

## Dokсорubisin ile oluşturulmuş deneysel kardiyotoksisite üzerine melatoninin etkisi

Funda Demir<sup>1</sup>, Figen Narin<sup>2</sup>, Hülya Akgün<sup>3</sup>, Kazım Üzüm<sup>4</sup>, Recep Saraymen<sup>5</sup>  
Ali Baykan<sup>1</sup>, Esat Köklü<sup>1</sup>

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi <sup>1</sup>Pediyatri Uzmanı, <sup>2</sup>Biyokimya Yardımcı Doçenti, <sup>3</sup>Patoloji Öğretim Görevlisi, <sup>4</sup>Pediyatri Profesörü, <sup>5</sup>Biyokimya Uzmanı

**SUMMARY:** Demir F, Narin F, Akgün H, Üzüm K, Saraymen R, Baykan A, Köklü E (Departments of Pediatrics, Biochemistry and Pathology, Erciyes University Faculty of Medicine, Kayseri, Turkey). Effect of melatonin on doxorubicin-induced experimental cardiotoxicity. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2004; 47: 260-268.

Doxorubicin, a widely used antineoplastic agent in clinical practice, has a serious side effect, cardiotoxicity. Due to the risk of life-threatening cardiotoxicity which limits doxorubicin's therapeutic potential, diagnosis and prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity become essential. Free radicals, lipid peroxidation and antioxidant enzymes are suggested to be mainly involved in doxorubicin-induced cardiotoxicity pathogenesis. The aim of this study was evaluation of the pathogenesis of doxorubicin-induced cardiotoxicity and the effect of melatonin. The study was designed with three groups: in the first group (n=10 young rabbits) doxorubicin was administered in six equal intraperitoneal injections over a period of two weeks (cumulative dose 15 mg/kg). The second group (n=7 young rabbits) who received melatonin (10 mg/kg/day intraperitoneally) 24 hours before intraperitoneal doxorubicin, and it was continued seven days after the last dose of doxorubicin. The third group was the control group (n=7). We measured myocardial and plasma glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) activities and myocardial nitric oxide (NO) activity in our rabbit model. Serum troponin I (Tn I) and creatine kinase (CK-MB) values were tested for diagnostic value of cardiotoxicity. Our results suggested that doxorubicin formed severe cardiotoxicity in young rabbits with 15 mg/kg cumulative doses with markedly decreased myocardial GSH-Px and increased MDA and NO values. Melatonin reduced doxorubicin-induced cardiotoxicity by increasing myocardial GSH-Px and SOD activities. Although serum Tn I and CK-MB levels had diagnostic values, any change in plasma GSH-Px, SOD and MDA activities was determined in assessing doxorubicin-induced cardiotoxicity. In conclusion, decreased antioxidant enzyme levels, increased free radicals and lipid peroxidation play a major role in the pathogenesis of doxorubicin-induced cardiotoxicity, and melatonin is an effective antioxidant in reducing doxorubicin-induced cardiotoxicity.

**Key words:** doxorubicin, nitric oxide, glutathione peroxidase, malondialdehyde, melatonin.

**ÖZET:** Etkin bir antitümör ajan olan dokсорubisinin kardiyotoksik yan etkisi, ilacın terapötik kullanımını kısıtlamakta, kardiyotoksisitenin belirlenmesi ve önlenmesi önem kazanmaktadır. Kardiyotoksisitenin patogenezinde ağırlıklı olarak serbest radikallerde ve lipid peroksidasyon ürünlerinde artış, antioksidan enzimlerde azalma sorumlu tutulmaktadır. Çalışmada dokсорubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinin araştırılması ve bunun üzerine melatonin etkisinin araştırılması amaçlandı. Çalışma üç grupta planlandı. Birinci grup (n: 10) genç tavşanlara, 15 günlük süre içerisinde, altı eşit dozda (kümülatif doz 15mg/kg) intraperitoneal dokсорubisin, ikinci grup (n: 7) dokсорubisinle birlikte dokсорubisinden 24 saat önce başlanarak ve dokсорubisin son dozundan yedi gün sonrasına kadar devam etmek üzere; melatonin (10 mg/kg/gün

intraperitoneal) verilerek oluşturuldu. Üçüncü grup ise kontrol grubu (n: 7) olarak planlandı. Kardiyotoksisitenin patogenezindeki etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla miyokard ve plazma glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD), malondialdehit (MDA) ve miyokardiyal nitrik oksit (NO) düzeyleri ile kardiyotoksisite tanısındaki etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla serum troponin I ve kreatin kinaz MB (CK-MB) düzeyleri çalışıldı. Histopatolojik olarak miyokardiyal hücre zedelenmesinin gelişip gelişmediği araştırıldı. Doksorubisin verilen genç tavşanlarda histopatolojik olarak ağır kardiyomiyopati geliştiği; miyokardiyal GSH-Px'in azaldığı, MDA ve NO düzeylerinin yükseldiği saptandı. Doksorubisinle birlikte melatonin verilen grupta miyokardiyal GSH-Px ve SOD'nin yükseldiği, histopatolojik olarak melatoninin ağır kardiyomiyopatiyi önlediği saptandı. Gruplar arasında plazma GSH-Px, SOD ve MDA düzeyleri açısından fark bulunmadı. Serum troponin I (CK-MB) düzeylerinin, sadece ağır kardiyotoksisite gelişen grupta arttığı, antioksidan verilen gruplarda değişmediği görüldü. Sonuç olarak doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinde miyokardiyal antioksidan enzimlerde azalma, serbest radikallerde ve lipid peroksidasyon ürünlerinde artmanın rol oynayabileceği belirlenmiş ve melatoninin doksorubisine bağlı ağır kardiyotoksisiteyi önleyebileceği gösterilmiştir. Ayrıca sonuçlar serum troponin I ve kreatin kinaz MB düzeylerinin, ağır kardiyotoksisitesinin tanısında kullanılabileceğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** doksorubisin, nitrik oksit, glutatyon peroksidaz, malondialdehit, melatonin.

Kanser tedavisinde kullanılan doksorubisin, yan etkisi fazla olan etkili bir kemoterapik ajandır. Kardiyotoksisite en önemli yan etkisi olup ilk kez doksorubisin tedavisi alan çocuklarda kalp etmezliği geliştiğinin fark edilmesiyle dikkati çekmiştir. Doksorubisine bağlı kardiyotoksisite geliştiğinde kan basıncı, elektrokardiyografi değişiklikleri gibi hafif semptomların yanı sıra konjestif kalp yetmezliği, disritmi, miyokardit, perikardit ve kardiyomiyopati gibi ağır bulgular görülebilir<sup>1,2</sup>.

Doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezi tam olarak açıklanamamış, histopatolojik bulguların değişken olması bir çok faktörün etkili olduğunu düşündürmüştür<sup>1</sup>. Çalışmalarda elde edilen bulgular, doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinde; serbest radikal oluşumunun, antioksidan enzimlerde azalmanın ve lipid peroksidasyonunda artmanın rol oynuyor olabileceğini desteklemektedir<sup>1,2</sup>. Patogeneizde sorumlu tutulan serbest radikaller süperoksit, hidroksil radikalleri ve nitrik oksittir (NO). Serbest radikallerin indüklediği malondialdehit (MDA) gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin de olaya katkısı olduğu gösterilmiştir<sup>1,3</sup>. Doksorubisinin serbest radikal oluşumuna neden olması yanında; glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz gibi antioksidan enzimleri azaltarak kardiyotoksisiteye neden olduğu da gösterilmiştir<sup>1</sup>.

Doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinde serbest radikal ve antioksidan enzimlerin rol oynadığına ait bulguların belirlenmesi, antioksidan tedavi denemelerini gündeme getirmiştir<sup>2</sup>.

Doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin önlenmesine yönelik ilk çalışmada Van Vleet ve arkadaşları<sup>4</sup> tavşanlara doksorubisinle birlikte antioksidan olarak selenyum ve E vitamini vermişler, on haftalık çalışma döneminde selenyum ve E vitamininin doksorubisine bağlı kardiyotoksisiteyi azalttığını belirlemişlerdir. Bu çalışmayı kalsiyum kanal blokörü, koenzim Q, deksrazoksan (ICRF-187) ve melatonin gibi ajanların denendiği çalışmalar izlemiştir<sup>5</sup>.

Melatonin pineal bezde bir amino asit olan triptofan'dan sentezlenir. Melatonin etkilerini vücutta başlıca beyin olmak üzere çoğunluğu periferik dokularda bulunan özgün reseptörleri aracılığı ile gösterir. Melatoninin hücreleri, dokuları ve organları serbest radikal oluşturan ajan ve olaylar (potasyum siyanid, L-sistein, aşırı egzersiz, karbon tetraklorid, iskemi- $\alpha$ -reperfüzyon, protein ve iyonize radyasyon gibi) sonucu gelişen oksidatif zedelenmeye karşın koruduğu gösterilmiştir<sup>6,7</sup>. Melatoninin çeşitli serbest radikalleri ve serbest oksijen radikallerini (OH radikali, peroksinitrit ve nitrik oksid gibi) detoksifiye ettiği ve endojen en potent hidroksil radikal temizleyicilerinden biri olduğu

bildirilmektedir<sup>6,8</sup>. Glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve SOD gibi antioksidan enzimleri stimüle ettiği, nitrik oksid sentetaz gibi oksidatif enzimlerin sentezinde ise inhibitör etki yaptığı belirlenmiştir<sup>8,9</sup>.

Melatonin hücrenin mitokondrisine nüfuz edebilen bir antioksidan olup, mitokondrileri de oksidasyon zedelenmesinden koruyabilmektedir. Melatonin OH radikali ile karşılaştığında toksik etkisi çok düşük olan indolil radikaline dönüşür. Melatonin ile diğer indollerin (serotonin, N-asetil serotonin, 5-metoksimelatonin) antioksidan özellikleri karşılaştırıldığında, melatoninin antioksidan özelliğinin, bu moleküllerin antioksidan özelliklerinden belirgin olarak yüksek olduğu görülmüştür. Melatonin, diğer OH radikali temizleyicilerinden mannitol ve glutatyon ile karşılaştırılmış; melatoninin antioksidan etkisinin glutatyondan beş kat, mannitolden 15 kat daha güçlü olduğu belirlenmiştir<sup>8,9</sup>.

Melatoninin doksorubisinin kardiyak toksitesini azaltıcı etkisi olduğunu ilk kez Morishima ve arkadaşları<sup>10</sup> belirlemiş, bu etkiyi lipid peroksidasyonunu önleyip, antioksidan enzim aktivitelerini arttırarak sağladığını bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada da doksorubisin tarafından indüklenen kardiyak zedelenmenin, melatoninin düşük farmakolojik dozları ile de önlenildiği bildirilmiştir<sup>11</sup>.

Çalışmada melatoninin bu özelliklerinden yararlanarak doksorubisine bağlı kardiyotoksitesite gelişmesinin önlenmesi amaçlandı. Bu amaçla tavşanlarda deneysel olarak doksorubisine bağlı kardiyotoksitesite oluşturulması ve melatonin verilerek doksorubisinin olumsuz etkilerinin önlenmesi planlandı.

### Materyal ve Metot

Çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya, Patoloji ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dallarının işbirliği ile Hakan Çetinsaya Deneysel Araştırma Merkezi Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi.

Çalışmada yaşları 60-90 gün arasında, New Zeland White cinsi toplam 24 erkek tavşan kullanıldı. Hayvanlar bir haftalık adaptasyon döneminden sonra üç gruba ayrıldı. Doks grubu; sadece doksorubisin uygulanan grup (n=10); Doks+Mel grubu: doksorubisin ile birlikte melatonin uygulanan grup (n:7); kontrol grubu distile su uygulanan grup (n=7).

**Doksorubisin uygulaması:** Doksorubisin (Adriablastina, Pharmacia) 10 mg'lık flakonda, 5 ml distile su ile sulandırılarak, hayvan modellerinde belirlenen total kümülatif doza göre<sup>12</sup> her gün aynı saatte olmak üzere 2.5 mg/kg/gün, gün aşırı, altı eşit dozda, total kümülatif doz 15 mg/kg olacak şekilde, intraperitoneal olarak verildi.

**Doksorubisin+Melatonin uygulaması:** Doksorubisin Doks grubuna verildiği şekilde, melatonin (Sigma Chemical Company, Sigma, St.Louis, MO) 10 mg/kg/gün (farmakolojik doz 2.5-10 mg/kg)<sup>13</sup> olacak şekilde doksorubisine başlanmadan bir gün önce başlanarak, son doksorubisin dozundan sonra yedi gün daha devam edilecek şekilde, 20 gün süreyle, intraperitoneal olarak verildi.

Toz halinde olan melatonin, absöü etil alkol içinde sulandırılıp, günlük dozlar ayrı tüplere konularak -70°C'de saklandı. Günlük doz, uygulamadan önce buzluktan çıkarıldı ve oda ısısında iki saat bekletildikten sonra kullanıldı.

**Kontrol grubu:** Sadece distile su doksorubisinin sulandırıldığı eş değer miktarda gün aşırı, altı dozda uygulandı.

### Örneklerin alınması ve hazırlanması

**Kan örnekleri:** Sıfırinci gün kan örnekleri adaptasyon döneminin sonunda, ilaç uygulamalarına başlanmadan 24 saat önce alındı. Yirmibirinci gün kan örnekleri Doks grubunda doksorubisin tedavisinin son dozundan sekiz gün sonra, Doks+Melatonin gruplarında doksorubisin tedavisinin son dozundan sekiz gün, melatoninin son dozundan 24 saat sonra alındı.

Kan örnekleri tavşanların kulak venlerinden, antikoagulan içermeyen bir tüpe 2 ml ve heparinli bir tüpe 4 ml olacak şekilde alındı. Antikoagulan içermeyen tüpe alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve serum örnekleri -70°C'de saklandı. Serum örneklerinde keratin kinaz MB (CK-MB) ve troponin I düzeyleri çalışıldı. Heparinli tüpe alınan kan örnekleri 0°C'de 15 dk santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı ve plazma örnekleri çalışılmak üzere -70°C'de saklandı. Plazma örneklerinde GSH-Px, SOD ve MDA düzeyleri çalışıldı.

**Doku örnekleri:** Yirmibirinci gün kan örnekleri alındıktan hemen sonra midazolam ile sedatize edilip, kulak veninden 2 ml potasyum klorür

verilerek öldürülen tavşanlar, öldürüldü. Kalpleri hızla çıkarılarak soğuk suyla yıkandı ve sol ventrikülden iki parça doku örneği alındı. Örneklerden biri hızla kuru bir spanca sarılarak doku GSH-Px, SOD, MDA ve NO düzeyleri çalışılmak üzere  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. İkinci örnek %10'luk formol içerisinde konularak histopatolojik değerlendirme için saklandı.

#### *Biyokimyasal incelemeler*

Serum CK-MB düzeyi, Konelab 60İ otoanalizör ile Medkim firmasının CK-MB düzeyleri ölçümü için ürettiği reagent kitler kullanılarak 0.5 cc serumda, serum troponin I düzeyleri ise Innotrak Aio Immunoanalyzer cihazında Innotrak Aio TM Troponin I Analyte Pen kiti ile 0.5 cc serumda çalışıldı.

Plazma ve miyokardiyal GSH-Px aktivitesi; GSH-Px tarafından katalizlenen bir reaksiyonda  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile glutatyonun (GSH) oksidasyon hızının ölçülmesi esasına dayanan Paglia ve Valentine'nin<sup>14</sup> birleşik enzimatik yöntemi ile ölçüldü. Doku GSH-Px aktivitesi miyokardiyal homojenatının (1/4 w/v) 13200 rpm'de 30 dk santrifüjlenmesiyle elde edilen süpernatantın fosfat tamponu (0.05 M, pH = 7.4) ile 1/10 oranında dilüe edilip, 0.05 ml'si kullanılarak incelendi.

Plazma ve miyokardiyal SOD aktivitesi tayininde Sun ve arkadaşları<sup>15</sup> tarafından geliştirilen "süperoksit üreticisi olarak ksantin oksidaz sisteminin kullanılması ve nitroblue tetrazoliumun (NBT) redüksiyonunun inhibe edilmesi" esasına dayanan yöntem kullanıldı. Doku SOD aktivitesi miyokardiyal homojenatından elde edilen süpernatantın 0.05 ml'sinin, 0.01 M fosfat tamponu (pH:7.4) ile 1/10 oranında dilüe edilerek incelendi.

Plazma MDA aktivitesi Stocks ve Dormandy<sup>16</sup> tarafından geliştirilen ve Jain<sup>17</sup> tarafından modifiye edilen temel ilkesi "lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan MDA'nin tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek 532 nm dalga boyunda maksimum absorban veren renkli bir kompleks oluşturması" esasına dayanan yöntem kullanılarak bakıldı. Doku MDA düzeyi Ohkawa ve arkadaşları<sup>18</sup> tarafından geliştirilen yöntemle göre bakıldı.

Doku NO düzeyi için dondurularak saklanan miyokardiyal homojenatından elde edilen süpernatantların 0.05 ml'si, Somogyi reaktifi (%10  $\text{ZnSO}_4$  ve 0,5 N NaOH) ile 1/4 (v/v)

oranında seyreltilerek ve deproteinize edilerek,  $+ 4^{\circ}\text{C}$ 'de 1500 rpm de 10 dakika santrifüj edildi<sup>19</sup>. Elde edilen deproteinize süpernatantlardan NO ( $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ ) tayini yapıldı.

Griess reaksiyonu, nitrat ( $\text{NO}_3$ ) iyonlarına spesifik olmadığından süpernatantta bulunan nitrat ( $\text{NO}_3$ ) önce nitrite ( $\text{NO}_2$ ) redüklendi ve sonra nitrit üzerinden hazırlanan nitrat standart grafiğinden miktar tayini yapıldı<sup>20</sup>.

#### *Histopatolojik incelemeler*

Formol ile fikse edilen miyokard dokuları patoloji laboratuvarında değerlendirildi. Rutin işlemlerinden geçirilen dokulardan, parafin bloklar elde edildi. Her örnekten mikrotom ile 5-6  $\mu\text{m}$  kalınlığında doku kesitleri alındı. Doku kesitleri hemotoksilen-eozin histokimyasal boyama yöntemi ile boyandı. Hemotoksilen-eozin ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelendi. Histopatolojik değişikliklerin ağırlığına göre skorlama yapıldı. Aşağıda belirtilen her histopatolojik değişiklik için 1 puan verildi<sup>21</sup>:

- Miyokard liflerinde şişme ve intertisiyel ödem (+1),
- Miyokard liflerinde disorganizasyonu (+1),
- Miyokard liflerinde nekroz (+1),
- Miyokard liflerinde vakuolizasyon (+1),
- Miyokard liflerinde hiçbir değişiklik yoksa (+0).

Kardiyomiyopati derecesinin ağırlığı, toplam puana (0 ile 3) göre yapıldı:

- 0 puan: kardiyomiyopati yok,
- 1 puan: hafif derecede kardiyomiyopati,
- 2 puan: orta derecede kardiyomiyopati,

Tüm istatistiksel analizler SPSS 10.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Tüm parametreler istatistiksel analizlerde nonparametrik testler kullanıldığı için ortanca (en düşük-en yüksek) olarak ifade edildi. Gruplar arası karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi ve Mann-Whitney U testi, grup içi karşılaştırmada ise Wilcoxon signed ranks testi kullanıldı. Tüm istatistiksel analizlerde  $p < 0.05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

#### **Bulgular**

Çalışmaya Doks grubunda on, Doks+Mel grubunda yedi, kontrol grubunda yedi tavşan ile başlandı. Çalışma Doks grubunda on, Doks+Mel grubunda yedi, kontrol grubunda yedi tavşan ile bitirildi. Doks grubunda sıfırncı.

gün ve 21. gün serum CK-MB ve troponin I, plazma MDA, SOD, GSH-Px düzeyleri Tablo I'de gösterildi. Tedavi öncesi, ve sonrası değerleri kıyasladığımızda troponin, CK-MB düzeylerinin 21. gün sonunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükselmiş olduğu saptandı ( $p<0.05$ ). Diğer parametrelerde değişiklik olmadığı belirlendi (Tablo I).

Doks+Mel grubunda değerlerde anlamlı değişiklik olmadığı belirlendi ( $p<0.05$ ; Tablo II).

Her iki grubun değerleri birbiriyle kıyaslandığında 21. günde Doks grubunda troponin ve CKMB değerlerindeki yüksekliğin Doks+Mel grubuna göre anlamlı olduğu saptandı ( $p<0.05$ ).

Doku MDA, NO, SOD ve GSH-Px değerleri Doks, Doks+Mel ve kontrol gruplarında incelendi ve bu parametrelerin gruplar arasındaki değerleri birbirleriyle kıyaslandı. MDA'nın Doks ve Doks+Mel gruplarındaki

değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu saptandı ( $p<0.05$ ). NO'nun Doks ve Doks+Mel grubu değerlerinin kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ). SOD değerleri incelendiğinde Doks ve Doks+Mel grubu değerlerinin kontrol grubuna göre, Doks+Mel grubu değerinin ise Doks grubuna göre anlamlı yüksek olduğu ve GSH-Px'in değerleri incelendiğinde ise kontrol ve Doks+Mel gruplarının değerlerinin Doks grubuna göre anlamlı artmış olduğu saptandı ( $p<0.05$ ; Tablo III).

Doks grubunun kardiyomiyopati skoru 3 (ağır kardiyomiyopati), Doks+Mel gruplarının kardiyomiyopati skoru 1 (hafif kardiyomiyopati), kontrol grubunun kardiyomiyopati skoru 0 olarak bulundu (Tablo IV). Grupların histopatolojik bulguları karşılaştırıldığında Doks grubu kardiyomiyopati skorunun diğer grupların kardiyomiyopati skoruna göre istatistiksel

**Tablo I.** Doks grubunda (n: 10) 0. gün ve 21. gün serum CK-MB ve troponin I, plazma MDA, SOD, GSH-Px düzeyleri

	0. gün	21. gün	p değeri
Troponin I (ng/mL)	0.22 (0.17-0.26)	0.27 (0.24-0.56)	<0.05
CK-MB (U/I)	2080 (1043-4059)	4123 (2542-5981)	<0.05
MDA ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.52 (0.11-0.78)	0.69 (0.27-1.41)	>0.05
SOD (U/L)	1.31 (1.15-1.42)	1.24 (0.97-1.44)	>0.05
GSH-PX (U/mL)	0.18 (0.11-0.38)	0.26 (0.08-0.43)	>0.05

Ortanca (en düşük - en yüksek)

**Tablo II.** Doks+Mel grubunda (n: 71) 0. gün ve 21. gün serum CK-MB ve troponin I, plazma MDA, SOD, GSH-Px düzeyleri

	0. gün	21. gün	p değeri
Troponin I (ng/mL)	0.21 (0.17-0.35)	0.21 (0.16-0.28)	>0.05
CK-MB (U/I)	2539 (1726-4106)	2324 (1401-4809)	>0.05
MDA ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.30 (0.13-1.04)	0.56 (0.29-1.41)	>0.05
SOD (U/L)	1.25 (1.13-1.51)	1.26 (0.93-1.49)	>0.05
GSH-PX (U/mL)	0.25 (0.10-0.39)	0.24 (0.18-0.84)	>0.05

Ortanca (en düşük - en yüksek)

**Tablo III.** Doks, Doks+Mel ve kontrol gruplarında doku MDA, SOD, NO ve GSH-Px değerleri

Grup	n	MDA (nmol/ $\mu\text{g}$ protein)	NO ( $\mu\text{mol}\times 10^{-3}/\mu\text{g}$ protein)	SOD (U/ $\mu\text{g}$ protein)	GSH-Px (mU/ $\mu\text{g}$ protein)
Doks	10	0.056 (0.031-0.087) <sup>a</sup>	0.13 (0.06-0.26) <sup>a</sup>	5.42 (2.58-7.63) <sup>a</sup>	2.4 (1.3-7.6)
Doks + Mel	7	0.038 (0.029-0.062) <sup>a</sup>	0.07 (0.04-0.13) <sup>a,b</sup>	6.95 (4.30-12.48) <sup>a</sup>	6.7 (3.8-10.7) <sup>a,b</sup>
Kontrol	7	0.027 (0.017-0.042)	0.03 (0.02-0.05)	4.97 (3.04-7.26)	4.6 (2.2-5.0) <sup>b</sup>

Ortanca (en düşük - en yüksek)

<sup>a</sup>  $p<0.05$ , kontrol grubu ile kıyaslandığında, <sup>b</sup>  $p<0.05$  Doks grubu ile kıyaslandığında.

**Tablo IV.** Grupların histopatolojik kardiyomiyopati skorlaması

Grup	n	Kardiyomiyopati skoru
Doks.	10	3.0 (2.0 - 3.0) <sup>a</sup>
Doks+Mel	7	1.0 (1.0 - 2.0) <sup>a,b</sup>
Kontrol	7	0.0 (0.0 - 0.0) <sup>b</sup>

Ortanca (en düşük - en yüksek).

<sup>a</sup> p<0.05, Kontrol Grubu ile kıyaslandığında; <sup>b</sup> p<0.05, Doks Grubu ile kıyaslandığında.

olarak anlamlı oranda yüksek olduğu (p<0.05) belirlendi. Doks grubunda bir miyokard dokusunda kardiyomiyopati bulguları ile birlikte bakteri kümeleri görüldü.

### Tartışma

Etkin bir antitümör ajan olan doksorubisinin kardiyotoksik yan etkisi, antitümör etkisinden en yüksek düzeyde faydalanılmasını engellemekte, kardiyotoksik etki nedeniyle antitümör etkinin kısıtlanması, kardiyotoksisitenin önlenmesi çalışmalarını gündeme getirmektedir. Doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin önlenmesine yönelik çalışmalar daha çok deneysel çalışmalar olup; fare, sıçan, tavşan, domuz ve köpeklerde yapılan çalışmalarda, doksorubisille oluşturulan kardiyotoksisitenin klinik ve morfolojik özelliklerinin insanlardakine benzer olduğu belirlenmiştir<sup>5</sup>. Çalışmada tavşan modeli tercih edilmiş ve çocukluk çağında kullanılan doksorubisinin kardiyotoksik etkisini yansıması açısından genç tavşanlar seçilmiştir. Doksorubisin dozu hayvan modellerinde (tavşan ve sıçan) belirlenen total kümülatif doza (15 mg/kg) uygun verilmiştir<sup>5,12</sup>.

Çalışmada sadece doksorubisin verilen grupta histopatolojik olarak miyokardiyal fibrillerde şişme ve interstisiyel ödem, disorganizasyon ve nekrozdan oluşan bulguların olması ile ağır kardiyomiyopati geliştiği saptanmıştır. Miyokardiyal fibrillerde şişme ve interstisiyel ödem, miyokardiyal fibrillerin disorganizasyonu, ve nekrozdan oluşan histopatolojik bulgular literatürdeki bulgularla benzerlik göstermektedir<sup>12,21</sup>. Doks+Mel grubunda yapılan histopatolojik değerlendirmede normal miyokard dokusu yanında sadece miyokardiyal fibrillerde şişme, interstisiyel ödem ve disorganizasyondan oluşan hafif kardiyomiyopati bulgusu saptandı. Bu durum mela-

toninin doksorubisine bağlı kardiyotoksisiteyi tam olarak önlemese de oldukça gerilettiğini düşündürmektedir.

Çalışmada doksorubisine bağlı miyokardiyal zedelenmenin belirlenmesinde, klinikte kullanılan, invaziv olmayan serum CK-MB ve troponin I düzeylerinin tanısal değeri de değerlendirilmiştir. Çalışmada Doks grubunda çalışma sonu CK-MB düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanması literatürdeki çalışmalarla uyumlu bulunmuştur<sup>12</sup>. Hafif kardiyomiyopati saptanan Doks+Mel grubunda çalışma sonu serum CK-MB düzeylerinde artış tesbit edilmemesi, minör miyokardiyal zedelenmenin belirlenmesinde serum CK-MB düzeylerinin yeterli olmadığını düşündürmüştür.

Doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin belirlenmesinde, CK-MB ile ilgili yeterli çalışma olmasına rağmen; troponin I düzeylerinin tanısal değeri ile ilgili çok az sayıda çalışma vardır. Mathew ve arkadaşları<sup>22</sup> malign hastalarda 375 mg/m<sup>2</sup>lik kümülatif dozların üzerinde asemptomatik miyokardiyal hasarın tespitinde serum troponin I düzeylerinin belirleyici olduğunu bildirmişlerdir. Herman ve arkadaşları<sup>23</sup> sıçanlarda 7 mg/kg kümülatif dozda serum troponin T düzeylerinde artış saptadıklarını belirtmekle birlikte, serum troponin I düzeylerinin değerlendirildiği veya kümülatif doz karşılaştırılması yapılmış deneysel çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda Doks grubunda, troponin I düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmış, bu bulgu serum troponin I düzeylerinin kardiyomiyopatinin biyokimyasal göstergesi olabileceği görüşünü desteklemiştir. Ancak hafif kardiyomiyopati saptanan Doks+Mel grubunda 21. gün troponin I düzeylerinde yükselme bulunmamıştır. Bu nedenle troponin I'nın minör miyokardiyal zedelenmeyi göstermede yetersiz kaldığı düşünülmüştür.

Doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezi tam olarak açıklanamamış. Bulgular, kardiyotoksisite gelişmesinde serbest radikallerin açığa çıkmasının ve antioksidan enzimlerin azalmasının önemli rol oynadığını ortaya koymuştur<sup>1,2</sup>. Çalışmamızda aralıklı doz doksorubisin uygulamasının (2.5 mg/kg/günaşırı); serbest radikal, lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistem üzerine etkileri de

değerlendirilmiştir. Doksorubisine bağlı kardiyotoksisite oluşturulan çalışmalarda son doksorubisin enjeksiyonundan üç hafta sonra antioksidan sistem ve lipid peroksidasyonu değerlendirilmiş ve doksorubisinin kronik süreçte kalp doku GSH-Px'ını azalttığı ve lipid peroksidasyon ürünlerini artırdığı belirlenmiştir<sup>24,25</sup>.

Kardiyomiyositleri serbest oksijen radikallerine karşı koruyan major antioksidan enzim GSH-Px'dır<sup>26</sup>. Çalışmamızda sadece doksorubisin verilen grupta kalp doku GSH-Px düzeylerinin azalmış olduğu bulunmuş, bu bulgu doksorubisin kardiyotoksisitesinin patogenezinde GSH-Px'ın azalmasının primer rolü olduğu görüşünü teyit etmiştir. Li ve Singal<sup>27</sup> 15 mg/kg kümülatif dozda doksorubisin verdikleri ratlarda doksorubisinin son dozundan sonra ikinci saatten itibaren GSH-Px enzim aktivitesinde azalma saptadıklarını, Yin ve arkadaşları<sup>28</sup> ise doksorubisini 15 mg/kg tek doz olarak verdiklerinde GSH-Px aktivitesinin değişmediğini bildirmişlerdir. Bulgularımız Li ve Singal'in<sup>27</sup> bulguları ile uyumlu, Yin ve arkadaşlarının<sup>28</sup> bulguları ile uyumlu değildir. Bu farklılığın Yin ve arkadaşlarının<sup>28</sup> kümülatif dozu tek doz olarak vermesinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda doksorubisikle birlikte melatonin kullandığımız grupta kalp doku GSH-Px aktivitesi korunmuştur. Histopatolojik olarak da kardiyotoksisitenin geriletmiş görülmesi, kalpdeki artmış GSH-Px aktivitesi ile açıklanmıştır.

Dalloz ve arkadaşları<sup>29</sup> sıçanlarda doksorubisin+radyasyon'un kardiyak fonksiyonlar ve antioksidan sistemleri üzerine olan etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında, sadece doksorubisin verilen grupta, son doksorubisin dozundan 24 saat ve 30 gün sonraki plazma ve doku SOD düzeylerinde azalma veya artış olmadığını, kontrol grubu ile benzer bulduklarını bildirmişlerdir. Iliskovic ve arkadaşları<sup>30</sup> doksorubisin son dozundan üç hafta sonra kalp doku, SOD düzeylerinde değişiklik olmadığını, doksorubisikle birlikte antioksidan olarak probukol verilen grupta doku SOD düzeyinin anlamlı oranda arttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda antioksidan etkinliklerini değerlendirmek istediğimiz melatonin grubunda kontrol grubuna göre kalp doku SOD düzeylerinde artış olduğunu belirledik. Bu artış kompensatuar mekanizmaya bağlansa da, Doks grubuna göre istatistiksel olarak

anlamlı olması dikkat çekici idi. Çalışmalardaki bulgular ve bizim bulgularımız SOD'nin doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinde rolünün az olsa da, önlenmesinde etkin olduğunu düşündürmektedir.

Doksorubisinin serbest radikal aracılığıyla oluşturduğu kardiyak zedelenmenin bir diğer mekanizmasının da lipid peroksidasyonu olduğu düşünülmektedir<sup>1</sup>. Literatürde doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patofizyolojisinden kalp doku MDA düzeylerinde yükselmenin sorumlu tutulduğu çok sayıda çalışma bildirilmiştir<sup>24,25,31</sup>. Bazı araştırmacılar CK-MB ve LDH gibi kardiyak enzimlerdeki yükselmeyi kardiyak membranların doksorubisine bağlı lipid peroksidasyonuna uğramaları sonucu enzim salınımının olmasına bağlamışlardır<sup>12</sup>. Çalışmamızda da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doksorubisin grubunda MDA düzeylerinde anlamlı artış belirlenmiş, bu bulgu doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinde lipid peroksidasyon ürünlerindeki artışında etkili olduğu görüşünü desteklemiştir. Çalışmamızda ise kullandığımız melatoninle kalp doku MDA düzeylerinde azalma bulmadık. Bu sonuç melatoninin antioksidan etkinliğini lipid peroksidasyonunu engelleyerek yapmadığını düşündürmektedir.

Doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinde sorumlu tutulan NO ve peroksinitrit ile ilgili ilk çalışma Weinstein ve arkadaşları<sup>32</sup> tarafından yayınlanmıştır. Weinstein ve arkadaşları<sup>32</sup> 20 mg/kg intraperitoneal tek doz doksorubisin verdikleri farelerde, kalp dokusunda NO sentetaz II enziminde artış olduğunu ve son doksorubisin dozundan beş gün sonra da, doksorubisine bağlı oksidatif olayın devam ettiğini, kardiyak dokuda proteine bağlı peroksinitrit radikallerinde artış saptadıklarını bildirmişlerdir. Fadilloğlu ve arkadaşları<sup>33</sup> ile Aldieri ve arkadaşlarının<sup>34</sup> yaptıkları çalışmalarda da bu sonucu destekler bulgular elde edilmiştir. Çalışmamızda kalp doku NO düzeyi ile ilgili bulgularımız literatürle uyumlu olup, Doks grubunda NO düzeyleri; kontrol, doks+mel grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur. Bu bulgu, doksorubisine bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinde NO'nin rolünün olduğu görüşünü desteklemiş, melatoninin NO sentezini azaltarak antioksidan aktivite sağlıyor olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda kalp doku GSH-Px, SOD ve MDA düzeyleri ile birlikte plazma GSH-Px, SOD ve MDA düzeyleri de belirlenmiştir. Ömürleri kısa olan ve oluştukları dokuda etkin olan antioksidan enzimlerin ve serbest radikallerin doku düzeylerinin tanısal değeri plazma değerlerinden kıymetlidir. Ancak klinikte plazma değerlerinin belirlenmesi doku değerlerinin belirlenmesinden daha pratik olacaktır. Çalışmamızda plazma GSH-Px, SOD ve MDA düzeyleri açısından grupların başlangıç değerleri ve çalışma sonu değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Bu bulgu plazma GSH-Px, SOD ve MDA düzeylerinin doksorubisin kardiyotoksisitesini belirlemede kullanılamayacağını düşündürmüştür.

Melatoninin serbest radikallere bağlı patofizyolojik olayları engelleme, nükleer DNA'yı ve membran lipidlerini oksidatif zedelenmeden koruma<sup>35</sup>, GSH-Px, SOD, katalaz gibi antioksidan enzim aktivitelerini stimüle etme<sup>13,36</sup> özellikleri ile birlikte, tümör büyümesini engelleyebilme ve kemoterapötiklerin yan etkilerini önleyebilme özelliklerinin olduğu bildirilmektedir<sup>35</sup>. Çalışmamızda farmakolojik dozda kullanılan melatoninin (10 mg/kg), kalp doku GSH-Px düzeylerini Doks ve kontrol gruplarına göre anlamlı oranda arttırdığı; SOD düzeylerini de kontrol grubuna göre anlamlı oranda arttırdığı, kalp doku NO düzeylerinde Doks ve kontrol gruplarına kıyasla anlamlı oranda azalma, kalp doku MDA düzeylerinde Doks grubuna kıyasla azalma sağladığı, ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.

Bulgularımız, melatoninin antioksidan etkinliğini, kalp doku GSH-Px ve SOD düzeylerinde artış, kalp doku NO düzeylerinde azalma sağlayarak yaptığını düşündürmektedir. Melatoninin doku GSH-Px, SOD ve NO düzeylerine etkisi ile ilgili bulgularımız literatürle uyumludur<sup>9,13,37</sup>. Birçok araştırmacı melatoninin lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'yi azalttığını bildirmişlerdir<sup>10,36,38</sup>. Çalışmamızda Doks+Mel grubunda MDA düzeyleri azalma eğiliminde olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Çalışmamızda MDA ile ilgili bulguların daha önce yapılan bazı çalışmaların<sup>10,11,36,38</sup> bulgularından farklı olması, melatonin kullanma dozu, süresi ve lipid peroksidasyon ürünü ve antioksidan enzimlerin ölçülme zamanı gibi

faktörlerden kaynaklanıyor olabileceğini ve güvenilir veriler elde etmek için daha ayrıntılı çalışmaların yapılmasının uygun olacağını düşünüyoruz.

Sonuçta; doksorubisin verilen grupta ağır kardiyomiyopati geliştiği, doksorubisin ile birlikte melatonin verilen grupta ise hafif kardiyomiyopati bulguları olduğu ve melatoninin doksorubisine bağlı kardiyotoksisiteyi önleyemese de hafiflettiği kanısına varıldı. Serum troponin I ve CK-MB düzeylerinin doksorubisine bağlı ağır kardiyomiyosit hasarının belirlenmesinde yararlı olabileceği, hafif miyokardiyal zedelenmeyi göstermede ise yetersiz kalabilecekleri görüldü. Doksorubisin verilen grupta miyokardiyal GSH-Px düzeyleri azaldığı, MDA ve NO düzeylerinin yükseldiği saptandı; bu bulgu doksorubisinin kardiyotoksisitesinin patogenezinde GSH-Px'ın azalmasının, MDA ve NO düzeylerinin artmasının rolü olduğu görüşünü destekledi. Başlangıç plazma GSH-Px, SOD ve MDA düzeyleri ile çalışma sonu düzeyleri arasında fark saptanmayıp, plazma GSH-Px, SOD ve MDA düzeylerinin doksorubisin kardiyotoksisitesini belirlemede kullanılamayacağı kanısına varıldı. Ayrıca melatoninin miyokardiyal GSH-Px düzeylerini ve SOD enzim aktivitesinde yükselttiği, NO düzeyini azalttığı saptandı. Doksorubisine bağlı kardiyotoksisiteyi önlemede yeterli olabileceği, melatoninin kardiyotoksisiteyi önlemedeki etkinliğine yönelik yeni çalışmaların yapılması gerektiği düşüncesine varıldı.

#### KAYNAKLAR

1. Singal PK, Iliskovic N, Li T, Kumar D. Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *FASEB J* 1997; 11: 931-936.
2. 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: 411-420.
3. Singal PK, Deally CM, Weinberg LE. Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. *J Mol Cell Cardiol* 1987; 19: 817-828.
4. Van Vleet JE, Ferrans VJ. Clinical and pathologic features of chronic adriamycin toxicosis in rabbits. *Am J Vet Res* 1980; 41: 1462-1469.
5. Herman EH, Ferrans VJ. Preclinical animal models of cardiac protection from anthracycline-induced cardiotoxicity. *Semin Oncol* 1998; 25: 15-21.
6. Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997; 336: 186-195.



7. Reiter RJ. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Braz J Med Biol Res* 1993; 26: 1141-1155.
8. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* 1997; 29: 363-372.
9. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: a review. *J Biomed Sci* 2000; 7: 444-458.
10. Morishima I, Okumura K, Matsui H, et al. Zinc accumulation in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: effects of melatonin, a cardioprotective antioxidant. *J Pineal Res.*1999;26:204-210.
11. Agapito MT, Antolin Y, del Brio MT, Lopez-Burillo S, Pablos MI, Recio JM. Protective effect of melatonin against adriamycin toxicity in the rat. *J Pineal Res* 2001; 31: 23-30.
12. Saad SY, Najjar TA, Al-Rikabi AC. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacol Res* 2001; 43: 211-218.
13. Reiter RJ, Tan DX, Sainz RM, Mayo JC, Lopez-Burillo S. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54: 1299-1321.
14. Paglia DE, Valentina WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
15. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
16. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1978; 90: 37-43.
17. Jain SK. Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes. *Biochem Biophys Acta* 1988; 937: 205-210.
18. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochem* 1979; 95: 351-358.
19. Davidge ST, Stranko CP, Roberts JM. Urine but not plasma nitric oxide metabolites are decreased in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 1008-1013.
20. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41: 892-896.
21. Morishima I, Matsui H, Mukawa H, et al. Melatonin, a pineal hormone with antioxidant property, protects against adriamycin cardiomyopathy in rats. *Life Sci* 1998; 63: 511-521.
22. Mathew P, Suarez W, Kip K, et al. Is there a potential role for serum cardiac troponin I as a marker for myocardial dysfunction in pediatric patients receiving anthracycline-based therapy? A pilot study. *Cancer Invest* 2001; 19: 352-359.
23. Herman EH, Lipshultz SE, Rifai N, et al. Cardiac troponin T: elevated serum levels and loss from cardiac myocytes in doxorubicin toxicity. *Circulation* 1996; 94: 1-85.
24. Siveski-Iliskovic N, Kaul N, Singal PK. Probucool promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Circulation* 1994; 89: 2829-2835.
25. Sadzuka Y, Sugiyama T, Shimoi K, Kinoshita N, Hirota S. Protective effect of flavonoids on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Lett* 1997; 92: 1-7.
26. Myers C. The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Semin Oncol* 1998; 25: 10-14.
27. Li T, Singal PK. Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucole. *Circulation* 2000; 102: 2105-2110.
28. Yin X, Wu H, Chen Y, Kang YJ. Induction of antioxidants by adriamycin in mouse heart. *Biochem Pharmacol* 1998; 56: 87-93.
29. Dalloz F, Maingon P, Cottin Y, Briot F, Horiot JC, Rochette L. Effects of combined irradiation and doxorubicin treatment on cardiac function and antioxidant defenses in the rat. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 785-800.
30. Iliskovic N, Hasinoff BB, Maliszka KL, Li T, Danelisen I, Singal PK. Mechanisms of beneficial effects of probucole in adriamycin cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 1999; 196: 43-49.
31. Sayed-Ahmed MM, Salman TM, Gaballah HE, Abou El-Naga SA, Nicolai R, Calvani M. Propionyl-L-carnitine as protector against adriamycin-induced cardiomyopathy. *Pharmacol Res* 2001; 43: 513-520.
32. Weinstein DM, Mihm MJ, Bauer JA. Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294: 396-401.
33. Fadilloğlu E, Yılmaz HR, Erdoğan H, Sogut S. The activities of tissue xanthine oxidase and adenosine deaminase and the levels of hydroxyproline and nitric oxide in rat hearts subjected to doxorubicin: protective effect of erdosteine. *Toxicology* 2003; 191: 153-158.
34. Aldieri E, Bergandi L, Riganti C, Costamagna C, Bosia A, Ghigo D. Doxorubicin induces an increase of nitric oxide synthesis in rat cardiac cells that is inhibited by iron supplementation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 185: 85-90.
35. Kalyanaraman B, Joseph J, Kalivendi S, Wang S, Konorev E, Kotamraju S. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. *Mol Cell Biochem* 2002; 234/235: 119-124.
36. Dziegiel P, Jethon Z, Suder E, Sopol M, et al. Role of exogenous melatonin in reducing the cardiotoxic effect of daunorubicin and doxorubicin in the rat. *Exp Toxicol Pathol* 2002; 53: 433-439.
37. Gilad E, Cuzzocrea S, Zingarelli B, Salzman AL, Szabo C. Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. *Life Sci* 1997; 60: 169-174.
38. Kocak G, Erbil KM, Ozdemir I, et al. The protective effect of melatonin on adriamycin-induced acute cardiac injury. *Can J Cardiol* 2003; 19: 535-541.