niteliğinde bir ajandır. Yapısında kuinon bulunan bu antibiyotik molekülün formülü $C_{27}H_{29}NO_{11}HCl$, molekül ağırlığı 579,98 g/mol, yarılanma süresi 12-18,5 saattir (16). Antrasiklinler bir mantar türü olan *Streptomyces peucetius variete caesiu* kültüründen üretilmiştir (2, 17, 18).

Antrasiklin molekülü, ilaca kırmızı renk veren tetrasiklik çekirdek ile ona glikosidik bir bağ ile bağlı bir aminoglikoz grubundan (daunosamin) oluşur (19). Antrasiklin grubunun bütün üyeleri tetrasiklik halkaya komşu kinon ve hidrokinon grupları içermektedirler. Doksorubisin, hidroksi türevidir olduğu Daunorubicin molekülündeki 14. karbonun hidroksil grubu alması ile meydana gelir (20, 21).



Şekil 1. Doksorubisinin yapısı (22)

Doksorubisin, kemoterapide kullanılan ilk antrasiklin antibiyotiktir (1). Akut lenfositik ve myeloid lösemiler, Wilms tümörü, akciğer, mide, safra kanalı, pankreas, mesane, göğüs, prostat, over, endometrium, serviks, tiroid, testis, baş-boyun ve skuamöz hücreli cilt kanserleri, over, testis, tiroid ve akciğer kanserlerinde, lösemi, lenfoma, nöroblastom, hepatoblastom, Ewing sarkomu, rabdomiyosarkom, yumuşak doku sarkomları, kemik sarkomları olmak üzere çeşitli kanserlerin tedavisinde

önemli klinik uygulaması olan ve kullanımda hâlâ ilk sırada yer alan en önemli antitümör ilaçlardandır (1, 4, 23, 24).

2.1.2. Etki Mekanizması

Doksorubisin hücrede 4 farklı şekilde etki gösterir (25):

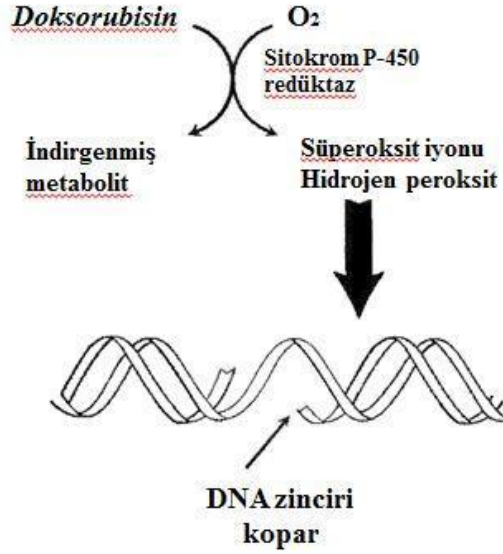
a. DNA'ya bağlanma: Doksorubisin, DNA çift zincirini, zincir içerisindeki komşu guanozin-sitozin baz çiftleri arasına enine yerleşerek etki gösterir. Aynı DNA çift-zincirinde birçok noktada olan bu yerleşim komşu baz çiftlerinin birbirinden uzaklaşmasına, zincirin uzamasına ve sarmallığın azalmasına sebep olur. Bunun sonucunda DNA'nın replikasyonu ve transkripsiyonu inhibe edilir. Ayrıca DNA'da tamir edilemeyen tek ve çift zincir kırılmalarına yol açar (26-29). Bundan ötürü mutajenik ve teratojenik etki gösterirler (20, 27, 30).

b. DNA ve RNA polimerazların inhibisyonu: DNA ve RNA polimerazların işlevlerini baskılayarak DNA replikasyonunu ve RNA transkripsiyonunu bozar. Döneme özgü olmayan bir antineoplastik ilaçtır; ancak doksorubisinin S (DNA sentezi veya replikasyon dönemi) dönemindeki hücrelerde etkinliğinin daha fazla olduğu da söylenmektedir (28, 31).

c. Akışkanlık ve iyon geçişini değiştirmek üzere hücre zarına bağlanma: Hücre membranı ile etkileşime girerek serbest radikallerin oluşumuna sebep olur. Oluşan serbest radikaller lipid peroksidlerinin meydana gelmesine ve membran fonksiyonlarının değişmesine yol açar. Lipid peroksidlerinin oluşması, malondialdehit (MDA) seviyelerini artırır (23, 24, 32). Lipid peroksidasyonu, membran potansiyeli ve akışkanlığında azalmaya sebep olur. Membranın iyon geçirgenliğinde artışa ve bunun sonucunda hücre ölümüne neden olur (33).

d. Serbest radikal oluşturma: Mikrozomlarda hücre nükleusunun membranında yer alan sitokrom P-450 redüktaz enzimi antrasiklinlerin semikinon serbest radikallerine indirgenmesine neden olan reaksiyonu katalizler. Semikinon radikali oksijen ile tepkimeye girerek DNA zincirini parçalayan süperoksit iyonlarını oluşturur. Oluşan O_2^- , H_2O_2 ve $OH\cdot$ oluşumuna sebebiyet verir. Bunun sonucunda

hücre DNA'sında kimyasal ve oksidatif hasar oluşur (20, 34, 35). Sonuç olarak doksorubisinin kimyasal yapısı serbest radikallerin oluşum hızı ile savunma sistemlerinin gücü arasındaki dengenin bozulmasıyla ortaya çıkan 'oksidatif stresi' arttırarak serbest radikallerin oluşmasına yol açarak hücre hasarına neden olur (36).



Şekil 2. Doksorubisinin moleküler oksijen (O₂) ile etkileşime girip süperoksit iyonu ve hidrojen peroksit oluşumuna neden olarak DNA zincirinde kırılmalara yol açması (37)

2.1.3. Metabolizması ve Farmakokinetikleri

Gastrointestinal sistemde iyi absorbe edilememesi oral yolla, çevre dokulara sızarak doku nekrozuna sebep olması intramuskuler ve subkutan kullanımını engeller. Bu yüzden sadece intravenöz (i.v.) olarak uygulanır. İntravenöz uygulamadan sonra hızla parçalanır. Bu parçalanma sonucunda ana bileşikten daha az aktif Doksorubisinol ve Daunorubisinol oluşur (24, 38).

İntravenöz uygulamadan sonra kalp, karaciğer, dalak, miyokart gibi dokularda birikir ve buralarda plazmadan 5-10 kat daha yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Tümör dokusu en yüksek doku konsantrasyonunu barındırır (39).

Dokulara fazla bağlanır ve oradan yavaş salınır, bu nedenle karaciğerde hızlı metabolize edilmesine karşın vücutta kalışı ve etkisi uzun sürer. Herhangi bir nedenden ötürü karaciğer fonksiyonu bozulmuşsa eliminasyonu yavaşlar ve dozu azaltılmazsa vücutta birikme yapar (40). Karaciğer ve böbrekten atılır. Karaciğerde biyotransformasyona uğrar, safradan ekskresyonla doksorubisinol ve daunorubisinol olarak atılır. Karaciğerde önce indirgenir, ardından karbonil kökü ayrılır. Böbreklerde ise önce karbonil kökü ayrılır, sonra indirgenme meydana gelir (41). Esas olarak karaciğerden safra yoluyla elimine edilmesine karşın, az bir miktarı da idrarla (% 3-10) ve dışkıyla (%40-50) atılır. Dışkıyla atılan kısmı değişmemiş, ilaç şeklinde iken; Böbreklerden atılımı ise ilaç uygulanmasından 1-2 gün sonra idrarın geçici bir süre için kırmızıya boyanmasına sebep olur ancak bunun klinik açıdan bir önemi yoktur (42).

2.1.4. Oluşturduğu Yan Etkiler

Doksorubisinin kullanımı akut ve kronik yan etkilerinin bulunması sebebiyle tartışma yaratsa da kanser hastalarının tedavisinde oldukça önem taşır. Enjeksiyonu sonrası yan etkileri bulantı, kusma, kemik iliği supresyonu, ritim bozukluğu (43), saç dökülmesi, alopesi, stomatit mukozit, ekstremitasyon (doksorubisinin damar dışına kaçışı), radyosensitizasyon, gastrointestinal toksisite, nefrotoksisite ve kardiyotoksisite gibi etkilerdir (44-47). Geri dönüşümlü ve tedavi edilebilir yan etkilerinin yanı sıra kalıcı hasar bırakan yan etkileri de mevcuttur. En ciddi yan etkisi serbest radikallere bağlı olarak ortaya çıkan kalıcı ve doza bağımlı kardiyotoksik etkidir (2).

Doksorubisine bağlı toksisite patojenezinden serbest radikal oluşumu, antioksidan enzimlerde azalma ve lipid peroksidasyonunda artma sorumlu tutulmaktadır (3, 4). DXR'ın tetrasiklik aglikon molekülünde yer alan semikinon halkasının, membran fazında çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu ve radikal oksijen aktivitesini artırdığı belirlenmiştir (48).

Patojenezde rol alan serbest radikaller O_2^- , $OH\cdot$ ve NO' dur (3, 4). Endojen nitrik oksit sentaz seviyesini arttırarak hücre içi süper oksit düzeyini arttırır (49, 50).

Bu yolla hücre içi hidrojen peroksit artar (51). Serbest radikaller tarafından indüklenen Malondialdehit (MDA) gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin de patojenez katkısı bulunmaktadır (3, 4).

2.1.4.1. Doksorubisin ve Kardiyotoksisite

İlacın kullanımını sınırlayan en önemli yan etkisi kardiyotoksisitedir. Kardiyotoksisite terapötik moleküllerin kalp fonksiyonu üzerine olan olumsuz etkilerini geniş bir yelpazede tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Kardiyak fonksiyon defektleri semptomatik veya asemptomatik olabilmektedir. Yeni üretilen antrasiklinlerin lipozomal formları daha az sıklıkta kardiyak hasar oluşturuyor olsalar da, bunlarda bile kardiyotoksisite hâlâ en ciddi problemdir (52-54).

Kardiyotoksisite oluşturma mekanizması hakkında birçok teori geliştirilmiştir. Bunlardan birkaçı nükleik asit ve protein sentezinde inhibisyon (55), vazoaktif aminlerin salınımı (56), mitokondriyal anormallik, miyokart fonksiyon bozukluğu, sarkoplazmik retikulumdaki ryanodin reseptörünün geri dönüşümlü olarak inhibe edilerek Ca^{++} salınımının engellenmesi (57), adrenerjik fonksiyonlarda (58), lizozomda, Na-K-ATPaz ve Ca-ATPaz adenilat siklazda ve miyokarttaki elektrolit düzeninde değişiklikler, serbest oksijen radikali oluşumu, miyokardiyal antioksidan enzim seviyesinde azalma, lipid peroksidasyonu ve apoptozdur (5). Doksorubisinin kardiyomiyosit yapısını bozarak kan basıncında ve kalp hızında düzensizlik, kontraktilitede azalma, sitoplazmik vakuolizasyon, fibrozis, mikrotübülde hasar, vakuolizasyon, sarkomerde yarıma, sarkoplazmik retikulumda dilasyon, mitokondri hasarı ve miyofibril kaybı meydana getirmektedir (59).

Kardiyomiyositlerde apoptozu (programlı hücre ölümü) uyardığına dair kanıtlar mevcuttur. DOX'un uyardığı kardiyomiyosit toksisitesinden hidrojen peroksit ve süperoksit formasyonları sorumlu tutulmaktadır (51, 60). Bu hücre içi oksidanlar, apoptozun stimülatörü olan p53 genini aktif hale getirirler (60, 61).

Kardiyotoksisite patojenezinde serbest oksijen radikallerinin (ROS'lar) oluşumu, lipid peroksidasyonuna bağlı artmış hücre içi oksidatif stres gibi önemli

olaylar yer almaktadır (5, 62). ROS ve redoks resiklusunu oluşumunda etkin maddeler olan antrasiklin molekülleri birçok reaktif oksijen oluşturabilmektedirler (63). Oluşturduğu serbest radikaller O_2 'yi indirgeyerek süperoksit anyon radikali (O_2^-) ve hidrojen peroksitin (H_2O_2) oluşumuna yol açarlar. H_2O_2 ve O_2^- endojen glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzim seviyelerini azaltarak oksidatif stresi artırır ve kardiyomiyopati oluşumunu kolaylaştırır (3, 64, 65).

Doksorubisinin hücresele düzeyde oluşturduğu patojenik değişiklikleri açıklamak amacıyla ileri sürülmüş pek çok mekanizma arasından üç tanesi en fazla kabul gören olmuştur: antrasiklin bağımlı lipid peroksidasyonunun etkin bir katalizörü ve hücresele Fe^+ deposu olan ferritinden aldığu Fe^+ ile etkileşerek serbest oksijen radikalleri açığa çıkarması, nükleer ve mitokondriyal DNA ile etkileşmesi, apoptozu uyaran biyokimyasal yolları aktive eden gen aktivasyonunu başlatması (34, 66, 67).

2.1.4.1.1. Doksorubisin Kardiyotoksisitesinin Klinik Tipleri

Kardiyotoksisite akut, subakut, kronik ve geç dönemlerde ortaya çıkabilmektedir.

a. Akut Kardiyotoksisite

Akut kardiyotoksisite ilacın verilmesi sırasında ya da verilmesinden sonraki ilk 24 saat içinde gelişir. Geçici ritim bozuklukları, miyokardit, perikardit, hipotansiyon ve kalp fonksiyonlarda bozulma ile karakterizedir. Bu etkiler geri dönüşümlüdür, nadiren konjestif kalp yetmezliği, miyokardiyal infarkt görülmüş, ölüm rapor edilmiştir. Görülme sıklığı % 0.4-41 arasındadır (54, 68).

b. Subakut Kardiyotoksisite

Antrasiklinlerin son dozundan birkaç gün veya hafta sonrasında ortaya çıkan ve kardiyomiyopati yaratabilen kardiyotoksisite tipidir. Oluşturduğu hasar kalıcıdır, %60 oranında ölümle sonuçlanır. Görülme sıklığı %0.4-23 arasındadır (69).

c. Kronik Kardiyotoksisite

Kronik kardiyotoksisite ölümlerle sonuçlanan konjestif kalp yetmezliği geliştirebilmesinden ötürü daha ciddidir (70). Kronik kardiyomiyopatide hipotansiyon, taşikardi, kardiyak dilatasyon ve ventriküler yetersizlik gibi belirtiler de ortaya çıkar (71).

d. Geç Kardiyotoksisite

Antrasiklin tedavisinden sonraki birkaç yıl içinde ortaya çıkabilmekle birlikte 20 yıl sonra bile kendini gösterebilir. Konjestif kalp yetmezliği, aritmi, ileti problemleri ve ani ölüm geliştirebilir. Geç kardiyotoksisitenin sıklık ve şiddeti antrasiklinle tedaviden sonraki sürenin uzamasıyla artış gösterir (72).

2.1.4.2. Histopatolojik Değişiklikler

Doksorubisin kaynaklı kardiyak hasar sonucu kardiyomiyositlerde interstisyel ödem, fibrozis, perinükleer vakuolleşme, miyokardiyal disorganizasyon ve dejenerasyon gözlenir (73).

Miyokard interstisyumunda vakuollü kardiyomiyositler bulunur. Fibröz alanlara bitişmiş atriumlar gözlenir. Miyofibrillerin kısmi ya da bütün olarak kaybı ve miyositlerde oluşan vakuolar dejenerasyon doksorubisin kardiyomiyopatisinin başlıca karakteristikleridir. Miyosit vakuolleri birleşerek membrana bağlı büyük boşluklar oluştururlar (5, 74). Histopatolojik değişimlerin şiddeti uygulanan doz ile orantılıdır (27).

2.1.4.3. Doksorubisinle Serbest Radikal Oluşumu ve Oksidatif Stres

Kalp dokusunda diğer dokulara göre fazla miktarda reaktif oksijen radikali oluşumu gözlenir; çünkü kalp dokusu oksijeni en yüksek oranda tüketen dokulardan biridir. Öte yandan diğer dokulara nazaran çok daha düşük antioksidan savunma aktivitesine sahip olmasından ötürü serbest oksijen radikallerine daha fazla maruz

kalır (75, 76). Ayrıca bol miktarda mitokondri içerdiğinden DOX'un uyardığı oksidatif hasardan oldukça etkilenir (77). DOX yaratmış olduğu kardiyotoksisitenin hedef organelleri olan mitokondrilerin içinde birikme yapar (78).

Oksijen içeren serbest radikaller reaktif oksijen türleri (ROS) şeklinde adlandırılır. En yaygın ROS'lar süperoksit anyon (O_2^-) ve hidroksil (OH^\bullet) radikallerdir. En az reaktif olan ve oksijen molekülünün bir elektron almasıyla oluşan O_2^- , diğer serbest radikallerin oluşumuna da yol açar ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumuyla son bulan bir reaksiyon zincirini başlatır.

ROS üretmeye yatkın kimyasal yapısıyla DOX'un oksidatif stresi indüklemesi, ihtiva ettiği antrakinin halkasının enzimatik redüksiyonuyla ilişkilidir. Antrakinin, flavin bağımlı redüktazlarla elektron redüksiyonuna uğrayarak, bir serbest radikal olan semikinonu oluşturmaktadır. NADH dehidrojenaz, sitokrom P-450 redüktaz ve ksantin oksidaz gibi bir takım mitokondriyal enzimin, semikinon redüksiyonunu katalizlediği rapor edilmiştir (5, 79-81). Meydana gelen semikinon eşleşmemiş elektronunu moleküler oksijene verebilir ve antrakinin formuna geri dönerek O_2^- radikalini oluşturabilir (77, 82, 83).

O_2^- radikali, süperoksit dismutazla tepkimeye girerek moleküler oksijen ve H_2O_2 moleküllerini oluşturur. H_2O_2 'nin redüksiyonuyla OH^\bullet meydana gelir (84). Açığa çıkan bu radikaller mikrozomal ve mitokondriyal lipid peroksidasyonunu uyardığı gibi, hücrel enzimler ve nükleik asitlere de zarar verebilmektedirler (63).

Doksorubisine maruz kalan kardiyomiyositlerde katalaz enzim düzeylerinin düştüğü, selenyuma bağımlı glutatyon peroksidaz-1 (GSH-Px-1)'in aktivasyonunun hızlıca engellendiğini gösteren çalışmalar olmuştur (48, 85, 86). Bunun yanında DOX'un çeşitli antioksidan düzeylerini baskıladığı da bildirilmiştir (48, 87). Bir başka çalışmada reaktif oksijen radikalleri ve nitrik oksidin (NO) aşırı üretiminin kardiyak kontraktiletiyi azalttığına rastlanılmıştır (88). DXR ayrıca miyokardiyal toksisiteye aracılık eden endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) transkripsiyonunu da indüklemektedir (89, 90).

2.1.4.4. Apoptoz

Apoptoz, hücre hasarının son formudur. Temel mekanizması, fizyolojik ve genetik olarak düzenlenmiş apoptoz, programlanmış hücre ölümünün bir formu olarak kabul edilmektedir (91). Anormal apoptozun pek çok hastalıkta hastalığın şiddetini ya da ilerlemesini etkilediği gösterilmiştir (92).

Programlanmış hücre ölümü (apoptoz) değişik morfolojilerle karakterize, faal bir süreçtir. Apoptoz esnasında kromozomal DNA nükleozomlar arasından kesilerek parçalara ayrılır. Kromatin yoğunlaşır, nükleus parçalanır. Devamında hücre büzülür ve plazma membranıyla çevrili apoptotik cisimciklere ayrılır. Apoptotik cisimcikler membranla kuşatılmış olduklarından hücre içeriği bozulmadan kalır ve makrofajlar veya komşu hücrelerce hızlıca fagosite edilir.

Apoptoza yol açan ve kaspazları aktifleyen iki temel sinyal yol vardır: intrinsek yol ve ekstrinsek yol. Ekstrinsek yolda ölüm ligandları hücre yüzey reseptörü Fas'a bağlanır. Fas reseptörü ile ilişkili ölüm alanı proteini (FADD) kompleks oluşturur. Oluşan kompleks, başlatıcı kaspazların (kaspaz-8 gibi) aktiflenmesine sebep olur ve efektör kaspaz 3 aktive olur (5, 7, 93).

Intrinsek yol, anti-apoptotik olan Bcl-2 ve Bcl-XL ile pro-apoptotik olan Bax, Bak ve BH3-only diye isimlendirilen Bcl-2 ailesi proteinlerince düzenlenir. BH3-only proteinlerinin aktivasyonu, mitokondriden sitokrom-c serbestleyen olaylar zincirini tetikleyerek apoptoz-aktive edici faktör-1, sitokrom-c ve pro-kaspaz-9 apoptozom komplekslerin oluşumuna yol açar. Sonrasında kaspaz-9 aktif hale gelerek pro-kaspaz-3'ten aktif kaspaz-3 meydana getirir (5).

DOX ürettiği serbest radikallerle mitokondrial DNA (mtDNA) hasarına neden olarak ekstrinsek apoptotik yolu aktive eden transkripsiyonel faktörleri disregüle eder, kalsiyum metabolizmasını bozar, lipid peroksidasyonunu uyarır, mPTP'lerde açılma yapar, mitokondriden sitokrom-c salınımına sebep olur (94).

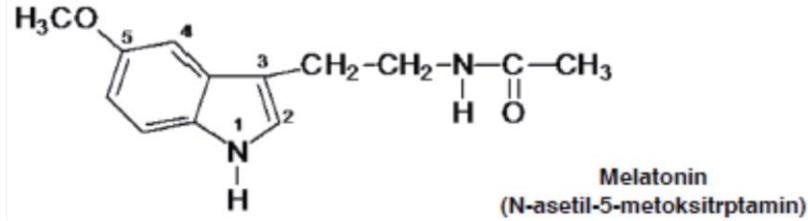
2.2. Melatonin

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) 1958'de bir grup araştırmacı tarafından sığır pineal bezinden izole edilmiştir (95, 96). Melanin granüllerinin agregasyonuna yol açarak kurbağa deri rengine de açılma yaptığı için bu adı almıştır, 'karanlık hormonu' da denir (97, 98).

Pineal bez beynin merkezinde, üçüncü ventrikülün arkasında lokalize olmuş nöroendokrin bir organdır (97, 99) ve iki tip hücresi vardır: hormon (en çok melatonin) ve peptit sentezleyen pinealositler ile nöroglial hücreler (97, 100).

$C_{13}H_{16}N_2O_2$ moleköl formüllü ve 232.2783 moleköl ağırlığındaki melatonin sirkadiyen bir ritimde ve ışıksız ortamda salgılanan bir indolamindir (97, 99, 101). Pineal bezden hariç retina, gastrointestinal sistem, kemik iliği, lökositler, plateletler, eritrositler, deri ve diğer beyin alanları gibi çok sayıda organ ve hücrenin de melatonin üretme yeteneğindedir (102, 103).

Melatonin sirkadiyen ritim, nöroendokrin sistem, kardiyovasküler sistem, bağışıklık, termoreğülasyon gibi pek çok biyolojik süreçte işlev görmektedir (104). Melatoninin kimyasal yapısı Şekil 3'te gösterilmiştir.



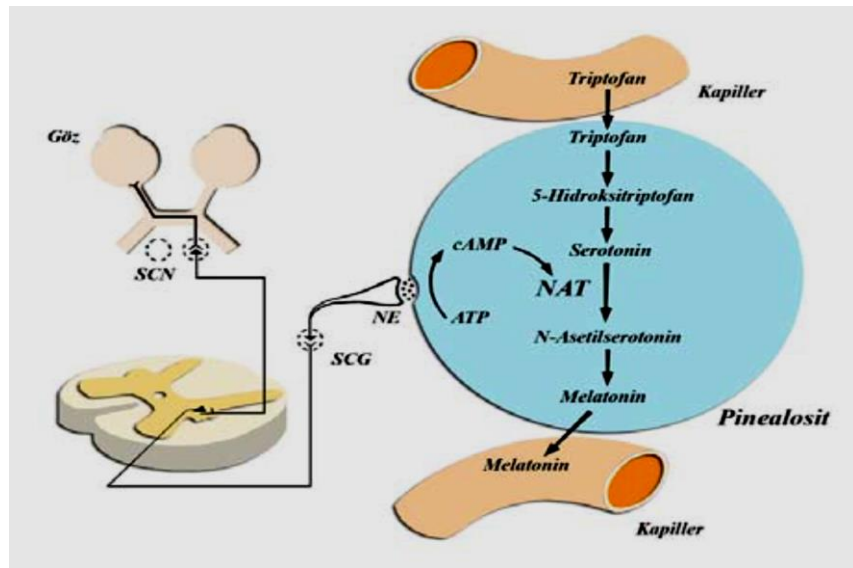
Şekil 3. Melatoninin kimyasal yapısı (105)

2.2.1. Melatoninin Biyosentezi ve Metabolizması

Melatonin üretimi için dolaşımdan hücreye alınan triptofan, triptofan 5-hidroksilaz aracılığıyla 5-hidroksitriptofan'a; 5-hidroksitriptofan L-aromatik aminoasit dekarboksilaz (dopadecarboksilaz) tarafından 5-hidroksitriptamin'e (serotonin) evrilir. Serotonin, N-asetiltransferaz (NAT) ile N-asetilserotonin'e, N-

asetilserotonin de hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) aracılığıyla melatonine dönüşür (99, 106, 107) (Şekil 4).

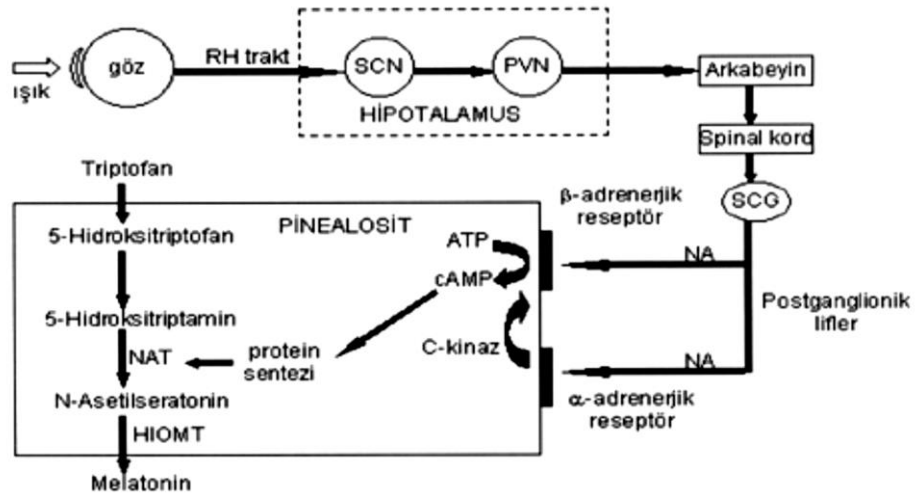
NAT enzimi aktivitesi, dolayısıyla melatoninin kan düzeyi karanlık fotoperiyotta pik yapmaktadır. Bu fotoperiyot, pineal bezi uyaran sempatik sinir liflerinin spontan aktivitesinin en yüksek olduğu saatlere denk gelir. Kısa süreli ışığa maruziyette, sempatik aktivite baskılanır, bu sebeple NAT enzimi aktivitesi ve melatonin düzeyi hızla düşer (102).



Şekil 4: Melatoninin pinealositlerde sentez ve salgılanması. Karanlıkta SCG'den gelen uyarılar, cAMP yolağı ile melatonin salınımında hız kısıtlayıcı enzim NAT'ı aktifler ve melatonin üretimi artar (109).

Görme sisteminin bir uç organı olan pineal bez, ritmik ışık mesajını her organa ulaştırır. Işık uyarısı pineal beze çok nöronlu bir sistemle gelir. Retinadan başlayan ve suprakiazmatik nukleusta (NSC) son bulan ilk nöronal yolak retino-hipotalamik traktustur. Retinal ışık reseptörleri, ışığı elektriksel uyarana dönüştürüp NSC'ye iletir. Suprakiazmatik nukleustan çıkan lifler pineal bez ve omuriliğin intermediolateral kolonuna, daha sonra da sempatik bir ganglion olan süperior servikal gangliona (SCG) gider. SSG'dan çıkan postganglionik lifler de pineal beze gelerek burada dağılım gösterirler (107).

Pineal bez içinde, postganglionik sempatik sinir uçlarından norepinefrin salınmaktadır. Norepinefrinin pinealosit membranındaki β -adrenerjik reseptörlere bağlanması ile hücre içinde önce adenilat siklaz aktifleşir ve cAMP artar. Sonrasında da N-asetiltransferaz (NAT) ve onu takiben melatonin sentezi artar. Pinealosit hücre membranlarında α -adrenerjik reseptörler de bulunur ve bu reseptörler β -adrenerjik uyarımı artırırlar (99, 108, 109). (Şekil 5).



Şekil 5: Pinealosit içerisinde melatonin üretiminin kontrol mekanizması.

(TRH): Retino-hipotalamik-traktus, (NSC): Suprakiazmatik nukleus, (NPV): Para ventrikular nukleus, (SCG): Süperior servikal ganglion (108)

Üretildikten sonra depolanmayan melatonin düşük molekül ağırlığı, lipofilik ve hidrofilik olma özelliklerinden ötürü pinealositlerden pasif diffüzyonla hızla hücre dışına atılır ve doğrudan kan dolaşımına geçerek tüm biyolojik sıvılara ve dokulara ulaşır.

Yarılanma süresi 10-40 dakika arası olan melatonin yaygın olarak karaciğerde, daha düşük oranda böbreklerde metabolize edilir. Karaciğerden ilk geçişte %90'ı metabolize olan melatonin 6-hidroksimelatonin'e dönüştürülür. 6-hidroksimelaton sülfat veya daha az oranda glukuronik aside bağlanarak idrarla atılır. Melatoninin idrardaki metaboliti, 6-sulfatoksi-melatonin'dir (99, 107).

2.2.2. Melatonin Salınımının Düzenlenmesi

Melatonin üretimi gece boyu fazla, gün içerisinde azdır. Işığa maruz kalma melatonin salgılanmasını akut olarak baskılayabilir (110). Geceleri büyük oranda artış gösteren melatonin düzeylerinin yüksek kalma süresi karanlığın süresine bağlıdır. (107, 108).

Plazma melatonin konsantrasyonu gece 02:00 ile 04:00 arasında en yüksek değere erişir. Erişkinde salınım genelde saat 21:00-22:00 arası başlayıp, 07:00-09:00 arası son bulur (108). Melatonin plazma konsantrasyonu gündüz 0-20 pg/dl, gece 50-200 pg/dl seviyesine kadar yükselir. Günde 30 mg melatonin sentez edilmekte, bunun %80'i gece üretilmektedir (111) .

2.2.3. Melatonin Reseptörleri

MT1 veya Mel1a (yüksek afinite (pikomolar)) yerleri ve MT2 veya Mel1b (düşük afinite (nanomolar)) yerleri olmak üzere membrana bağlı iki melatonin bağlanma yeri bulunmaktadır. Ayrıca üçüncü bir bağlanma bölgesinin varlığı da kabul edilmektedir: MT3 (M12) (97, 101, 112).

MT1 ve MT2 reseptörleri serebellumda, retinal yollarda ve ganglionik hücrelerde tespit edilmiştir (112). MT1 reseptör geni insanlarda kromozomun 4q35.1; MT2 reseptör geni ise 11q21-22 lokalizasyonunda belirlenmiştir (108).

İnsanlarda melatonin reseptörleri beyin, retina, kalp-damar sistemi, karaciğer ve safra kesesi, bağırsak, böbrek, bağışıklık hücreleri, prostat ve meme epitelyal hücreleri, ovaryum/granuloza, miyometriyum ve deri gibi çok sayıda organda belirlenmiştir (113).

Melatonin reseptörleri insan fetusunda da bol miktarda mevcuttur. Fakat fetal pinealosit, gestasyonun 26. haftasından itibaren melatonin üretme kabiliyeti kazanabilir (112).

2.2.4. Etki Mekanizmaları

2.2.4.1. Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

Melatoninin antioksidan özelliği başlıca iki temel etki altında toplanabilir: reseptör bağımsız olarak oksidan maddeyi doğrudan süpürücü etkisi; reseptör bağımlı olarak endojen antioksidan mekanizmaları aktifleyen dolaylı etkisi (109).

Serbest oksijen radikallerini (ROS) ve serbest nitrojen radikallerini (RNS) direkt olarak temizleyebilme kabiliyeti sayesinde, melatoninin temel işlevinin organizmaları oksidatif stresten korumak olduğu öne sürülmektedir (114).

Melatoninin hem doğrudan ve dolaylı yoldan serbest radikal toplayıcısı etkisi hem de antioksidan etkisi kanıtlanmış durumdadır. Yüksek düzeyde lipofilik özellikte olması, melatoninin en önemli avantajıdır. Çünkü bu özelliği sayesinde serbest radikal toplayıcı etkisini göstermek amacıyla herhangi bir bağlanma bölgesine ve reseptöre ihtiyacı yoktur (115).

Melatonin en zararlı radikal olan hidroksil radikalini ($\text{OH}\cdot$) bile yok edebilen potent bir antioksidandır. $\text{OH}\cdot$ radikali ile tepkimesi sonucu, ortamdaki $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalini tutarak antioksidan etki gösteren indolil katyon radikaline dönüşür (114, 115).

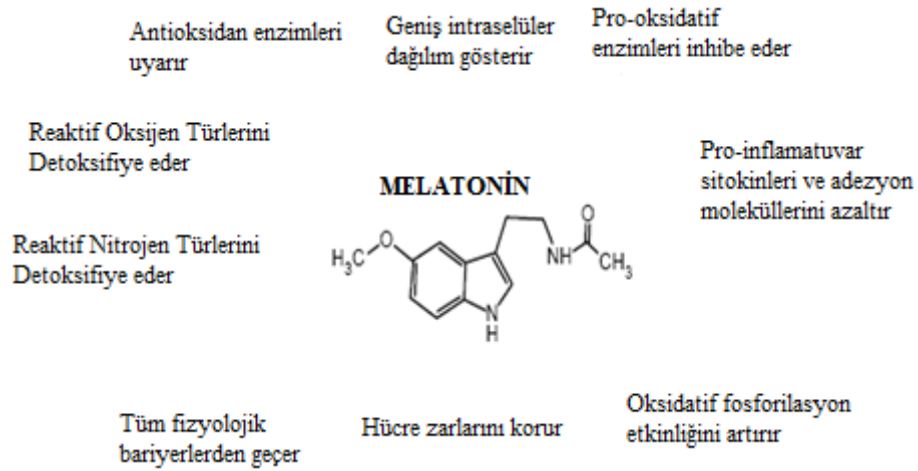
Melatonin $\text{OH}\cdot$ 'ı mannitol, glutatyon, E vitamini ve C vitamini gibi diğer antioksidanlardan çok daha yüksek bir etkinlik düzeyi ile nötralize eder (116). C veya E vitamini gibi klasik antioksidanlar, etki göstermeleri sonrası, mücadele ettikleri oksidanlardan yalnızca biraz daha az zararlı prooksidanlara dönüşmekte iken; melatoninin etki göstermesinin ardından ara basamaklarda ve sonuçta ortaya çıkan ürünler ilk durumdaki gibi antioksidan etki gösterirler. Melatonin E vitaminine göre en az iki, glutatyonla göre beş kat daha etkili bir antioksidandır. (101, 117).

Melatoninin bütün hücre ve hücre içi bölümlere rahatlıkla diffüze olabiliyor olması, serbest radikallere ulaşp, onları etkisiz hale getirmesi bakımından önemli bir özelliktir. Yüksek toksisiteye sahip hidroksil radikalini yok etmesine ek olarak melatonin, hidroksil radikalinin prekürsörü olan H_2O_2 'yi suya dönüştüren, güçlü antioksidan enzim glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesini de stimüle eder (115).

Öte yandan melatoninin dolaylı antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GSH-Rd), katalaz (CAT) ve glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) aktivitelerini de artırmaktadır (114).

Melatoninin H_2O_2 ile tepkimesi sonucu N1-asetil-N2-formil-5-metoksi knüramin (AFMK) oluşmakta, AFMK katalazla N1-asetil-5-metoksi knüramine dönüştürülmekte ve antioksidan etkiye sahip bu metabolitler melatoninin süpürücü etkisine katkı sağlamaktadır (105).

Şimdiye dek melatoninin toksik özelliğe sahip olduğunu gösteren hiçbir rapor bulunmamış, tam tersine çok etkili bir radikal temizleyicisi olduğu sonucuna varılmıştır (114).



Şekil 6: Melatoninin antioksidan fonksiyonu (118)

2.2.4.2. Apoptoz Üzerine Etkisi

Apoptoz genel anlamda hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye ihtiyaç duyan ve homeostazisi dengelen bir olaydır (119).

Melatoninin değişik ajanlarla oluşan apoptozu düzenleyici rolü üzerine çalışmalar mevcuttur. (120, 121). Melatoninin apoptozu inhibe eden mekanizması, onun bir antioksidan olarak serbest radikalleri temizleme özelliğiyle ilişkili gibi görünse de, son zamanlarda melatoninin antiapoptotik etkisinin mitokondriyal geçiş poru (MTP) ile doğrudan etkileşimi ile açıklanabilen yeni bir mekanizma ileri sürülmüştür (122).

Melatonin, antioksidan gücü hem *in vivo* hem de *in vitro* deneylerle belgelenmiş bir ajandır. Periferel doku çalışmaları melatoninin apoptotik süreçleri

antioksidan özelliğiyle de baskılayabildiğini ileri sürmüşlerdir (123). Melatoninin antimitotik ve antioksidan etkisinin, eksikliği tümör oluşumuna yol açan p53 geninin ekspresyonunu da artırdığı söylenmektedir (124).

2.2.4.3. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi

Mevcut çalışmalardan elde edilen bulgular melatoninin kalp-damar sistemine etkilerinin reseptör ve non-reseptör aracılı olduğunu göstermektedir. Melatonin serebral arterlerde vazokonstriksiyon, periferdeki damar yataklarında vazodilatasyon yapmaktadır (105).

Yüksek kan basıncının neden olduğu kalp damar sistemindeki oksidan hasarda serbest radikallerin etkisi bulunmaktadır (125). Bu konu ile ilgili yapılan bir çalışmada deney hayvanlarında hipertansiyon geliştirilmiş ve hem miyokartta hem doku hasar parametrelerinde gözlenen değişiklikler, melatonin uygulanan grupta anlamlı olarak geri çevrilmiştir (105).

Liu ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir araştırmada doksorubisinle oluşan kardiyak fonksiyon bozukluğu, mikroskobik değişimler, apoptoz, sol ventrikülün işlevi ve kalbin morfolojik çalışmasında melatoninin protektif etkide olduğu gösterilmiştir (126).

Öz ve arkadaşlarının (127) bir çalışmasında melatonin, doksorubisin uygulamasından sonra artış göstermiş MDA düzeylerini düşürerek miyokardial lipid peroksidasyonunu baskılamış ve miyokardial lezyonları önleyerek kardiyotoksositeye karşı koruma sağlamıştır.

Siklosporin A (CsA) yaygın kullanılan immünsüpresif ilaçtır; ancak tedavi edici kullanımının kardiyotoksosite yarattığı bilinmektedir. 2006'da bir grup araştırmacı (128) CsA kaynaklı kardiyotoksitenin önlenmesinde melatoninin yararlı etkilerini araştırmışlar, yaptıkları incelemede melatoninin antioksidan enzim seviyelerini önemli ölçüde yükselterek oksidatif hasarı azalttığını ve kalbin morfolojisini düzelttiğini gözlemlemişlerdir.

Bir diğer araştırmada doksorubisin uygulanan grupta miyokardiyal GSH-Px ve SOD düzeylerinin azalmış, MDA ve NO düzeylerinin yükselmiş olduğu

gözlenirken; melatoninin miyokardiyal GSH-Px düzeylerini ve SOD enzim aktivitesini yükselttiği, NO düzeyini azalttığı ve sonuçta ağır kardiyotoksisteye karşı koruma sağladığı saptanmıştır (129).

İzoproterenol (ISP) bir beta-adrenerjik agonisttir ve yüksek dozda akut miyokardiyal nekroz oluşturur. Bir çalışmada, sıçanlarda ISP ile aktive olan miyokart infarktüsüne karşı melatoninin protektif etkide olduğunu ve ISP ile birlikte melatonin uygulamasının miyosit hasarını hafiflettiği gösterilmiştir (130).

2.3. Adrenomedullin

2.3.1. Tarihçe

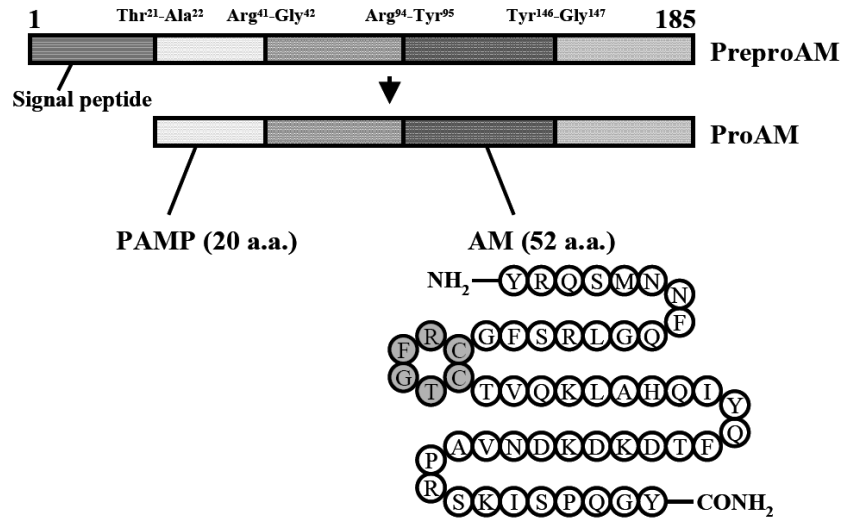
Adrenomedullin (ADM) 1993 yılında bir grup bilim insanının feokromasitoma dokusundan izole edilen peptitleri incelerken keşfettiği, trombosit cAMP düzeyini artıran bir peptittir. Bol miktarda bulunduğu adrenal medulla hücrelerinden izole edilmiş olmasından ötürü “adrenomedullin” ismini almıştır (131). Daha sonra insan adrenomedullinini kodlayan gen ve ardından rat geni açıklanmıştır (131, 132). Sonraki çalışmalarda plazma ADM seviyesinin çeşitli klinik durumlarda arttığı belirlenmiş ve ADM reseptörü saptanmıştır (133-135).

2.3.2. Moleküler Özelliği

ADM kalsitonin gen ilişkili peptit (CGRP) ile %24 aminoasit homolojisi gösterdiği ve CGRP'ye benzer bir biyolojik aktivite profiline sahip olduğu için kalsitonin/CGRP/amilin peptid ailesine katılmıştır (131, 136, 137). Adrenomedullin geni 11. kromozomda lokalize olup, 4 ekson ve 3 intron bölgesi içermektedir. 52 aminoasitten oluşan insan adrenomedullini karboksi terminalinde tirozin aminoasiti bulunan, 16 - 21. karbonları arasında disülfid bağı içeren bir vazodilatatör peptittir (138).

ADM'nin prekürsörü 185 aminoasitten oluşan preproadrenomedullin adını alan bir moleküldür. Bu molekülün 21 numaralı aminoasitine bağlı N-terminalinden aminoasitlerin ayrılmasıyla önce 164 aminoasitlik proadrenomedullin (ProADM)

oluşur. ProADM'den 53 aminoasitlik immatur ve inaktif ADM ve eş zamanlı olarak plazmada enzimatik amidasyonla immatur ADM, 52 aminoasitlik matur ADM formuna dönüşmektedir. ProADM'nin N terminal bölgesinde amidasyon sinyalinin yer aldığı proadrenomedullin N-terminal 20 peptit (PAMP) oluşur. PAMP biyolojik açıdan aktif bir peptittir; fakat ADM'den daha az potenttir (Şekil 7). ADM'yi 4. ekzon, PAMP'ı 2. ve 3. ekzonlar kodlar (137-139).



Şekil 7. Adrenomedullin molekülünün yapısı (137)

2.3.3. Biyosentezi ve Metabolizması

Adrenal medulla başta olmak üzere miyokart, akciğerler, böbrek, santral sinir sistemi, gastrointestinal ve endokrin dokular, vasküler endotel ve düz kas hücreleri gibi pek çok dokuda sentezlenmektedir (132, 137). İn vitro çalışmalar kültürlenmiş kardiyak hücreler ve vasküler düz kas veya endotel dokuların ADM'yi kültür ortamı içine aktif olarak salgıladığını göstermişlerdir (139). Dolaşımdaki ADM'nin bir kısmının damar sisteminden ve kalpten geldiği önerilir (140). Plazmaya ilaveten idrar, süt, beyin omurilik sıvısı (BOS), tükürük, amnion sıvısı, ter ve umbilikal vendede bulunur (141-144). ADM plazmada spesifik olarak, kompleman faktör H olarak

da tanımlanan adrenomedullin bağlayıcı protein-1 (AMBP-1) denen bir protein tarafından taşınmaktadır (145).

Üretimi oldukça hızlı olan ADM depolanmamakta, sentezlenir sentezlenmez salgılanmaktadır (137). Dolaşımdaki adrenomedullinin molekül ağırlığı 6028.79 g/mol, metabolizması hızlı ve yarılanma ömrü 20 dakikadır (146).

En karakteristik etkileri siklik adenosin monofosfat (cAMP), nitrik oksit ve böbrek prostaglandin sistemleri aracılı vazodilatör ve hipotansif etkileridir (137, 147, 148). Kronik olarak ayrıca antihipertrofik, anti-apoptotik, antifibrotik, antioksidan, anjiyogenez ve natriüretik etkileri de vardır (149). Giderek artan veriler ADM'nin başlangıçta vazodilatör ajan olarak beklenen etkisinden daha fazla biyolojik etkiye sahip olduğunu ve kalp de dahil olmak üzere çeşitli organlarda sentezlendiğini ortaya koymuştur (131, 132).

2.3.4. Dokulardaki Dağılımı

2.3.4.1. Adrenomedullin Peptidinin Dağılımı

ADM, CGRP ailesinin bir üyesidir; fakat CGRP gibi sadece nöral dokudan sentezlenmemekte, pek çok dokuda yaygın bulunmaktadır. ADM kardiyak miyositler, vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, renal distal ve toplayıcı tübüller, sindirim sisteminde mukozal ve glandüler epitel ile respiratuar ve üreme sistemindeki epitelde, endokrin ve nöroendokrin sistemlerde, hipotalamusta supraoptik nükleus ve paraventriküler nükleusun magnoselüler alanında, kanda, idrarda, serebrospinal sıvı ve amniyon sıvısında belirlenmiştir (150). İmmünoreaktif (ir)-ADM'nin feokromositoma ve adrenal medullada bol ve yoğun olduğu gösterilmiştir (151). İr-ADM ayrıca insan merkezi sinir sisteminde talamus, hipotalamus ve hipofiz bezinde merkezi sinir sisteminin diğer bölgelerine oranla daha yüksek seviyelerde bulunmuştur (152).

Tablo 1. Adrenomedullinin dokulardaki dağılımı (153)

KARDİYOYASKÜLER SİSTEM	damar endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri kardiyomiyositler, miyokardiyum
ENDOKRİN SİSTEM	Adrenokortikal hücreler, feokromositoma
SANTRAL SİNİR SİSTEMİ	Paraventriküler nükleus, supraoptik nükleus, glioblastoma
KAN HÜCRELERİ	Makrofaj, granülosit, lenfosit, monosit
BÖBREK	Mezangiyal hücreler, glomerüler epitelyal hücreler , distal ve toplayıcı tubuller, renal tubuler hücreler
SOLUNUM YOLU	Bronşiyal epitel, kolumnar epitel, alveolar makrofajlar
DÜZ KAS HÜCRELERİ	
GENİTAL SİSTEM	Plasental trofoblastlar, endometrium epiteli, meme duktal hücreleri, prostatik epitel hücreleri
DERİ	Dermal epitel, keratinosit, saç folikülleri
GASTROİNTESTİNAL SİSTEM	Kolorektal karsinoma, pankreas, gastrik mukoza

2.3.4.2. Adrenomedullin mRNA'sının Doku Ekspresyonu

İnsan ADM mRNA'sı yüksek oranda feokromositoma, adrenal medulla, kardiyak ventrikülü, akciğer ve böbrekte (131); bunlara ek olarak gastrointestinal sistem, normal ve gebe uterus ve insan beyni gibi çeşitli dokularda eksprese edilir. En yüksek ekspresyonu hipotalamus ve beyin tümörleri, koroid pleksus, adrenal bezler ve adrenokortikal adenomlar ve hipofiz bezinde gerçekleşir (154). Sıçan nefronunda ADM mRNA'sı glomerül, kortikal toplayıcı kanal, dış medullar toplama kanalı ve iç medullar toplama kanalında mevcuttur; ancak proksimal tübül veya medullar kalın çıkan tarafta bulunmaz (155). İnsan adrenal korteksinde ADM zona glomeruloza hücrelerinde sentezlenir (156). Bundan başka, ADM mRNA'sı, nöroendokrin hücrelerinin salgı granüllerinde, sıçan mide mukozasındaki birkaç epitelyal hücrelerinde ve normal sıçan derisinin epitel hücrelerinde lokalize olmuştur (140).

2.3.5. Plazma Seviyesini Etkileyen Faktörler

2.3.5.1. İnflamatuvar Sitokinler

İnflamatuvar sitokinler interlökin (IL-1 α , IL-1 β), tümör nekroz faktör (TNF- α , TNF- β) ve bakteriyel endotoksin ile lipopolisakkarit (LPS), vasküler endotel ve düz kas hücrelerinde kültürlenmiş sıçanların ADM sentezini ve salgılanmasını güçlü bir şekilde uyarırlar. Anestezi uygulanmış ratlarda LPS'in damar içine injeksiyonu, plazma ADM konsantrasyonunu arttırmıştır (157). TNF- α , IL-1 ve LPS vasküler endotel hücrelerden ADM salgılanmasının temel indükleyicileridirler (158). Ek olarak fetal serum, dönüştürücü büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1), vazoaktif intestinal peptid (VIP) ve trombin adrenomedullinin vasküler endotel hücrelerden salınımını engelleyen en potent inhibitörler arasındadır (159, 160).

2.3.5.2. Hümorale Faktörler

Glukokortikoidler, kortikosteroidler ve tiroid hormonları, Anjiotensin II (Ang II), aldosteron, atriyal natriüretik peptit (ANP), endotelin (ET-1), bradikinin, P maddesi, adrenalin, noradrenalin, doku plazminojen aktivatörü (TPA) vasküler endotel ve düz kas hücrelerinden ADM salgılanmasını uyarırken; vazoaktif intestinal peptit (VIP), trombin ve IF- γ potent inhibitörler olarak ADM üretimini baskılar (157, 161-163).

2.3.5.3. Mekanik ve Metabolik Etkiler

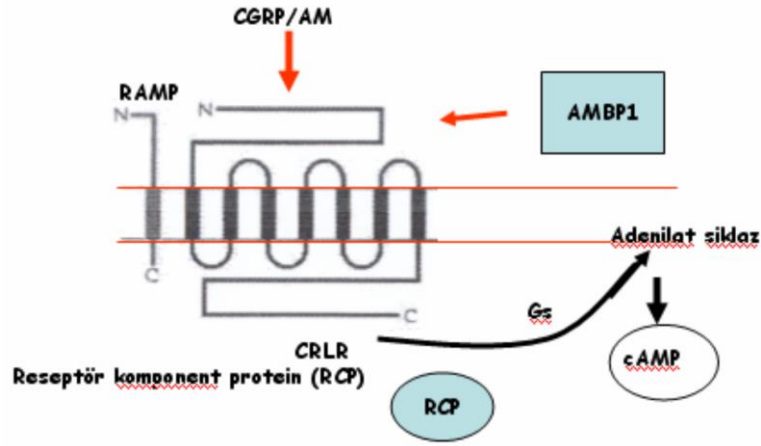
Tüm bu faktörlere ek olarak fiziksel uyarılar, ani stres ve kardiyomistlerin gerilmesi gibi mekanik faktörlerin yanı sıra iskemi, hipoksi, oksidatif stres ve hiperglisemi gibi metabolik faktörlerin de ADM sekresyonunu indüklediği gösterilmiştir (164-166).

2.3.6. ADM Reseptörleri

ADM reseptör bağlanma bölgeleri önce sıçanlarda sonra insanlarda tespit edilmiştir. Sıçanlarda sırasıyla kalp, akciğerler, adrenal bezler, böbrek ve santral sinir sisteminde; insanlarda mikrovasküler endotelde, deride ve gastrointestinal immün sistemde yüksek düzeylerde bulunmuştur (167).

ADM, CGRP reseptörleriyle benzer özellik gösteren plazma membran reseptörlerine bağlanmaktadır. Kalp miyositleri dahil bazı sistemlerde, ADM ve CGRP ortak reseptör ve sinyal mekanizmasını paylaşırlar (168-170). En iyi bilinen CGRP/ADM reseptör kompleksi “kalsitonin reseptörü benzeri reseptör” (CRLR)’dür (171). Bu reseptörün işlevsel olabilmesi için hücre membranında “reseptör aktivite düzenleyici protein” (RAMP) adı verilen bir proteine ihtiyaç vardır (172). RAMP’lar 1, 2 ve 3 olmak üzere 3 tiptir. CRLR/RAMP1 kompleksi CGRP reseptör; CRLR/RAMP2 ve CRLR/RAMP3 kompleksleri AM reseptör özelliği gösterir (173-175). Adrenomedullinin sinyal iletiminde rol alan diğer molekül 146 aminoasitten oluşan ve CGRP reseptör potansiyeline sahip “reseptör komponent protein” (RCP)’dir. Sonuç olarak ADM ve CGRP’nin fonksiyonel reseptörleri CRLR, RAMP ve RCP proteinleridir (172).

ADM CRLR’ye bağlandıktan sonra CRLR, guanilat siklaz (Gs) aracılığıyla ve adenilat siklaz-protein kinaz A yoluyla hedef hücrede cAMP’de artışa neden olur (şekil 8). Adrenomedullin hedef hücrede primer ikincil haberci olarak cAMP yolağını kullanır (176, 177). Kullandığı diğer sinyal ileti yolları NO/cGMP aktivasyonu (178), inositol trifosfat aktivasyonu (179), ATP duyarlı K⁺ kanal aktivasyonu (180), protein kinaz A (PKA) ve protein kinaz B fosforilasyonu ve protein tirozin kinaz aktivasyonudur (181). NO/cGMP yolağı adrenomedullinin vazodilatasyon, antiproliferatif, antimitotik, antiapoptotik aktivite ve oksidatif stresi düşürücü etkisinden sorumludur (182). ADM’nin oksidatif strese karşı koruyucu bir rol oynayarak kardiyovasküler hasarı önleme ve bir antioksidan olma özelliğinin cAMP ve protein kinaz A yolu üzerinden sağlandığı söylenmektedir (183). cAMP düzeylerini yükselterek protein kinaz A’yı aktifleştiren Adrenomedullin, bu yolla miyokart kontraktilitesini de artırmaktadır (184).

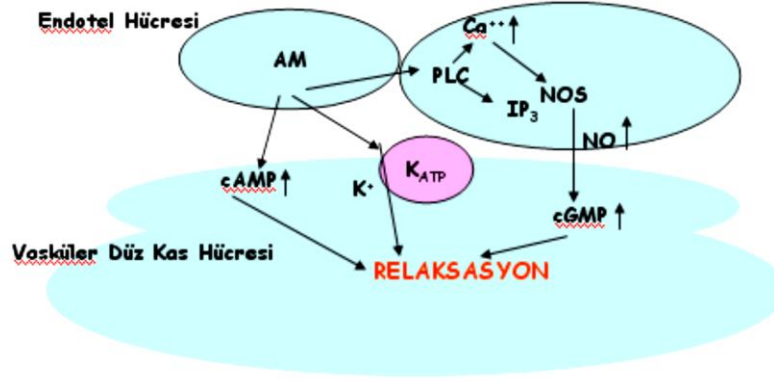


Şekil 8. ADM Reseptörleri (137)

2.3.7. Adrenomedullin ve Vasküler Etkileri

Adrenomedullin potent bir vazodilatatör peptittir. ADM ve CGRP hem invivo hem de invitro çalışmalarda güçlü hipotansif ve vazodilatator etki göstermiştir (185-187). AM vazodilatatör etkisiyle hem sistolik hem de diastolik kan basıncında doza bağımlı olarak derece derece düşüşe neden olduğu gösterilmiştir (188). Endotelyum-bağımlı ve endotelyum-bağımsız mekanizmalar aracılığıyla sistemik ve pulmoner kan damarlarında nonadrenerjik ve nonkolinerjik vazodilatasyon yaparak kalp, böbrek, adrenal bez ve akciğerlere giden kan miktarı arttırmaktadır (185).

Vasküler endotelial hücrelerde AM ve CGRP reseptörleri aracılığıyla intraselüler cAMP konsantrasyonu artışı, intraselüler Ca²⁺ artış yapar. Artmış intraselüler Ca²⁺ konsantrasyonu, nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesini uyarır (189). Nitrik oksit sentazın ardından da Gs aktive olur (190). Aktive olmuş guanilat siklaz vazodilatasyona sebep olur (191). Endotel bağımsız vazodilatasyon ise düz kas hücrelerinde intraselüler cAMP artışı, Ca²⁺ konsantrasyonunda azalma ve K⁺ kanal aktivasyonu ile sağlanmaktadır (192, 193).



Şekil 9: Adrenomedullinin vazodilatasyon mekanizmaları (137)

2.3.8. Adrenomedullin ve Kardiyovasküler Sistem

Karakteristik etkisi sağlıklı insanda ve kalp yetmezliği olan hastalarda periferik direnci ve kan basıncını düşürerek hipotansiyon yapmak ve buna sekonder olarak kalp debisini arttırmaktır. ADM ayrıca beyin, akciğer ve böbrek damarları gibi spesifik bölgelerde kan akışında artışa yol açan, güçlü vazodilatör etkiye sahiptir (194, 195).

ADM kardiyak miyositlerde protein sentezinde artış ve hipertrofi meydana getirmekte, kardiyak fibroblastlarda ise ekstrasellüler matris üretimini ve proliferasyonu inhibe etmektedir (175). Ek olarak Ang II veya trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)'nin uyardığı vasküler düz kas hücre migrasyonunu da engellemektedir (196). Herhangi bir uyarı olmadan vasküler düz kas hücre proliferasyonunu (197), anjiogenik etkisiyle de endotel hücre proliferasyonunu stimüle eder (198).

2.3.9. Adrenomedullinin Kardiyovasküler Hastalıklardaki Rolü

Adrenomedullin plazma konsantrasyonu konjestif kalp yetmezliğinde (181), primer arteriyel hipertansiyonlu hastalarda, aterosklerozda, miyokard infarktüsü sonrasında ve sol ventrikül hipertrofisi ile nefroskleroz gibi hipertansiyon komplikasyonu olan kişilerde normalden daha yüksek bulunmuştur (199).

2.3.9.1. Hipertansiyon

Hipertansiyonlu hastalarda normal tansiyonlu kişilere göre daha yüksek olan plazma ADM seviyesi kan basıncı ve hedef organ hasarının şiddeti ile korelasyon gösterir (200). Bir çalışmada ADM'nin kronik infüzyonunun hem hipertansiyonlu hem de normal tansiyonlu sıçanlarda hipotansif etki gösterdiği bulunmuştur (201). Adrenomedullinin hipertansiyonda artış göstermesi, peptidin natriüretik ve vazodilatatör özellikleri sayesinde miyokardiyal yüklenmeyi azaltarak koruyucu rol oynamakta ve miyokardiyal hipertrofiyi sınırlandırmaktadır (202). Öte yandan, malign hipertansiyonu olan hastalarda antihipertansif tedavi sonrası kan basıncında düşüş meydana gelmiş, bu düşüşü takiben plazma ADM seviyesinde büyük bir artış görülmüştür. Kalsiyum kanal blokörü ve anjiyotensin konverting enzim (ACE) inhibitörünün uygulanması kan basıncını düşürürken, plazma ADM düzeyini etkilememektedir (203).

2.3.9.2. Ateroskleroz

ADM'nin endotelial ve vasküler düz kas hücrelerinde salgılanması ve üretilmesinin, plazma ADM oranının ile endotelial hasar arasındaki ilişkiden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir. Nitekim ateroskleroz hastalarında plazma ADM düzeyleri endotel hasarının derecesini yansıtır (175).

Ateroskleroz plağındaki makrofajlarda da tespit edilen adrenomedullinin aterojenezi inhibe ettiği (159) ve bu etkisinde vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve endotel hücre apoptozunu inhibe etmesinin yanında antiinflamatuvar etkisinin rol oynadığı düşünülmektedir (197). Bu çalışmalar ADM'nin aterosklerozun ilerlemesine karşı vasküler koruyucu olarak rol oynadığını düşündürmektedir (140).

2.3.9.3. Akut Miyokardiyal İnfarktüs

Plazma ADM konsantrasyonu miyokart infarktüsünün akut fazında yükselmekte ve 2-3. günde maksimum seviyeye ulaşır 3 haftada normale inmektedir. Bu hastalardaki yüksek peptid düzeyinin (-) prognostik faktör olduğu

düşünülmektedir (204). ADM'nin kompensatuvar ve koruyucu etkileri koroner vazodilatasyonu ve koroner kan akımının artışı sağlıyor olabilir. Ayrıca miyokart enfarktüsü sonrası ADM muamelesi kalp yetmezliğinin ilerlemesini engelleyip, sıçanlarda sağ kalımı artırabilir (205).

ADM'nin kısa süreli infüzyonu infarkt alanını azaltır ve antioksidan ve antiapoptotik özellikleri ile sıçanlarda miyokard iskemi/reperfüzyon hasarını azaltır (206). Adrenomedullinin miyokard hücrelerindeki oksidatif stresi azalttığı ve lokal koroner vazodilatasyon ile miyokardiyal iskemiye sınırlandırdığı gözlenmiştir. Kardiyomiyositlerin apoptozunu inhibe ettiği, infarkt alanını düşürdüğü, ventriküler fibrilasyon oluşumunu azalttığı, ayrıca kan basıncını etkilemeyen düşük dozda kronik ADM infüzyonunun deneysel olarak oluşturulan miyokart infarktüsünde kardiyak remodelingi inhibe ettiği saptanmıştır (202).

2.3.9.4. Kalp Yetmezliği

Plazma ADM seviyesi kronik kalp yetmezliğinde yükselir (207) ve hastalığın ciddiyetiyle orantılı olarak artar (208, 209). Seviye hem diyastolik hem de sistolik kalp yetmezliğinde yükselir (210). Hayvan çalışmalarında kronik ADM muamelesi hipertrofinin kalp yetmezliğine geçişini zayıflatmış ve kalp yetmezliği olan sıçanlarda sağ kalımı artırmıştır (211). ADM sistematik ve lokal olarak kalp yetmezliğinin ilerlemesine karşı hareket eden bir otokrin veya parakrin hormon gibi işlev görmektedir (140). Bir çalışmada yüksek doz ADM uygulaması hem normal sıçanlarda hem de kalp yetmezliği olanlarda ortalama arteriyel kan basıncını hafifçe düşürürken kalp debisini önemli ölçüde artırmıştır. Kalp yetmezliği olan sıçanlarda ayrıca sağ ventrikül basıncı ve atriyal basınçta önemli bir düşüş görülmüştür. Bugüne dek yapılan klinik çalışmalar da kalp yetmezliğinde basınç ve hacim düzenlenmesinde ADM'nin bir rolü olduğunu desteklemektedirler (195).

Apoptozun bir cAMP-bağımsız mekanizma ile inhibe edildiği bir çalışmada ADM'nin kalbi koruyucu etkisi kültürlenmiş sıçan aortik endotel hücrelerinde gösterilmiş; antiapoptotik etkisi de insan umbilikal damar endotel hücrelerinde gözlenmiştir (212). Bu bulgular ADM'nin apoptozun inhibe ederek ve

proliferasyonu düzenleyerek kardiyovasküler dokuları hasara karşı koruduğunu göstermektedir (140). Sonuç olarak adrenomedullin izole kardiyomiyosit ve kardiyak fibroblastlardan sentez ve sekrete edilmekte olup, miyokardiyal hipertrofi, arteriyel hipertansiyon, ateroskleroz ve kalp yetmezliğinin iyileşmesini parakrin veya otokrin olarak düzenlemektedir (213).

2.3.10. Adrenomedullin ve Oksidatif Stres

Adrenomedullinin cAMP bağımlı yolak aracılığıyla oksidatif stresi inhibe ettiği gösterilmiştir (214). Endojen ADM üretiminin oksidatif streste artış gösteriyor olması, bu peptidin oksidatif stres ürünlerini inhibe ederek organ hasarına karşı koruyucu görev üstlendiğini düşündürmektedir (215).

Oyar ve arkadaşları yaptıkları bir araştırmada abdominal aortik iskemi/reperfüzyon ile indüklenen miyokardiyal hasar sonrası artış gösteren miyokardiyal doku MDA seviyesi, SOD, CAT, AII, TNF- α ve Tn-I düzeylerinin adrenomedullin uygulamasının ardından önemli ölçüde azaldığını gözlemişlerdir (216).

Bir başka çalışmada ADM'nin vasküler düz kas hücrelerinde Anjiotensin-2 ile uyarılan intraselüler ROS üretiminin, hem reseptör bağımlı mekanizma hem de cAMP-PKA bağımlı yolak ile azaltıldığını göstermişlerdir (11).

Oba ve arkadaşlarının bir incelemesinde Puromycin aminonükleosit (PAN) ile oluşturulan ROS aşırı üretiminin olduğu ortamda ADM üretimi artış göstermiş ve ROS'ların üretimi ADM sayesinde baskılanarak ROS bağımlı apoptoz engellenmiştir. (12).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Kurgusu

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu tez çalışması, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyle Yel el Etik Kurul Başkanlığınca 09/06/2015 tarihli ve 77.637.435-51 sayılı karar ile onaylanmıştır. Kullanılmış olan deney hayvanları, kimyasallar ve ihtiyaç duyulan araç gereçler İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2015-ÖNP-TIPF-0016 nolu projeye desteklenmiştir.

Çalışmada aynı jenerasyondaki 8 haftalık, 300±50 gr arasında değişen ağırlıklara sahip, 32 tane Wistar-Albino cinsi erkek rat kullanılmıştır. Kullanılmış olan hayvanlar Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiş olup, çalışma süresince aynı laboratuvar şartları altında tutulmuşlardır. Hayvanların bakımı, beslenme ve barındırılması aynı merkezde yapılmıştır.

3.1.2. Laboratuvar Koşulları

Deneklerin, deney süresi boyunca ortalama 22±2°C'lik oda ısısına sahip, 12 saatlik karanlık/aydınlık döngüsünün sağlandığı, %40±20 oranında nemlendirilen laboratuvar ortamında barındırılması sağlanmıştır. Sıçanlara su ihtiyacı olarak çeşme suyu verilmiş, tüm denekler standart yemle beslenmişler ve barındırılmalarında standart Tip 3 kafesleri kullanılmıştır. Hayvanlar her kafeste maksimum 3 hayvan bulunacak şekilde gruplara bölünmüş ve hayvanların günlük takipleri düzenli olarak yapılmıştır.

3.1.3. Uygulanan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan Doksorubisin hidroklorid, Melatonin ve Adrenomedullin Sigma-Aldrich firmasından satın alınmıştır.

3.1.4 Çalışma Planı

Bu çalışmada 1 kontrol ve 3 deney basemold grubu oluşturulmuştur. Deney grupları her grup için 8'er (n=8) hayvan olacak şekilde "Kontrol", "Doksorubisin", "Doksorubisin+Melatonin" ve "Doksorubisin+Adrenomedullin" olarak belirlenmiştir. Grupların homojen olarak dağılmasına ve hayvanların vücut ağırlıklarının birbirine yakın olmasına özen gösterilmiştir. Deney süresi her bir hayvan için yedi gün olarak belirlenmiştir. Deney sırasında hayvanların birkaçı ölmüş, ölenler çalışmaya dahil edilmemiştir. Deney grupları ve uygulanan kimyasallar Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Kullanılan kimyasal maddeler ve uygulama günleri

Gruplar	Uygulama yöntemleri	n	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün	7.gün
Kontrol	(i.v)	n=6	-	-	-	-	SF	-	-
DXR	(i.v)	n=8	-	-	-	-	DXR	-	-
DXR+MEL	(i.p)	n=6	MEL	MEL	MEL	MEL	MEL+DXR	MEL	MEL
DXR+ADR	(i.p)	n=7	ADR	ADR	ADR	ADR	ADR+DXR	ADR	ADR

Kontrol grubu (n=6): Bu gruptaki deneklere herhangi bir kimyasal verilmemiş, yalnızca deneyin 5.gününde kuyruk veninden intravenöz (i.v) yoldan tek doz % 0,9'luk SF uygulanmıştır.

Doksorubisin grubu (n=8): Bu gruptaki deneklere deneyinimiz 5. gününde kuyruk veninden i.v yoldan tek doz 45 mg/kg/gün doksorubisin uygulanmıştır.

Doksorubisin+Melatonin grubu (n=6): Bu gruptaki deneklere 7 gün boyunca intraperitoneal (i.p) yoldan 10 mg/kg/gün melatonin uygulanmıştır. Melatonin enjeksiyonu akşam üzeri saat 17:00 dolaylarında yapılmıştır. Deneyin 5. gününde kuyruk veninden tek doz 45 mg/kg/gün doksorubisin enjekte edilmiştir. Doz ve uygulama süresi, Öz ve İlhan'ın yaptığı bir çalışma referans alınarak belirlenmiştir (104).

Doksorubisin+Adrenomedullin grubu (n=7): Bu gruptaki deneklere 7 gün boyunca i.p olarak, % 0,09'luk SF içerisinde dilue edilmiş ve çözündürülmüş 12 µg/kg/gün adrenomedullin uygulanmıştır. Deneyin 5. gününde kuyruk veninden tek doz 45 mg/kg/gün doksorubisin enjekte edilmiştir.

Uygulanacak dozların belirlenmesi amacıyla deneklerin ağırlıkları her gün ölçülmüştür.

3.2. Analiz Yöntemleri

3.2.1. Anestezi ve Numunelerin Toplanması

Deneyin son gününde (8. gün) hayvanların ağırlıklarına göre, anestezi madde olan Nembutal (Sodyum pentobarbital) 50-60 mg/kg/ip uygulanmıştır. Anestezi altındaki denekler, hipotermiyi önlenmek amacıyla alttan ısıtmalı tabla üzerine yatırılmışlardır ve hayvanın deri altına akupunktur iğnelerinden yapılmış özel EKG elektrodları yerleştirilerek EKG kayıtları alınmıştır. Deneklerin vücut sıcaklıklarının deney boyunca sabit tutulmasına özen gösterilmiştir. Kayıt alımının ardından, ratlar derin anestezi altında iken ayak parmakları güçlü bir şekilde sıkıştırılıp, ağrı duyusu tam olarak kaybolduğunda, denek diseksiyon masasına yatırılıp işlemlere başlanmıştır. Vertikal abdominal insizyon ile karın ön duvarı; sağ sternotomi ile toraks açılarak kalp dokusu çıkarılmıştır. Alınan kalp dokusunun SF ile yıkandıktan sonra sağ ventrikül ve sol ventrikülün bir kısmı histolojik çalışma için %10'luk nötral formalin içinde fiksasyonu sağlanmıştır. Sol ventrikülün kalan kısmı tartılıp 1'e 9 oranında fosfat tamponlu çözelti ile sulandırıldıktan sonra mekanik parçalayıcı ve sonikatör yardımıyla homojenize edilmiştir. Dokular ileri parçalama

işlemi için +4 °C’de 15000 g’de santrifüj edilmiş, elde edilen çözeltinin süpernatant kısmı porsiyonlara ayrılmış ve analizin yapılacağı güne kadar -80 °C’de saklanmıştır.

Alınan sağ ve sol ventrikül dokusundaki histolojik değişiklikler, hematoksilin-eosin (H&E) ile boyama işlemi ardından ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir.

Biyokimyasal parametrelerden total oksidan ve antioksidan düzeyleri (TOS, TAS), glutatyon, SOD ve aspartat aminotransferaz (AST) doku proteini hemolizat, hemoglobin seviyeleri otoanalizörde spektrofotometrik; MDA ve katalaz manuel olarak spektrofotometrik metotla ölçülmüştür. 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) seviyeleri ELİSA testiyle ölçülmüştür.

3.2.2. Sayısal EKG Kayıtlarının Eldesi

EKG çekimi deneklerde, DII derivasyonu olarak kaydedilmiştir. Kayıt öncesinde hayvanlar anestezi edilmiş, anestezi etkisi altındayken hayvanın deri altına iğne elektrotlar yerleştirilerek kayıt alınmıştır. Kayıt esnasında sıçanlar hipotermiyi önlenmek adına alttan ısıtmalı tabla üzerine yatırılmış ve vücut (rektal) sıcaklıkları deney süresince 35,5 \pm 0,50 °C civarında tutulmuştur.

Kaydın bilgisayar ortamında sayısal olarak elde edilebilmesi amacıyla “PowerLab/SP8” biyoelektrik kayıt cihazı ve bu cihazla uyumlu Lab Chart 7 bilgisayar programı kullanılmıştır (ADInstruments, Australia). Kayıtlar elektrokardiyografin örneklem hızı 4000 örnekleme/sn olarak ayarlanarak, her hayvan için yaklaşık 5’er dakikalık süreyle alınmıştır.

Kayıtları takiben yapılan değerlendirmede şu parametreler ölçülmüştür:

a) QRS kompleksi, b) QT intervali, c) RR intervali, d) PR intervali, d) QTc (Düzeltilmiş QT) intervali

Alınan EKG kayıtlarının ortalama 3. dakikası içinde yapılan ölçümler değerlendirmeye alınmış ve ölçümler istatistiksel açıdan kıyaslanmak üzere birbirini takip eden 3-5 atımda alınmıştır.

3.2.3. Doku Takibi ve Dokuların Parafine Gömülmesi

Hayvanlardan izole edilen kalp dokusu, sağ ve sol ventriküllere ayrılmış, bütün dokular % 10'luk nötral formalin içerisinde 3-4 gün boyunca tespit edilmiştir. Doku örneklerini içeren kasetler bir gece akarsu altında yıkanmış ve nemi korunarak tespit solüsyonundan arındırılmaları sağlanmıştır. Ertesi sabah doku takip kasetleri LEICA TP 1020 marka doku takip cihazında, giderek artan alkol konsantrasyonlarında (% 60, 70, 80 ve 90'lık etil alkollerde 30'ar, %96'lık ve 100'lük alkolde 60'ar dakika) dehidratasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Dehidratasyon işleminin ardından doku önce 1:1 oranında 30 dakika alkol:ksilen karışımında, daha sonra 2'şer kez 60'ar dakika ksilende tutulmuş, böylece dokunun şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. İnfiltrasyon işlemi, doku örnekleri 60 °C'lik etüvde 30 dakika 1:1 oranında ksilen:parafin karışımında, 2 değişim 60'şar dakika parafinde tutularak yapılmıştır. Bu işlemlerin ardından doku takip kasetleri TP 1020 marka cihazdan çıkarılmıştır.

3.2.4. Parafin Bloklardan Kesit Alma

Parafin bloklar sertleşmesi için bir gün önceden buzdolabında +4 °C'de tutulmuş, ertesi gün buzdolabından çıkartılarak oda ısısında tutulan parafin bloğun kenarı bıçağa paralel olacak ve kesit alınacak yüz bıçağa bakacak şekilde blok tutucuya yerleştirilmiştir. Bloktaki parafin fazlası, LEICA RM 2245 marka rotatuar mikrotomda, doku örneği gelene kadar 10 µm kalınlığında trimlenerek uzaklaştırılmıştır. Doku örneği açığa çıktığında örnekten 5 µm'lik ince kesitler alınmış, suluboya fırçası yardımıyla benmari içindeki 40 °C'lik suya bırakılarak kırışıklıkların açılması sağlanmıştır. Dokuların aktarılacağı lamlar üzerine doku kimlik bilgileri yazılmış ve ardından lamlar 45°'lik açı ile su banyosuna daldırılmış ve açılan kesitler lam üzerine alınmıştır. Daha sonra lamlar dik konumlandırılarak kurumaya bırakılmıştır. Lamlar üzerine yeterli doku örneği alındıktan sonra kesit alınan parafin bloğun kesit yüzeyi sıcak parafin ile kapatılmıştır. Lamalara alınan kesitler bir gece boyunca 37 °C'lik etüvde bekletilerek, kesitlerin parafinden arındırılması ve lama yapışması sağlanmıştır.

3.2.5. Kesitlerin Boyanması

Deneklerden alınan doku kesitlerindeki yapısal farklılıkları gözlemlemek için Hematoksilen&Eosin boyaması yapılmıştır.

Hematoksilen-Eosin Boyaması

Kesit alma işleminin ardından deparafinizasyon işlemi için parafin bloktan lama alınmış 5 µm'lik örnek kesitler etüvde bir gece bekletilmiştir. Etüvden alınan kesitler kimyasal deparafinizasyon işlemi için 30'ar dakika 2 değişim ksilende; kimyasal deparafinizasyondan sonra rehidratasyon işlemi için 2'şer dakika azalan alkol konsantrasyonlarında (%95'lik, 80'lik, 70'lik ve 60'lık etil alkol serilerinde) tutulmuştur. Rehidratasyondan sonrasında 5 dakikalık akarsu yıkamaları gerçekleştirilmiş, akarsudan sonra 6 dakika Hematoksilen boya (Merck) ile muamele edilmesinin ardından 5 dakikalık akarsuya bırakılmıştır. Bu işlemi takiben diferansiyasyon işlemi için asit alkol solüsyonuna 1-3 saniye batırılıp çıkarılmış ve yeniden 5 dakikalık akarsu yıkaması gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 5 dakika eosin boya (Merck) solüsyonunda tutulmuş ve 3 dakikalık akarsu yıkaması gerçekleştirilmiştir. Kesitler sırasıyla 1'er dakikalık %80 ve 95'lik alkol içinde tutulduktan sonra 1 saat ksilende bekletilmiştir. Bu işlemlerin ardından kesitler üzerine entellan damlatılarak kesitler lamel ile kapatılmış, penset vasıtasıyla hava kabarcıkları çıkarılmıştır. İşlemlerin sonunda hücreler nükleusları mavi-mor; stoplazma ve diğer doku kısımları pembe renk alarak ışık mikroskobu altında incelenecek duruma gelmiştir. Boyanan preparatlar Olympus B×43 tipi kamera ataçmanlı ışık mikroskobunda (Olympus SC100) incelenmiş, kesitler dijital fotoğraf makinesi ile fotoğraflanmıştır.

Doku örnekleri histopatolojik olarak kas liflerinin disorganizasyonu, interstisyel ödem, interstisyel hemoraji, nükleer dejenerasyon, perinükleer vakuolizasyon, inflamatuvar hücre varlığı ve fibrozis bakımından değerlendirilmiş ve histopatolojik değişimler skorlanmıştır. Her histopatolojik değişim 1 puan olarak değerlendirilmiş; değişim bulunmayanlar 0 kabul edilmiştir. Histopatolojik hasar

derecesi parametrelerin toplam puanına göre değerlendirilmiştir (0-2 puan: Hasar yok; 3-4 puan: Hafif derecede hasarlı 5-7 puan: Hasarlı) (129).

3.2.6. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi

Tümör Necrosis Faktör Alfa Tayini

TNF- α antikoruna ile kaplı kuyucuklara kalp dokusu homojenatı pipetlenmiş, doku 37 °C'de 90 dk inkübe edilmiştir. Her kuyucuğa biotin işaretli antikor eklenmiş, 37 °C'de 60 dk inkübe edilmiş sonrasında 3 kez 350 mikrolitre yıkama solüsyonuyla yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Avidin biotin peroksidaz kompleks eklenerek 30 dk 37 °C'de inkübe edildikten sonra 5 kez 350 mikrolitre yıkama solüsyonuyla yıkama yapılmıştır. Kromojen eklenmiş, ışısız ortamda 37 °C'de 30 dk inkübe edilmiş ve süre bitiminde tepkime H₂SO₄ kullanılarak sonlandırılmıştır.

Kreatin Kinaz Miyokardiyal Band Tayini

CK-MB antikoruna ile kaplı kuyucuklara kalp dokusu homojenatı pipetlenmiştir. Her kuyucuğa biotin işaretli antikor ve streptavidin işaretli HRP enzimi eklenmiş, 37 °C'de 60 dk inkübe edilmiş sonrasında 5 kez 350 mikrolitre yıkama solüsyonuyla yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. HRP enzimi için substrat eklenmesinin ardından karanlıkta 37 °C'de inkübe edilmiş ve süre sonunda H₂SO₄ kullanılarak tepkime sonlandırılmıştır.

İnterlökinlerin Tayini

IL-1, IL-18 ve IL-6 antikorları ile kaplı kuyucuklara kalp dokusu homojenatı pipetlenmiştir. Her kuyucuğa biotin işaretli antikor ve streptavidin işaretli HRP enzimi eklenmiş, 37 °C'de 60 dk inkübe edilmiş sonrasında 5 kez 350 mikrolitre yıkama solüsyonuyla yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. HRP enzimi için substrat eklenmesinin ardından karanlıkta 37 °C'de inkübe edilmiş ve süre bitiminde H₂SO₄ kullanılarak tepkime sonlandırılmıştır.

Nitrik Oksit Tayini

NO antikoru ile kaplı kuyucuklara kalp dokusu homojenatı pipetlenmiştir. Her kuyucuğa biotin işaretli antikor ve streptavidin işaretli HRP enzimi eklenmiş, 37 °C’de 60 dk inkübe edilmiş daha sonra da 5 kez 350 mikrolitre yıkama solüsyonuyla yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. HRP enzimi için substrat eklenmesinin ardından karanlıkta 37 °C’de inkübe edilmiş ve süre bitiminde H₂SO₄ kullanılarak reaksiyon sonlandırılmıştır.

Hipoksi ile İndüklenen Faktör 1 α Tayini

HIF-1 α antikoru ile kaplı kuyucuklara kalp dokusu homojenatı pipetlenmiştir. Her kuyucuğa biotin işaretli antikor ve streptavidin işaretli HRP enzimi eklenmiş, 37 °C’de 60 dk inkübe edilmiş daha sonra da 5 kez 350 mikrolitre yıkama solüsyonuyla yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. HRP enzimi için substrat eklenmesinin ardından karanlıkta 37 °C’de inkübe edilmiş ve süre bitiminde H₂SO₄ kullanılarak reaksiyon sonlandırılmıştır.

Total Antioksidan Seviye Tayini

Doku örneklerinde total antioksidan seviyesi, Architect C16000 (Abbott Diagnostic, USA) marka klinik kimya otoanalizörü kullanılarak kit (Rel Assay Diagnostics, Referans No: RL0017; Lot No: DR15056A) yardımıyla tayin edilmiştir. 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 dayanmaktadır 660 nm’deki absorbans değişimi numunedeki total antioksidan düzeyiyle alakalıdır. Ölçümde, kalp dokusu homojenatından elde edilen süpernatant kullanılmıştır.

Total Oksidan Seviye Tayini

Doku örneklerinde total antioksidan seviyesi, Architect C16000 (Abbott Diagnostic, USA) marka klinik kimya otoanalizörü kullanılarak kit (Rel Assay Diagnostics, Ref No: RL0024; Lot No: NR130440) aracılığıyla ölçülmüştür. Numunede bulunan oksidanlar, ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyon

yükseltger. Oluşan ferrik iyon ph'sı düşük ortamda kromojenle renkli bir kompleks oluşturur. Rengin spektrofotometrik olarak belirlenen yoğunluğu, numunede bulunan oksidan moleküllerin total miktarıyla ilgilidir. Ölçümde kalp dokusu homojenatından elde edilen süpernatant, standart olarak hidrojen peroksit çözeltisi kullanılmıştır.

Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayini

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

Bu metotta süperoksit üretmek amacıyla ksantin ve ksantin oksidaz kullanılmaktadır. Reaksiyon sonunda ortaya çıkan süperoksit, 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyumklorid 41 (INT) ile tepkimeye girer ve bu etkileşim kırmızı renk formazon oluşumuna yol açar. Numunelerdeki SOD aktivitesi tepkimenin inhibisyonuna göre belirlenir. INT düzeyinin azalması %50 oranında inhibe eden SOD ünite olarak ifade edilir ve 505 nm'de absorbans okuması yapılır. SOD aktivitesi doku için "U/mg protein" olarak hesaplanmıştır.

Glutasyon Peroksidaz Aktivite Tayini

Dokuda GPx analizi Randox Ransel marka GPx (Lot No: 360781; Ref No: RS505) kiti kullanılarak yapılmıştır. Glutasyon peroksidaz aktivitesi, Paglia ve Valentine yöntemine dayalı saptanır. Glutasyon peroksidaz, kümen hidroperoksit ile glutasyonun oksidasyonunu katalizler. Kümen hidroperoksidin indirgenmesiyle ortaya çıkan okside glutasyon (glutasyonun yükseltgenmiş formu) (GSSG), glutasyon redüktaz (GR) ve NADPH varlığında NADPH'ın NADP⁺'ye yükseltgenmesiyle indirgenir. Enzim aktivitesi, spektrofotometrik yöntemle 340 nm'de absorbanstaki değişim izlenerek belirlenir.

Katalaz Tayini

Katalaz tayini, kinetik ölçüme dayalı Aebi yöntemine dayanır. Katalaz, hidrojen peroksidin su ve moleküler oksijen vermek üzere bozunmasını katalize eder.

Çalışmamızda katalaz aktivitesi, hidrojen peroksit konsantrasyonunda birim zamandaki azalmanın 240 nm'de spektrofotometrik yöntemle izlenmesiyle belirlenmiştir.

Dokuda katalaz aktivitesinin tayini için önceden hazırlanan homojenizatlar, 50mM fosfat tamponu (pH=7,0) ile 1:5 oranında seyreltilmiş, 2,00 mL homojenizat üzerine 1,00 mL hidrojen peroksit çözeltisi (30mM) eklenip 15'er saniye aralıklarla 240 nm'deki absorban değişimleri kaydedilmiştir. Benzer işlemler kör denemeyle de tekrarlanmış, aktivite hesabı, başlangıç ile 30. saniye absorbanları göz önünde bulundurularak ve hemolizat için kullanılan formüle göre hesaplanmıştır. Elde edilen değerlerin seyrelme faktörü ile çarpılmış, protein miktarına bölünmüş ve "k/g protein" cinsinden aktivite birimi ifade edilmiştir.

Aspartat Aminotransferans Tayini

Ratların AST seviyeleri Architect C16000 (Abbott Diagnostic, USA) marka klinik kimya otoanalizörü kullanılarak tespit edilmiştir. (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 katalize eder. Ortamda yeterli miktarda α -ketoglutarat ve L-Aspartat bulunması halinde AST, oksaloasetat ve L-Glutamat oluşumuna sebebiyet verir. Meydana gelen oksaloasetat NADH varlığında malat dehidrogenaz enzimi ile L-Malat'a indirgenir ve NAD meydan çıkar.

Malondialdehit Tayini

Bu ürün, biyolojik materyallerde farklı kovalent bağlı formlarda ve serbest halde bulunur. Sıcakta asit veya bazla muameleyle kovalent yapıdan ayrıştırılır. MDA tayini, TBA ile tepkimeye girerek oluşturduğu renkli kompleksin spektrofotometrik yöntemle izlenmesine dayanır.

Tüpler 0,5 mL numune üzerine 2,5 mL %10'luk TCA ilave edilerek vortekste karıştırılmalarının ardından, 15 dakika kaynar suda bekletilip hemen soğumaya alınmıştır. 5000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüjleme işlemi ardından her bir süpernatandan 2'şer mL başka bir tüpe aktarılmış, üzerine de 1 mL %0,67'lik TBA eklenip vortekste karıştırma işlemi yapılmıştır.

3.2.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın EKG, biyokimya ve histoloji verilerinin tüm istatistiksel değerlendirmesinde SPSS 22.0 (Statistical Package for Social Sciences) istatistik programı kullanılmıştır. Gruplar arası farklılıkları saptamak için Kruskal-Wallis varyans analizi yapılmış, anlamlılık ortaya çıkması halinde bu anlamlılığın hangi gruplar arasında olduğunu görebilmek amacıyla non-parametrik yöntem Mann-Whitney U testiyle ikişerli karşılaştırma yapılmıştır. Histoloji bulgularının istatistiğinde ki-kare testi uygulanmış, ortalamalar ile standart sapmalar hesaplanarak p değerinin 0.05'ten küçük olduğu durumlar anlamlı olarak kaydedilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. EKG Bulguları

Tablo 3'te kontrol ve ilaç gruplarında ölçülen EKG parametrelerinin istatistiksel değerlendirmesi verilmektedir.

Tablo 3: Grupların EKG parametre değerleri

Gruplar	PR (s)	QRS (s)	RR (s)	QT (s)	QTc (s)
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS
Kontrol	0.050±0.006	0.018±0.002	0.284±0.074	0.089±0.021	0.167±0.024
DXR	0.059±0.013♦	0.024±0.006♦	0.274±0.046	0.121±0.021♦	0.233±0.040♦
DXR+Mel	0.059±0.004♦	0.022±0.002♦	0.275±0.037	0.111±0.017♦	0.212±0.026♦
DXR+ADR	0.055±0.007♦	0.019±0.002♦*	0.303±0.059♦	0.107±0.021♦♦	0.195±0.033♦♦*

Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, s: Saniye, DXR: Doksorubisin, Mel: Melatonin, ADR: Adrenomedullin

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

♦: DXR grubuna göre anlamlı (p<0,05),

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

Kardiyotoksosite ajanı olan DXR enjekte edilen sıçanlardaki EKG parametre değerleri kontrol grubuyla kıyaslandığında, hem PR intervali hem QRS süresi daha uzun bulunmuş, buna paralel olarak QT ve QTc süreleri uzamıştır.

DXR+MEL grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında PR intervali, QRS süresi, QT ve QTc sürelerinde uzama gözlenmiştir.

DXR+ADR grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PR intervali, QT ve QTc sürelerinde istatistiksel olarak anlamlı uzama tespit edilmiştir.

4.2. Histoloji Bulguları

Hayvanların sol kalpte oluşan histopatolojik hasar derecesine göre gruplar arası dağılımı Tablo 4'te belirtilmiştir. Sonuçlara göre kontrol grubunda bulunan hayvanların 5 (%83,3)'inde normal histolojik yapı; 1 (%16,7) tanesinde hafif hasar

gözlenmiştir. DXR grubundaki 1 (%12,5) hayvanının dokusunda hafif hasar bulunurken, 7 (%87,5) tanesinin hasarlı grupta yer aldığı belirlenmiştir. DXR+MEL grubunda 3 hayvanın (%50,0) hafif, diğer 3 (%50,0)'ünün ise hasarlı dokuya sahip olduğu tespit edilmiştir. DXR+ADR grubunda yer alan 7 denekten ise 3 (%42,9)'ü hafif hasarlı, 4 (%57,1)'ü hasarlı olduğu ortaya çıkmıştır.

Tablo 4: Hayvanların sol kalpte oluşan histopatolojik hasar derecesine göre dağılımı

GRUPLAR	HASAR YOK n (%)	HAFİF HASAR n (%)	HASARLI n (%)	TOPLAM n (%)
Kontrol	5 (83,3)	1 (16,7)	0 (0,0)	6 (100)
DXR	0 (0,0)	1 (12,5)	7 (87,5)	8 (100)
DXR + MEL	0 (0,0)	3 (50,0)	3 (50,0)	6 (100)
DXR + ADR	0 (16,7)	3 (42,9)	4 (57,1)	7 (100)
Toplam	5 (18,5)	8 (29,6)	14 (46,2)	27 (100)

Tablo 5'te sol kalbin histolojik incelemesi sonucu elde edilen hasar skorlarının ortalama değerleri belirtilmiştir. Kruskal-Wallis testinin sonucuna göre gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmiştir. Kontrol grubunun ortalama değeri ($1,50 \pm 1,22$) DXR ($5,50 \pm 1,06$), DXR+MEL ($4,50 \pm 1,04$) ve DXR+ADR ($5,00 \pm 1,15$) gruplarının ortalama değerlerinden küçük ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. DXR+MEL ve DXR+ADR grupları ile DXR grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlılık tespit edilmemiştir.

Tablo 5: Sol kalpteki histopatolojik hasar skorlarının ortalama değerleri

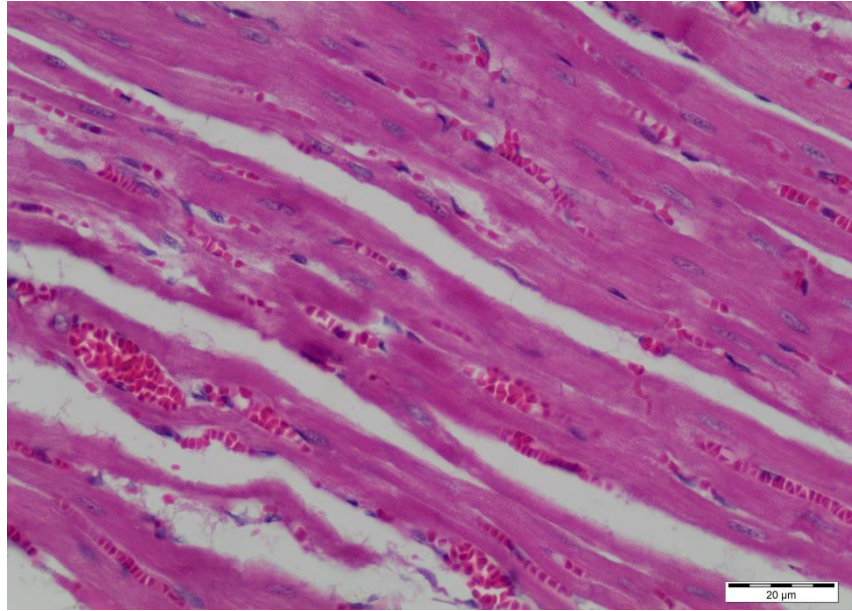
Gruplar	N	Mean \pm SS
Kontrol	6	1,50 \pm 1,22
DXR	8	5,50 \pm 1,06♦
DXR + Mel	6	4,50 \pm 1,04♦
DXR + ADR	7	5,00 \pm 1,15♦

Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, DXR: Doksorubisin, Mel: Melatonin, ADR: Adrenomedullin

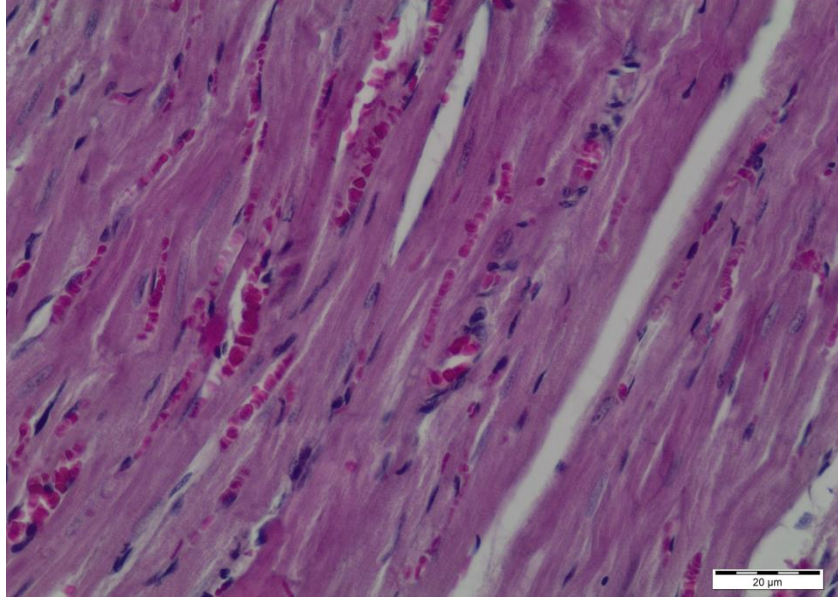
♦: Kontrol grubuna göre anlamlı (p<0,05)

•: DXR grubuna göre anlamlı (p<0,05)

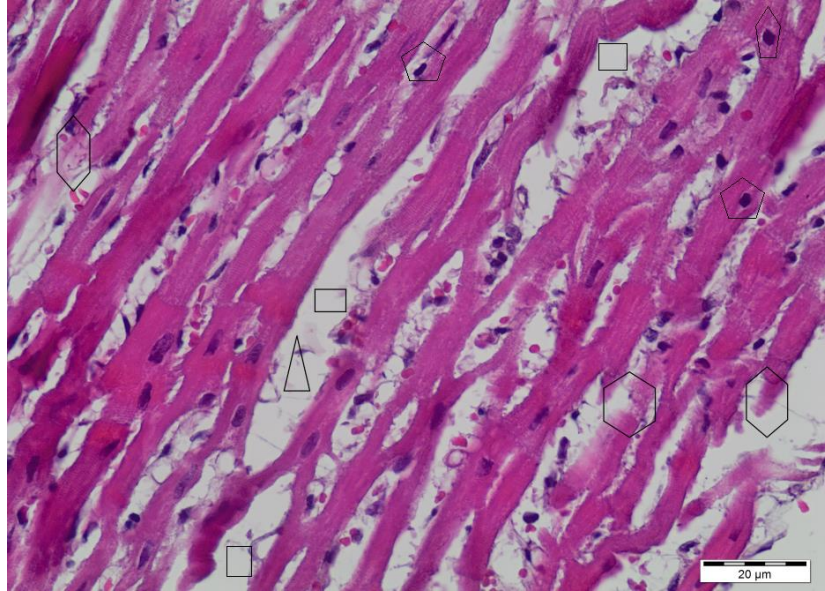
*: DXR+MEL grubuna göre anlamlı (p<0,05)



Resim 1: Kontrol grubu sol ventrikül normal doku görüntüsü (H&E boyama X40; bar: 20µm)

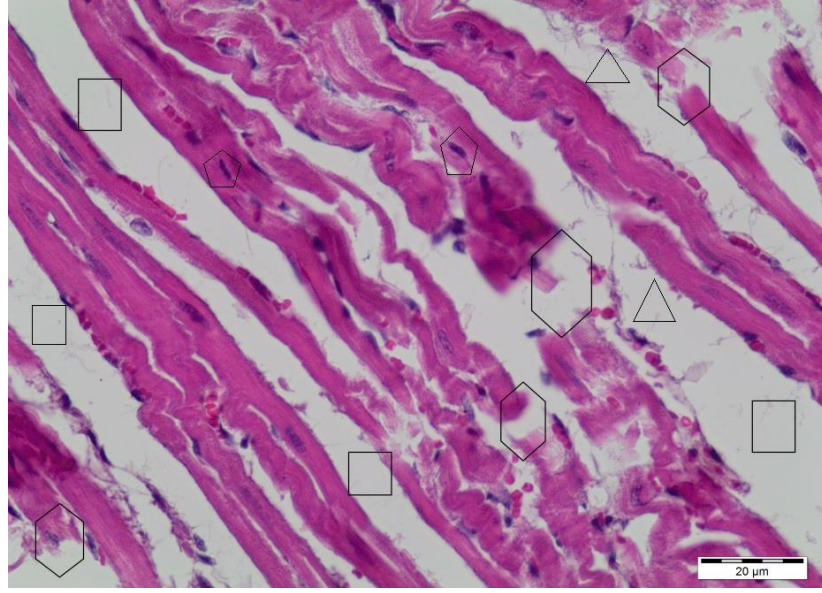


Resim 2: Kontrol grubu sol ventrikül normal doku görünümü (H&E boyama X40; bar: 20µm)

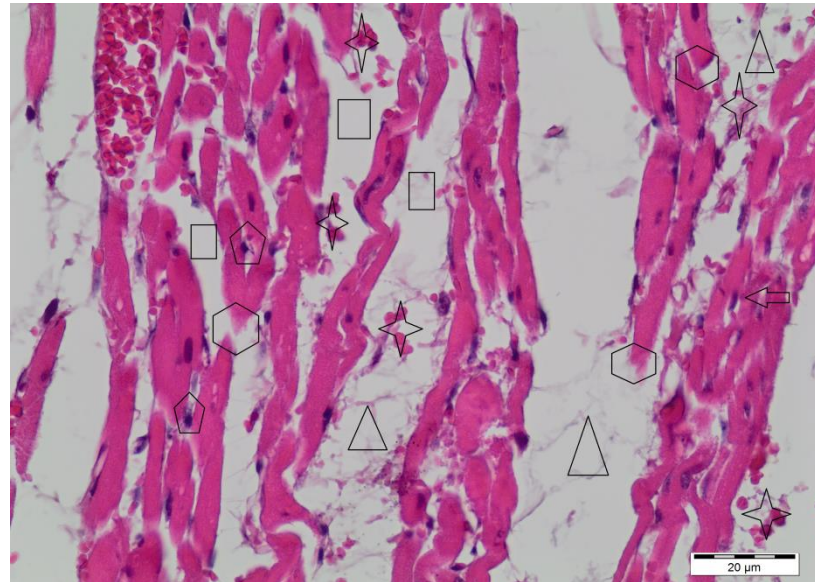


Resim 3: DXR grubunda oluşan hasar görüntüsü (H&E boyama X40; bar: 20µm)

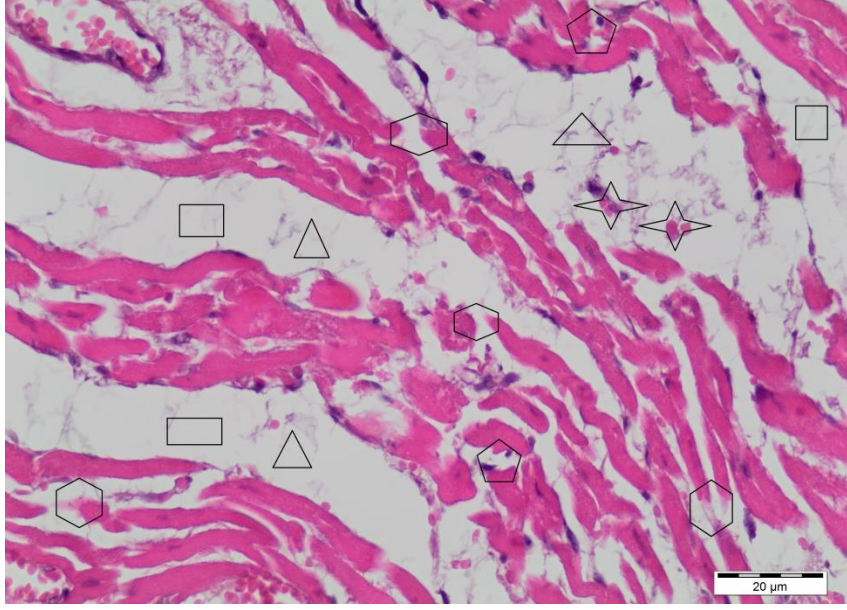
□ : interstisyel ödem ; ⬡ : liflerde disorganizasyon ; △ : fibrözis ;
⬠ : nükleer dejenerasyon



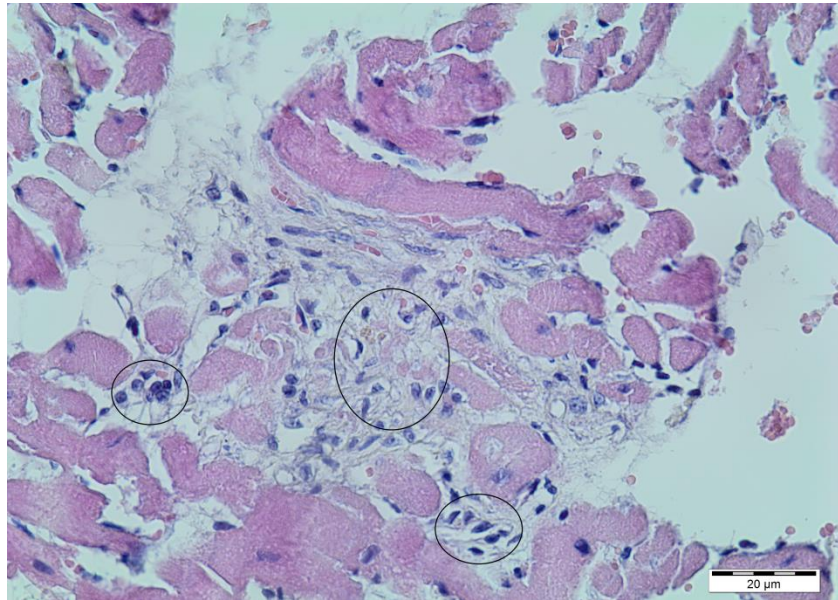
Resim 4: DXR grubunda meydana gelen hasar görüntüsü (H&E boyama X40; bar: 20µm)
□: interstisyel ödem ; ⬡: liflerde disorganizasyon ; △: fibrözis ; ⬠: nükleer dejenerasyon



Resim 5: DXR grubunda meydana gelen hasar görüntüsü (H&E boyama X40; bar: 20µm)
□: interstisyel ödem ; ⬡: liflerde disorganizasyon ; △: fibrözis ;
⬠: nükleer dejenerasyon ; ☆: interstisyel hemoraji ; ⇐: perinükleer vakuolizasyon

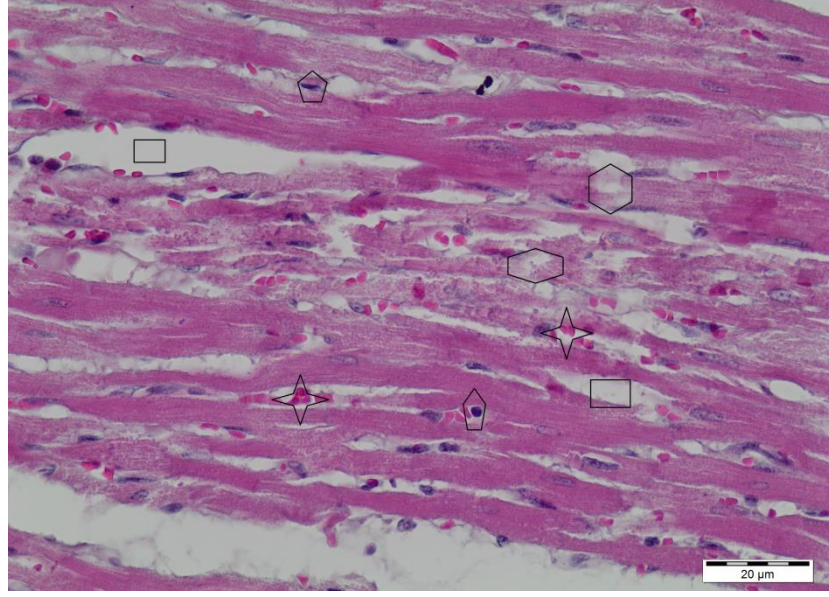


Resim 6: DXR grubunda oluşan hasar görüntüsü (H&E boyama X40; bar: 20µm)
□: interstisyel ödem ; ⬡: liflerde disorganizasyon ; △: fibrözis ; ⬠: nükleer dejenerasyon ;
☆: interstisyel hemoraji

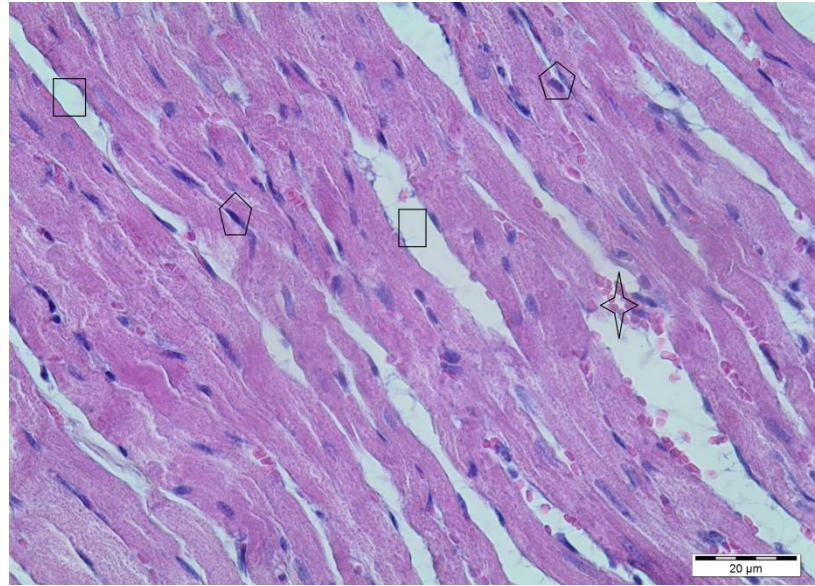


Resim 7: DXR grubunda meydana gelen hasar görüntüsü (H&E boyama X40; bar: 20µm)

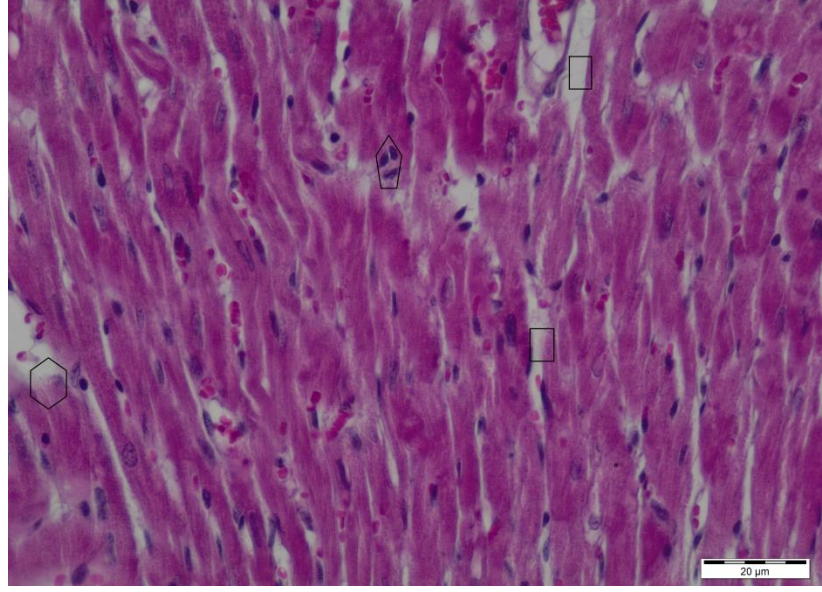
○: infiltrasyon



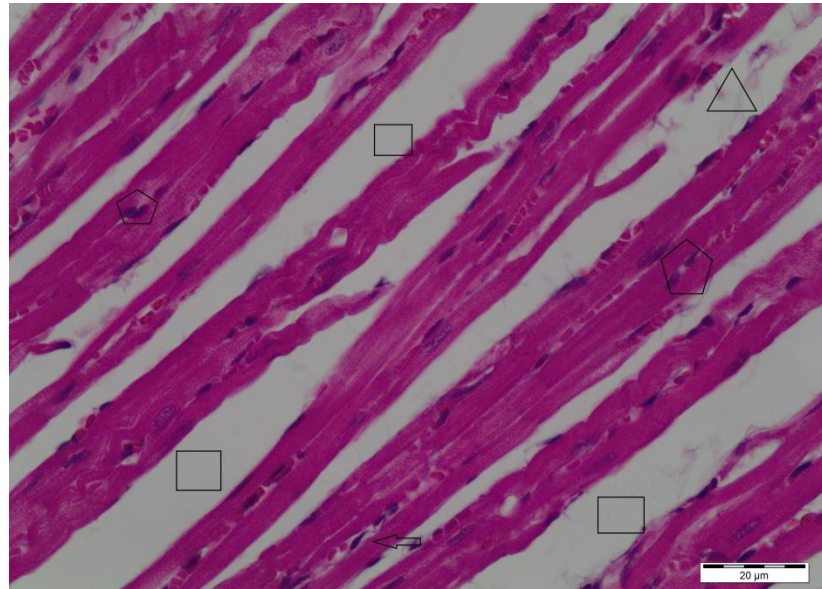
Resim 8: DXR+MEL grubu sol ventrikül dokusunun görünümü (H&E boyama X40-bar: 20µm)
□ : interstisyel ödem ; ⬡ : liflerde disorganizasyon ; ⬠ : nükleer dejenerasyon ;
✧ : interstisyel hemoraji



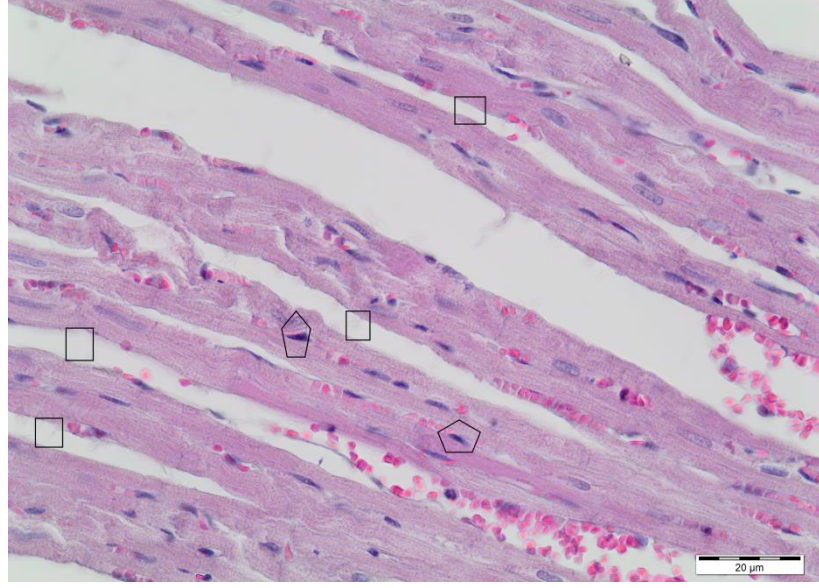
Resim 9: DXR+MEL grubu sol ventrikül dokusunun görüntüsü (H&E boyama X40-bar: 20µm)
□ : interstisyel ödem ; ⬠ : nükleer dejenerasyon ; ✧ : interstisyel hemoraji



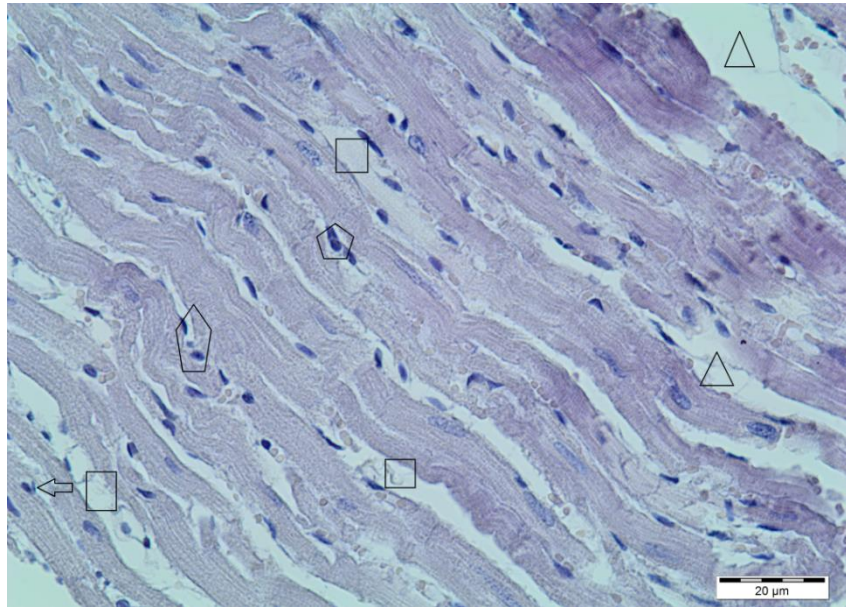
Resim 10: DXR+MEL grubu sol ventrikül dokusunun görünümü (H&E boyama X40-bar: 20µm)
□ : interstisyel ödem ; ⬠ : nükleer dejenerasyon ; ⬡ : liflerde disorganizasyon



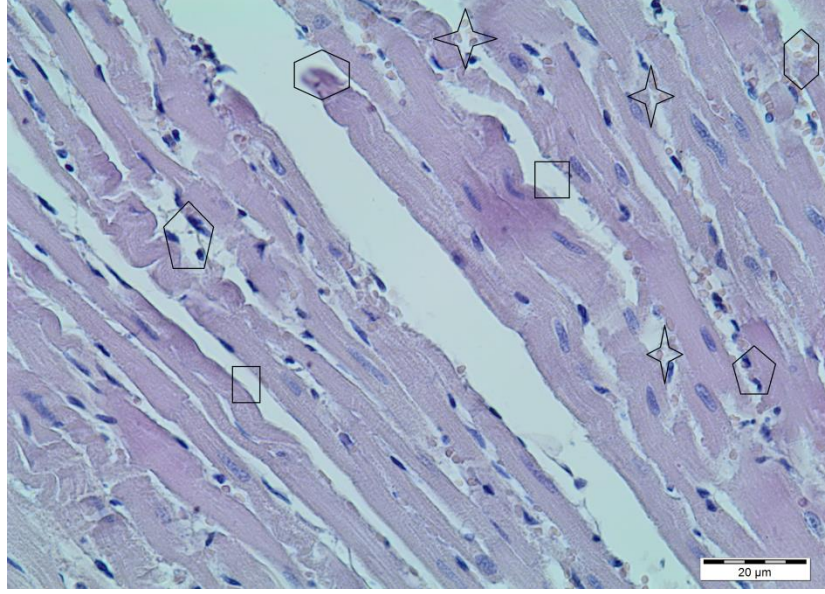
Resim 11: DXR+ADR grubu dokusunda oluşan değişim (H&E boyama X40- bar: 20µm)
□ : interstisyel ödem ; ⬠ : nükleer dejenerasyon ; ⬡ : fibrözis



Resim 12: DXR+ADR grubu dokusunda oluşan değişim (H&E boyama X40- bar: 20µm)
□ : interstisyel ödem ; ◡ : nükleer dejenerasyon ; ✦ : interstisyel hemoraji



Resim 13: DXR+ADR grubu dokusunda meydana gelen değişim (H&E boyama X40- bar: 20µm)
□ : interstisyel ödem ; ◡ : nükleer dejenerasyon ; △ : fibrözis ; ⇐ : perinükleer vakuolizasyon



Resim 14: DXR+ADR grubu dokusunda meydana gelen değişim (H&E boyama X40- bar: 20µm),
□ : interstisyel ödem ; ◓ : nükleer dejenerasyon ; ☆ : interstisyel hemoraji ,
◓ : liflerde disorganizasyon

Grupların sağ ventrikül dokularında oluşan hasar seviyelerine göre dağılımları Tablo 6'da gösterilmiştir. Kontrol grubunda bulunan 6 (% 100,0) hayvanın tamamının normal histolojik yapı gösterdiği saptanırken; DXR grubunda bulunan 8 (% 100) hayvanın 1 (% 12,5) tanesi hafif derecede hasarlı, 7 (% 87,5) tanesi hasarlı sınıfına girmiştir. DXR+MEL grubundan 3 (% 50,0) hayvan normal histolojik yapıya sahip iken, 2 (% 33,3) tanesi hafif derecede hasarlı, 1 (%16,7) tanesi hasarlı sınıfına dahil olmuştur. DXR+ADR grubunda bulunan 7 (% 100) hayvanın 1 (% 14,3) tanesinde hafif hasar gözlenirken, 6 (% 85,7) tanesinde hasar tespit edilmiştir.

Tablo 6: Hayvanların sağ kalpte oluşan histopatolojik hasar derecesine göre dağılımı

GRUPLAR	HASAR YOK	HAFİF HASAR	HASARLI	TOPLAM
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Kontrol	6 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (100)
DXR	0 (0,0)	1 (12,5)	7 (87,5)	8 (100)
DXR + MEL	3 (50,0)	2 (33,3)	1 (16,7)	6 (100)
DXR + ADR	0 (0,0)	1 (14,3)	6 (85,7)	7 (100)
Toplam	9 (33,3)	4 (14,8)	14 (51,9)	27 (100)

Deney gruplarının hasar skorlaması yapılmış ve ortalama değerler Tablo 7’de verilmiştir. Skorum sonucunu yapılan istatistiksel sonuca göre gruplar arasında anlamlı fark olduğu saptanmıştır. Kontrol grubunun ortalama değeri (0.50 ± 0.83), DXR (5.75 ± 1.03), DXR+MEL (2.66 ± 1.36) ve DXR+ADR (5.71 ± 1.11) gruplarının ortalama değerlerinden küçük ve istatistiksel olarak anlamlıdır. DXR grubu DXR+MEL grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, DXR+ADR grubu ile arasında anlam tespit edilmemiştir. DXR+MEL grubu ortalaması DXR+ADR ile mukayese edildiğinde ise anlamlı derecede düşük bulunmuştur.

Tablo 7: Sağ kalpteki histopatolojik hasar skorlarının ortalama değerleri

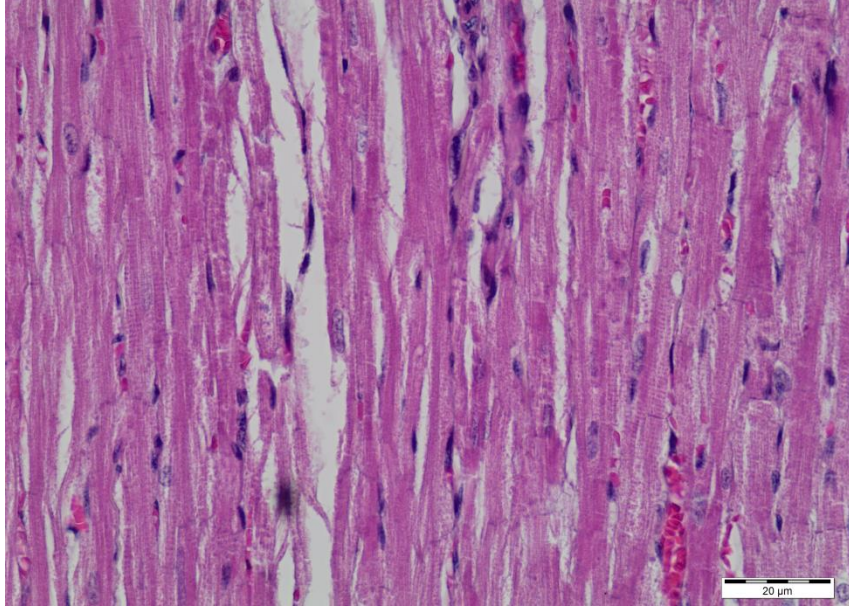
GRUPLAR	n	Mean \pm SS
Kontrol	6	0.50 ± 0.83
DXR	8	5.75 ± 1.03 ♦
DXR + MEL	6	2.66 ± 1.36 ♦♦
DXR + ADR	7	5.71 ± 1.11 ♦*

Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, DXR: Doksorubisin, Mel: Melatonin, ADR: Adrenomedullin

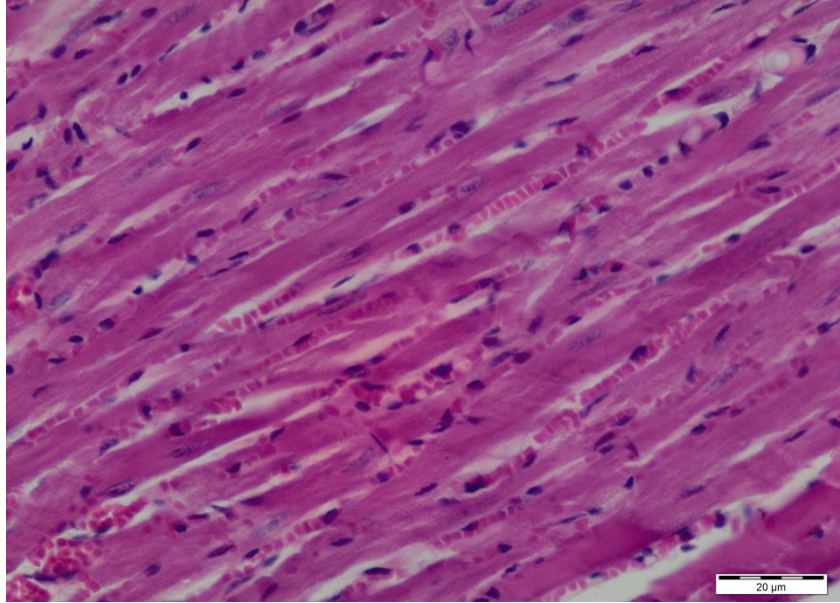
♦: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$)

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

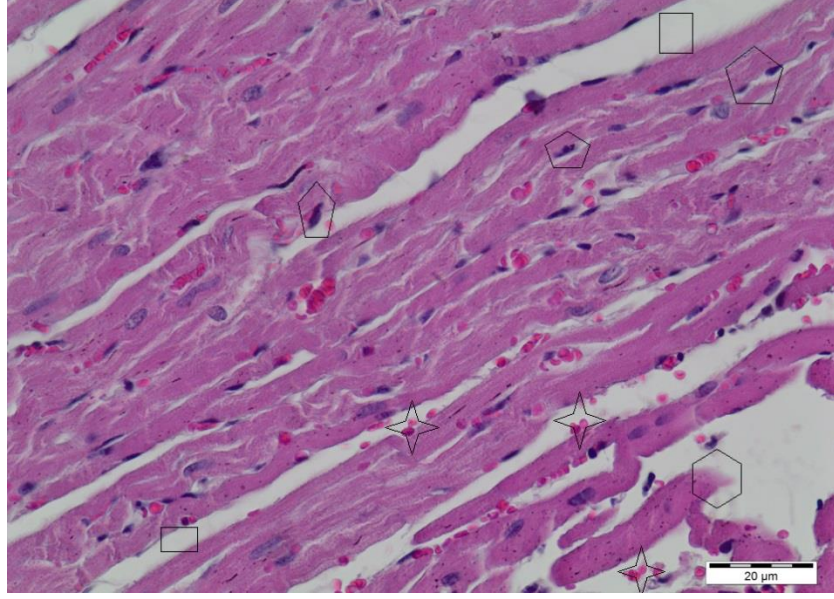
*: DXR+MEL grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$)



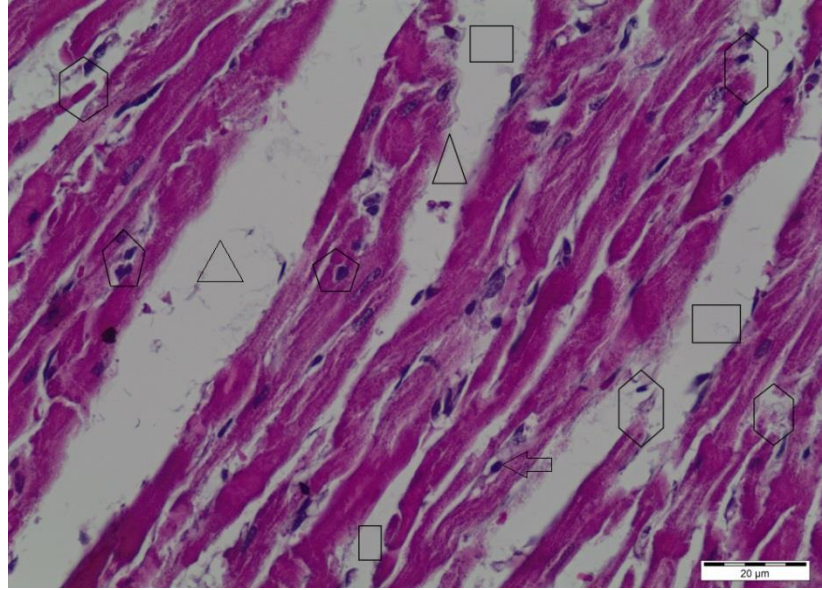
Resim 15: Kontrol grubu sağ ventrikül doku görüntüsü (H&E boyama X40; bar: 20µm)



Resim 16: Kontrol grubu sağ ventrikül doku görünümü (H&E boyama X40; bar: 20µm)



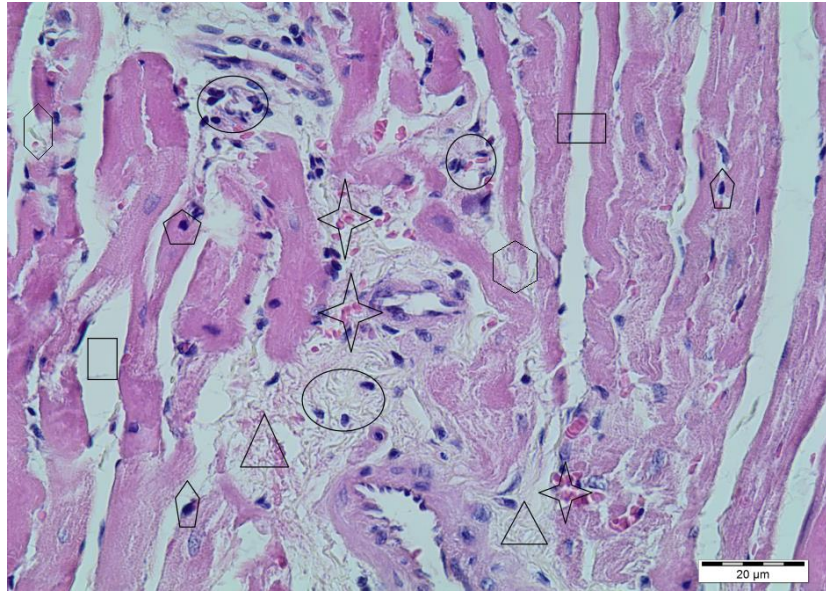
Resim 17: DXR grubu sağ ventrikülde meydana gelen hasar görüntüsü (H&E boyama X40- bar: 20µm) □: interstisyel ödem ; ⬠: nükleer dejenerasyon ; ☆: interstisyel hemoraji , ⬡: liflerde disorganizasyon



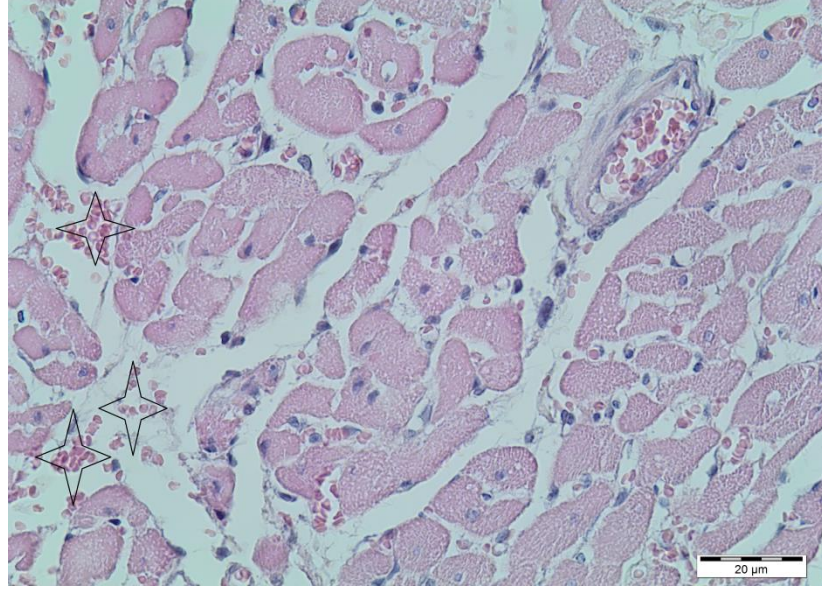
Resim 18: DXR grubu sağ ventrikülde oluşan hasar görüntüsü (H&E boyama X40- bar: 20µm) □: interstisyel ödem ; ⬠: nükleer dejenerasyon ; △: fibrözis ; ⇔: perinükleer vakuolizasyon



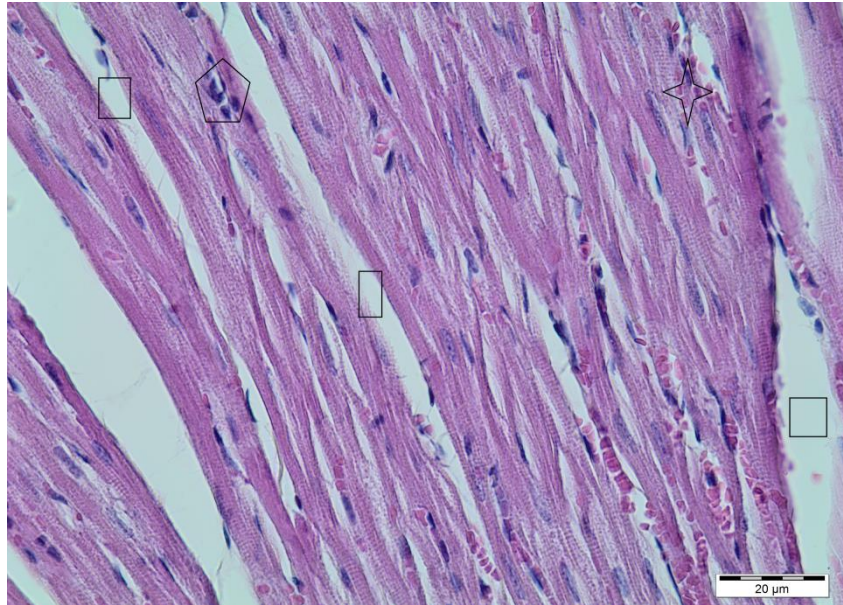
Resim 19: DXR grubu sağ ventrikülde oluşan hasar görüntüsü (H&E boyama X40- bar: 20µm)
 □ : interstisyel ödem ; ⬠ : nükleer dejenerasyon ; ☆ : interstisyel hemoraji ,
 ⬡ : liflerde disorganizasyon ; ○ : infiltrasyon



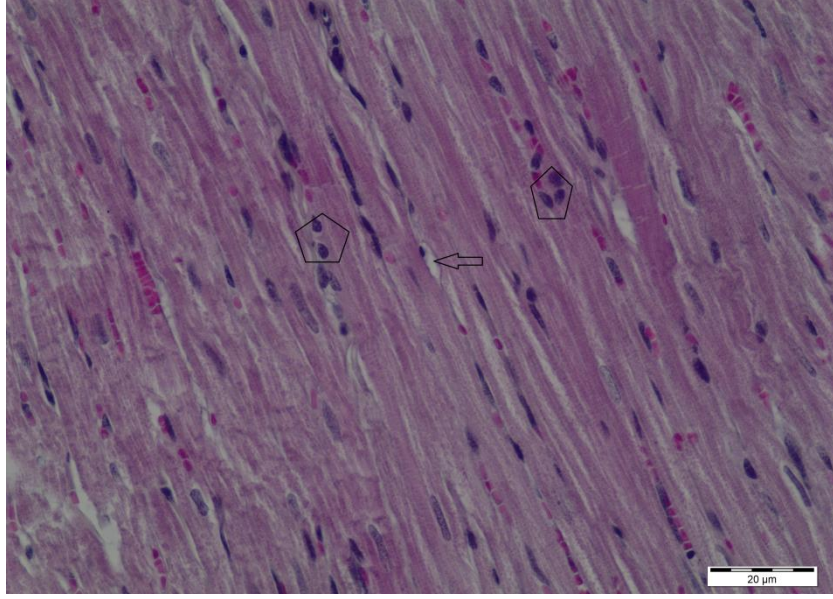
Resim 20: DXR grubu sağ ventrikülde oluşan hasar görüntüsü (H&E boyama X40- bar: 20µm)
 □ : interstisyel ödem ; ⬠ : nükleer dejenerasyon ; ☆ : interstisyel hemoraji ,
 ⬡ : liflerde disorganizasyon ; ○ : infiltrasyon ; △ : fibrözis



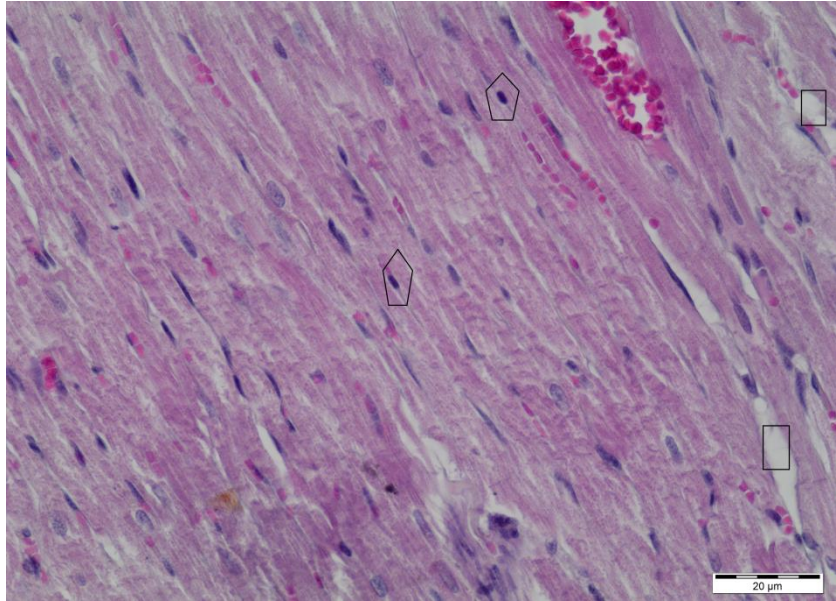
Resim 21: DXR grubu sağ ventrikülde meydana gelen hasar görüntüsü (H&E boyama X40- bar: 20µm) ☆: interstisyel hemoraji



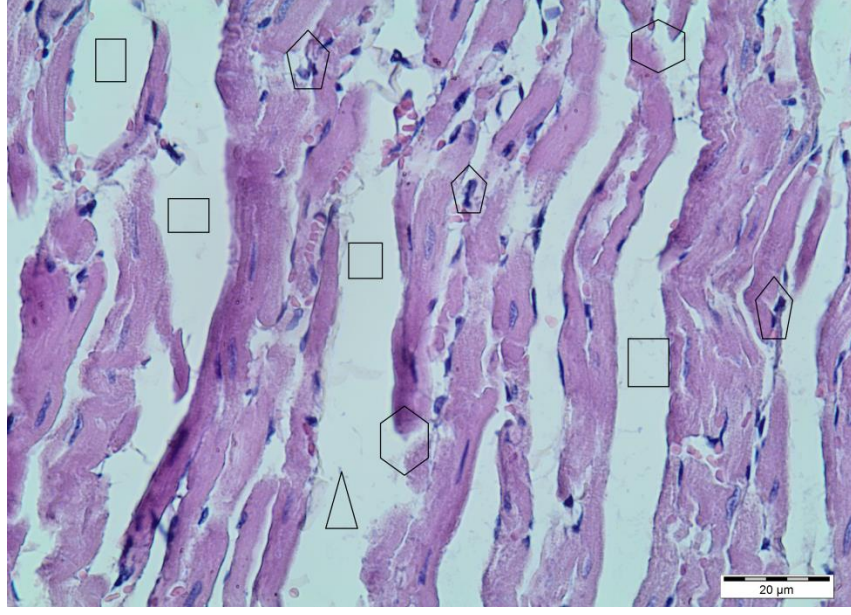
Resim 22: DXR+MEL grubu sağ ventrikül doku görüntüsü (H&E boyama X40-bar: 20µm)
□: interstisyel ödem ; ⬠: nükleer dejenerasyon ; ☆: interstisyel hemoraji



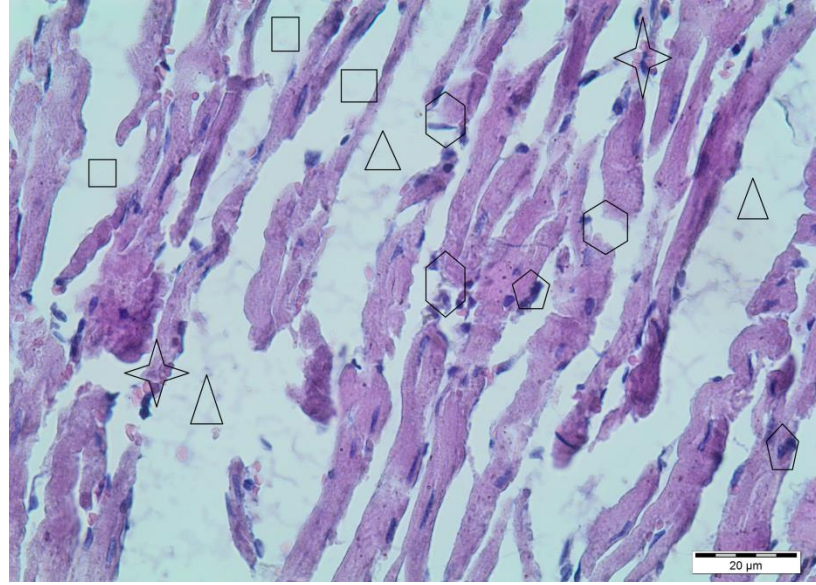
Resim23: DXR+MEL grubu sağ ventrikül doku görünümü (H&E boyama X40-bar: 20µm)
◡ : nükleer dejenerasyon ; ⇨ : perinükleer vakuolizasyon



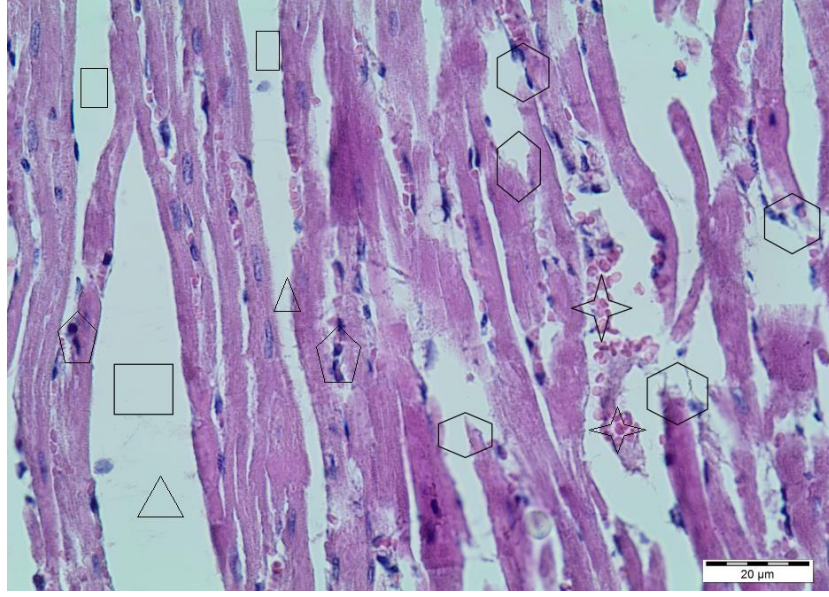
Resim 24: DXR+MEL grubu sağ ventrikül doku görüntüsü (H&E boyama X40-bar: 20µm) ,
◡ : interstisyel ödem ; ◡ : nükleer dejenerasyon



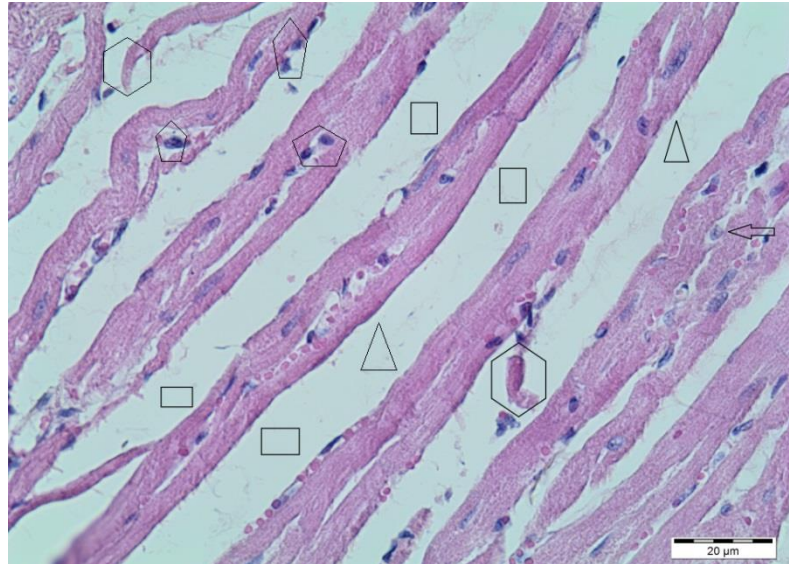
Resim 25: DXR+ADR grubu sağ ventrikül dokusunda oluşan değişimler (H&E boyama X40-bar:20µm) □ : interstisyel ödem ; ⬠ : nükleer dejenerasyon ; ⬡ : liflerde disorganizasyon ;
△ : fibrözis



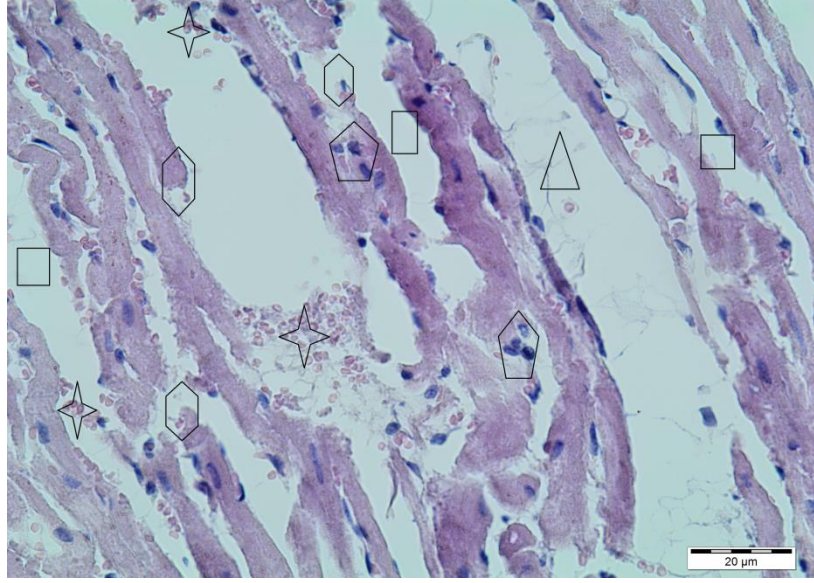
Resim 26: DXR+ADR grubu sağ ventrikül dokusunda oluşan değişimler (H&E boyama X40-bar:20µm) □ : interstisyel ödem ; ⬠ : nükleer dejenerasyon ; ⬡ : liflerde disorganizasyon ;
△ : fibrözis ; ☆ : interstisyel hemoraji



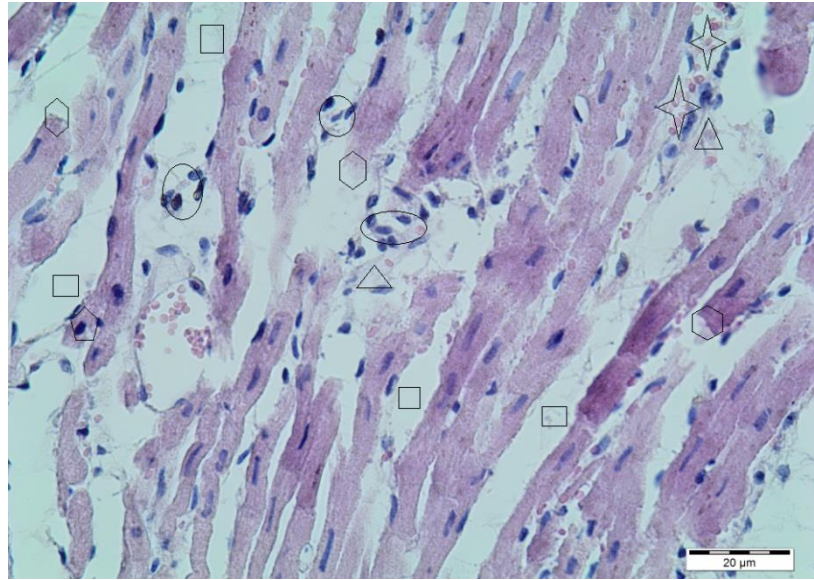
Resim 27: DXR+ADR grubu sağ ventrikül dokusunda oluşan değişimler (H&E boyama X40-bar:20µm) □: interstisyel ödem ; ⬠: nükleer dejenerasyon ; ⬡: liflerde disorganizasyon ; △: fibrözis ; ☆: interstisyel hemoraji



Resim 28: DXR+ADR grubu sağ ventrikül dokusunda oluşan değişimler (H&E boyama X40-bar:20µm) □: interstisyel ödem ; ⬠: nükleer dejenerasyon ; ⬡: liflerde disorganizasyon ; △: fibrözis ; ⇐: perinükleer vakuolizasyon



Resim 29: DXR+ADR grubu sağ ventrikül dokusunda oluşan değişimler (H&E boyama X40-bar:20μm) □: interstisyel ödem ; ⬠: nükleer dejenerasyon ; ⬡: liflerde disorganizasyon ; ⬤: fibrözis ; ☆: interstisyel hemoraji



Resim 30: DXR+ADR grubu sağ ventrikül dokusunda oluşan değişimler (H&E boyama X40-bar:20μm) □: interstisyel ödem ; ⬠: nükleer dejenerasyon ; ⬡: liflerde disorganizasyon ; ⬤: fibrözis ; ☆: interstisyel hemoraji ; ○: infiltrasyon

4.3. Biyokimya Bulguları

Kontrol ve deney gruplarında dokuda ölçülen biyokimyasal parametre sonuçları ve istatistiksel değerlendirmeler Tablo 8’de gösterilmiştir. Kreatin kinaz miyokardiyal bant (CK-MB) seviyeleri incelendiğinde DXR grubunda kontrol grubuna göre anlamlı artış gözlenirken, DXR+MEL grubunda anlamlı düşüş belirlenmiştir. DXR grubu ile kıyaslandığında DXR+MEL grubunda anlamlı azalma olduğu bulunmuştur. DXR+ADR grubunda DXR+MEL grubuna göre anlamlı artışa rastlanmıştır.

HIF-1 α düzeyleri değerlendirildiğinde sadece DXR+MEL grubunda kontrol grubuna göre azalma görülmüştür. Ek olarak DXR+ADR grubunda DXR+MEL grubuna göre anlamlı artış olduğu belirlenmiştir.

İnterlökin-1 (IL-1) seviyesi ele alındığında kontrol grubuna göre sadece DXR+MEL grubunda azalma gözlenmiştir ve bu azalma anlamlıdır. DXR grubu ile karşılaştırıldığında yine sadece DXR+MEL grubunda anlamlı azalma olduğu tespit edilmiştir. DXR+MEL ile DXR+ADR grupları kıyas edildiğinde ise DXR+ADR grubunda DXR+MEL grubuna göre anlamlı artış meydana gelmiştir.

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, IL-6 seviyesinde diğer hiçbir grup arasında fark tespit edilmemiştir. DXR grubuyla kıyas edildiğinde DXR+MEL grubunda anlamlı düşüş meydana geldiği belirlenmiştir. DXR+ADR ile DXR+MEL grupları birbiriyle kıyaslandığında DXR+ADR grubunda DXR+MEL grubuna göre anlamlı artış gözlenmiştir.

IL-18 seviyesi incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla DXR+MEL grubunda anlamlı azalma tespit edilmiştir. DXR grubu ile kıyaslandığında, DXR+MEL grubunda belirgin düşme saptanmıştır. DXR+MEL grubuna göre de DXR+ADR grubunda anlamlı derecede artma meydana gelmiştir.

Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeyi, kontrol grubuna göre DXR grubunda anlamlı derecede yüksek, DXR+ADR grubunda anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur. DXR grubuyla karşılaştırıldığında DXR+MEL ve DXR+ADR grupları ortalamasının anlamlı olarak azaldığı göze çarpmıştır.

NO değerleri bakımından kontrol grubuna göre sadece DXR+MEL grubunda azalma gözlenmiştir ve bu azalma anlamlıdır. DXR+MEL grubunda DXR grubuna

göre anlamlı bir azalma, DXR+ADR grubunda DXR+MEL grubuna göre anlamlı bir artma saptanmıştır.

Endojen antioksidan olan glutatyon peroksidaz (GPx) enzimi kontrol grubuyla kıyaslandığında DXR ve DXR+MEL gruplarında düşüş gözlenmiş ve bu düşüşün anlamlı olduğu fark edilmiştir. DXR grubuna kıyasla DXR+MEL grubunda anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. DXR+ADR grubunda ise DXR+MEL grubuna göre anlamlı bir artış söz konusu olmuştur.

Tablo 8: Dokuda ölçülen biyokimyasal parametre değerleri

	Kontrol (n=6) Ort±SS	DXR (n=8) Ort±SS	DXR+MEL (n=6) Ort±SS	DXR+ADR (n=7) Ort±SS
CK-MB (ng/mg protein)	7,21±2,28	11,96±3,55♦	4,07±0,74♦♦	9,19±2,73*
HIF-1α (ng/mg protein)	2,22±0,60	3,07±1,67	1,45±0,38♦	2,89±0,62*
AST (U/g protein)	1284,83±512,47	1298,37±398,20	1182,16±249,02	2015,42±635,78
TNF-α (pg/mg protein)	125,49±48,56	102,02±47,70	100,94±35,62	92,76±22,32
IL1 (pg/mg protein)	39,58±11,86	58,90±21,80	22,31±5,12♦♦	47,65±10,87*
IL6 (ng/g protein)	4,62±2,10	7,66±3,25	2,80±0,82♦	6,87±1,61*
IL18 (pg/mg protein)	127,33±19,45	193,77±81,32	74,19±19,21♦♦	149,11±27,62*
MDA (nmol/mg protein)	280,66±11,03	344,83±57,49♦	200,54±103,59♦	203,31±57,21♦♦
NO (μmol/g protein)	70,16±22,24	79,14±30,87	38,57±12,64♦♦	73,17±13,21*
SOD (U/mg protein)	8,25±1,52	6,33±1,67	5,36±1,55	8,90±3,79
GPx (U/mg protein)	2,08±0,81	1,38±0,24♦	0,92±0,23♦♦	1,62±0,67*
CAT (k/g protein)	4,59±1,61	4,25±1,07	4,32±1,21	5,87±1,78
TAS (mmol/g protein)	0,12±0,07	0,12±0,07	0,07±0,02	0,09±0,04
TOS (μmol/g protein)	2,11±1,55	0,46±0,19	0,78±0,49	0,56±0,24

Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, DXR: Doksorubisin, Mel: Melatonin, ADR: Adrenomedullin

- ♦: Kontrol grubuna göre anlamlı (p<0,05);
- ♦♦: DXR grubuna göre anlamlı (p<0,05),
- *: DXR+MEL grubuna göre anlamlı (p<0,05)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada DXR ile oluşturulan kardiyotoksisite üzerine adrenomedulinin etkilerinin incelenmesi ve bu etkilerin melatonin gibi iyi bilinen bir antioksidan ile kardiyak hasarı önleyici etkisi açısından kıyaslanması hedeflenmiştir.

5.1. Elektrokardiyografi Bulgularının Değerlendirilmesi

Kardiyak hasarların belirlenmesinde EKG önemli bir veridir. Bir kemoterapötik ajan olan DXR'ın kalp üzerinde yarattığı toksik etkilerin gösterilmesinde önemli bir veri olarak kullanılmıştır. DXR enjekte edilen ratlarda PR (217), QRS (218, 219), QT (217, 218, 220-222) ve QTc (222) süreleri ile farelerde QRS (223) ve QT (224-226) sürelerinde kontrole kıyasla anlamlı uzama bildirilmiştir. Bir grup araştırmacı da (227) ratlarda DXR uygulamasının QRS, PR ve QTc sürelerinde kontrol grubuna göre anlamlı uzama gösterdiğini rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamız da literatürü desteklemektedir. Çalışmamızda kontrol grubu ile kıyaslandığında DXR grubunun PR, QRS, QT ve QTc sürelerinin anlamlı olarak uzadığı görülmüştür. DXR'ın PR ve QRS sürelerinde uzama yapması, sırasıyla atriyoventriküler (A-V) ve intraventriküler iletiyi yavaşlattığını; QT süresinin uzaması repolarizasyon süresinin uzadığını düşündürmektedir.

Bilinen en iyi antioksidanlardan olan melatonin pek çok kalp ile ilgili çalışmada kullanılmıştır. Çalışmamızda DXR+MEL grubu ratların PR, QRS, QT ve QTc sürelerinde kontrol grubuna göre anlamlı artış tespit edilmiştir. Literatürde DXR ile oluşturulmuş kardiyotoksisitenin sebep olduğu EKG değişiklikleri üzerine melatoninin belirtilen parametreler üzerine etkinliğini gösteren bir çalışma yoktur. Bu yönüyle ilk olan çalışmamızda bulgular, DXR'ın yol açtığı elektrokardiyografik değişiklikler üzerine melatoninin aynı şekilde etkiye devam ettiğini göstermektedir.

ADR çok yeni bulunan bir madde olup günümüzde pek çok yönüyle çalışılmaktadır. Potent vazodilatatör bir madde olması yönüyle kardiyak çalışmalar oldukça fazladır. Çalışmamız ADR'nin DXR kardiyotoksisitesindeki etkinliğini araştıran ilk çalışmalardan biridir.

Bu çalışmada DXR+ADR grubunun PR, QT ve QTc süreleri kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak uzun bulunmuştur.

5.2. Histoloji Bulgularının Değerlendirilmesi

Sağ kalbin histolojik olarak incelenmesinde, DXR'ın kalp dokusunda negatif yönde anlamlı histolojik değişiklikler yaptığı saptanmış; MEL uygulamasının bu negatif etkileri istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde önlediği, ADR verilmesinin ise korumadığı görülmüştür.

Sol kalpte DXR uygulamasının kontrol grubuyla kıyas edildiğinde tüm deney gruplarında anlamlı derecede doku harabiyetine sebep olduğu gözlenmiş, MEL ya da ADR uygulamasının bu haraplanmayı önleyemediği fark edilmiştir.

Elde edilen histolojik bulgular total olarak ele alındığında DXR'ın kalpte yol açtığı histopatolojik hasarın MEL ile azaltıldığı; fakat ADR'nin hasarı azaltıcı etkiye sahip olmadığı görülmüştür. Literatürde de DXR ile oluşturulmuş kardiyotoksisteye karşı melatoninin protektif etkiye sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (126, 127, 228-230). Bizim çalışmamız da bu çalışmaları desteklemektedir.

5.3. Biyokimya Bulgularının Değerlendirmesi

CK-MB akut dönemde kalp hasarını gösteren bir izoenzimidir. Normalde kanda düşük düzeylerde bulunan ve hasar meydana geldiğinde kandaki seviyesi yükselmeye başlayan CK-MB'nin kaynağı kalp kasıdır. O nedenle kardiyak hasarın gösterilmesinde çalışmamızda kullanılmıştır. DXR grubunun ortalama CK-MB değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. DXR'la birlikte melatonin verilmesi durumunda değer istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır. Bu sonuçlar literatürle uygunluk göstermektedir. Daha önce yapılmış çalışmalarda da DXR, plazma CK-MB değerini artırırken DXR ile birlikte MEL uygulaması bu artışı önlemiştir (127, 231). İsoproterenolle oluşturulan miyokardiyal infarktüste melatonin enjeksiyonu benzer etki yaratmıştır (232).

HIF-1 (Hipoksiyle İndüklenebilir Faktör-1) tümör hücrelerinin hipoksiye olan adaptasyon mekanizmalarından biridir. HIF-1 α hipoksiye hızlı bir şekilde cevap

verebilmek için hücreler tarafından düzenli olarak sentezlenen, hipoksik ortamda miktar olarak artan bir HIF-1 subunitidir ve HIF-1'in aktivitesini belirler. Bu çalışmada HIF-1 α seviyesinde DXR+MEL grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı azalma gözlenmiştir; bu yönüyle çalışmamız literatürde ilktir.

Sitokinler immün sistem hücrelerinin gelişmesi, farklılaşması ve aktivasyonunda, antijen sunumu, adezyon moleküllerinin ekspresyonu, akut faz yanıtları gibi immün yanıtın ve inflamasyonun her safhasında, hücre ölümünde, hematopoez ve yara iyileşmesi gibi birçok biyolojik olayda hücreler arası iletişimi sağlayan protein yapısında aracı moleküllerdir. İnflamatuar araçların aktiflenmesi, ROS üretimi artışına ve oksidatif strese sebebiyet verir. Proinflammatuar ve anti-inflamatuar olmak üzere iki türü bulunur. Yapılan çalışmalar melatoninin serbest radikalleri süpürücü etkide olduğunu, antioksidan enzimleri artırdığını (233, 234); sitokinleri ve inflammatuar mediatörlerin ekspresyonunu inhibe ettiğini göstermiştir (235). Bizim çalışmamızda, DXR ile olan artışı, DXR+MEL grubu, kontrol grubuna göre proinflammatuar sitokinlerden IL-1 ve IL-18'i anlamlı şekilde azaltmıştır. DXR grubuna kıyasla IL-1, IL-18 ve anti-inflamatuar sitokinlerden IL-6 seviyelerinin anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür. Bu bulgular literatürle paralellik göstermektedir.

Oksidatif stresin dokudaki en son göstergelerinden biri MDA'dır ve serbest radikallerin yol açtığı lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkar. DXR serbest radikalleri artırarak membranın işlevini bozar ve kardiyomiyopatik etkiler oluşturur. DXR kardiyotoksitesinde MDA düzeyinin arttığını gösteren pek çok çalışma mevcuttur (127, 236) Çalışmamızda da DXR ile kardiyak MDA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde artmış, DXR'a ek olarak uygulanan melatonin bu artışı önlemiştir. Öz ve İlhan (104) DXR'ın yol açtığı MDA artışının melatoninle azaldığını kalp dışı dokularda da göstermişlerdir. Son yıllarda ADR'nin antioksidan özelliği üzerinde durulmaktadır (10, 12, 238) Bizim çalışmamızda DXR ile birlikte verilen ADR, DXR ile artmış MDA düzeylerini anlamlı olarak azaltmıştır. Literatürde ADR'nin iskemi/reperfüzyon ile artmış MDA'yı azalttığını gösteren araştırmalar da mevcuttur (216, 239).

Nitrik oksit (NO) reaktif bir radikaldir. Pek çok yönüyle literatürde çalışılmaktadır. Fizyolojik reaktif NO düzeyleri apoptotik süreci baskılayarak; artmış düzeylerinin bu koruyuculuğu ortadan kaldırarak pro-apoptotik etkilere yol açabileceği gösterilmiştir. NO'nun süperoksit ile reaksiyonuyla peroksinitrit oluşur. Peroksinitrit gibi yapıların oksidan özellikleri bilinmektedir (240-242). Çalışmamızda DXR ile beraber verilen MEL, NO seviyesini DXR'a göre anlamlı olarak düşürmüştür. MEL'in NO sentaz (NOS) aktivitesini azaltarak NO oluşumunu önleyebilmesi (243) ve NO'yu süpürücü etki göstermesi (244) bu sonuçta etkili olabileceği düşünülmektedir.

Glutasyon peroksidaz enzimi (GPx) serbest radikaller olan H₂O₂ ile hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlar. Aktivitesindeki azalma hidrojen peroksit birikmesine ve hücre hasarına yol açarken; lipid peroksidasyonunun başlamasını önlemede görev alır. Çalışmamızda önemli bir veri olup antioksidan aktivite bakımından incelenmiştir. Kontrol grubuyla kıyas edildiğinde hem DXR hem DXR+MEL gruplarında anlamlı düşüş gösterirken; DXR+ADR grubu bu düşüşü anlamlı olarak yükseltmiştir. Literatürde de DXR'ın, kontrol grubuna göre GPx seviyesinde anlamlı azalma yaptığını gösteren çalışmalar mevcuttur (127, 220, 231). Çalışmada elde edilen bulgulara bakıldığında, DXR ile birlikte MEL uygulamasının GPx seviyesini düşürdüğü gözle çarpmıştır. MEL'in GPx aktivitesinde artış yapmamış olması, kendisinin sahip olduğu güçlü antioksidan özellikten ve serbest radikalleri süpürücü etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

DXR kanser tedavisinde kullanılan vazgeçilmez bir ajandır; ancak gerek kalp gibi hayati önemi olan bir organda gerekse diğer organlarda oluşturduğu hasardan ötürü, yarattığı toksik etkinin azaltılması gerekmektedir. Bu çalışmada DXR'ın toksik etkilerini hafifleten maddelerin bulunması amaçlanmıştır. Bu yolla ciddi yan etkileri sebebiyle kullanımı sınırlanmış olan DXR'ın kemoterapide daha güvenli ve etkin kullanımı sağlanmış olacaktır.

Sonuç olarak DXR kardiyotoksitesini DXR kullanımını kısıtlayan önemli bir yan etkidir. Bu yönüyle bu toksisiteyi kaldırabilmek adına literatürde pek çok çalışma yapılmıştır. Çalışma grubumuz DXR kardiyotoksitesini bilinen güçlü bir

antioksidan olan melatonin ile azaltmıştır. Ancak bir antioksidan olan ADR bu doz itibariyle toksisiteye karşı melatonin kadar gcl koruyamamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. DXR bilinen kardiyotoksik bir maddedir.
2. MEL doksorubisin hasarına karşı kardiyoprotektif etkiye sahiptir.
3. Kullandığımız doz itibariyle ADR DXR'ın yarattığı kardiyak hasarı biyokimyasal birkaç parametrede önleme eğilimindedir ancak histopatolojik olarak korumamıştır.
4. ADR'nin kullanılan dozla ilişkili etkileri ileri araştırmaları gerektirmektedir.
5. DXR kardiyomiyopatisi üzerinde her iki kimyasalın beraber çalışılmasının da bu anlamda yararlı olabileceği düşünülmektedir.

ÖZET

Bu çalışmada DXR ile oluşturulan kardiyotoksisite üzerine ADR'nin etkilerinin araştırılması ve bu etkilerin MEL gibi iyi bilinen bir antioksidan ile kardiyak hasarı önleyici etkisi açısından kıyaslanması hedeflenmiştir.

Deneyde 8 haftalık, 300±50 gr ağırlığında, 32 adet Wistar albino erkek sıçan kullanılmıştır. Denekler dört gruptan oluşmaktadır: Kontrol, Doksorubisin (DXR), Doksorubisin+Melatonin (DXR+MEL) ve Doksorubisin+Adrenomedullin (DXR+ADR). Bir hafta boyunca DXR+MEL grubuna intraperitoneal yoldan her gün 10 mg/kg melatonin, DXR+ADR grubuna intraperitoneal yoldan her gün 12 µg/kg adrenomedullin verilmiştir. Deneyin 5. gününde tüm gruplara kuyruk veninden tek doz DXR (45 mg/kg); kontrol grubuna ise SF enjekte edilmiş, 8. gününde EKG kayıtları alınmıştır. Hayvanlar dekapite edilip, biyokimyasal ve histolojik inceleme yapmak üzere kalp dokuları alınmıştır. Elektrokardiyografik, biyokimyasal ve histolojik farklılıklar Kruskal Wallis ve Mann Whitney U testleri uygulanarak karşılaştırılmıştır.

Sonuç olarak DXR kardiyotoksitesini DXR kullanımını kısıtlayan önemli bir yan etkidir. Bu toksisiteyi ortadan kaldırmak adına literatürde pek çok çalışma yapılmıştır. Çalışma grubumuz DXR kardiyotoksitesini, bilinen güçlü bir antioksidan olan melatonin ile azaltmıştır. Ancak bir antioksidan olan ADR bu doz itibarıyla toksisiteye karşı melatonin kadar güçlü koruyamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Adrenomedullin, doksorubisin, melatonin, kardiyotoksisite

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of ADR on cardiotoxicity induced by DXR and to compare these effects with a well-known antioxidant such as MEL in terms of cardiac injury inhibitory effect.

In the experiment, 32 Wistar albino male rats for 8 weeks weighing 300 ± 50 gr were used. The animals divided into four groups: Control, Doxorubicin (DXR), Doxorubicin+Melatonin (DXR+MEL) ve Doxorubicin+Adrenomedullin (DXR+ADR). Melatonin (10 mg/kg per day, intraperitoneally) and adrenimedullin (12 μ g/kg per day, intraperitoneally) were given to DXR+MEL and DXR+ADR groups, respectively, for seven days. On the fifth day of the experimen, a single dose of 45 mg/kg DXR in all groups and SF in the control group was injected intravenously by the tail veins, on the 8th day ECGs are recorded. Animals were decapitated and cardiac tissues were isolated for biochemical and histological examination. Electrocardiographic, biochemical and histological differences were compared by Kruskal Wallis and Mann Whitney U tests.

In conclusion, DXR cardiotoxicity is an important side effect that limits the use of DXR. Many studies have been done in the literature in order to remove this toxicity. Our study group reduced DXR cardiotoxicity with melatonin, a known strong antioxidant. However, ADR, an antioxidant, does not protect as much as melatonin against toxicity at this dose.

Key words: Adrenomedullin, doxorubicin, melatonin, cardiotoxicity

KAYNAKLAR

1. Gewirtz D.A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 1999; 57: 727-741.
2. Singal P.K, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Molecular and cellular biochemistry* 2000; 207: 77-86.
3. Singal P.K, Iliskovic N, Li T, Kumar D. Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *FASEB J* 1997; 11: 931-116.
4. Wojtacki J, Lewicka-Nowak E, Lesniewski-Kmak K. Anthracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention-review of the literature. *Med Sci Monit* 2000; 6: 411-431.
5. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis* 2007; 49: 330-352.
6. Raj S, Franco VI, Lipshultz SE. Anthracycline-induced cardiotoxicity: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2014; 16: 315.
7. 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.
8. 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.
9. Zhou M, Simms H.H, Wang P. Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1 attenuate vascular endothelial cell apoptosis in sepsis. *Ann Surg* 2004; 240:321-30.
10. Kim S.M, Kim J.Y, Lee S, Park J.H. Adrenomedullin protects against hypoxia/reoxygenation-induced cell death by suppression of reactive oxygen species via thiol redox systems. *FEBS Lett* 2010; 584: 213-218.

11. Yoshimoto T, Fukai N, Sato R, et al. Antioxidant effect of adrenomedullin on angiotensin II-induced reactive oxygen species generation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 2004; 145:3331–7.
12. Oba S, Hino M, Fujita T. Adrenomedullin protects against oxidative stress-induced podocyte injury as an endogenous antioxidant. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 510-517.
13. Yoshihara F, Horio T, Nishikimi T, Matsuo H, Kangawa K. Possible involvement of oxidative stress in hypoxia-induced adrenomedullin secretion in cultured rat cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 2002; 436: 1-6.
14. Yin H, Chao L, Chao J. Adrenomedullin protects against myocardial apoptosis after ischemia/reperfusion through activation of Akt-GSK signaling. *Hypertension* 2004; 43(1): 109-16.
15. Tokudome T, Horio T, Yoshiharara F, et al. Adrenomedullin Inhibits Doxorubicin-Induced Cultured Rat Cardiac Myocyte Apoptosis via a cAMP-Dependent Mechanism. *Endocrinology* September 2002; 143(9): 3515–3521.
16. Yıldız D.P. Sıçanlarda Doksorubisin İle Oluşturulmuş Kardiyotoksisite Üzerine Melatonin Ve Timokinonun Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir 2016.
17. Wallace K.B. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacology & Toxicology* 2003; 93: 105-115.
18. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 185–229.
19. Wallace KB. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacol Toxicol* 2003; 93: 105–115.
20. Hardman J.G, Limbird L.E. Goodman&Gilman’s the Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th Ed *McGraw-Hill Medical Publishing Division* 2001; 1425- 1429.
21. Tatlıdere E. Sıçanlarda Doksorubisin’in Neden Olduğu Kardiyak Toksisite Ve Hemodinamik Değişikliklere Karşı Resveratrol’ün Koruyucu Etkilerinin

- Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2008.
22. Little P.J, Bhattacharya R, Moreyra A.E, Korichneva I.L. Zinc and cardiovascular disease. *Nutrition* 2010; 26(11): 1050-1057.
 23. Muggia F.M, Green M.D. New anthracycline antitumor antibiotics. *Critical reviews in oncology/hematology* 1991; 11: 43-64.
 24. Hideg K, Kalai T. Novel antioxidants in anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovascular toxicology* 2007; 7: 160-164.
 25. Lipshultz S.E, Alvarez J.A, Scully R.E. Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Heart* 2008; 94: 525-533.
 26. Evans W.E, Petros W.P, Relling M.V, et al. Clinical pharmacology of cancer chemotherapy in children. *Pediatric clinics of North America* 1989; 36: 1199-1230.
 27. Hortobagyi G.N. Anthracyclines in the treatment of cancer: an overview. *Drugs* 1997; 4: 1-7.
 28. Li T, Danelisen I, Bello-Klein A, Singal P.K. Effects of probucol on changes of antioxidant enzymes in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Cardiovasc Res* 2000; 46: 523-530.
 29. Hadi N, Yousif N.G, Al-amran F.G, et al. Vitamin E and telmisartan attenuates doxorubicin induced cardiac injury in rat through down regulation of inflammatory response. *BMC Cardiovascular Disorders* 2012; 12:63.
 30. Hozayen, Walaa G, H. S. Abou Seif. "Protective effects of rutin and hesperidin against doxorubicin-induced lipodystrophy and cardiotoxicity in albino rats." *J Am Sci* 7 (2011): 765-75.
 31. Van Acker F.A, Hulshof J.W, Haenen G.R, et al. New synthetic flavonoids as potent protectors against doxorubicin induced cardiotoxicity. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 31-37.
 32. Alyane M, Kebsa L.B.W, Boussenane H, Rouibah H, Lahouel M. Cardioprotective Effects and Mechanism of Action of Polyphenols Extracted From Propolis Against Doxorubicin Toxicity. *Pak. J. Pharm. Sci* 2008; Vol.21, No.3: 201-209.

33. Sun A.Y, Simonyi A, Sun G.Y. The “french paradox” and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radical Biology & Medicine* 2001; Vol. 32, No. 4: 314 –318.
34. Kalyanaraman B, Joseph J, Kalivendi S, et al. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity *Molecular and Cellular Biochemistry* 2002; 234/235: 119–124.
35. De Graff W.G, Myers Jr L.S, Mitchell J.B, Hahn S.M. Protection against adriamycin cytotoxicity and inhibition of DNA topoisomerase II activity by 3,4-dihydroxybenzoic acid. *International Journal of Oncology* 2003; 23: 159-163.
36. Ayla Ş, Oktar H, Tanrıverdi G ve ark. Doksorubisin ile Oluşturulmuş Deneysel Kardiyotoksisite Üzerine Nikotinamidin Etkisi, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 2008; 39(1): 7-14.
37. Mutlu E. Erişkin Erkek Sıçanlarda Doksorubisin İle Oluşturulan Testis Hasarı Üzerine L-Karnitinin Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir 2008.
38. Lipshultz S.E, Cohen H, Colan S.D, Herman E.H. The relevance of information generated by in vitro experimental models to clinical doxorubicin cardiotoxicity. *Leukemia & lymphoma* 2006, 47: 1454-1458.
39. Robert J, Gianni L. Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. *Cancer Surveys* 1993; 17: 219-252.
40. Doroshoow J.H. Anthracyclines and anthracenediones. In BA Chabner, DL Longo (eds), *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*. Lippincott. Philadelphia: Williams and Wilkins 2006: 416.
41. Woo M.H, Evans W.E, Relling M.V. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. In:Pui CH (editör). *Childhood Leukemias*, Cambridge, Cambridge University 1999; 275-276.
42. <http://www.bccancer.bc.ca/HPI/DrugDatabase/DrugIndexPro/Doxorubicin.htm>
43. Quiles J.L, Huertas J.R, Battino M, Mataix J, Ramírez-Tortosa M.C. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology* 2002; 180: 79-95.

44. Venkatesan N, Punithavathi D, Arumugam V. Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats. *British journal of pharmacology* 2000; 129: 231-234.
45. Khan M.S, Holmes J.D. Reducing the morbidity from extravasation injuries. *Ann Plast Surg* 2002; 48: 628-632.
46. Schimmel K.J, Richel D.J, van den Brink R.B, Guchelaar H.J. Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer treatment reviews* 2004; 30: 181-191.
47. Bryant J, Picot J, Levitt G, et al. Cardioprotection against the toxic effects of anthracyclines given to children with cancer: a systematic review. *Health technology assessment* 2007; 11: iii, ix-x: 1-84.
48. Siveski-Iliskovic N, Hill M, Chow D.A, Singal P.K. Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circulation* 1995; 9: 10-15.
49. Vasquez-Vivar J, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Pritchard KA Jr, Kalyanaraman B: Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from Adriamycin. *Biochemistry* 1997; 36: 11293–11297.
50. 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.
51. Kotamraju S, Konorev EA, Joseph J, Kalyanaraman B. 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.
52. Keefe D.L. Anthracycline-induced cardiomyopathy. *Semin Oncol* 2001; 28: 2-7.
53. Rahman A.M, Yusuf S.W, Ewer M.S. Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *International journal of nanomedicine* 2007, 2: 567-583.
54. Outomuro D, Grana DR, Azzato F, Milei J. Adriamycin-induced myocardial toxicity: new solutions for an old problem? *International journal of cardiology* 2007, 117: 6-15.

55. Monti E, Prosperi E, Supino R, Bottiroli G. Free radical-dependent DNA lesions are involved in the delayed cardiotoxicity induced by Adriamycin in the rat. *Anticancer Res* 1995; 15: 193-197.
56. Bristow M.R, Sageman W.S, Scott R.H, 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.
57. Belham M, Kruger A, Mepham S, Faganello G, Pritchard C. Monitoring left ventricular function in adults receiving anthracycline-containing chemotherapy. *European journal of heart failure* 2007, 9: 409-414.
58. 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.
59. Yagmurca M, Fadilliglu E, Erdogan H ve ark. Erdosteine prevents doxorubicin – induced cardiotoxicity in rats. *Pharmacol Res* 2003; 48: 377-382.
60. Wang L, Ma W, Markovich R, Chen J.W, Wang P.H. Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I. *Circ Res* 1998; 83: 516–522.
61. Huang C, Zhang Z, Ding M, et al. Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *J Biol Chem* 2000; 275: 32516–32522.
62. Menna P, Salvatorelli E, Minotti G. Cardiotoxicity of antitumor drugs. *Chemical research in toxicology* 2008, 21: 978-989.
63. Gutteridge J.M. Anthracycline toxicity, iron and oxygen radicals, and chelation therapy. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1993; 122: 228-229.
64. Singal P.K, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Thomas T.P, Li T. Combination therapy with probucol prevents Adriamycin-induced cardiomyopathy. *L Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 1055-1063.

65. Li Ti, Singal P.K. Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol. *Circulation* 2000; 102: 2105.
66. Corna G, Santambrogio P, Minotti G, Cairo G. Doxorubicin paradoxically protects cardiomyocytes against iron-mediated toxicity: role of reactive oxygen species and ferritin. *Journal of biological chemistry* 2004, 279: 13738-13745.
67. Kremer L.C, Caron H.N. Anthracycline cardiotoxicity in children. *N Engl J Med* 2004; 351:120-121.
68. Van Dalen E.C, van den Brug M, Caron H.N, Kremer L.C. Anthracycline-induced cardiotoxicity: comparison of recommendations for monitoring cardiac function during therapy in paediatric oncology trials. *Eur J Cancer* 2006; 42: 3199-3205.
69. Zucchi R, Danesi R. Cardiac toxicity of antineoplastic anthracyclines. *Curr Med Chem* 2003; 3: 151-171.
70. Geiger S, Lange V, Suhl P, Heinemann V, Stemmler HJ. Anticancer therapy induced cardiotoxicity: review of the literature. *Anticancer Drugs* 2010; 21: 578-590.
71. Al-Majed, A.A, Gado A.M, Al-Shabanah O.A, Mansour M.A. Alpha-lipoic acid ameliorates myocardial toxicity induced by doxorubicin. *Pharmacological research* 2002; 46(6): 499-503.
72. Durmaz T, Özdemir Ö, Bozkurt E. Antrasiklin kardiyotoksitesisi. *TGKD* 2009; 13 (1): 25-34.
73. Gokcimen A, Cim A, Tola H.T, et al. Protective Effect of N-Acetylcysteine, Cafeic Acid and Vitamin E on Doxorubicin Hepatotoxicity. *Human & Experimental Toxicology* 2007; 26: 519-525.
74. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology* 2010; 115: 155-162.
75. Guzy J, Kusnir J, Marekova M, et al. Effect of Quercetin on Daunorubicin induced heart mitochondria changes in rats. *Physiol Res* 2003; 52: 773-780.

76. Ascensão A, Magalhães J, Soares J, et al. Endurance training attenuates Doxorubicin-induced cardiac oxidative damage in mice. *Int J Cardiol* 2005; 100: 451-460.
77. Doroshow J.H. Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase. *Cancer Res* 1983; 43: 4543–4551.
78. Sarvazyan N. Visualization of doxorubicin-induced oxidative stress in isolated cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1996; 271: 2079-2085.
79. Bachur NR, Gordon SL, Gee MV. NADPH cytochrome P-450 reductase activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 954–957.
80. 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.
81. Davies KJ, Doroshow JH. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. 1. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *J Biol Chem* 1986; 261: 3060–3067.
82. Svingen BA, Powis G. Pulse radiolysis studies of antitumor quinones: radical lifetimes, reactivity with oxygen, and one-electron reduction potentials. *Arch Biochem Biophys* 1981; 209: 119–126.
83. Bachur N.R, Gee M.V, Friedman R.N. Nuclear catalyzed antibiotic free radical formation. *Cancer Res* 1982; 42: 1078–1081.
84. Cummings J, Willmott N, Smyth J. The molecular pharmacology of doxorubicin in vivo. *Eur J Cancer* 1991; 27: 532-535.
85. Doroshow JH, Locker GY, Myers CE. Enzymatic defenses of the Mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. *J Clin Invest* 1980; 65: 128–135.
86. Li T, Danelisen I, Singal PK. Early changes in myocardial antioxidant enzymes in rats treated with adriamycin. *Mol Cell Biochem* 2002; 232: 19–26.

87. Doroshow J.H, Locker G.Y, Baldinger J, Myers C.E. The effect of doxorubicin on hepatic and cardiac glutathione. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1979; 26: 285–295.
88. Fogli S, Nier P, Breschi M.L. The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage. *Faseb J* 2004; 18: 664-675.
89. Vasquez-Vivar J, Martasek P, Hogg N, et al. Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from Adriamycin. *Biochemistry* 1997; 36: 11293–11297.
90. 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.
91. Wyllie A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284: 555-556.
92. Carson D.A, Ribeiro J.M. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993; 341: 1251-1254.
93. Ashkenazi A, Dixit V.M. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 255–260.
94. Zhang Y.W, Shi J, Li Y.J. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Arch Immunol Ther Exp* 2009; 57: 435–445.
95. Yazıcı C, Köse K. Melatonin: The Antioxidant Power of Darkness. *Health Sciences* 2004; 13(2): 56-65.
96. Reiter R.J, Tan D, Terron P, Flores L.J, Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochimica Polonica* 2007; 54: 1-9.
97. Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997; 336: 186-95.
98. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, et al. photoreceptor. *The Journal of Neuroscience* 2001; 21(16): 6405-6412.
99. Kuş İ, Sarsılmaz M. Pineal bezin morfolojik yapısı ve fonksiyonları. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 2002; 22: 221-226.
100. Moller M, Baeres FM. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res* 2002; 309(1): 139-150.

101. Altun A, Vardar A, Altun B.U. Melatonin and the cardiovascular system. *Anadolu Kardiyol Derg* 2001; 1: 283-8.
102. Özgüner F, Özçankaya R, Delibaş N, Koyu A, Çalışkan S. Melatonin ve Klinik Önemi. *S.D.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 1995; 2 (4): 1-6.
103. Hardeland R, Poeggeler B. Melatonin beyond its classical functions. *Open Physiol* 2008; J 1:1–23.
104. Öz E, İlhan M.N. Effects of melatonin in reducing the toxic effects of doxorubicin. *Molecular and cellular biochemistry* 2006; 286(1-2): 11-15.
105. Şener G. Karanlığın Hormonu: Melatonin. *Marmara Eczacılık Dergisi* 2010; 14: 112-120.
106. Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia* 1989; 45(10): 922-932.
107. Palaoglu Ö.S, Beşkonaklı E. Pineal Bez ve Yaşlanma. *Turkish Journal of Geriatrics Geriatri* 1998; 1:1: 13-18.
108. Çam A, Erdoğan MF. Melatonin. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2003; 56: 103-12.
109. Topal T, Öter Ş, Korkmaz A. Melatonin ve kanserle ilişkisi. *Genel Tıp Derg* 2009; 19(3).
110. 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.
111. Mollaoğlu H, Özgüner MF. Yaşlanma sürecinde melatoninin rolü. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg* 2005; 12(3): 52-56.
112. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2004; 25: 177-195.
113. Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: Biological role and clinical relevance. *Biomed Pharmacother* 2006; 60: 97-108.
114. 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.

115. Namıduru E.S, Meram İ, Tarakçıoğlu M. Melatonin. *KocatepeTıp Dergisi* 2001; 2: 139-146.
116. 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.
117. Korkmaz A, Reiter R.J, Topal T, et al. Melatonin: An established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med* 2009; 15: 43–50.
118. Ballı E. (2003). Melatoninin Fonksiyonları. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 4(4): 380-385.
119. Coşkun G. ve Özgür H. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 2011; 20(3): 145-158.
120. Sainz R.M, Mayo J.C, Uria H, et al. The pineal neurohormone melatonin prevents in vivo and in vitro apoptosis in thymocytes t al. *J Pineal Res* 1995; 19:178–188.
121. Sainz R.M, Mayo J.C, Reiter R.J, et al. Melatonin regulates glucocorticoid receptor: an answer to its antiapoptotic action in thymus. *FASEB J* 1999; 13:1547–1556.
122. Andrabi S.A, Sayeed I, Siemen D, Wolf G, Horn T.F. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. *FASEB J*.2004; 18:869–871.
123. Leon J, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan D.X, Reiter R.J. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res* 2005; 38: 1-9.
124. 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.
125. Campese VM. Oxidative stress and sympathetic activity in hypertension. *Am J Hypertens* 2010; 23: 456.
126. Liu X, Chen Z, Chua C.C, et al. Melatonin as an effective protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2002; 283(1): 254-263.

127. Öz E, Erbaş D, Sürücü H.S, Düzgün E. Prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity by melatonin. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2006; 282: 31–37.
128. Rezzani, R, Rodella L.F, 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.
129. Demir F, Narin F, Akgün H ve ark. Doksorubisin ile oluşturulmuş deneysel kardiyotoksisite üzerine melatoninin etkisi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2004; 47: 260-268.
130. Acikel M, Buyukokuroglu M.E, Aksoy H, Erdogan F, Erol M.K. Protective effects of melatonin against myocardial injury induced by isoproterenol in rats. *Journal of pineal research* 2003; 35(2), 75-79.
131. Kitamura K, Kangawa K, Kawanmato M, et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192: 553-560.
132. Sakata J, Shimokubo T, Kitamura K, et al. Molecular cloning and biological activities of rat adrenomedullin, a hypotensive peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 195: 921-927.
133. Jougasaki M, Wei C.M, Aarhus L.L, et al. Renal localization and actions of adrenomedullin:a natriuretic peptide. *Am J Physiol* 1995; 268: 657-663.
134. Kapas S, Catt K.J, Clark A.J. Cloning and expression of cDNA encoding a rat adrenomedullin receptor. *J Biol Chem* 1995; 270: 25344-25347.
135. Ishiara T, Kato J, Kitamura K, et al. Production of adrenomedullin in human vascular endothelial cells. *Life Sci* 1997; 60: 1763-1769.
136. Wimalawansa S.J. Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily. *Crit Rev Neurobiol* 1997; 11: 167–239.
137. Etöz B.Ç, Büyükcoşkun N.İ. Adrenomedüllin ve Etkileri. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 31(2): 127-132,

138. Ishimitsu T, Kojima M, Kangawa K, et al. Genomic structure of human adrenomedullin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203: 631-639.
139. Kitamura K, Kangawa K, Eto T. Adrenomedullin and PAMP: Discovery, structures and cardiovascular functions. *Microsc Res Tech* 2002; 57: 3-13.
140. Wong H.K, Cheung T.T, Cheung B.M.Y. Adrenomedullin and cardiovascular diseases. *J R Soc Med Cardiovasc Dis* 2012; 1:14.
141. Sato K, Hirata Y, Imai T, Iwashina M, Marumo F. Characterization of immunoreactive adrenomedullin in human plasma and urine. *Life Sci* 1995; 57: 189-194.
142. Martinez A, Elasser T.H, Muro C.C, et al. Expression of adrenomedullin and its receptor in normal and malignant human skin:a potential pluripotent role in the integument. *Endocrinology* 1997; 138: 5597-5604.
143. Nagata N, Kato J, Kitamura K, et al. Dissociation of adrenomedullin concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in pregnant and non-pregnant women. *Eur J Endocrinol* 1998; 139: 611-614.
144. Fujioka M, Nishio K, Sakaki T, Minamino N, Kitamura K. Adrenomedullin in patients with cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2000; 31: 3079-3083.
145. Pio R, Martinez A, Unsworth E.J, et al. Complement factor H is a serumbinding protein for adrenomedullin and the resulting complex modulates the bioactivities of both partners. *J Biol Chem* 2001; 276: 12292–300.
146. Hirayama N, Kitamura K, Imamura T, et al. Secretion and clearance of the mature form of adrenomedullin in humans. *Life Sci* 1999; 64:2 505–509.
147. Eto T, Kato J, Kitamura K. Regulation of production and secretion of adrenomedullin in the cardiovascular system. *Regulatory Peptides* 2003; 112: 61–69.

148. Peacock WF. Novel biomarkers in acute heart failure: MR-pro-adrenomedullin. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52(10): 1433–1435.
149. Jougasaki M, Burnett Jr JC. Adrenomedullin: potential in physiology and pathophysiology. *Life Sci* 2000; 66: 855–72.
150. Nishikimi T, Kitamura K, Saito Y, et al. Clinical studies on the sites of production and clearance of circulating adrenomedullin in human subjects. *Hypertension* 1994; 24(5): 600-604.
151. Washimine H, Asada Y, Kitamura K, et al. Immunohistochemical identification of adrenomedullin in human, rat, and swine tissue. *Histochem Cell Biol* 1995; 103: 251–4.
152. Ichiki Y, Kitamura K, Kangawa K, et al. Distribution and characterization of immunoreactive adrenomedullin in human tissue and plasma. *FEBS Lett* 1994; 338: 6–10.
153. Özçelik AAA. İntrauterin Büyüme Geriliği Olan Yenidoğanlarda Adrenomedullin ve Nitrik Oksit Düzeyleri, Uzmanlık Tezi, TC Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara 2003.
154. Eto T. A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides. *Peptides* 2001; 22: 1693–711.
155. Owada A, Nonoguchi H, Terada Y, Marumo F, Tomita K. Microlocalization and effects of adrenomedullin in nephron segments and in mesangial cells of the rat. *Am J Physiol* 1997; 272: F691-697.
156. Rebuffat P, Forneris M.L, Aragona F, et al. Adrenomedullin and its receptors are expressed in the zona glomerulosa of human adrenal gland: evidence that ADM enhances proliferation and decreases apoptosis in cultured ZG cells. *Int J Mol Med* 2002; 9: 119–24.
157. Sugo S, Minamino N, Shoji H, et al. Interleukin-1, tumor necrosis factor and lipopolysaccharide additively stimulate production of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 207: 25–32.

158. Isumi Y, Shoji H, Sugo S, et al. Regulation of adrenomedullin production in rat endothelial cells. *Endocrinology* 1998; 139: 838–46.
159. Nakayama M, Takahashi K, Murakami O, et al. Adrenomedullin in monocytes and macrophages. Possible involvement of macrophage-derived adrenomedullin in atherogenesis. *Clin Sci* 1999; 97: 247-51
160. Von der H.K, Kandler M.A, Popp K, et al. Aerosolized adrenomedullin suppresses pulmonary transforming growth factor-beta1 and interleukin-1 beta gene expression in vivo. *Eur J Pharmacol* 2002; 457: 71–6.
161. Vesely D.L, Blankenship M, Douglass M.A, et al. Atrial natriuretic peptide increases adrenomedullin in the circulation of healthy humans. *Life Sci* 1996; 59: 243–54.
162. Lainchbury J.G, Troughton R.W, Lewis L.K, et al. Hemodynamic, hormonal, and renal effects of short-term adrenomedullin infusion in healthy volunteers. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1016–20.
163. Charles C.J, Lainchbury J.G, Nicholls M.G, et al. Adrenomedullin and the renin–angiotensin–aldosterone system. *Regul Pept* 2003; 112: 41-9.
164. Hayashi M, Shimosawa T, Fujita T. Hyperglycemia increases vascular adrenomedullin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 258: 453–6.
165. Hague S, Zhang L, Oehler M.K, et al. Expression of the hypoxically regulated angiogenic factor adrenomedullin correlates with uterine leiomyoma vascular density. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2808–14.
166. Tsuruda T, Kato J, Kitamura K, et al. Enhanced adrenomedullin production by mechanical stretching in cultured rat cardiomyocytes. *Hypertension* 2000; 35: 1210–4.
167. Julián M, Cacho M, García MA, et al. Adrenomedullin: a new target for the design of small molecule modulators with promising pharmacological activities. *Eur J Med Chem* 2005; 40(8): 737-750.
168. Zimmerman U, Fischer J.A, Frei K, et al. Identification of adrenomedullin receptors in cultured rat astrocytes and in neuroblastoma × glioma hybrid cells (NG108–15). *Brain Res* 1996; 724: 238–245.

169. Nishikimi T, Horio T, Yoshihara F, et al. Effect of adrenomedullin on cAMP and cGMP levels in rat cardiac myocytes and nonmyocytes. *Eur J Pharmacol* 1998; 353: 337-344.
170. Kohno M, Yasunari K, Minami M, et al. Regulation of rat mesangial cell migration by platelet-derived growth factor, angiotensin II, and adrenomedullin. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2495–2502.
171. Choksi T, Hay D.L, Legon S, et al. Comparison of the expression of calcitonin receptorlike receptor (CRLR) and receptor activity modifying proteins (RAMPs) with CGRP and adrenomedullin binding in cell lines. *Br J Pharmacol*. 2002; 136: 784–92.
172. Debbie L.H, David M.S. ADM reseptors: molecular identity and function. *Peptides* 2001; 22: 1753-63.
173. Chakravarty P, Suthar T.P, Coppock H.A, et al. CGRP and adrenomedullin binding correlates with transcript levels for calcitonin receptor-like receptor (CRLR) and receptor activity modifying proteins (RAMPs) in rat tissues. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 189–95.
174. Morfis M, Christopoulos A, Sexton PM. RAMPs: 5 years on, where to now? *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24(11): 596–601.
175. Bunton D.C, Petrie M.C, Hillier C, Johnston F, McMurray J.J.V. The clinical relevance of adrenomedullin: a promising profile? *Pharmacol Ther* 2004; 103: 179–201.
176. Fung E, Fiscus R.R. Adrenomedullin induces direct (endothelium-independent) vasorelaxations and cyclic adenosine monophosphate elevations that are synergistically enhanced by brain natriuretic peptide in isolated rings of rat thoracic aorta. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2003; 41(6): 849-855.
177. Bayram Z. İnsan İnternal Torasik Arter Halkalarında Adrenomedullin'in Etkileri: Siklooksijenaz, Nitrik Oksid Sentaz ve Potasyum Kanallarının Rolü, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı, Antalya 2009: 8.

178. DeMatteo R, May C.N. Direct coronary vasodilator action of adrenomedullin is mediated by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 1414–20.
179. Nishimatsu H, Suzuki E, Nagata D, et al. Adrenomedullin induces endothelium dependent vasorelaxation via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway in rat aorta. *Circ Res* 2001; 89: 63–70.
180. Terata K, Miura H, Liu Y, Loberiza F, Gutterman D.D. Human coronary arteriolar dilation to adrenomedullin: role of nitric oxide and K⁺ channels. *J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H2620–6.
181. Cheung B.M, Tang F. Adrenomedullin: exciting new horizons. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 2012; 6: 4–17.
182. Zhang B, Tang C, Jiang Z, et al. Effects of adrenomedullin on vascular calcification in rats. *Zeitschrift für Kardiologie* 2002; 91(7): 568-574.
183. Yoshimoto T, Fukai N, Sato R, et al. Antioxidant effect of adrenomedullin on angiotensin II-induced reactive oxygen species generation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 2004; 145: 3331–3337.
184. Saetrum Opgaard O, Hasbak P, de Vries R, Saxena P.R, Edvinsson L. Positive inotropy mediated via CGRP receptors in isolated human myocardial trabeculae. *Eur J Pharmacol* 2000; 397: 373–82.
185. Nuki C, Kawasaki K, Kitamura K, et al. Vasodilator effect of AM and CGRP receptors in rat mesenteric vascular beds. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 196: 245-251.
186. Santiago J.A, Garrison E, Purnell W.L, et al. Comparison of responses to adrenomedullin and adrenomedullin analogs in the mesenteric vascular bed of the cat. *Eur J Pharmacol* 1995; 272: 115-118.
187. Nakamura M, Yoshida H, Makita S, et al. Potent and long-lasting vasodilatory effects of adrenomedullin in humans. Comparisons between normal subjects and patients with chronic heart failure. *Circulation* 1997; 95: 1214-1221.

188. Oya H, Nagaya N, Furuichi S, et al. Comparison of intravenous adrenomedullin with atrial natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *American Journal of Cardiology* 2000; 86: 94-98.
189. Shimekake Y, Nagata K, Ohta S, et al. Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca²⁺ mobilization, in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 4412–4417.
190. Moncada S, Palmer R.M, Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
191. Feng C.J, Kang B, Kaye A.D, Kadowitz P.J, Nossaman B.D. L-NAME modulates responses to adrenomedullin in the hindquarters vascular bed of the rat. *Life Sci* 1994; 55: 433-438
192. Nishimura J, Seguchi H, Sakihara C, et al. The relaxant effect of adrenomedullin on particular smooth muscles despite a general expression of its mRNA in smooth muscle, endothelial and epithelial cells. *Br J Pharmacol* 1997; 120: 193–200.
193. Lang M.G, Paterno R, Faraci F.M, Heistad D.D. Mechanisms of adrenomedullin-induced dilatation of cerebral arterioles. *Stroke* 1997; 28: 181–185.
194. Del B.R, Lazzeri C, Barletta G, et al. Effects of low-dose adrenomedullin on cardiac function and systemic haemodynamics in man. *Clin Physiol* 2000; 20: 457–65.
195. Nagaya N, Satoh T, Nishikimi T, et al. Hemodynamic, renal, and hormonal effects of adrenomedullin infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation* 2000; 101: 498-503.
196. Shichiri M, Fukai N, Ozawa N, Iwasaki H, Hirata Y. Adrenomedullin is an autocrine/paracrine growth factor for rat vascular smooth muscle cells. *Regul Pept* 2003; 112: 167–73.
197. Kano H, Kohno M, Yasunari K, et al. Adrenomedullin as a novel antiproliferative factor of vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 1996; 14: 209–13.
198. Limuro S, Shindo T, Moriyama N, et al. Angiogenic effects of adrenomedullin in ischemia and tumor growth. *Circ Res* 2004; 95: 415-2.

199. Wolf K, Kurtz A, Pfeifer M, et al. Different regulation of left ventricular ANP, BNP and adrenomedullin mRNA in the two-kidney, one-clip model of renovascular hypertension. *Pflugers Arch* 2001; 442: 212–7.
200. Ishimitsu T, Nishikimi T, Saito Y, et al. Plasma levels of adrenomedullin, a newly identified hypotensive peptide, in patients with hypertension and renal failure. *J Clin Invest* 1994; 94: 2158–61.
201. Nishikimi T. Adrenomedullin in Cardiovascular Disease. *New York: Springer* 2005.
202. Nakamura R, Kato J, Kitamura K, et al. Beneficial effects of adrenomedullin on left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Res* 2002; 56: 373–80.
203. Kita T, Kitamura K, Kuwasako K, Kawamoto M, Eto T. Short-term modulation of the renin-angiotensin system does not alter plasma adrenomedullin concentration in humans. *J Hypertens* 1998; 16: 2057–62.
204. Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, et al. Plasma adrenomedullin as an indicator of prognosis after acute myocardial infarction. *Heart* 1999; 81:483–7.
205. Nakamura R, Kato J, Kitamura K, et al. Adrenomedullin administration immediately after myocardial infarction ameliorates progression of heart failure in rats. *Circulation* 2005; 110:426–31.
206. Okumura H, Nagaya N, Itoh T, et al. Adrenomedullin infusion attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Circulation* 2004; 109: 242–8.
207. Kato J, Kitamura K, Kangawa K, Eto T. Receptors for adrenomedullin in human vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol* 1995; 289: 383–5.
208. Jougasaki M, Wei C.M, McKinley L.J, Burnett J.C. Elevation of circulating and ventricular adrenomedullin in human congestive heart failure. *Circulation* 1995; 92: 286–9.

209. Nishikimi T, Saito Y, Kitamura K, et al. Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 1424–31.
210. Yu C, Cheung B.M.Y, Leung R, et al. Increase in plasma adrenomedullin in patients with heart failure characterised by diastolic dysfunction. *Heart*. 2001; 86: 155–60.
211. Nishikimi T, Yoshihara F, Horinaka S, et al. Chronic administration of adrenomedullin attenuates transition from left ventricular hypertrophy to heart failure in rats. *Hypertension* 2003; 42: 1034–41.
212. Sata M, Kakoki M, Nagata D, et al. Adrenomedullin and nitric oxide inhibit human endothelial cell apoptosis via a cyclic GMP-independent mechanism. *Hypertension* 2000; 36:83–8.
213. Nicholls M.G, Lainchbury J.G, Lewis L.K, et al. Bioactivity of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide in man. *Peptides* 2001; 22: 1745–52.
214. Chini E.N, Chini C.C, Bolliger C, et al. Cytoprotective effects of adrenomedullin in glomerular cell injury: central role of cAMP signaling pathway. *Kidney Int* 1997; 52: 917-925.
215. Shimosawa T, Shibagaki Y, Ishibashi K, et al. Adrenomedullin, an endogenous peptide, counteracts cardiovascular damage. *Circulation* 2002; 105: 106–111.
216. Oyar E.Ö, Kiriş İ, Gülmen Ş, et al. Adrenomedullin attenuates aortic cross-clamping–induced myocardial injury in rats. *The American Journal of Surgery* 2011; 201(2): 226-232.
217. Xin YF, Zhou GL, Deng ZY, et al. Protective effect of *Lycium barbarum* on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Phytotherapy Research* 2007; 21(11): 1020-1024.
218. 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.

219. Kelishomi RB, Ejtemaeemehr S, Tavangar SM, et al. Morphine is protective against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rat. *Toxicology* 2008; 243 (1-2): 96-104.
220. 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.
221. Ashour O.M, Elberry A.A, Alahdal A.M, et al. Protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against doxorubicin-induced oxidative cardiotoxicity in rats. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 2011; 17(4): BR110.
222. Saeed N.M, El-Naga R.N, El-Bakly W.M, et al. Epigallocatechin-3-gallate pretreatment attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a mechanistic study. *Biochemical pharmacology* 2015; 95(3): 145-155.
223. 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.
224. 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.
225. 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.
226. Naidu MU, Kumar KV, Mohan IK, Sundaram C, Singh S. Protective effect of Ginkgo biloba extract against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Indian J Exp Biol* 2002; 40(8): 894-900.
227. 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.
228. 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.

229. Balli E, Mete U.O, Tuli A, Tap O, Kaya M. Effect of melatonin on the cardiotoxicity of doxorubicin. *Histol Histopathol* 2004; 19: 1101-1108.
230. Zhang Y, Li L, Xiang C, et al. Protective effect of melatonin against Adriamycin-induced cardiotoxicity. *Experimental and therapeutic medicine* 2013; 5(5): 1496-1500.
231. Othman A.I, El-Missiry M.A, Amer M.A, Arafa M. Melatonin controls oxidative stress and modulates iron, ferritin, and transferrin levels in adriamycin treated rats. *Life Sciences* 2008; 83: 563–568.
232. 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.
233. 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.
234. 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.
235. 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.
236. Sahna E, Parlakpınar, H, Ozer M.K, et al. Melatonin protects against myocardial doxorubicin toxicity in rats: role of physiological concentrations. *Journal of pineal research* 2003; 35(4): 257-261.
237. Kim S.M, Kim J.Y, Lee S, Park J.H. Adrenomedullin protects against hypoxia/reoxygenation-induced cell death by suppression of reactive oxygen species via thiol redox systems. *FEBS letters* 2010; 584(1): 213-218.
238. Inal S, Koc E, Ulusal-Okuyay G, et al. Protective effect of adrenomedullin on contrast induced nephropathy in rats. *Nefrologia* 2014; 34(6): 724-31.

239. Oyar E.Ö, Korkmaz A, Kardeş Ö, Ömeroğlu S. Aortic cross-clamping-induced spinal cord oxidative stress in rabbits: the role of a novel antioxidant adrenomedullin. *Journal of Surgical Research* 2008; 147(1): 143-147.
240. Radi R.B.J.S, Beckman J S, Bush K.M, Freeman B.A. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* 1991; 266(7): 4244-4250.
241. Pryor W.A, Squadrito G.L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1995; 268(5): L699-L722.
242. Quijan C, Alvarez B, Gatti R.M, Augusto O, Rafael R.A.D.I. Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochemical Journal* 1997; 322(1): 167-173.
243. Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 1997; 60: 2255-2271.
244. Noda Y, Mori A, Liburdy R, Packer L. Melatonin and its precursors oxide. *J. Pineal Res* 1999; 27: 159-163. Y, Mori A, Liburdy R, Packer L. Melatonin and its precursors oxide. *J. Pineal Res* 1999; 27: 159-163.

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Gülçin DURDAĞI, 1988 yılında İzmir’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kars Halil Atila İlköğretim Okulu’nda, liseyi Suphi Koyuncuoğlu Lisesi’nde tamamladı. 2008 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde başladığı lisans eğitimini 2014’te tamamlayıp, aynı yıl İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizioloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2014 senesinin Şubatından bu yana aynı bölümde öğrenimini sürdürmektedir.