

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA SİSPLATİN İLE OLUŞTURULAN NÖROTOKSİSİTEYE
MELATONİNİN ETKİSİ

Arş. Gör. Dr. Umut Arda BAYRAKTAR

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

2021 – ANKARA

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA SİSPLATİN İLE OLUŞTURULAN NÖROTOKSİSİTEYE
MELATONİNİN ETKİSİ

Arş. Gör. Dr. Umut Arda BAYRAKTAR

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ.DR. MELTEM TUNCER

2021 - ANKARA

TEŞEKKÜR

Nörofizyoloji gibi oldukça karışık bir alanda bana tez vererek tezin her aşamasında bana yol gösteren, bilimsel desteğini eğitimim süresince her zaman yanımda hissettiğim tez danışmanım hocam Doç. Dr. Meltem Tuncer'e, çalışmanın tüm aşamalarında büyük destek ve yardımlarını gördüğüm hocam Doç. Dr. Okan Arıhan'a, çalışma arkadaşım Arş. Gör. Özbeyen Atalay'a, biyokimya analizlerini yapan Prof. Dr. Ebru Bodur ve Arş. Gör. Müslüm Gök'e ve istatistiki değerlendirmelerinde destekleri için Prof. Dr. Ergun Karaağaoğlu'na teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca eğitimim süresince her türlü desteği sağlayan Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ayşen Erdem'e, Fizyoloji ailesindeki tüm hocalarıma, araştırma görevlisi arkadaşlarıma, idari personelimize çok teşekkür ederim.

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi TTU-2020-18596 proje numarası ile desteklenmiştir.

ÖZET

Bayraktar UA. Sıçanlarda Sisplatin ile Oluşturulan Nörotoksositeye Melatonin Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Uzmanlık Tezi, Ankara, 2021.

Nörotoksosite sisplatinin (Cis) önemli yan etkilerden biridir. Patogenezinde oksidatif stres ve inflamasyon vardır. Melatonin (Mel) iyi bir antioksidan ve antiinflamatuvar madde olduğundan bu yan etkiyi düzeltme potansiyeline sahiptir. Bu çalışmanın amacı sıçanlarda Cis'in yaptığı nörotoksosite üzerinde Mel'in etkisini değerlendirmektir. Bu amaçla 48 sıçan 6 gruba bölündü. Kontrol (%0.9 NaCl), Çözücü (%5 etanol), Cis (6 mg/kg), Cis (6 mg/kg) + Çözücü, Mel (20 mg/kg), Cis (6mg/kg) + Mel (20 mg/kg). Cis tek doz, Mel 5 gün süre ile kullanıldı. İlaç protokolü sonrası *T-maze*, *rotarod* ve *hot plate* testleri yapıldı. Davranış testleri sonrası sakrifiye edilen sıçanların beyin dokusunda AChE, oksidatif stres ve proinflamatuvar belirteçler ölçüldü. Sonuçlarda Cis ve Cis+Çözücü gruplarda kognitif fonksiyonda ve motor performansta belirgin bozukluk saptanırken Cis+Mel grupta kognitif fonksiyonda belirgin, motor performansta istatistiksel anlamlılığa ulaşmayan düzelme saptandı. AChE seviyeleri Cis verilen sıçanlarda yüksekti. Mel eklenmesi önemli bir değişiklik yapmadı. TBARS ve MAO seviyeleri Cis+Çözücü grupta kontrole göre anlamlı yüksek iken ($p<0.05$) Cis+Mel grupta MAO seviyelerinde anlamlı, TBARS seviyelerinde anlamlı olmayan düşme oldu. SOD ve GPx seviyeleri Cis+Çözücü grupta kontrole göre anlamlı düşüktü. Mel eklenmesi ile belirgin artış gösterdi. GR aktivitesi Cis+Çözücü grupta düşükken Cis+Mel grupta anlamlı yüksekti. TNF- α seviyeleri Cis ve Cis+Çözücü gruplarda yüksek iken Mel eklenmesi ile kontrol grup seviyelerine döndü. IL-6 ve IL-1 β seviyeleri 3 Cis grubunda da yüksekti. Mel ile sitokin seviyeleri değişmedi. Sonuçlar Mel'in Cis'in yaptığı nörotoksositeyi önlemede etkili olabileceğini göstermektedir. Kesin bir sonuca ulaşmak için farklı dozlarda ve farklı sürelerde Mel kullanılarak yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Sisplatin, Nörotoksosite, Melatonin, Enflamasyon, Oksidatif stres, Kolinerjik Disfonksiyon

Destekleyen Kurumlar: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi (AP)

Proje No: TTU-2020-18596

ABSTRACT

Bayraktar UA. The Effect of Melatonin on Cisplatin Induced Neurotoxicity in Rats. Hacettepe University, Faculty of Medicine, Thesis in Physiology, Ankara, 2021

Cisplatin (Cis) induced neurotoxicity is thought to be caused by oxidative stress and inflammation. Melatonin (Mel) is a well known antiinflammatory and antioxidative drug. We aimed to assess the effects of Mel on Cis induced neurotoxicity in rats. We divided forty eight rats into six groups as: Control (0.9% NaCl), Vehicle (5% ethanol), Cis (6 mg/kg), Cis (6 mg/kg) + Vehicle (5% ethanol), Mel (20 mg/kg) and Cis (6 mg/kg) + Mel (20 mg/kg). We used Cis as a single dose and Mel for 5 days. After drug injections, we performed *T-maze*, *rotarod* and *hot plate* tests. Rats were sacrificed after behavioral tests and AChE, oxidative stress markers and proinflammatory cytokines were studied from the dissected brain. Cognitive and motor functions were impaired in Cis and Cis+Vehicle groups. Mel repaired cognitive impairment significantly ($p<0.05$) and motor function insignificantly. While AChE, TBARS and MAO levels were higher in Cis and Cis+Vehicle groups compared to control group ($p<0.05$), there was a significant decrease in MAO levels but an insignificant decrease in AChE, TBARS levels in Cis+Mel group. SOD and GPx levels were lower in Cis+Vehicle group compared to the control. They increased with the addition of Mel. While GR activity was low in Cis+ Vehicle group, it was higher in Cis + Mel group. TNF- α levels were high in Cis and Cis + Vehicle groups, returned to the control group levels with the addition of Mel. IL-6 and IL-1 β levels were high in all 3 Cis groups. There wasn't any change with Mel. These results support that melatonin may be an effective agent in preventing the Cis induced neurotoxicity. However, to reach a definitive conclusion, further studies are required using melatonin in different doses and in different periods.

Key Words: Cisplatin, Neurotoxicity, Melatonin, Oxidative Stress, Cholinergic Dysfunction

Supported by: Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (BAP) Project No: TTU-2020-18596

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Santral Sinir Sisteminin Anatomik ve Fizyolojik Özellikleri	4
2.2. Nörotoksisite	6
2.2.1 Nörotoksisite Tipleri	6
2.2.2. İlaçların Yaptığı Nörotoksisite Mekanizmaları	7
2.2.2.1.Oksidatif Stres	8
2.2.2.2. Apoptotik Olaylar	15
2.2.2.3. Eksitotoksisite	15
2.2.2.4. Diğer Biyokimyasal Mekanizmalar	15
2.2.3. Deney Hayvanı Modelinde Nöropatiyi Değerlendirmek için Kullanılan Testler	15
2.2.4. Kemoterapotiklerin Yaptığı Nörotoksisite	21
2.3. Sisplatin	22
2.3.1. Kimyası ve Farmokokinetiği	22
2.3.2. Etki Mekanizması	23
2.3.3. Klinik Kullanımı	26
2.3.4. Sisplatin Toksisitesi	26
2.3.5. Sisplatin ve Nörotoksisite	27
2.3.5.1. Nörotoksisite Oluş Mekanizmaları	29

2.3.6. Klinik Çalışmalarda Sisplatinin Yaptığı Nörotoksisiteyi Önlemek için Kullanılan Tedaviler	35
2.4. Melatonin	36
2.4.1. Sentez, Salınım ve Metabolizması	36
2.4.2. Melatonin Etki Mekanizmaları	40
2.4.3. Melatoninin Etkileri	41
2.4.4. Sisplatin Toksisitesi Üzerinde Melatoninin Etkisi	46
2.4.5. Melatoninin Nöroprotektif Olarak Kullanımı	47
2.4.6. Melatoninin Platin Bazlı Kemoterapötiklerin Yaptığı Nörotoksisite Üzerindeki etkisi	48
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	50
3.1. Gereçler ve Deney Protokolü	50
3.2. Davranış Testleri	52
3.3. Biyokimyasal Analizler	54
3.4. Rutin Biyokimyasal Testlerin Analizi	60
3.5. İstatiksel Analizler	60
4. BULGULAR	61
4.1. Genel Bulgular	61
4.2. Davranış Testleri	62
4.2.1. <i>T-Maze</i> Testi	62
4.2.2. <i>Rotarod</i> Testi	63
4.2.3. <i>Hot Plate</i> Testi	64
4.3. Biyokimyasal Analizler	64
4.3.1. Beyin Doku Örneklerinde Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Analizleri	64
4.3.2. Rutin Biyokimyasal Testlerin Analizi	73
5. TARTIŞMA	76
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	87
KAYNAKLAR	88

SİMGELER ve KISALTMALAR

2-OHM	2 hidroksimelatonin
4-OHM	4 hidroksimelatonin
5-MT	5 metoksitriptamin
6-OHM	6 hidroksimelatonin
8-OHdG	8 hidroksi 2 deoksi guanozin
AChE	Asetilkolinesteraz
AFMK	N1-formil 5-metoksikimuramin
ALT	Alanin amino transferaz
AMK	N1-asetil 5-metoksikimuramin
AST	Aspartat amino transferaz
BUN	Kan üre nitrojen
CAT	Katalaz
C3-OHM	Siklik 3 hidroksi melatonin
Cis	Sisplatin
CTR	Bakır taşıyıcı reseptör 1
DAG	Diçilgliserol
DRG	Dorsal kök gangliyonu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu
GABA	Gama amino bütirik asit
GSH	Aktif glutatyon
GSSG	Glutatyon disülfid
GPX	Glutatyon peroksidaz
GR	Glutatyon redüktaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HNE	4 hidroksinonenal
HO-1	Hem oksijenaz 1
iNOS	İndüklenebilen nitrik oksit sentaz
IL-6	İnterlökin-6

IL-1 β	İnterlökin-1 β
IP3	İnositol 3- fosfat
MAO	Monoaminoksidaz
Mel	Melatonin
NAC	N-asetilsistein
NAT	N-asetil transferaz
NER	Nükleotit ekzisyon tamiri
NF-kB	Nükleer faktör kappa B
NMDA	N-metil D aspartat
NO	Nitrik oksit
NRF-2	Nükleer faktör eritroid 2
OH	Hidroksil radikali
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali
OCT	Organik Katyon Taşıyıcısı
OXA	Oksaliplatin
PKC	Protein kinaz C
ROR/RZR	Retinoid orfan reseptör/retinoid Z reseptör
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Superoksit dismutaz
SSS	Santral sinir sistemi
TBARS	Tiyobarbütirik asit ürünleri
TNF- α	Tümör nekrozis faktör- α
TRPA1	Geçici reseptör potansiyel ankyrin 1
TRPM8	Geçici reseptör potansiyel mukolipin 8
TRPV1	Geçici reseptör potansiyel vanilloid 1

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.2.1. Moleküler oksijenden köken alan serbest oksijen radikalleri
- Şekil 2.2.2. Serbest oksijen türlerinin enzimatik yoldan temizlenmesi
- Şekil 2.2.3. Oksidatif stresin hücre üzerindeki etkileri
- Şekil 2.2.4. Doymamış yağların peroksidasyonu
- Şekil 2.2.5. *T-maze* apparatus planı
- Şekil 2.2.6. *Rotarod* apparatusu
- Şekil 2.2.7. *Hot plate* testi uygulaması
- Şekil 2.3.1. Sisplatin kimyasal yapısı
- Şekil 2.3.2. Sisplatinin hücre içinde hidrolizi ve hedefleri
- Şekil 2.3.3. Sisplatinin DNA üzerinde çapraz bağlanma ile yaptığı kompleksler
- Şekil 2.3.4. Sisplatin etki mekanizması
- Şekil 2.3.5. Sisplatine bağlı oksidatif stres sonucu apoptozis
- Şekil 2.3.6. Sisplatinin yaptığı nörotoksisite mekanizmaları
- Şekil.2.4.1 Melatoninin yapısı
- Şekil 2.4.2. Melatoninin sentez basamakları
- Şekil 2.4.3. Melatoninin metabolizması
- Şekil 2.4.4. Melatoninin hücrede etki yerleri
- Şekil 3.1. Deney protokolü
- Şekil 3.2. Deneyde kullanılan *T-maze* aparatı
- Şekil 3.3. Deneyde kullanılan *rotarod* aparatı
- Şekil 3.4. Deneyde kullanılan *hot plate* düzeneği
- Şekil 4.1. *T-maze* testinde alışılmamış kola gidiş yüzdelerinin dağılımı
- Şekil 4.2. *Rotarod* testi sonuçları
- Şekil 4.3. *Hot plate* testinde geri çekmede gecikme süreleri
- Şekil 4.4. Beyin dokusundaki AChE seviyeleri
- Şekil 4.5. Beyin dokusundaki MAO seviyeleri
- Şekil 4.6. Beyin dokusundaki TBARS seviyeleri
- Şekil 4.7. Beyin dokusundaki SOD enzim aktiviteleri

- Şekil 4.8. Beyin dokusundaki GPx aktiviteleri
- Şekil 4.9. Beyin dokusundaki GR aktiviteleri
- Şekil 4.10. Beyin dokusundaki TNF- α seviyeleri
- Şekil 4.11. Beyin dokusundaki IL-1 β seviyeleri
- Şekil 4.12. Beyin dokusundaki IL-6 seviyeleri

TABLolar DİZİNİ

- Tablo 4.1. Sıçanların ağırlık (gram) ölçümü sonuçları
- Tablo 4.2. Beyin dokusundaki oksidatif stres belirteçlerinin gruptaki seviyeleri
- Tablo 4.3. Beyin dokusundaki antioksidan enzimlerde sisplatin nörotoksitesi ve melatonin eklenmesi ile ortaya çıkan değişiklikler
- Tablo 4.4. Serum glukoz, BUN ve kreatinin seviyeleri
- Tablo 4.5. Karaciğer fonksiyon testlerinin değerlendirilmesi
- Tablo 4.6. Lipit seviyelerinin dağılımı

1. GİRİŞ VE AMAÇLAR

Kanser halen en önemli ölüm nedenlerinden biridir. Yeni kemoterapötik ilaçların geliştirilmesi sonucu bazı kanserlerde tam iyileşme sağlanmaktadır. Kemoterapötik ilaçlar, ciddi yan etkileri nedeniyle çoğu kez tedavinin sonlandırılmasına veya etkin dozun azaltılmasına neden olmaktadır. Bu ilaçların çoğu sinir sistemini etkiler ve en önemli yan etkilerinden biri nörotoksisitedir.

Antimetabolitler, alkilleyici ajanlar, tirozin kinaz inhibitörleri nörotoksik etki gösterirler. Bunlar içerisinde en fazla nörotoksik etki gösteren ajanlar doksorubusin ve sisplatin'dir (Ongnok ve ark 2020). Sisplatin pürin rezidülerine bağlanarak DNA şelatörü olarak etki eder ve kanser hücrelerinin apoptozisine neden olur (Dasari ve Tchounwou 2014). Sisplatinin kan beyin bariyerini az olarak geçtiği bilinmekle beraber beyinde ciddi nörotoksisiteye neden olabilir. Sisplatin kullanan hastalarda kognitif fonksiyonda belirgin bozukluklar ve ciddi periferik nöropatiler ortaya çıkmaktadır (Lange ve ark 2016). Sisplatin nörotoksitesinin en önemli kısmı periferik nöropatidir. En sık dorsal kök gangliyonlarındaki nöronlarda toksik etkiye neden olur.

Sisplatin çeşitli mekanizmalarla nörotoksik etki gösterir. Bunlardan en önemlilerinden biri oksidatif streştir (Hashem ve ark 2015). Bunun yanı sıra DNA aracılı apoptoz yolağı, mitokondri hasarı, proinflamatuvar sitokinlerin aktivasyonu, iyon kanallarındaki bozukluklar ve glial aktivasyon sisplatin nörotoksitesinden sorumlu mekanizmalardır.

Çalışmalar, sisplatin uygulaması ile serbest radikal oluşumunun ve dolayısıyla oksidatif hasarın arttığını göstermiştir (Areti ve ark 2014, Rehman ve ark 2019). Bu bulgular, oksidatif stresin sisplatin toksisitesinde önemli bir rol oynadığına işaret etmektedir. Sisplatin direkt olarak mitokondriyal DNA'yı harap eder ve sıçan hipokampusündeki nöronlarda mitokondriyal respiratuvar kapasiteyi azalttığı gösterilmiştir (Lomeli ve ark 2017, Podratz ve ark 2011). Mitokondriyal disfonksiyon oksidatif stresi provoke ederek intrinsik apoptotik yolağı başlatabilir. Mitokondriyal disfonksiyonun, nöronal öncüllerin, antioksidan genlerin ve enzimlerin

ekspresyonunun azalması ve NF-kB ve iNOS seviyelerinde artma ile korele olduğu gösterilmiştir (Jangra ve ark 2016). Bunun sonucunda malondialdehit, protein karbonil gibi oksidatif ürünler artmaktadır.

Mitokondrial DNA tutulumu yanı sıra mitokondrinin zar potansiyelinde kayıplar ve mitokondrial yapı değişiklikleri de gösterilmiştir (Custodio ve ark 2009) .

Nörotoksisitenin en önemli belirleyicilerinden biri de kolinerjik disfonksiyondur (Chtourou ve ark 2015). Sisplatinin beyindeki toksisitesi, artan asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi ile ilişkilidir. AChE aktivitesindeki artışın nedenlerinden birisi de reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışıdır. ROS plazma membranının peroksidasyonunu artırarak kolinerjik sistemin bütünlüğünü ve işlevselliğini etkiler (Pearson ve Patel 2016). Bunun yanı sıra monoaminooksidazların (MAO), monoamin nörotransmitterlerinin oksidatif deaminasyonunu katalizleyerek hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşturduğu gösterilmiştir. MAO aktivitesinin artışı H₂O₂ oluşumunda önemli bir mekanizmadır ve böylece oksidatif stres artar. Sisplatin nörotoksitesini sonrası beyin dokusunda AChE ve MAO aktivitesinde artış beklenir (Abdel-Wahab ve Moussa 2019).

Pro inflamatuvar sitokinler de nörotoksisite oluşumunda önemli rol oynarlar. Bunlar içinde TNF- α , IL-1 β , IL-6 major sitokinlerdir. Sisplatin nörotoksitesinde bu sitokinlerin sinir dokusunda yükseldiği gösterilmiştir (Jangra ve ark 2016). Sisplatinin yaptığı nörotoksisitede nöroinflamasyon önemli bir patofizyolojik mekanizma olabilir.

Sisplatinin yaptığı nörotoksisitenin önlenmesi veya azaltılması amacıyla birçok ajan kullanılmıştır. Bu ajanların önemli bir kısmı antioksidan, antiinflamatuvar etkisi olan (N asetil sistein, curcumin, naringin, E vitamini gibi) maddelerdir (Abdel-Wahab ve ark 2019, Chtourou ve ark 2015, Khadrawy ve ark 2019, Pace ve ark 2010). Fakat kesin koruyucu bir tedavi yöntemi ortaya konamamıştır.

Melatoninin geniş spektrumlu antioksidan ve güçlü serbest radikal tutucu olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Melatonin, apoptotik hücre ölümünü de inhibe eder (Reiter ve ark 2016). Çalışmalarda melatoninin T ve B hücreleri, monositleri aktive ederek immun modülatör özellik gösterdiği rapor edilmiştir (Medrano-

Campillo ve ark 2015). Antiinflamatuvar etkileri siklooksijenaz tip 2' nin azalması ve nitrik oksit (NO) inhibisyonu ile ilişkilidir (Naseem ve Parvez 2014).

Melatonin antioksidan olarak sisplatinin yaptığı ototoksisitede, nefrotoksisitede, testis ve over harabiyetlerinde kullanılmış ve etkin olduğu gösterilmiştir (Barberino ve ark 2017, De Araujo ve ark 2019, Ko ve ark 2019, Madhu ve ark 2015). Nörolojik hastalıklarda nöroprotektif etkisi nedeniyle kullanılmıştır. Özellikle Parkinson hastalığı, mani, tardif diskinezide etkisi saptanmıştır. (Aranarochana ve ark 2019, Rasheed ve ark 2018, Souzaa ve ark 2014). Melatoninin ayrıca aliminyum, kadmiyum, metamfetamin gibi toksik ajanların yaptığı nörotoksisitede de nöroprotektif etkisi rapor edilmiştir (Priyanka ve ark 2012, Shagirtha ve ark 2011, Tocharus ve ark 2010).

Bizim bilgilerimize göre melatoninin sisplatin nörotoksisitesi üzerindeki etkisi ile ilgili *in vivo* bir çalışma vardır. Bu çalışmada melatonin ve alfa lipoik asidin sisplatinin yaptığı periferik nöropati üzerindeki etkileri histopatolojik, elektrofizyolojik olarak çalışılmış alfa lipoik asit nörotoksisite üzerinde melatonine göre daha etkili olduğu bulunmuştur (Tuncer ve ark 2010).

Bu çalışmanın amacı sıçanlarda sisplatinin yaptığı nörotoksisite üzerinde melatoninin koruyucu etkisinin olup olmadığını davranış testleri, nörotoksisite ortaya çıkışında önemli iki mekanizma olan beyin dokusunda oksidatif stres, inflamasyon belirteçleri ve kolinerjik disfonksiyon üzerindeki etkileri ile araştırmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Santral Sinir Sistemi

2.1.1. Santral Sinir Sisteminin Anatomik ve Fizyolojik Özellikleri

Beyin hemisferleri hücre gövdelerinden oluşan gri cevher (serebral korteks) ve miyelinli liflerden oluşan beyaz cevherin yaptığı iki katmandan meydana gelir (Noback ve ark 2005).

Serebral korteks, frontal, parietal, oksipital ve temporal loblardan oluşur. Frontal lob bilinçli düşünmeden sorumludur. Parietal lob çeşitli duyu organlarından gelen bilgileri birleştirmede önemli rol oynar. Ayrıca nesnelerin kullanılması ve bazı mekansal görüş işlemlerinde (*visuospatial processing*) parietal lobun kimi bölümleri rol alır. Ses ve kokunun algılanması, aynı zamanda da yüzler, mekanlar gibi karmaşık uyarıların işlenmesi temporal lob tarafından sağlanır. Oksipital lob görme duyusuyla ilgili bilgilerin işlendiği lobdur (Noback ve ark 2005).

Beyin korteksi hemen altında diensefalon, talamus, hipotalamus ve epitalamus bulunur. Talamus kortekse gelen bilgilerin geçtiği bir kavşak konumundadır. Dikkat ve uyanıklık halinde önemli bir fonksiyona sahiptir. Talamusun hemen altında hipotalamus bulunur. Hipotalamus, farklı sayıda çekirdekler içerir. Bu çekirdekler ve yollar nöral ve endokrin sistemin bağlayıcıları konumundadır. Hipotalamus hipofiz bezinin hemen üstünde olup bu beze bir sapla bağlanmıştır. Hipotalamus ve talamusun bazı kısımları limbik sistem içine girer. Diensefalonun bir diğer bölümü epitalamus melatonin hormonu salgılayan pineal bezi kapsar (Widmaier ve ark 2015).

Serebellum, istemli hareketleri başlatmamasına rağmen hareketlerin, postür ve dengenin düzenlenmesinde rol alan önemli bir merkezdir. Serebellum kas, eklem, deri, göz, vestibüler sistem, iç organlar gibi bölgelerden bilgiler alır. Genelde fonksiyonları motor olmasına rağmen öğrenmenin bazı biçimlerine de katılır (Widmaier ve ark 2015).

Ön beyin, serebellum ve omurilik arasındaki ileti yollarının hepsi beyin sapından geçer. Beyin sapının özellikle pons bölgesinde seyreden ve akson demetleriyle karışmış gevşek bir yapı gösteren nöron gövdelerine retiküler

formasyon adı verilir. Bu yaşam için gereklidir. Motor fonksiyona, kardiyovasküler ve solunum sistemi denetimine, uyku ve uyanıklığı düzenleyen mekanizmalara ve dikkati yöneltme olaylarına katılır. Nörotransmitterlerin amin grubunun çoğu bu bölgedeki hücrelerin aksonlarından salgılanır. Bu hücrelerin uzantıları ile uzak mesafelere ulaşırlar (Hall 2016).

Nöronlar, SSS'nin ana hücreleridir. Beyinde yaklaşık 100 milyon nöron vardır. Nöronlar duyuların algılanması, motor ve duysal cevapların oluşturulması, öğrenme, hafıza gibi birçok fonksiyonu sağlayan hücrelerdir (Ming ve Song 2011).

Nöronlar, yapısal olarak hücre gövdesi, akson, dendritler ve presinaptik terminaller bulundurur. Hücre gövdesi nöronun genomik ve metabolik merkezidir. Beyinde vücuttaki diğer organlardan çok daha fazla gen kullanılır. Yaklaşık 30.000-40.000 gen kadardır. Bunun 15.000'i nöral dokuya spesifiktir (Ming ve Song 2011).

Nöronlar post mitotik hücrelerdir. Bir kez diferansiye olduklarında bölünemezler. Bu eski dogma son yıllarda yetişkin sinir sisteminde öncül hücrelerin halen var olduğunun gösterilmesi ile önemini kaybetmiştir. Yetişkinlerdeki öncül hücreler nöronlara diferansiye olabilirler. Dolayısıyla yetişkinde de nörogenezisin varlığı söz konusudur (Ming ve Song 2011).

Beyin kendisi için gerekli maddelerin geçmesini sağlayan buna karşılık çoğu toksik maddenin geçişine izin vermeyen bir kan beyin bariyeri ile çevrelenmiştir. Bu sayede birçok zararlı madde beyne ulaşamaz. Kan ve beyin arasında üç ana bariyer vardır (Abbott ve ark 2010).

A) Kan beyin bariyeri, kapiller endotel hücrelerdeki sıkı bağlantılarla oluşur. İlaçlar ve solütler bu bariyeri geçtiklerinde nöron ve glial hücre gövdelerine kolaylıkla geçerler. Bu bariyerin ana görevlerinden biri ilaçların ve toksik maddelerin geçişini engellemektir (Abbott ve ark 2010).

B) Beyin için ikincil bariyer, kan- BOS bariyeridir. Beynin lateral, üçüncü ve dördüncü ventriküllerindeki koroid pleksuslar boyunca devam eder. Bu bariyer epitelin BOS yapan yüzeyindeki epitel hücreler arasındaki sıkı bağlantılardan oluşur. Bazı ilaçlar bu yolla beyine geçebilirler.

C) Üçüncü bir bariyer, araknoid bariyerdir. Araknoid avaskülerdir. Hücreler arasında sıkı bağlantılar bulunur. Beyin omurilik sıvısının önemli bir kısmı bu araknoid viluslar yoluyla sinüslere boşalır. Araknoid zardan taşınım beyne solüt girişi için önemli bir yol değildir (Abbott ve ark 2010).

2.2 Nörotoksisite

Nörotoksisite, 90'lı yılların ortalarında kimyasal veya fiziksel etkilerle sinir sisteminin kimyası, yapısı veya fonksiyonunu bozan herhangi bir yan etki olarak tanımlanmıştır. Sinir sistemindeki morfolojik, fonksiyonel değişiklikler hafif veya geçici olsalar dahi yan etki olarak kabul edilmelidir. Sinir sistemini bozan her türlü maddeye nörotoksik madde denir (Costa 2017).

Sinir sisteminin gelişimi embriyonik evrede başlar, gebelik süresince ve genç erişkin yaşa kadar devam eder. Bu uzun periyod süresince nörotoksik maddelere maruziyet farklı bozukluklara yol açar. Beyin gelişimi periyodunda nörotoksik bir ajan şiddetli uzun süreli sinir sistemi harabiyeti yapabilir. Aynı nörotoksik ajan matur beyin dokusunda daha az şiddette nörotoksisite ortaya çıkarır (Costa 2017).

Nörotoksisiteye etki eden birçok faktör vardır. Bunlar hastanın yaşı, ilacın metabolize olup olmadığı, böbrek fonksiyonu, etnik farklılıklar, cinsiyet olabilir. Bazı ilaçlar karaciğerde metabolize olarak toksisiteyi azalır veya artar. Diğer bir metabolizma yolu ise sekestrasyondur. Bazı maddeler bu şekilde belirli yerlerde birikir ve beyne geçişleri engellenir (Harris ve Blain 2004).

2.2.1 Nörotoksisite Tipleri

Nörotoksisite santral veya periferik ya da her iki sinir sistemini birlikte tutabilir. En sık görülen ilaçlara bağlı periferik nöropatilerdir. Bunun önemli bir nedeni kan beyin bariyeri ile santral sisteminin kısmen korunmuş olmasıdır.

Hasar bölgesine göre nörotoksik ajanlar sınıflandırılabilir (Mosser ve ark 2013).

1. Nöronal hücre ölümüne neden olan kimyasallar: Bu kimyasallar nöron ölümüne neden olduklarından nörotoksisitenin en ağır formunu oluştururlar. Nöronopati olarak adlandırılırlar. Nöron kaybı geri dönüşsüz olduğundan ciddi sonuçlar doğurabilir. Nöronal ölüm ya apoptotik tipte veya nekrotik tipte olur.

Nöronopati yapan mekanizmalar diğer organlardakine benzer şekilde oksidatif stres, Ca^{+2} nin aşırı yükselmesi, mitokondriyal sitotoksisite, hücre enerjisinde değişiklikler veya hücre iskeletinin yıkımı sonucu olabilir. Bunlara ek olarak sinir sistemine özel çeşitli glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonu ile ilişkili eksitotoksisite nöronal ölümün nedeni olabilir.

2. Aksonal harabiyete neden olan kimyasallar: Aksonun distal kısmı bu tip harabiyette ilk etkilenir. Buna karşılık nöron gövdesi sağlam kalır. Uzun aksonlar kılalardan daha fazla etkilenirler, ya tek duyu ya da tek motor lifler tutulabileceği gibi her ikisi birden tutulabilir. Sinir iletimi çoğu zaman bozuktur ve bunun sonucu ekstremitelerde duyu ve motor kayıplar ortaya çıkar. Zedelenme kısmen veya tam olarak düzeltilebilir.

3. Glia hücreleri harap eden kimyasallar: Diğer bir hasar ise glial hücreler üzerindedir. Özellikle miyelin yapımında görev alan oligodendrositler ve Schwann hücreleri çok ciddi hasar alabilir. Astrositler de nörotoksisitede hedef hücre olabilir. Manganez, alkol gibi nörotoksik ajanların astrosit fonksiyonunu bozduğu gösterilmiştir (Mosser ve ark 2013). Mikroglial aktivasyon, oksidatif stres ve nöroinflamasyonu arttırarak nöronlarda da toksik etki gösterebilir.

4. Nöronal zarları ve nöronal iletimi etkileyen kimyasallar: Nöronal iletim nörotoksik ajanlar için potansiyel hedeflerden bir tanesidir. Nörotransmitter sentezinde tutulan enzimler, nörotransmitter depolama mekanizmaları, nörotransmitter salınımı, reseptörler ve geri alım sistemleri etkilenebilir.

5. İndirekt nörotoksisiteye neden olan kimyasallar: Sinir sisteminde sadece nöronal ve glial hücrelerle ilişkili mekanizmalar değil bazen indirekt mekanizmalar da etkilenebilir. Bunlar içerisinde en çok bilineni endokrin bozucular ve tiroid hormon seviyesindeki değişikliklerdir.

2.2.2 İlaçların Yaptığı Nörotoksisite Mekanizmaları

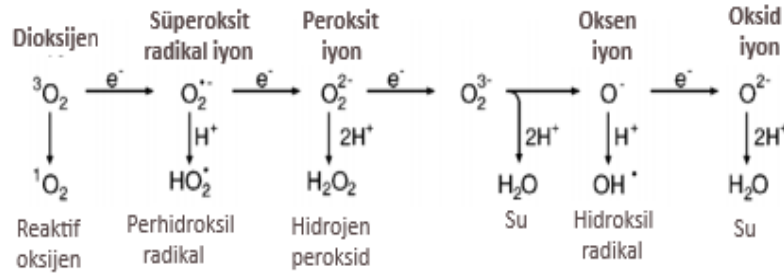
Nörotoksisite mekanizmalarının en önemlileri oksidatif stres, apoptotik süreçler, eksitotoksisite ve diğer biyokimyasal mekanizmalardır.

2.2.2.1 Oksidatif Stres

Oksidatif stres, hücrelerde ve dokularda metabolik olayların sonucu ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin (ROS), serbest radikallerin yapım ve birikimi ile bu reaktif ürünleri ortadan kaldırmaya çalışan biyolojik sistem arasındaki dengesizliktir.

Serbest radikaller, atomik veya moleküler yörüngedeki bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektronları kapsayan moleküller veya moleküler fragmanlar olarak tanımlanır. Oksijenden köken alan radikaller canlı organizmada en önemli reaktif ürünlerdir. Moleküler oksijen özel bir yapıya sahiptir ve kendisi radikaldir. Bir elektron eklenmesi onu süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) yapar. Süperoksit yapımı hücrenin mitokondrisinde gerçekleşir. Mitokondriyal elektron transport zinciri ATP'nin ana kaynağıdır ve yaşam için gereklidir. Enerji yapımı süresince elektronların küçük bir kısmı oksijene geçer ve serbest radikal olan süperoksidi oluşturur. Süperoksit radikali NADPH oksidaz, ksantin oksidaz ve peroksidaz gibi enzimler tarafından katalize edilir (Apel ve Hirt 2004).

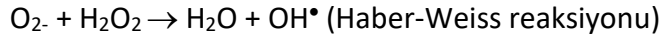
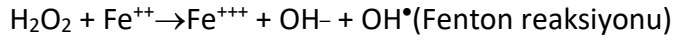
Süperoksit radikali daha sonra çeşitli reaksiyonlarda H_2O_2 , hidroksil radikal ($\cdot OH$), peroksinitrit ($ONOO^-$), hipokloroz asit ($HOCl$) yapımında rol alır (Şekil 2.2.1).



Şekil 2.2.1. Moleküler oksijenden köken alan serbest oksijen radikalleri (Apel ve Hirt 2004)'den

Hidrojen peroksit aminooksidaz, ksantin oksidaz gibi çok sayıda oksidaz enzimleri tarafından yapılır.

Hidroksil radikali serbest radikal türleri arasında en reaktif olanıdır. Kısa ömürlüdür. ROS'ların en güçlüsüdür. Katalizör olarak Fe^{+2} veya Cu^{+2} ile hidrojen peroksitin tepkimesi sonucu (Fenton reaksiyonu) veya süperoksit radikal varlığında (Haber-Weiss reaksiyonu) yapılır (Valko ve ark 2007).

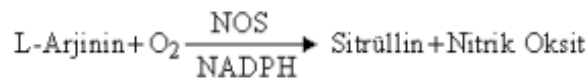


H_2O_2 , serbest radikal değildir. Fakat serbest radikal yapımında önemli rol oynar. Glukoz oksidaz, ürat oksidaz, D-aminooksidaz gibi bazı enzimlerce iki elektronun oksijene transferi sonrası ortaya çıkar. Yağda çözünen bir maddedir. Dolayısıyla hücre zarında birikip toksik etki gösterebilir.

ROS, sıklıkla fizyolojik ve patolojik durumlarda mitokondri tarafından yapılır. ROS yapımı enzimatik ve non enzimatik reaksiyonlar sonucu olabilir. Enzimatik olanlar solunum zincirinde, prostaglandin sentezinde, fagositozda ve CYP 450 sisteminde bulunan enzimatik reaksiyonlar sonucu ortaya çıkar (Halliwell 2007).

Non enzimatik olarak oksijen organik ürünlerle reaksiyona girdiğinde veya hücreler iyonize radyasyona maruz kaldığında bazen de mitokondriyal solunum zincirinde de serbest radikal oluşur. Serbest radikaller endojen olduğu gibi ekzojen kaynaklı da olabilir. Ekzojen serbest radikal yapımı çevresel kirliliğe, ağır metallere (Cd, Hg, Pb, As,) çeşitli ilaçlara (siklosporin, gentamisin, bileomisin, sisplatin vs), kimyasal çözücülere, sigaraya, alkol ve radyasyona maruziyet sonrası oluşabilir. Bu ekzojen ürünlerle temas olduğunda bunlar organizmada yıkılırlar veya metabolize edilirler ve sonuç olarak serbest radikaller oluşur (Valko ve ark 2007).

Nitrik oksit, radikal nitrik oksit sentaz tarafından arjininin sitrülüne oksidasyonu sırasında sentezlenir. Nitrik oksit hücre içine her zaman geçebilen küçük bir moleküldür. Üzerindeki çiftlenmemiş elektron nedeniyle bir radikaldir.

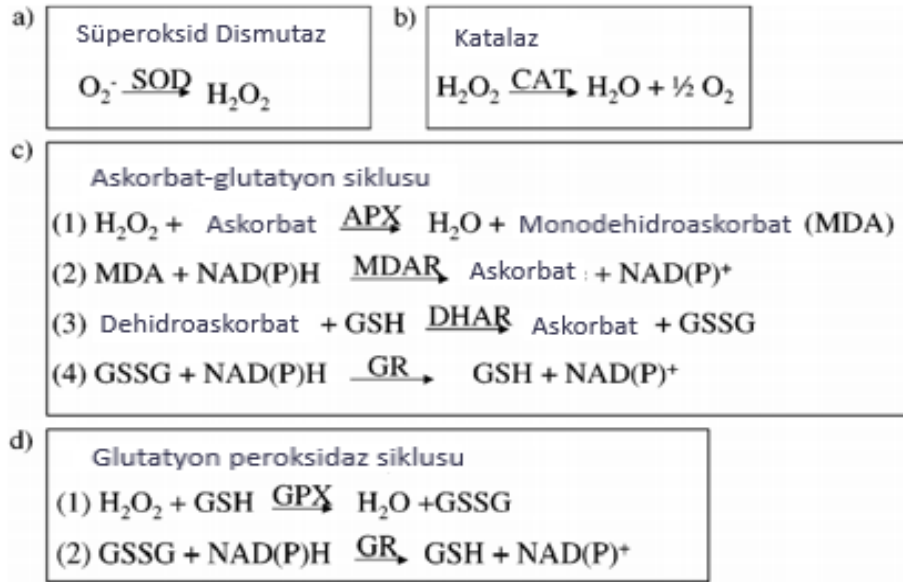


Nitrik oksit önemli bir oksidatif biyolojik sinyaldir. Nöral geçişte, kan basıncı düzenlemesinde, bağışıklık sisteminde, düz kas gevşemesinde rol oynar. Aşırı yapımı nitrozativ stres olarak tanımlanır. Proteinlerin yapısını değiştiren nitrozilasyon reaksiyonlarına neden olur (Pacher ve ark 2007).

Protein fosforilasyonu, çeşitli transkripsiyonel faktörlerin aktivasyonu, apoptoz, immünite, diferansiasyon gibi olaylar uygun ROS yapımı ve hücre içerisinde bunların düşük seviyede tutulmasına bağlıdır.

Serbest radikallerin ortamda artışı sonucu organizmada bazı koruyucu sistemler uyarılır. Antioksidanlar, oksijeni ortamdan uzaklaştırarak veya seviyesini düşürerek, katalitik metal iyonları ortamdan uzaklaştırarak etkili olabilirler veya serbest radikal hasarına yol açan reaksiyonların başlamasını engelleyebilirler, hasar onarıcı etki gösterebilirler. Bunlar içerisinde en etkin olanı glutatyon sistemidir. Antioksidanlar ekzojen ve endojen olabilir. Endojen olanlar enzimatik veya non enzimatik olarak ayrılabilir.

Enzimatik olanlar süperoksid dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz(GPX), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR) ve sitokrom oksidazdır (Şekil 2.2.2.). Non enzimatik olanlar ise albümin, seruloplazmin, transferrin, haptoglobulin, melatonin, glutatyon (GSH), bilirubin vs olabilir.



Şekil 2.2.2. Serbest oksijen türlerinin enzimatik yoldan temizlenmesi a) SOD, superoksid oksijeni hidrojen perokside çevirir. b) Katalaz hidrojen peroksidi suya dönüştürür. c) Hidrojen peroksit askorbat-glutatyon siklusunda askorbat peroksidaz tarafından su ve monodehidroaskorbata katalizlenir. Monodehidroaskorbat redüktaz bu ürünü NADPH varlığında askorbata dönüştürür. Dehidroaskorbat bu reaksiyonlar sırasında spontan yapılır ve GSH ile redüktaz enzimi tarafından askorbata dönüşür. GSH GSSG'ye oksidize olur. Glutatyon redüktaz ile GSSG yeniden GSH'a katalize olur. d) Hidrojen peroksit glutatyon peroksidaz siklusunda GSH oksidize olarak hidrojen peroksit suya dönüşür ortaya çıkan GSSG glutatyon redüktaz ile yeniden GSH verir (Apel ve Hirt 2004)'den

GSH'nun oksidize formu glutatyon disülfiddir (GSSG). GSH sitozolde, nükleusta ve mitokondride çok miktarda bulunur. Bu hücre kompartmanlarında majör çözümler antioksidandır. GSH sitozolde glutamat, sistein ligaz ve glutatyon sentetaz etkileri ile sentezlenir. Mitokondriyal varlığı iç zar transportu gerektirir. İki mitokondriyal elektriksel nötral antiport taşıyıcı protein GSH transportu için gösterilmiştir: Dikarboksilat taşıyıcı protein ve iki oksogluterat taşıyıcı protein (Shen ve ark 2005).

Nükleustaki GSH, DNA tamiri ve ekspresyonu için gerekli olan sülfidril proteinlerinin redoks durumunu idame ettirir. Oksidize GSH hücre içerisinde birikir. GSH/GSSG oranı oksidatif stresin iyi bir belirteçidir.

GSH, oksidatif strese karşı çeşitli detoksifiye edici enzimlerin kofaktörü olarak (GPX, glutatyon transferaz gibi) etkili olabilir. Plazma zarı yoluyla amino asit transportuna katılır, hidroksil radikalleri ve tekil oksijeni direkt olarak GPX'ın katalitik etkisi ile lipid peroksitleri ve hidrojen peroksidi detoksifiye ederek temizler. GSH, çoğu antioksidanları rejenere etme yeteneğine sahiptir (Masella ve ark 2005).

Ekzojen olanlar askorbik asit (C vitamini), alfa tokoferol (E vitamini), karotenoidler ve flavanoidlerdir. Normal koşullarda bu antioksidanların hem aktiviteleri hem intrasellüler seviyeleri arasında bir denge vardır.

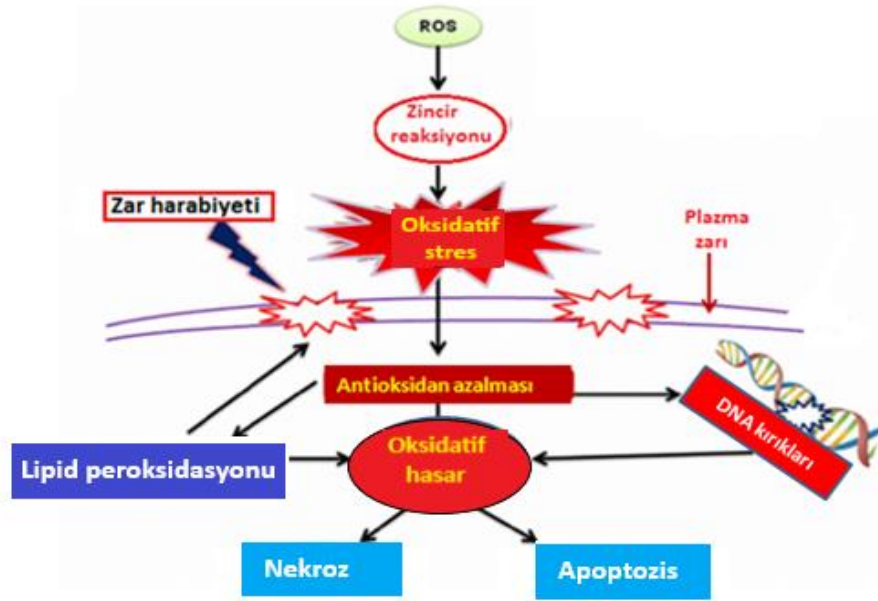
Serbest radikallerin artması yani oksidan-antioksidan dengesinin bozulması oksidatif stresi ortaya çıkaracaktır. Serbest radikallerin düşük, orta konsantrasyonlarda bazı yararlı etkileri vardır. Örneğin bazı hücresel yapıları sentezlemek ve patojenlerle savaşmak için konak defans sistemleri tarafından kullanılmak için gereklidirler. Fagositler serbest radikalleri sentezler ve depo ederler. Bir patojen ile karşılaştıklarında onu ortadan kaldırmak için açığa çıkarırlar (Droge 2002). Serbest radikaller hücresel sinyal yollarının bazılarında da rol alırlar (Pacher ve ark 2007). Fibroblast, endotel, vasküler düz kas hücresi gibi çeşitli hücrelerde NO'nin sinyal molekülü olarak etki ettiği bilinmektedir. Nitrik oksit nonspesifik konakçı defansında da rol oynar. Serbest radikallerin fizyolojik aktivitelerinden biri de mitojenik cevaptır (Pacher ve ark 2007).

Serbest radikallerin organizmadaki zararlı etkileri:

Oksidatif stres çeşitli hücrel yapıları kötü yönde etkileyebilir (Finosh ve Jayabalan 2013). Bu yapılar zarlar, lipidler, proteinler, lipoproteinler ve DNA olabilir (Şekil 2.2.3.). Aşırı hidroksil radikali ve peroksinitrit yapımı lipid peroksidasyonuna neden olarak hücre zarlarını ve lipoproteinleri bozar. Peroksidasyonun son ürünü malondialdehittir. Malondialdehit hücrelerde mutajenik olarak etkilidir

DNA, oksidatif stres ile ilişkili lezyonlara yatkındır. 8 okso 2 deoksi guanozin yapımı ortaya çıkar. Mutagenizisten ve diğer DNA lezyonlarından sorumludur (Nishida ve ark 2013).

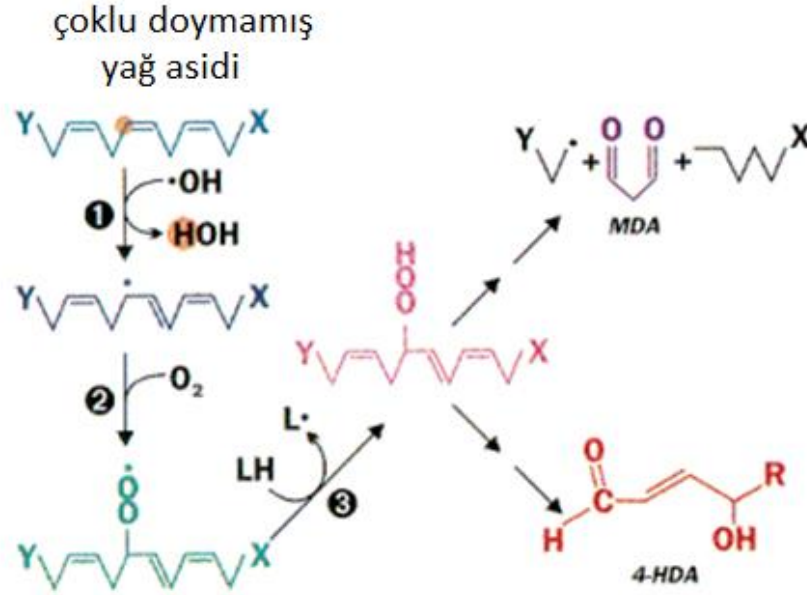
Ortaya çıkan DNA lezyonlarına cevap olarak antioksidanların yanı sıra baz ekzasyon tamir sistemi gibi çeşitli mekanizmalar tamirde kullanılabilir.



Şekil 2.2.3. Oksidatif stresin hücre üzerindeki etkileri (Finosh ve Jayabalan 2013)'den

Serbest oksijen radikalleri çoklu doymamış yağ asitlerinde oksidasyon yaparak lipid peroksidasyonunu başlatırlar. Bunun için yağ asidinin bir hidrojen atomunu metilen gruptan koparırlar. Böylece karbon üzerinde eşleşmemiş bir elektron kalır. Yağ asidinde bulunan çift bağ bitişindeki hidrojenini kaybetmiş karbondan dolayı koparılması kolaylaşır. Hidrojen kaybeden yağ asidi yapısal olarak

yeniden düzenlenir ve konjuge dien yapısı ortaya çıkar. Bu yapı oksijenle birleşerek lipid peroksil radikallerine dönüşür (Şekil 2.2.4). Bu radikaller diğer yağ asitlerinden hidrojen kopartmaya devam ederek zincirleme bir reaksiyon oluştururlar (Girotti 1998). Lipid peroksidasyon reaksiyonları sonucunda malondialdehit, 4-hidroksinonenal ve aldehitler ortaya çıkar. Bu ortaya çıkan peroksit ürünleri tiyobarbitürik asit ürünleri (TBARS) olarak adlandırılır. TBARS, dokuda ve vücut sıvılarında spektrofotometrik ve fluometrik olarak ölçülerek oksidatif stresin bir belirteci olarak kullanılabilir (Pryor 1989). Ortamda yeterli antioksidan olmadığında peroksil radikaller birbiriyle çapraz kovalan bağlar yaparak doku harabiyetine neden olurlar.



Şekil 2.2.4. Doymamış yağların peroksidasyonu (Girotti 1998)'den

Oksidatif stres hücre içi proteinlerini geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olarak hasara uğratabilir. Protein yapılar oksidize olduklarında üzerlerinde karbonil grupları oluşur. Bunun yanı sıra lipid peroksidasyonu sonucu oluşan aldehitler ve proteinlerin lizin rezidülerinin oksidasyon ürünleri sonucunda da proteinler üzerinde karbonil gruplar ortaya çıkabilir (Dalle-Donne ve ark 2003). Proteinler üzerindeki oksidatif modifikasyonlar yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açar. Protein

karbonil deriveleri oksidatif stresi değerlendirmede kullanılabilir. Bu deriveler daha stabil yapılar olduğundan lipid peroksidasyon ürünlerine göre daha kullanışlıdır.

Oksidatif stresin DNA üzerindeki yaptığı etki birçok hastalığa neden olabilir. Bunların başında kanser gelir. Hidroksil radikalleri, DNA bazlarındaki çift bağlara hidrojen atomu ekleyerek veya iki deoksiribozun C-H bağlarından ve timin yapısındaki metil gruplarından hidrojen atomu çıkararak reaksiyona girer. Timin peroksil radikalleri indirgenir ve hidroksihidroperoksit, timin glikol, 5-hidroksimetilurasil, 5-formilurasil ve 5-hidroksi 5-metilhidantoin gibi oksidasyon ürünleri ortaya çıkar. Baz mutasyonları içerisinde en dikkati çeken 8-hidroksi-2-deoksiguanozindir. Hidroksil radikaller guaninin 8. pozisyonunda değişim yaratarak oksidasyona yol açarlar. Bu ürün DNA hasarını belirlemede kullanılır (Helbock ve ark 1999)

Oksidatif stresin klinikte gösterilmesi:

Oksidatif stresi göstermek için çeşitli metodlar kullanılabilir. Powers ve ark oksidatif stresi gösteren testleri dört ana grupta toplamıştır (Powers ve Jackson 2008).

1. Serbest radikaller olarak oksidanları tanımlamak bir yöntem olabilir. ROS ve serbest radikaller oldukça reaktif ve kısa yarı ömürleri olduğundan direkt olarak ölçmek zor olabilir. Ekzojen moleküller kullanıldıktan sonra (floresan prob gibi) oksidanları stabilize edip ölçmek mümkün olabilir.

2. Dokularda antioksidan seviyelerini ölçmek mümkündür. Antioksidan seviyesi doku tiplerine göre farklılık gösterebilir. Bu nedenle bazı yanılmalara neden olabilir. Beslenme durumu ölçümleri etkileyebilir. Tüm bunlara rağmen antioksidan seviyelerini ölçmek oksidatif stresi göstermede kullanışlı bir belirteçtir.

3. Oksidasyon ürünlerini ölçmek en sık kullanılan yöntemdir. Protein oksidasyon belirteci olan protein karbonil, lipid peroksidasyon belirteci olan malondialdehit, DNA oksidasyon belirteci olan 8-okso-2-deoksiguanozin ölçümü oksidatif stresi göstermede önemli yöntemler arasındadır.

4. Redoks dengesini ölçmek kullanışlı diğer bir yöntemdir. En sık kullanılan redoks belirteci redükte glutatyonun oksidize glutatyona oranıdır (GSH/GSSG). Bu

dört yöntemin avantajları ve kısıtlamaları olduğundan oksidatif stresi göstermek için birden fazla yöntemin kullanılması uygundur.

2.2.2.2 Apoptotik Olaylar

Nöronal apoptotik hücre ölümü bazı ilaçların direkt etkisi sonucu veya oksidatif stres sonucu ortaya çıkar. Bu yolakta, kaspazlar ve kaspazlardan bağımsız yollar etkilidir (Qi ve ark 2019)

2.2.2.3 Eksitotoksisite

Bu, salgılanan aminoasitlerin toksik etkilerine bağlı hücre ölümüdür. Beyin dokusunda N-metil-D aspartat (NMDA) ve glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonuna sekonder hücre içine fazla Ca^{++} girişi sonucu oluşur (Yamamoto ve Bankson 2005). Hücre içi Ca^{++} artışı, çeşitli Ca^{++} 'a bağlı enzimlerin aktivasyonuna bu da protein, fosfolipid ve nükleik asitlerin yıkımına neden olur.

2.2.2.4 Diğer Biyokimyasal Mekanizmalar

Mikrogliaların aktivasyonu, proinflamatuvar mediyatörlerin açığa çıkmasına bu da nöronal harabiyete neden olabilir (Costa 2017).

Biyokimyasal reaksiyonlar ısı değişikliklerine hassastır. Hipertermi, dopamin ve tirozin hidroksilazı azaltarak etkili olabilir. İlaçlar sinaptik serotonin seviyelerinde ve serotonin taşıyıcılarında değişiklik yaparak etkili olabilirler. Artan serotonin seviyesi kan beyin bariyerini bozabilir ve hipertermiye neden olabilir. Bu da ilaç nörotoksisitesini artıracaktır (Capella ve ark 2009).

2.2.3. Deney Hayvanı Modelinde Nöropatiyi Değerlendirmek için Kullanılan Testler

Deney hayvanlarında genel görünüm, etrafa uyum, yeme alışkanlıklarında değişiklikler, yürüme, davranış değişiklikleri takip edilmelidir. Nörolojik bozuklukları göstermek için bazı davranış testleri, duyu testleri, motor koordinasyon ve denge testleri gibi birçok farklı test kullanılabilir.

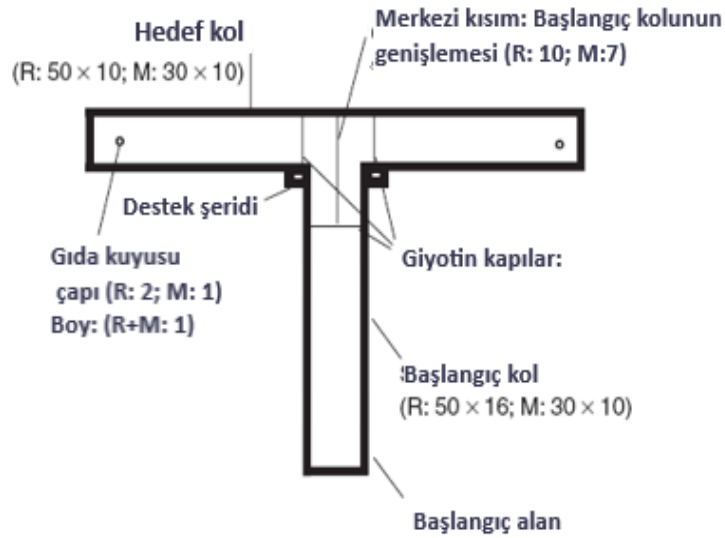
Kognitif fonksiyonun ve anksiyetenin değerlendirilmesi

T-maze testi

Bu testte hayvanların bilinç ve hafıza gibi merkezi sinir sistemi fonksiyonları değerlendirilir. Deney hayvanı T şeklinde bir labirente yerleştirilir ve labirentin bir ucuna bir ödül konulur (Şekil 2.2.7.). Hayvanın bu ödülü ne kadar sürede bulabildiği gözlenir. Test ödüksüz olarak spontan alternasyon *T-maze* şeklinde de yapılabilir.

Bu test hipokampus bozuklukları için önemlidir. Testte öncelikle bir alıştırma aşaması vardır. Bu aşamada hayvan ortama alışır ve ortam ile ilgili çeşitli bilgileri hafızasına yerleştirir. Daha sonra test başlar. Hayvan ortama alıştığı için ortamdaki ipuçlarını kullanarak ödülü bulmaya çalışır (Deacon ve Pawlins 2006).

T-maze'in genişliği hayvanın spontan dönüşleri için uygun olmalıdır. Eğer ödüllü dönüşleri tespit etmek istiyorsak genişlik 10 cm ve üstü olmalıdır (Şekil 2.2.7.).



Şekil 2.2.5. *T-maze* apparatus planı. Boyutlar cm olarak gösterilmiştir. R: sıçan M: fare. Kapalı mazeler için duvarlar 20 cm (fare), 30cm (sıçan) yüksekliğinde olmalı, Yükseltilmiş mazeler için, 1 cm (fare), 3 cm (sıçan) (Deacon ve Pawlins 2006)'den

T-maze çalışmaları ödüllü (besin, koku) veya cezalı (elektriksel uyarı) ya da spontan değişiklik şeklinde yapılabilir. Besin ve ceza durumlarında hayvanların önceden teste alıştırılması gerekir. Bunun için hayvanlar kafeslerinden alınır ve bu

sırada dokunmaya alıştırılır. Bu işlem gerektiğinde 5 er dakikalık aralıklarla yapılabilir.

Hayvanların verilen yiyeceğe alışmaları için kafeslerine ilgili yiyecek konulur. Böylece hayvanlar bu yiyeceğin kokusunu benimserler ve ona karşı bir tepki göstermezler. Daha sonra hayvanlar tartılır ve ağırlıklarına uygun olarak ilgili besinler verilir. Burada ölçüt olarak vücut ağırlığının %85 ve üstü olabilir (Hussein ve ark 2018).

İşleme geçilmeden önce test kriterleri belirlenmelidir. Çoğu testte testin (+) sayılması için hayvanın dört ayağının da aynı yerde olması kabul edilir. Son zamanlarda kuyruk yönünün daha önemli olduğu görülmüştür. Çünkü fareler eğer yanlış hedefe yönelirlerse kendilerini düzeltmeye çalışırlar. Aynı şekilde doğru hedefe yönediklerinde ise o hedeften uzağa hareket ederler.

Ödüllü teste başlamadan önce hayvanlar *T-maze* testine alıştırılmalıdır. Bunun için *T-maze* testindeki kapılar kaldırılır, yiyecekler yerleştirilir ve hayvanlar 3 dakika boyunca bu ortama alıştırılmaya çalışılır. Bu alışma süreci 10 ar dakikalık aralıklarla dört defa uygulanır. Daha sonra teste geçilir. Labirentin bir koluna ödül konulur ve farenin bu kola ne kadar sürede ulaşacağı kaydedilir. Her seferinde ödülün yeri değiştirilir. Böylece hayvan her seferinde farklı bir yere yönelir (Deacon ve Pawlins 2006)

Spontan değişiklik testlerinde ise herhangi bir alıştırma sürecine gerek duyulmaz. Testte hayvanlar istedikleri şekilde hareket ederler. Herhangi bir ödül olmadığından hayvanlar belirli bir şeyle kısıtlanmamıştır. Fakat özellikle hipokampus hasarı olan hayvanlar her seferinde aynı yere giderler. Bu testte öncelikle labirent hazırlanır. Daha sonra fare başlangıç bölgesine konulur ve bir hedefe ulaşmasına izin verilir. Daha sonra fare bu noktada hapsedilir. Otuz saniye sonra santral bölme kaldırılır ve hayvan hapsedildiği yerden alınır. Daha sonra hayvan yeniden başlangıç bölgesine yerleştirilir. Hayvan iki hedeften birini seçer ve bu hedefin neresi olduğu ve bu alana ne kadar sürede ulaştığı kaydedilir. Her bir deneme iki dakikadan uzun sürmemeli; en az 1 dakika olmalıdır (Golli ve ark 2016).

Prosedürün başarılı olabilmesi için bazı sorunların çözülmesi gerekir. Hayvanlar test ortamına alıştırılmalıdır. Bazen hayvan test için isteksiz olabilir. Bu durumda hayvanı motive etmek için çeşitli ödülleri verilebilir. Bu tip ödülleri test standartlarını değiştirmemesi için hem kontrol gruba hem de test edilecek gruba verilmesi gerekir. Spontan değişiklik testi için her deneme aşamasından sonra zemin kokusu değiştirilmelidir. Bu sayede hayvanlarının motivasyonları bozulmamış olur. Bazı araştırmacılar her deneyden sonra yeni bir kağıt parçası kullanarak test ortamını hayvanlar için ideal hale getirirler (Deacon ve Pawlins 2006).

Motor koordinasyon ve dengenin değerlendirilmesi

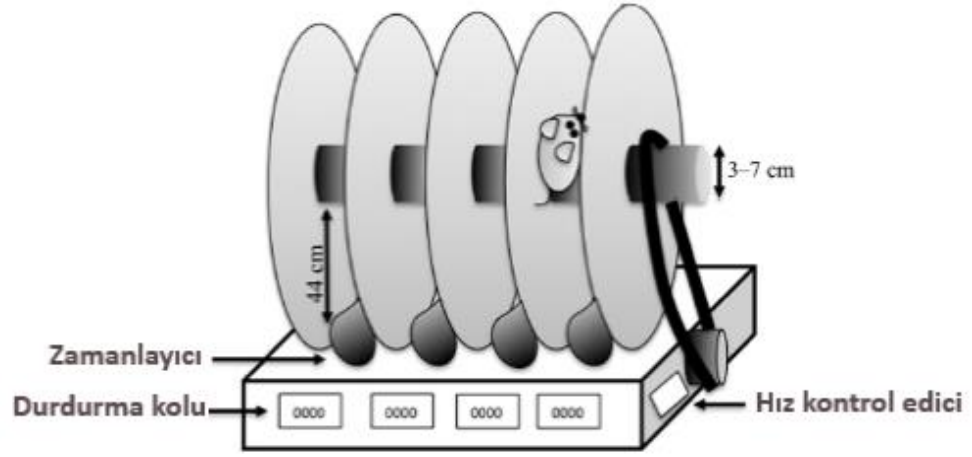
Bu amaçla yürüme analizi, tırmanma testi, yüzme testi, rotarod testi gibi testler kullanılabilir (Brooks ve Dunnett 2009).

Rotarod Testi

Rotarod testi, motor koordinasyon ve dengeyi değerlendirmek için en çok kullanılan testlerden birisidir (Le Doux 2014). Bu testte fareler dönen bir çubuğa oturtulur ve ne kadar zamanda dengesini kaybedip düşeceği kaydedilir. Bu çubuk ya sabit bir hızda ya da giderek artan hızlarda dönmektedir. Farelerin ne kadar zamanda düşeceği onların motor koordinasyon ve dengesini etkileyen birçok faktöre bağlıdır. Özellikle serebellar ve spinal fonksiyon bozukluğu olan fareler bu testte başarısız olurlar. Bu test birçok hayvan modelinde sensorimotor kayıpları çok iyi bir şekilde gösterebilir. (Le Doux 2014)

Rotarod aygıtı başlıca řu kısımlardan oluşur (şekil 2.2.5):

- 1- Hız kontrolü sağlayan otomotik aparat
- 2- Farelerin ne zaman düştüğünü kaydeden bir zamanlayıcı
- 3- Cihazın ana gövdesi



Şekil 2.2.6. *Rotarod* aparatı (Le Doux 2014)'den.

Rotarod testinde başlangıçta farelerin çubuğa alışması için düşük hızlarda bir alıştırma aşaması olur. Bu aşamada hız 5 rpm olarak ayarlanır. Düşen fareler her seferinde çubuğa tekrar yerleştirilir. Böylece iki dakika boyunca farelerin çubuğa alışmaları sağlanır.

Alıştırma aşamasından sonra test aşamasına geçilir. Test aşamasında hızın giderek artırılması şeklinde bir yöntem uygulanabilir. Genellikle 5 rpm den başlanıp hız her saniye 0.2 rpm arttırılır ve bu sırada farelerin ne kadar zamanda düşecekleri kaydedilir. Bu şekilde toplamda 3 ya da 5 kez test yapıldıktan sonra fareler tekrar yerlerine konulur (Monville ve ark 2007).

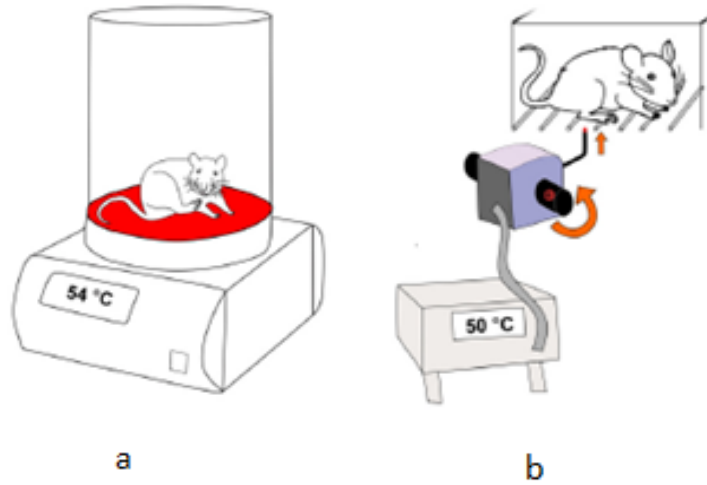
Sabit hızlı testlerde ise fareler orta düzeydeki hızla dönen çubuğa yerleştirilir. Genellikle bu hız 25 rpm'dir. Test sırasında üç ya da beş deneme yapılır. Fareler her deneme sonrası 5-10 dakika dinlenmeye alınır. Bazı fareler düşmemek için çubuğa tutunurlar. Bu durumda üç deneme sonrası düşme gecikmeleri skorlanabilir. Bazı uzun süreli çalışmalarda fareler düşmeye alışabilir. Bu durumda farelerin düşmemesi için aşağıdan şok verilir. Aynı zamanda çubukta ne kadar süre koşabildikleri, düşme sırasındaki rotarod hızı ve ne kadar mesafe gittikleri de hesaplanabilir (Ferrante ve ark 2002).

Duyu kaybının değerlendirilmesi

Sıklıkla deney hayvanlarında ağrı duyusu kullanılır. Mekanik uyarıya, ısıya (sıcak veya soğuk) hayvanın cevabı değerlendirilir. Bu amaçla kuyruk sıkıştırma testi, *hot plate* testi ve *pinprick* testi gibi testler uygulanabilir (Gunn ve ark 2011).

Hot plate testi

Bu test kuyruk çekme testlerinden farklı olarak supraspinal yollardaki bozuklukları gösterebilmek için de uygulanır. Testte hayvanın arka bacağına ısı uyarısı verilir ve hayvanın bu uyarıya ne kadar sürede tepki verdiği değerlendirilir. Sıcaklık için 50-55°C lik bir metal yüzey kullanılır. Hayvanın tepkileri bacaklarını çekme ya da yalanma şeklinde olabilir (Şekil 2.2.6.). Eğer herhangi bir cevap alınamazsa belirli bir süre sonra fareler uyarandan uzaklaştırılır. Çünkü aşırı sıcaklık tüm dokulara zarar verebilir (Deuis ve ark 2017).



Şekil 2.2.7. *Hot plate* testi uygulaması a) Sabit sıcaklık b) Giderek artırılan sıcaklık (Deuis ve ark 2017)'den

Test dinamik hot plate testi olarak da yapılabilir. Bu durumda fareler sıcaklığı giderek artan bir düzleme yerleştirilirler. Ağrıya yol açmayan sıcaklıkta uyarı verilir. Daha sonra uyarı şiddeti her seferinde belirli oranda arttırılır. Uyarıya cevabın verildiği sıcaklık kaydedilir. Bu cevaplar birçok faktörden etkilenir. Sıcaklığın ne hızla arttırıldığı önemlidir. Sıcaklık eğer birdenbire çok hızlı artarsa çok daha fazla cevap oluşturabilir. Uyarıya ne kadar sürede cevap verildiği önemlidir. Çok uzun süre

verilen uyarı ciddi doku hasarlarına neden olabilmektedir. Bazen hayvana verilen çeşitli ilaçlar onların davranışlarını etkileyebilir. Örneğin birçok analjezik madde uyarıya karşı verilen cevabı azaltmaktadır. Bu durumda elde edilen verinin güvenilir olması için küçük bir cevap bile önemsemeli ve test daha düşük sıcaklıklarda uygulanmalıdır. Aynı zamanda verilen cevap hangi sinir lifinin etkilenip etkilenmediğine de bağlıdır. Yüksek sıcaklıklar ve hızlı yükselen sıcaklık değişiklikleri Aδ lifleriyle alınırken düşük sıcaklıklar ve yavaş yükselen sıcaklık değişiklikleri C lifleriyle alınmaktadır (Deuis ve ark 2017).

Başka bir faktör de hayvanın bu uyarıya alışması ve uyarı verilmeden önce hemen bu uyarıya cevap vermesidir. Buna öğrenilmiş cevap da denilir. Bazen elde edilen veriyi daha iyi anlayabilmek için ısı uyarısı sadece belirli bir alana verilebilir. Bununla birlikte bu iyi bir deneyim ister ve hayvana çok fazla stres verebilir (Gunn ve ark 2011).

2.2.4 Kemoterapötiklerin Yaptığı Nörotoksisite

Kanser halen dünyada önemli bir sağlık sorunu olarak yerini korumaktadır. Son yıllarda kanser tedavisinde gösterilen ilerlemeler ve erken tanı yöntemleri kanserde mortalite olasılığını giderek azaltmaktadır. Tedavi ile ilerlemesi duran veya tam iyileşme sağlayan hastalarda kullanılan antineoplastik ilaçlara bağlı tedavi sürecinde ve tedavi sonrasında ciddi yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Bu yan etkilerin en önemlilerinden biri nöropatidir. Nöropati hastaların yaşam kalitesini azaltmakta çoğu kez geri dönüşsüz olmakta ya da tedaviden sonra da uzun yıllar devam etmektedir. Sinir sisteminde toksik etki gösteren antineoplastik ilaçlar büyük ve küçük sinir liflerini, duyu ve/veya motor nöronları, miyelinsiz sinirleri, aksonları, kranial sinirleri, otonomik sinirleri tutabilir (Cioroiu ve Weimer 2017). Antineoplastik ilaçlarda en çok etkilenen sinir sistemi bölümü periferik sinir sistemidir.

Antineoplastik ilaçların sinir sistemi üzerindeki etkileri ilacın fiziksel ve kimyasal özelliklerine ve kullanılan doza bağlıdır. Bunların yaptıkları periferik nöropati %19-85 arasında değişir. En yüksek risk, platin bazlı ilaçlar ve taksanlarla rapor edilmiştir (Fallon 2013, Seretny ve ark 2014). Bazı antineoplastikler

kullanıldıktan hemen sonra akut nöropati yapabilirler (Argyriou ve ark 2013). Bazı durumlarda ise nöropati semptomları tedavi tamamlandıktan haftalar, aylar sonra ortaya çıkabilir ya da tedavinin kesilmesinden sonra semptomların şiddeti artabilir. (Starobova ve Vetter 2017).

Nöropati yapan başlıca kemoterapötikler

1-Platin türevleri (sisplatin, karboplatin, oksaplatin)

2-İmmünmodülatör ilaçlar (talidomid)

3-Taksanlar (paklitaksel, doketaksel)

4-Epotilonlar (iksabepilon)

5-Vinka alkaloidleri (vinkristin, vinblastin, vinorelbin, vindesin)

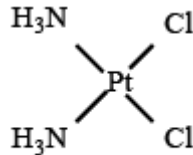
6-Proteaz inhibitörleri(bortezomib ve karfilzomib)

Bu kemoterapötikler farklı mekanizmalarla nörotoksisiteye neden olurlar (Boyette-Davis ve ark 2018).

2.3 Sisplatin

2.3.1 Kimyası ve Farmakokinetiği

Sisplatin ağır bir metal olan platin içeren güçlü bir antineoplastik ajandır. Sisplatin kimyasal olarak ilk kez 1844'de sentezlenen bir platin türevidir. Cis-diaminedichloroplatinium olarak bilinir. Merkezinde bir platinium atomu çevresinde iki klor atomu ile iki amonyak grubu içeren planar quadrilateral üründür (Şekil 2.3.1). Kemoterapötik olarak ilk dikkati çekmesi 1962 yılında Rosenberg'in yaptığı çalışmalarla olmuştur. Platinium elektrotlarının elektrolit ürününün E coli'nin üremesini inhibe ettiği dikkati çekmiştir (Rosenberg ve ark 1965). Preklinik ve klinik çalışmalardan sonra 1978'de sisplatin adıyla kemoterapötik ajan olarak FDA tarafından onaylanmıştır.



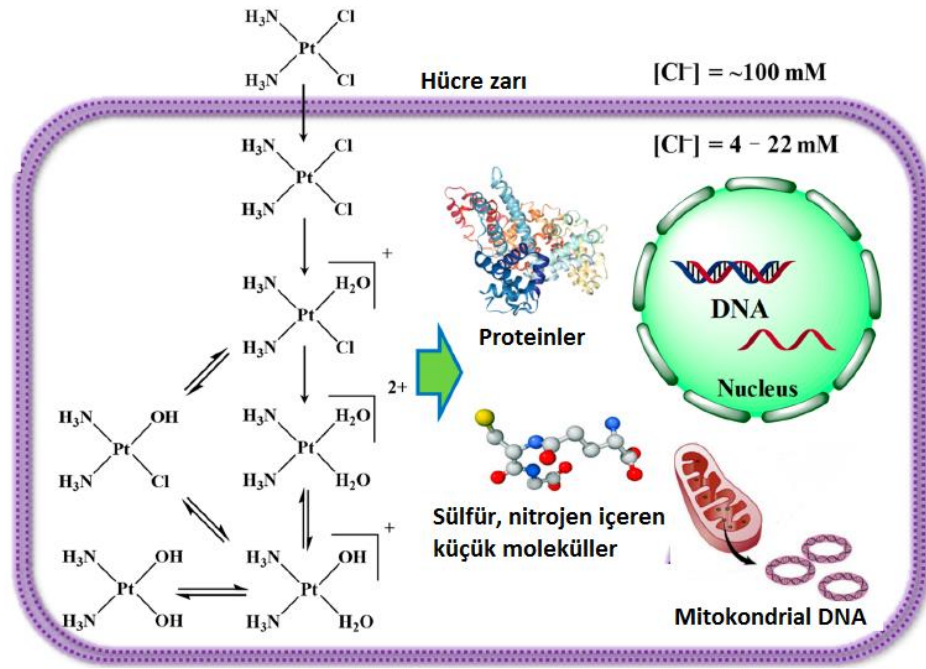
Şekil 2.3.1 Sisplatinin kimyasal yapısı (Dasari ve Tchounwou 2014)'den

Sisplatinin merkezindeki platin çeşitli biyomoleküllerle etkileşebilir. Platin yumuşak bir asittir. Sisplatin hidrolize ürünleri yumuşak bazlarla stabil bir bağ yapma eğilimindedir. Bazı bazlarla, DNA ve RNA'daki nükleobazlarla, protein ve peptidlerdeki histidin rezidüleri ile reaksiyona girebilir (Jung ve Lippard 2007).

Doğrudan damar içi enjeksiyondan hemen sonra, sisplatin oldukça hızlı bir şekilde tüm dokulara dağılım gösterir. Böbrek, karaciğer ve prostat gibi yapılarda yüksek konsantrasyonlarda bulunurken, mesane, testis, pankreas ve dalakta daha düşük, kalp, akciğer, bağırsak ve serebrum/serebellumda en düşük konsantrasyonlarda bulunur. Gastro-intestinal sistemden emilemediğinden, yalnızca intravenöz yolla uygulanmaktadır. Tedaviyi takiben yaklaşık 4 ay süre ile böbrek dokusunda platin tespit edilebilmektedir. Eliminasyon süresi altmış saat kadardır. Kullanımından iki saat sonra plazma sisplatinin % 90'dan fazlası geri dönüşümsüz olarak proteinlere bağlanır. Enzimatik olmayan bir şekilde metabolitlerine dönüşür. İnsanlarda bildirilen yarılanma ömürleri; $t_{1/2}$ (dağılım) 10-60 dakika ve $t_{1/2}$ (terminal) yaklaşık 2-5 gündür. Proteinlere fazla bağlanması nedeniyle uygulanan toplam dozun %27-45'inin 84-120 saatten fazla bir sürede üriner atılım ile sonuçlanır. Fekal atılımı çok azdır. Plazma yarı ömrü, azalmış böbrek fonksiyonu ile artar (Urien ve Lokiec 2004).

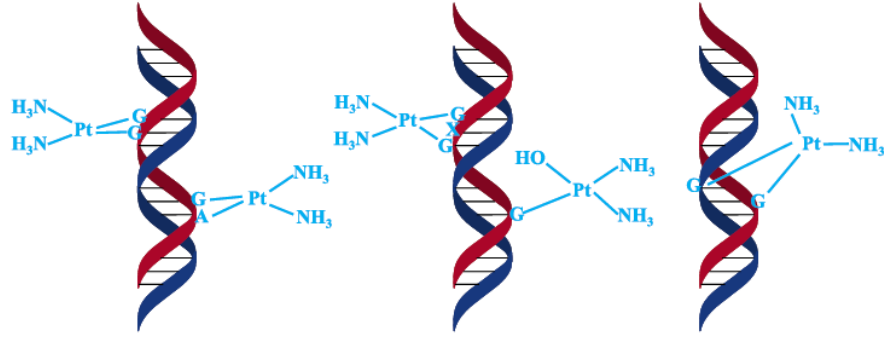
2.3.2 Etki Mekanizması

Sisplatin hücreye pasif transportla girebileceği kabul edilmekle beraber son yıllarda bakır transport protein (CTR1) ve organik katyon taşıyıcılar (OCT)'ların sisplatinin hücre içine girişinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Hu ve ark 2017, Pabla ve ark 2009). Sisplatin hücre dışında kandaki yüksek Cl^- iyonları nedeniyle hidrolize yatkın değildir. Hücre içerisine girdiğinde katyonik monoaqua ve diaqua kompleksleri yapmak için hidrolize olur (Şekil 2.3.2.). İki klor atomu iki su molekülü ile yer değiştirir. Bu bileşikler sisplatinin yüksek reaktif hidrolitik ürünleri olarak hedef organellerde çok daha etkili olurlar (Qi ve ark 2019).



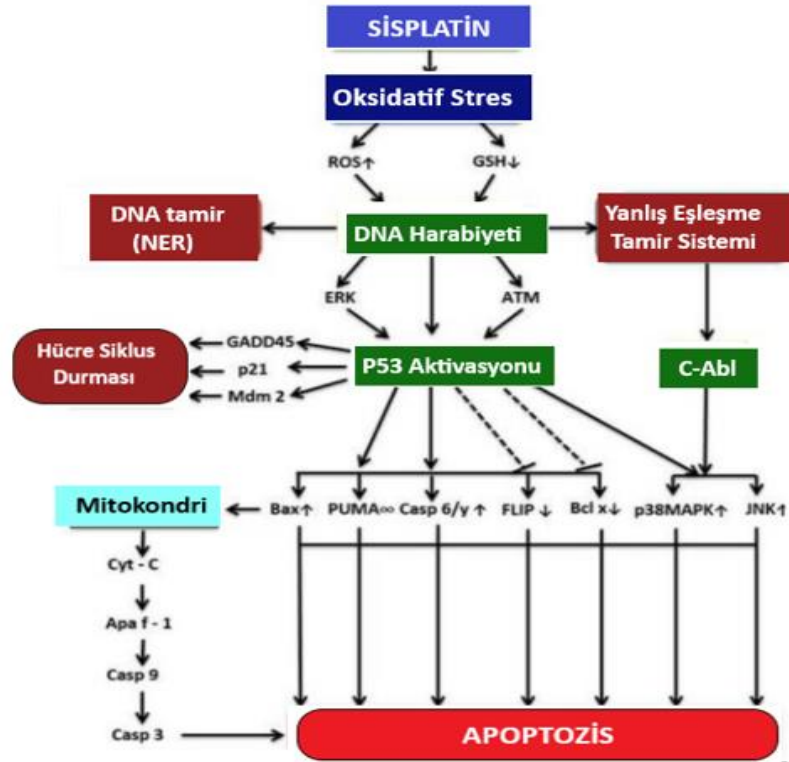
Şekil 2.3.2. Sisplatinin hücre içinde hidrolizi ve hedefleri (Qi ve ark 2019)'den

Sisplatinin etki mekanizması alkilleyici ilaçlarınkine benzerdir. Sadece *sis* izomeri sitotoksiktir. Döneme özgü olmayan bir ilaçtır, hücreleri her dönemde etkileyebilir. Sisplatinin kemoterapötik etkisinde esas hedef DNA olarak bilinir. DNA üzerinden etkili olarak tümör hücre proliferasyonunu bozar. Sisplatin ve özellikle hidrolize ürünleri, DNA'daki pürin halkalarının 7. pozisyonundaki nitrojen ile reaksiyona girerek DNA'nın iki pürin bazını çapraz bağlar ve hücre bölünmesi ve mRNA'nın transkripsiyonunu bozar (Dasari ve Tchounwou 2014). Bu çapraz bağlar zincir içi veya zincirler arası olabilir. Zincir içi bağlanma çok daha belirgindir. Sıklıkla adenin ve guanin, guanin ve guanin şeklinde 1,2 zincir içi bileşikler ortaya çıkabilir. Daha seyrek olarak 1,3 formunda guanin guanin bağlanmaları ve zincirler arası guanin guanin bağlanmaları görülebilir (Şekil 2.3.3.) (Jamieson ve Lippard 1999). Sisplatinin DNA'ya çapraz bağlanması yapıyı değiştirir. High Mobility Group Box 1 (HMG 1) protein normalde DNA'yı koruyan bir proteindir. Sisplatin DNA kompleksi bu protein tarafından tanımlanarak DNA- platin- HMG1 kompleksini yapar. Bu DNA replikasyonunun blokajı ve hücre siklusunun durmasıyla sonuçlanır (Jordan ve Carmo-Fonseca 2000).



Şekil 2.3.3. Sisplatinin DNA üzerinde çapraz bağlanma ile yaptığı kompleksler zincir içi 1,2-d(GpG), 1,2-d(ApG) ve zincirlerarası kompleks (G-G) ve monofonksiyonel kompleks (Qi ve ark 2019)'den

Sisplatinin bu genomik etkisi dışında nongenomik etkileri de kemoterapötik etkisinde söz konusudur. Mitokondriyal fonksiyonda değişiklikler sonucu reaktif oksijen türlerinin yapımını artırır, intrinsik ve ekstrinsik apoptozis yollarının her ikisini de aktive edebilir. Ayrıca Ca^{++} sinyal yolağında ve çeşitli protein kinazların (MAPK, JNK, PKC ve AKT) fonksiyonlarını etkileyerek hücre ölümüne neden olabilir. (Şekil 2.3.4.) (Dasari ve Tchounwou 2014).



Şekil 2.3.4. Sisplatin etki mekanizması (Dasari ve Tchounwou 2014)'dan

2.3.3 Klinik Kullanımı

Sisplatin solid tümörlerin tedavisinde sık kullanılan kemoterapötik bir ilaçtır. Tek başına veya diğer ilaçlarla kombinasyonda kullanılabilir. En sık kullanım alanlarından biri akciğer kanseri olmuştur (Pignon ve ark 2008).

Erken evre over kanserlerinde çok etkilidir (Hess ve ark 2007). Over karsinomu yanı sıra testis tümörlerinde ve metastatik üretelyal karsinomalarda yine kombinasyon tedavilerinde kullanılmaktadır (Pinto-Leite ve ark 2013).

Baş boyun kanserleri sisplatinin sık kullanıldığı kanserlerden birisidir. Radyasyon ve cerrahi ile birlikte diğer ilaçlarla kombine kullanılması önerilir (de Castro ve ark 2018).

Sisplatinin kullanıldığı kanserlerden bir diğeri meme kanseridir. Özellikle metastatik meme kanserli hastalarda yaşam süresini arttırdığı gösterilmiştir. Sisplatin ile birlikte kombine tedavi özellikle ileri evre meme kanserlerinde halen en etkin tedavi yöntemlerinden biri olarak kullanılmaktadır (Decatris ve ark 2004).

Primer beyin kanseri olan hastalarda ve metastatik beyin kanserlerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca testiküler kanserde, servikal kanserde, özefagus kanserinde, nöroblastomada, mezotelyomada ve lenfomalarda da kullanılmaktadır (Dasari ve Tchounwou 2014).

2.3.4 Sisplatin Toksisitesi

Sisplatin kanser hücrelerinde toksik etki gösterirken normal dokulardaki hücrelerde de sık yan etkilere neden olur. Yan etkilerinin kesin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Her bir yan etki için farklı mekanizmalar öne sürülmekle beraber başlıca mekanizmalar oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, DNA harabiyeti, hücre transport sistemindeki değişiklikler, inflamasyon, protein kinaz aktivasyonu, apoptozisin aktivasyonudur (Cepeda ve ark 2007).

En sık görülen yan etkisi nefrotoksisitedir. Klinik çalışmalarda yüksek serum kreatinin seviyesi, glomerüler filtrasyonun düşmesi, hipomagnezemi ve hipokalemi sık görülen bulgulardır (Kidera ve ark 2014). Sisplatin tedavisi alan hastaların yaklaşık 1/3 'ünde nefrotoksisite ortaya çıkabilir.

Bir diğerk yan etki ototoksisitedir. Sisplatin kullanımından sonraki erken evrelerde işitme kaybı ve tinnitus ortaya çıkabilir. Özellikle sık ve yüksek dozda sisplatin kullanan hastalarda işitme kaybı daha fazladır (Rademaker-Lakhai ve ark 2006).

Gastrointestinal toksisite bulantı, kusma, anoreksiya, kilo kaybı ve diyare şeklinde ortaya çıkar. Bu yan etki diğerk kemoterapötiklerde de sık görülen yan etkilerdir (Shahid ve ark 2018).

Hematolojik yan etkileri tromboz, lökopeni, nötropeni, trombositopeni ve anemi şeklinde ortaya çıkabilir. Bu sisplatinin kemik iliğı supresyonuna bağılyan etkileridir (Astolfi ve ark 2013).

Kardiyotoksisite klinikte seyrek görülür. Sisplatin dozu ile iyi bir korelasyon gösterir. Kardiyotoksisiteye bağılyan hastalarda elektrofizyolojik değışiklikler, aritmi, miyokardit, perikardit, kan basıncı değışiklikleri, miyokardiyal enfarktüs, kardiyomiyopati, kalp yetmezliğı, anjina rapor edilmiştir (Pai ve Nahata 2000).

Sisplatin karaciğerde sinüzoidleri harap edebilir. Hepatotoksik etkisi gösterilmiştir. Bunun yanı sıra hepatosit dejenerasyonu, inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ile giden özellikle portal alanda belirgin olan nekroz rapor edilmiştir (Karale ve Kamath 2017)

Diğerk yan etkileri görme bozukluğı, ışık hipersensivitesi, üreme sisteminde bozukluklar olabilir (Chovanec ve ark 2017).

2.3.5 Sisplatin ve Nörotoksisite

Sisplatin ile tedavi edilen hastaların yaklaşık %30'unda nörotoksisite gelişebilir. Sisplatinin az da olsa bakır taşıyıcı reseptör (CTR) yoluyla kan beyin bariyerini geçebildiğı ve tekrarlı dozlar sonrası beyin dokusunda fakat özellikle kan beyin bariyeri bulunmayan dorsal kök gangliyonu (DRG) nöronlarında birikerek etkili olduğı gösterilmiştir (Rzeski ve ark 2004). Sisplatine bağılyan nörotoksisite santral sinir sistemi ve periferik sinir sisteminde ortaya çıkabilir. Her iki durum da doza ve kullanım süresine bağılıdır (Brouwers ve ark 2009).

Sisplatinin yaptığı nöropati başlangıcı değışik olabilir. Bazı hastalarda semptomlar ilk dozdan sonra görülürken bir grupta uzamış tedavi siklusları sonrası

ortaya çıkabilmektedir. Sisplatinin yaptığı nöropati gelişimi sıklıkla 350 mg/m² kümülatif doza ulaşıldıktan sonra ortaya çıkmaktadır. 500-600 mg/m² sisplatin kümülatif dozunda hastaların %92'sinde nöropati gelişmiştir (Krarup-Hansen ve ark 2007). Nörotoksisite ilaç kesilmesinden sonra birkaç ay daha devam edebilir. Bazen de zamanla kötüleşebilir (coasting fenomen) (Starobova ve Vetter 2017). Sisplatin kümülatif dozu ne kadar yüksekse ve kullanım süresi ne kadar uzunsa kronik, geri dönüşümü olmayan nöropati oluşma olasılığı artmaktadır.

Bazı klinik ve genetik özellikler sisplatin tedavisi süresince nörotoksisite gelişimini kolaylaştırabilir. Hastanın yaşı, cinsiyeti, tümör tipi, birlikte kullanılan diğer kemoterapötikler ve özellikle glutatyon S transferaz genindeki polimorfizimli hastalarda risk artmaktadır (Cavaletti ve ark 2011).

Nörotoksisite yapan kemoterapötiklerin uzun süreli değerlendirildiği bir çalışmada, uzun yaşam süresi (ortalama 8.5 yıl) olan çocukların yaklaşık %50'sinde nöropatinin devam ettiği gösterilmiştir. Tedavi olarak sisplatin, vinka alkaloidlerinin ağırlıklı kullanıldığı bu grupta sisplatinin yaptığı uzun süreli nöropatinin diğer kemoterapötiklere göre daha sık olduğu saptanmıştır (Kandula ve ark 2018).

Sisplatinin yaptığı periferik nöropati klinik bulguları daha fazla dikkat çekici olması nedeniyle erken yıllarda tanımlanmıştır. Beyin fonksiyonu üzerindeki etkiler ise 1990 yılından beri bilinmektedir. En sık görülen bulgular hafıza, dikkat, öğrenme bozuklukları, iş yapamama, lokomotor aktivite bozuklukları şeklindedir. Diğer kemoterapötik ajanların da beyin fonksiyonu üzerinde benzer nörotoksik etkileri gösterilmiştir. Bu yan etki nöropati içerisinde "chemobrain" olarak sınıflandırılmıştır. Tüm kemoterapötikler içerisinde en yüksek "kemobeyin" etki gösterenler doksorubusin ve sisplatinidir (Ongnok ve ark 2020) .

Platin bazlı kemoterapi alan bazı küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalarda tedavi sonrası kontrollere göre belirgin kognitif fonksiyon bozuklukları rapor edilmiştir (Simo ve ark 2015). Simo ve ark.'nın çalışmasında tedavinin kesilmesinden 1 ay sonra bu hastalarda ilk kez T1 ağırlıklı volumetrik magnetik rezonans görüntülemeyi kullanarak beyin farklı bölgelerindeki volum farklılıklarını sağlıklı kişilerle karşılaştırmışlardır (Voxel bazlı morfometrik analiz).

İnsulada, parahipokampal girusta bilaterel olarak, sol anterior singular kortekste daha düşük gri cevher dansitesi göstermişlerdir. Sisplatinin beyinde yaptığı yapısal bozuklukların miyelin ana proteindeki liflerin dallanmasının kaybı, beyaz cevherde azalma şeklinde olabileceği rapor edilmiştir (Chiu ve ark 2017). Bu bulgular sisplatinin oligodendrositler üzerinde de toksik etkisinin olabileceğini doğrulamaktadır.

2.3.5.1.Nörotoksisite Oluş Mekanizmaları

Sisplatin, kan beyin bariyerini kısıtlı miktarda geçer. Buna rağmen intravenöz sisplatin kullanımının beyin tümörlerinde ve beyin metastazlarında etkili olduğu bilinmektedir. Kan beyin bariyerini geçişi bakır taşıyıcı protein (CTR 1) ile ilgilidir. CTR1 ekspresyonu kan beyin bariyerindeki endotel hücrelerinde ve nöronlarda vardır.

Nörotoksisite patogenezinde birçok farklı mekanizma öne sürülmüştür. Kesin mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Öne sürülen en önemli mekanizmalardan biri oksidatif strestir (Abdel-Wahab ve Moussa 2019, Cavaletti ve ark 1994, Chtourou ve ark 2015, Dasari ve Tchounwou 2014).

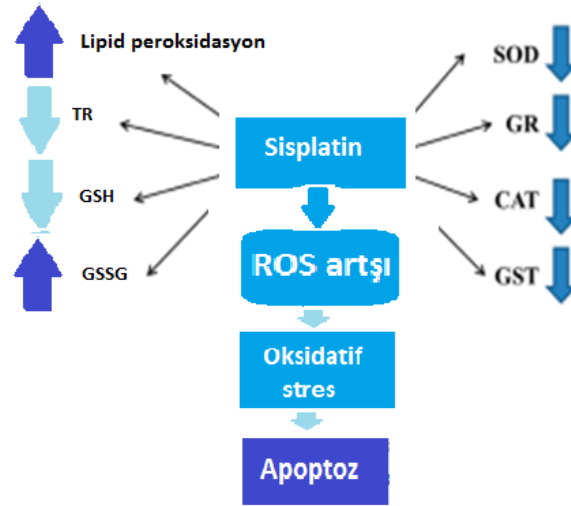
Oksidatif Stres:

Beyin, oksidatif strese diğer dokulara göre daha fazla duyarlıdır. Çünkü yüksek oranda oksijen kullanır ve serbest radikalleri engelleyecek iyi bir antioksidan sistemden yoksundur. Sisplatin oksidatif dengeyi bozarak serbest radikallerin birikimine neden olur. Bu radikaller hücreler için toksik etki göstermeleri yanı sıra kan beyin bariyer geçirgenliğini de bozarlar.

Sisplatin hücre içinde aqua sisplatine dönüşür ve (+) yük kazanır. Hücre içerisinde GSH'ın sisteini üzerindeki negatif yüklü sülfürle konjugasyona gider. Sisplatin-GSH konjugat kararsız yapılardır. Beta liyazlar aracılığı ile reaktif tiyollere dönüşür. Bunların yanı sıra sisplatin aracılı süperoksid anyon ve hidroksil radikallerinin arttığı buna karşılık antioksidan enzimlerin azaldığı da gösterilmiştir (Townsend ve Hanigan 2002). Bu mekanizma nefrotoksisite oluşumunda sıklıkla gösterilmiştir. Bunun önemli bir nedeni tubüler hücrelerin gamaglutamil transpeptidazdan zengin olmasıdır.

Oksidatif stresin önemli kaynaklarından biri mitokondrilerdir. Sağlıklı hücrelerde mitokondrilerde yapılan az miktardaki ROS antioksidan enzimler tarafından ortadan kaldırılır. Nöronlar mitokondriden zengin hücrelerdir. Dolayısıyla serbest radikallerden çok ciddi etkilenmektedirler. Aynı zamanda mitokondrideki zararların tamiri zordur ve buradaki bozukluklar enerji üretimini de bozacağından geri dönüşümü olmayan hasarlara neden olmaktadır. Sisplatin nörotoksitesinde beyin dokusunda, hipokampusta ve periferik sinir sisteminde ROS yapımının ve dolayısıyla oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir (Abdel-Wahab ve Moussa 2019, Areti ve ark 2014, Chtourou ve ark 2015, Dasari ve Tchounwou 2014, Hashem ve ark 2015, Khadrawy ve ark 2019).

Artan ROS yapımı hücredeki biyomoleküllerin, enzim, protein, lipid ve nükleoproteinlerin yapısını bozarak ciddi sonuçlara neden olur. Oksidatif stres demiyelinizasyon, mitokondriyal disfonksiyon, mikrotübüler harabiyetle birlikte nöronal harabiyete, kaspaz sistemin aktivasyonu ile apoptozise neden olur (Şekil 2.3.5.). Ortaya çıkan nöropatinin geri dönüşü çoğu kez mümkün değildir (Areti ve ark 2014).



Şekil 2.3.5. Sisplatin'e bağlı oksidatif stres sonucu apoptozis (Qi ve ark 2019)'dan

ROS yapımının artışı ile birlikte antioksidan enzim sisteminde de değişiklikler ortaya çıkar. Çalışmalarda antioksidan enzim seviyelerinde azalmalar gösterilmiştir.

Beyinde en önemli antioksidan sistem olan GSH'nın sisplatine bağlı azaldığı saptanmıştır (Abdel-Wahab ve Moussa 2019, Areti ve ark 2014, Chtourou ve ark 2015, Dasari ve Tchounwou 2014, Hashem ve ark 2015, Khadrawy ve ark2019).

ROS yapımı aynı zamanda proinflamatuvar sitokinlerin yapımının artmasına da neden olabilir. İnflamatuvar sitokinlerin artışı ROS yapımının daha da çok artmasına ve oksidatif olayların hızlanmasına neden olur (Areti ve ark 2014).

Artan ROS, DNA ile reaksiyona girerek 8-hidroksi guanin yapımı ve sonuçta DNA harabiyetine neden olur.

ROS hücre zar peroksidasyonu üzerindeki etkisi ile kolinerjik sistem fonksiyonunu etkiler. Santral kolinerjik sistem hipokampuste öğrenme ve hafızanın düzenlenmesinde önemli bir sistemdir. Kolinerjik sistem disfonksiyonu nörotoksisitenin bir bulgusudur. Sisplatin nörotoksisitesinde asetil kolin esteraz (AChE) aktivitesinde belirgin bir artış saptanmıştır. ROS bu artışın arkasındaki önemli nedenlerden birisidir (Abdel-Wahab ve Moussa 2019, Chtourou ve ark 2015, Jangra ve ark 2016). Beyinde monoaminooksidaz (MAO) aktivitesinde artış bulunmuştur. MAO, monoamino nörotransmitterlerin oksidatif deaminasyonunu hidrojen peroksit yaparak katalize eder. Bu da oksidatif stres artışının bir nedeni olabilir (Chtourou ve ark 2015).

Mitokondrial Disfonksiyon:

Sisplatin asıl olarak etkisini DNA' ya bağlanarak gösterir. Özellikle mitokondri DNA'sına zarar verir. Bunun önemli sonuçlarından biri elektron transport sisteminin bozulması ve bunun sonucu ROS yapımının artışıdır (Choi ve ark 2015, Lomeli ve ark 2017). İlk kez platin türevi ilaçların nörotoksite mekanizmasının mitokondri bozukluğu üzerinden çalıştığı Podratz ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Podratz ve ark 2011). Sisplatinin nükleer DNA'ya benzer şekilde mitokondrial DNA'ya da bağlanarak mitokondri yapısını ve fonksiyonunu bozduğu saptanmıştır. Sisplatin mitokondri DNA' sına bağlanarak mitokondride transkripsiyon ve replikasyonu bozar. Mitokondri DNA'sının kendini tamir etme yeteneği olmadığından dolayı mitokondri yenilenemez ve tamamen bozulur. Histolojik çalışmalarda mitokondrinin genişlediği, vakuolize olduğu, fonksiyonunu kaybettiği

görülür (Lomeli ve ark 2017, Podratz ve ark 2011). Mitokondrial bozukluk sonucu mitokondri geçirgenliği bozulur. Hücre içine Ca²⁺ girişi artar, bu da hücrenin apoptozise gitmesini kolaylaştırır.

Sisplatin ayrıca periferik sinirlerde mitokondriyal füzyon ve fisyon proteinlerinin ekspresyonunu bozabilir. Bunun sonucu mitokondri şeklinde, büyüklüğünde ve sayısında değişiklikler ortaya çıkabilir (Bobylev ve ark 2017).

Nükleer DNA Bozukluğu:

Sisplatin kanser hücresinde olduğu gibi sağlıklı hücrelerde ve nöronlarda da DNA'da zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlanmalar yapabilir. Bu değişiklikler sonucu hücre replikasyonu ve hücre siklusu bozulabilir. Hücre siklusu G2/M fazında kalır. Bu nörotoksisitede önemli mekanizmalardan birisidir. Özellikle kronik sisplatin kullanımı sonrasında bu etki daha belirgindir. Nörotoksisiteden en çok etkilenen DRG nöronlar bu durumdan en fazla etkilenirler. Ortaya çıkan DNA bileşikleri ile hasar arasında bir korelasyon vardır (Ta ve ark 2006). DNA tutulumu sonucu ortaya çıkan nöronal toksisite aksonları da etkileyeceğinden indirekt olarak aksonal değişiklikler ortaya çıkabilir.

DNA tamir yolları toksisiteyi sınırlamada önemlidir. Nükleer eksizyon tamir yolağı (NER) ana tamir mekanizmasıdır. Bu şekilde zincir içi çapraz bağların bir kısmı tamir edilebilir. Bir diğer tamir yolağı yanlış eşleşme tamir yolağıdır. Bunların yetersizliğinde ribozomal RNA'nın uygun transkripsiyonu olmaz ve protein sentezi bozulur. DNA bileşikleri diğer hücresel proteinler için bağlanma yerleri oluştururlar. Bu proteinler transkripsiyon faktörleri, histonlar ve yüksek mobiliteli proteinlerdir. Sonuçta bu proteinlerin fonksiyonları da etkilenir (Ongnok ve ark 2020).

Nöroinflamasyon:

Kemoterapötik ilaçlar immün sistem üzerinde miyeloproliferasyonu baskılayarak immün baskılayıcı etki gösterirler. İmmün sistemin aktivasyonu da bu ilaçlar tarafından mümkün olabilir (Zitvogel ve ark 2008). Bu aktivasyon nöroinflamasyon nedeni olabilir. Bu etki immün sistem hücreleri tarafından olabileceği gibi Schwann hücreler, astrositler ve en önemlisi mikroglial hücreler tarafından ortaya çıkarılabilir. Nörodejeneratif hastalık deneysel modellerinde

mikroglial hücrelerin aktivasyonu IL-1 β , IL-6, TNF- α , nitrik oksit ve ROS gibi nörotoksik moleküllerin salınımına neden olur. Sisplatinin yaptığı oksidatif stres proinflamatuvar sitokinlerin salınımını artırabilir (Abdel-Wahab ve Moussa 2019, Almutairi ve ark 2017, Arafa ve ark 2020, Ongnok ve ark 2020).

Sisplatin nörotoksitesisi ile ilgili hayvan çalışmalarında proinflamatuvar sitokinlerin hem beyin dokusunda hem de serumda yüksek seviyelerde bulunduğu gösterilmiştir (Abdel-Wahab ve ark 2019, Khadrawy ve ark 2019, Zaki ve ark 2018).

İyon Kanallarında Değişiklikler:

Bir platin türevi olan oksaliplatin akut nörotoksite yapar. Bunun patogeneğinde kalsiyum iyon değişikliği ile voltaj kapılı sodyum kanallarının fonksiyon bozukluğu öne sürülmüştür. Bu etki ürün yapısındaki oksa bileşiği ile ilişkili olabilir. Oksaliplatinin aksine sisplatin sodyum ve potasyum kanallarında belirgin bir bozukluğa neden olmaz (Argyriou ve ark 2013). Buna karşılık sisplatin kalsiyum kanalları üzerinde etkili olur.

Ca²⁺ hücrede fizyolojik olayların düzenlenmesinde anahtar rol oynayan bir iyondur. Hücre içi seviyesindeki küçük değişiklikler zar eksitabilitesinde, nörotransmitter salınımında ve nöronal hücre, glial hücre gen ekspresyonunda değişikliklere neden olur. Sisplatine bağlı kalsiyum dengesinde değişiklikler ve Ca²⁺ sinyal değişiklikleri gösterilmiştir. Özellikle küçük nöronlarda sisplatinin Ca²⁺ kanal akışını azalttığı saptanmıştır (Tomaszewski ve Büsselberg 2007). Sonraki çalışmalarda sisplatinin duyu nöronlarında N-tipi voltaj kapılı Ca²⁺ kanal ekspresyonunu arttırdığı dolayısıyla hücre içine Ca²⁺ girişini arttırdığı, artan hücre içi Ca²⁺ seviyesinin kaspaz aktivasyonunu artırarak apoptozise neden olabildiği rapor edilmiştir (Leo ve ark 2017). Bununla beraber sisplatinin yaptığı nörotoksite patogeneğinde bu kanalların rolü açık değildir.

Duyu nöronları çeşitli tipte geçici reseptör potansiyel kanalları eksprese eder. Bu kanallar inflamasyon ve ağrının oluşumuna neden olur.

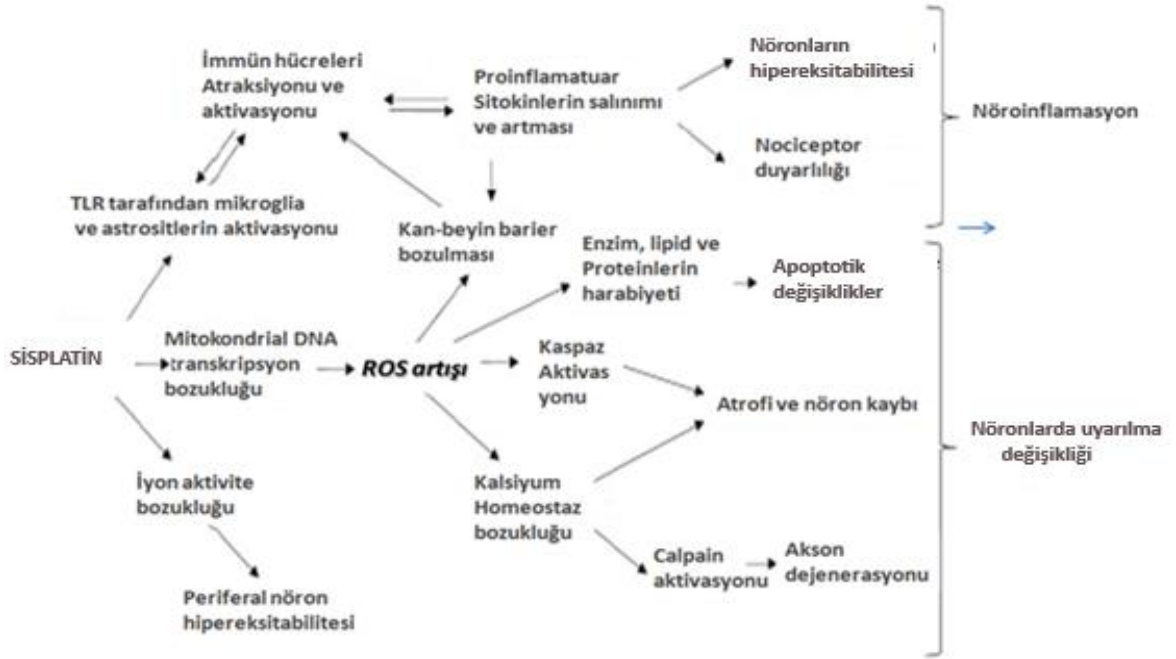
Ta ve arkadaşları sisplatin tedavisinin geçici reseptör potansiyeli vanilloid 1 (TRPV1) , TRPA1 ve TRPM8'i arttırdığını göstermiştir (Ta ve ark 2010). Özellikle

trigeminal sinirlerde sisplatin tedavisi sonrası TRPV1 ve TRPA1 ekspresyonları artmıştır ve böylece sıcaklık hassasiyeti ve mekanik duyarlılık artmıştır.

Akson Dejenerasyonu

Fizyolojik şartlar altında aksonal transport iyonların nörondan hedef hücreye veya zıt yönde taşınmasını sağlar. Sisplatin sonrası aksonal dejenerasyon ile transport işlemi bozulur. Burada sorumlu ana iki mekanizma miyelin kaybı ve aksonal iskelettteki değişikliklerdir (Boehmerle ve ark 2014). Sisplatin tedavisinin histon deasetilaz 6 aktivitesini artırarak alfa tübülün asetilasyonunu azalttığı da bulunmuştur (Ma ve ark 2018). Tübülün yapısının bozulması aksonal harabiyetin önemli bir nedenidir.

Sonuç olarak sisplatinin yaptığı nörotoksisite, oksidatif harabiyet, inflamasyon, mitokondrial disfonksiyon, DNA harabiyeti, kanal değişiklikleri ve apoptozis sonucu ortaya çıkmaktadır (Brouwers ve ark 2009, Zajaczkowska ve ark 2019) (Şekil 2.3.6.).



Şekil 2.3.6. Sisplatinin yaptığı nörotoksisite mekanizmaları (Zajaczkowska ve ark 2019)'den

2.3.6 Klinik Çalışmalarda Sisplatinin Yaptığı Nörotoksisiteyi Önlemek için Kullanılan Tedaviler

Sisplatin nörotoksisitesi için kanserli hastalarda farklı ilaç tedavileri denenmiştir. Antioksidanlar en sık kullanılan tedavilerdir. Alfa lipoik asit ile yapılan prospektif randomize plasebo kontrollü çift kör çalışmada nörotoksisite şiddeti ve insidansında belirgin bir azalma gösterilememiştir (Guo ve ark 2014).

Redükte glutatyon doğal nöroprotektan ve antioksidan bir maddedir. DRG nöronlarında platin birikimini engelleyebilir. Ek olarak doğal serbest radikal temizleyicisidir. Sinir büyüme faktörü reseptörlerini stimüle edebilir (Barhwal ve ark 2008). Üç prospektif randomize plasebo kontrollü çalışmada belirgin bir etki bulunamamıştır (Cascinu ve ark 1995, Colombo ve ark 1995, Smyth ve ark 1997).

Bir Ca⁺⁺ kanal blokörü olan nimodipin sisplatinin yaptığı nörotoksisite üzerinde over kanserli hastalarda belirgin bir nöroprotektif etki göstermemiştir (Cassidy ve ark 1998).

Kolon kanserli hastalarda okskarbazepin ile (Na⁺ kanal inhibitörü) prospektif randomize açık uçlu çalışmada sisplatinin yaptığı nörotoksisitenin insidansında ve şiddetinde belirgin azalma gösterilmiştir (Argyriou ve ark 2006).

Sinir büyüme faktörü ve reseptörünün ekspresyonunu stimüle eden retinoik asit nörotoksisiteyi önlemek amacıyla sisplatin ve paklitaksel kullanan ilerlemiş küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalarda prospektif randomize plasebo kontrollü bir çalışmada kullanılmıştır. Takip süresi bu çalışmada kısadır. Grade 2-4 nöropati insidansında ve şiddetinde azalma bulmuşlardır (Arrieta ve ark 2005).

Bir antioksidan olan E vitamini kolorektal, meme, akciğer kanseri olan 189 hastalık bir grupta koruyucu amaçlı kullanılmıştır. Bu hastaların 8 tanesi sisplatin, 2 tanesi karboplatin, 50 tanesi oksaliplatin, 109'u taksan veya her birinin kombinasyonunu kullanmakta idi. Randomize çift kör plasebo kontrollü çalışmada taksan kullanan grubun önemli bir kısmında karıştırıcı faktörler fazlaydı. Platin grubun yetersiz örnekleme büyüklüğü nedeniyle kesin bir değerlendirme yapılamamıştır (Kottschade ve ark 2011).

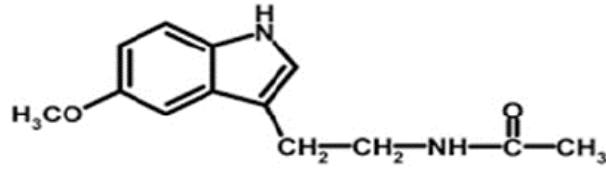
Farklı solüt tümörleri olan 108 hasta E vitamini ile randomize plasebo kontrollü bir çalışmada değerlendirilmiştir. Grade 3 ve 4 nörotoksisite şiddetinde ve insidansında belirgin azalma gösterilmiştir. Bu çalışmanın kısıtlılığı çalışmadan ayrılan hasta sayısının yüksek olmasıdır (Pace ve ark 2010). Aynı grup daha önceden 27 akciğer, over, farenks, gastrik, testiküler, özefagus ve dil kanserli hastalarda E vitamini tedavisinin nöroprotektif etkilerini prospektif randomize plasebo kontrollü bir çalışmada değerlendirmişlerdir. Bu çalışmanın kısıtlılığı ise vaka sayısının az olmasıdır. Kontrol grupta nörotoksisitenin insidansında ve şiddetinde belirgin azalma medyan sinaps amplitüdlerinde azalma gösterilmiştir (Pace ve ark 2010).

Bir organik tiyofosfat olan amifostinin sitoprotektif ve detoksifiye edici etkileri vardır. Bazı klinik çalışmalarda sisplatin nörotoksisitesinde tedavi amaçlı kullanılmıştır. Etkin olduğunu öne sürenler (Planting ve ark 1999) ve yetersiz bulanlar (Gallardo ve ark 1999) vardır.

2.4. Melatonin

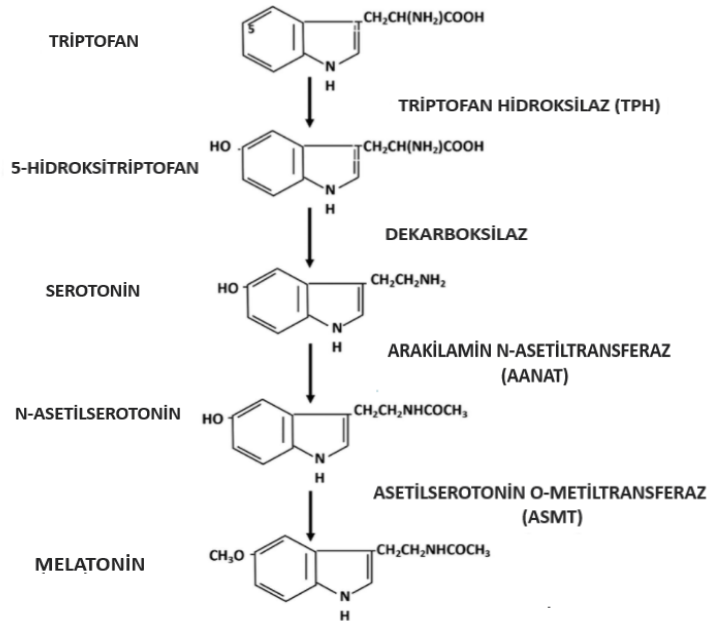
2.4.1 Sentez, Salınım ve Metabolizması

Melatonin hormonu ilk kez Lerner tarafından 1958 yılında bulunmuştur. Lerner, pineal ekstrelerinden elde ettiği hormonun cilt rengini açmasından dolayı siyah anlamına gelen melas ve iş anlamına gelen tossos kelimelerini birleştirerek melatonin adını vermiştir (Arendth 2007). Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) pineal glandda pinealositler tarafından sentezlenen bir hormondur (Şekil 2.4.1). Melatoninin ayrıca lakrimal bez, retina, eritrositler, trombositler ve gastrointestinal sistemde bazı hücreler tarafından da sentezlendiği gösterilmesine rağmen bunların plazma melatonin düzeyine etkisi azdır. Son yıllarda mitokondrisi bulunan tüm hücrelerde melatonin sentezlenebileceği görüşü vardır (Bubenik 2002, Pandi-Perumal ve ark 2006). Pineal dışı sentezlenen melatonin sirkadiyan siklusla düzenlenmez. Parakrin, otokrin etki gösteren diğer sinyaller tarafından düzenlenir. Bunlar içinde en yüksek melatonin konsantrasyonları (mikromolar konsantrasyonlarda) kemik iliğinde gösterilmiştir (Carrillo-Vico ve ark 2005).



Şekil.2.4.1. Melatoninin yapısı (N-asetil-5-metoksitriptamin) (Tordjmann ve ark 2017)'den

Melatonin, triptofan hidroksilaz enzimi aracılığıyla L-triptofandan sentezlenir. Hidroksilasyon sonrası ürün 5-hidroksitriptofandır. Bu ara ürün piridoksal fosfat ve 5-hidroksitriptofan dekarboksilaz ile dekarboksile olarak serotonine çevrilir. Serotonin, asetil CoA varlığında serotonin N-asetiltransferaz enzimi (NAT) ile N-asetil serotonine dönüşür. Hidroksiindol O-metiltransferaz ve S-adenozil metionin hidroksil grubunu metilleyerek melatonin sentezini sağlar (Tordjman ve ark 2017) (Şekil 2.4.2.). Norepinefrin melatonin sentezinin başlamasında anahtar rol oynar. Pinealositlerdeki adrenerjik 1 reseptörlere norepinefrinin bağlanması cAMP'yi stimüle eder ve daha sonra N-asetil transferaz yapılıır (Tan ve ark 2015).



Şekil. 2.4.2. Melatonin sentez basamakları (Tordjman ve ark 2017)'den

Melatonin sentezinde hız düzenleyen basamaklardan biri NAT enzimidir. Enzim aktivitesi karanlıkta artar. Aydınlıkta ise sempatik aktivite baskılanırken NAT enzimi aktivitesi ve melatonin kan seviyesi hızla azalır.

Melatonin "karanlığın hormonu" olarak bilinir. Uyku-uyanıklık siklusunun düzenlenmesinde önemli rol oynar. En yüksek seviyesi gece 24.00 - sabah 08.00 arasında ölçülür (Claustrat ve Leston 2015). Retinada fotoreseptörlerden alınan ışık uyarısı retinohipotalamik yol ile hipotalamustaki suprakiazmatik nukleusa ve daha sonra paraventricüler nukleusa iletilir. Buradan spinal kordun ilk torasik segmentlerinin pre gangliyonik sempatik nöronlarına direkt veya indirekt olarak gelen uyarılar superior servikal gangliyonun post gangliyoner sempatik nöronları aracılığıyla pineal beze ulaşır (Amaral ve Cipollo-Neto 2018). Sempatik sinirler, pinealositler üzerindeki terminallerde günlük karanlık-aydınlık değişimlerine göre norepinefrin salgırlar. Norepinefrin pinealosit membrandaki beta-adrenerjik reseptörlerce tanınır, buna bağlı olarak siklik nükleotid sistem (cAMP-PKA-CREB ve PLC-Ca⁺⁺-PKC) uyarılır ve melatonin sentezi sağlanır (Reiter ve ark 2014).

Işık uyarısı retinal fotoreseptif gangliyon hücrelerindeki melanopsinin yıkımını aktive eder. Bu hipotalamusa melatonin sentezinin inhibisyonu şeklinde iletilir. Melatoninin bu sirkadiyan ritmi yaşın ilerlemesi, duyu durum bozuklukları gibi durumlarda bozulabilir (Tordjmann ve ark 2017).

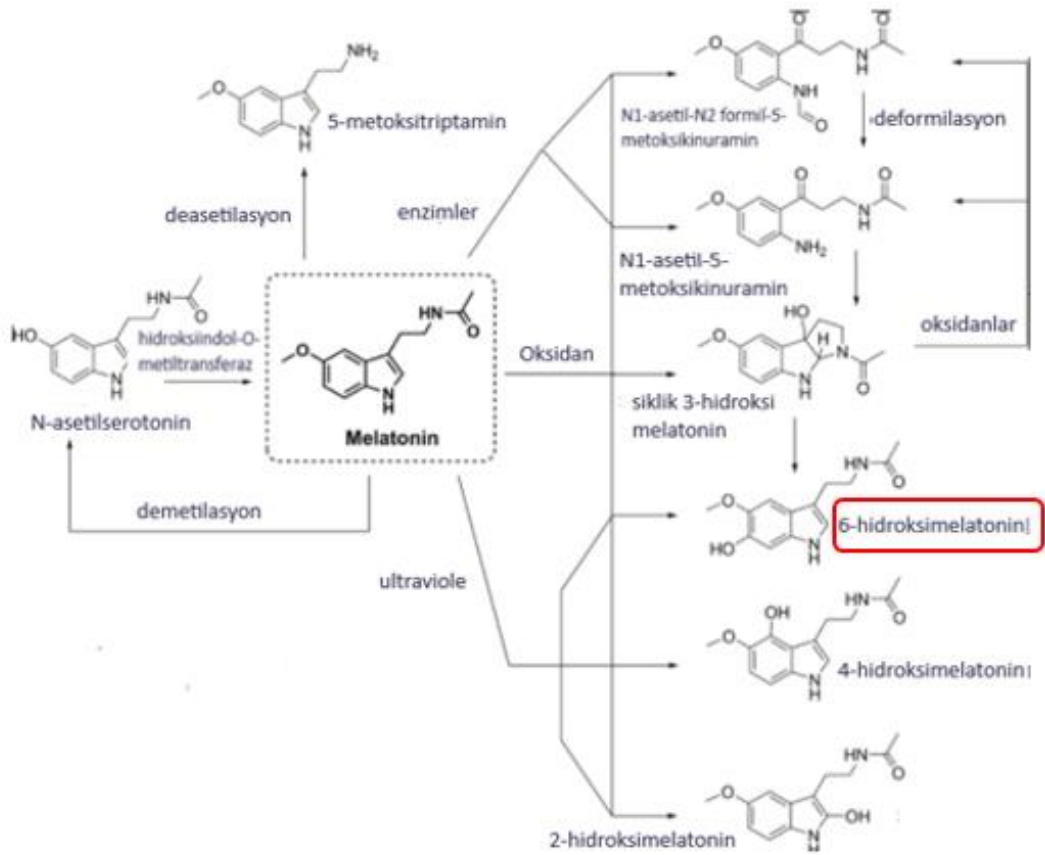
Melatonin depolanan bir hormon değildir. Sentezlendiği zaman salınır. Gece boyunca BOS sıvısına ve kan akımına salınır (Hardeland 2018).

Kanda melatonin sıklıkla albümine bağlanır. Suda kısmen, lipidlerde daha fazla çözünür. CYP 450 izoformları (esas olarak CYP1A2) tarafından 6-hidroksimelatoninine metabolize edilir ve karaciğerde sülfatlanarak konjuge olan melatonin idrar yoluyla atılır. Santral sinir sisteminde ise melatonin N-asetil-N2 formil 5 metoksikunuramine yıkılır (Tordjman ve ark 2017).

Melatonin sentez yolağında yapılan N-asetilserotonin aynı zamanda melatoninin bir metabolitidir. Demetilasyon ile yapılır. Melatonin deasetilasyon ile 5-metoksitriptamin (5-MT) yapar. Melatoninin iki -OH ile reaksiyonu sonucu yapılan

siklik-3-hidroksimelatonin (c3OHM) esas yıkım ürünüdür. C3OHM, N1-formil 5-metoksikimuramine (AFMK) ve N1-asetil 5-metoksikimuramine (AMK) dönüşür (Cardinalli 1981) (Şekil 2.4.3.). Her ikisi de enzimatik, serbest radikal veya ultraviyole radyasyon yolları tarafından yapılabilir. Her iki melatonin metabolitinin serbest radikali temizleme ve serbest radikali temizleme kaskadını aktive etme özellikleri vardır; güçlü antioksidanlardır (Hardeland 2009).

Melatoninin, 6 hidroksi melatonin (6OHM) metaboliti esas olarak karaciğerde yapılmakla beraber beyin ve deride de yapılır. Farklı kimyasal ajanlar tarafından melatonin oksidasyonu sonucu 4-OHM ve 2-OHM ortaya çıkar. Ultraviyole teması sonrası ise 6-OHM, 4-OHM, 2-OHM yapılabilir (Galano ve Reiter 2018).



Şekil 2.4.3. Melatonin metabolizması (Galano ve Reiter 2018)'den. 6-hidroksimelatonin en önemli karaciğer metabolitidir. Beyin ve deride de bulunur.

2.4.2 Melatonin Etki Mekanizmaları

Melatonin spesifik reseptörlerine veya hücre içi hedeflerine bağlanarak hücre davranışlarını düzenlemede çeşitli fonksiyonlar gösterebilir (Şekil 2.4.4.) (Reiter ve ark 2014, Slomonski ve ark 2012) .

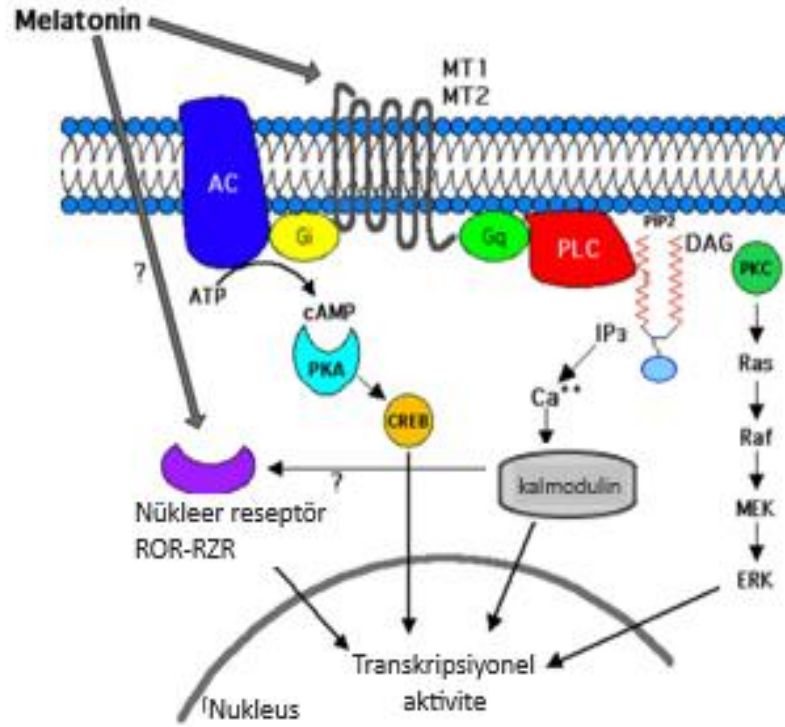
Melatonin hedef hücre zarındaki spesifik hücre reseptörlerine yüksek affinite ile bağlanır. Başlıca iki tip melatonin zar reseptörü vardır, MT1 ve MT2. Bunlar G protein ilişkili reseptörlerdir ve adenilat siklaz ile hücre içi sinyal yolağı aktive olur (Şekil 2.4.4). Hipotalamusun suprakiazmatik nükleusunda yoğunur (Yasuo ve ark 2009). Retina, hipokampus ve diğer beyin bölgelerinde de bulunur. Fotoperiyodik sinyaller bu yolla ilişkilidir. Melatonin reseptörleri santral sinir sistemi dışında mide, bağırsak kanalı, gonadlar, böbrek ve kan damarlarında da vardır. Bu reseptörler heterotrimerik Gi/G0 ve Gq/11 protein ilişkili reseptörlerdir. Adenilsiklaz, fosfolipaz A2 ve fosfolipaz C üzerinden etkilerini gösterirler. MT1 ve MT2 reseptörler santral sinir siteminde olduğu gibi tüm periferik dokularda da bulunur (Radogna ve ark 2010, Yasuo ve ark 2009).

MT1 ekspresyonu beyinde hipotalamusta, serebellumda, suprakiazmatik nükleusta, hipokampusta, substansia nigrada gösterilmiştir. Bunların yanı sıra immün sistem hücrelerinde, testiste, overde, deride, karaciğerde, retinada, pankreasta, dalakta eksprese edilmektedir (Dubocovich ve Markowska 2005, Slomonski ve ark 2012). MT2 beyinde hipotalamusta, suprakiazmatik nükleusta, immün sistem hücrelerinde, retinada, hipofizde, kan damarlarında, testiste, böbrekte, gastrointestinal sistemde, memede, yağ dokusunda ve deride bulunur (Slomonski ve ark 2012).

Melatonin nükleer retinoik orfan reseptörler/ retinoid Z reseptörler (ROR /RZR nükleer reseptörler) ile bağlanarak da etki gösterebilir (Amaral ve Cipello-Neto 2018). ROR tüm memeli dokularında gösterilirken RZR beyinde, pinealde ve retinada eksprese edilir (Carlberg 2000).

Reseptör içeren hücreler nanomolar konsantrasyonda melatonin seviyelerine cevap verebilirken çok daha yüksek konsantrasyonlarda melatonin

hücrede direkt hedefleri üzerinden etki gösterebilir. Bu hedeflerden en önemlisi kalmodulindir (Benitez-King ve Anton-Tay 1993). Bu şekilde birçok hücre daha yüksek konsantrasyondaki melatonin seviyelerinden etkilenebilir.



Şekil 2.4.4. Melatoninin hücrede etki yerleri (Slomonski ve ark 2012)'den

2.4.3 Melatonin Etkileri:

Klasik etkileri (hormon olarak melatonin)

Melatonin direkt ve erken etkileri, moleküler efektörlerle direkt etkileşimi sonrası ortaya çıkan etkileridir. Antioksidan etki, c AMP-PKA-CREB ve cGMP de azalma, diaçilgliserol (DAG), inositol 3 fosfat (IP3), protein kinaz C (PKC) aktivitesinde artma, potasyum ve kalsiyum kanallarının düzenlenmesi. Bu etkiler hedef doku ve hücre içi melatonin sinyal yolağına bağlıdır. Bu klasik hormonal etki şeklidir (Reiter ve ark 2014).

Melatoninin hormonal etkisine ek olarak yapıldığı ve salındığı gece süresince görülmeyen, bunun yerine plazma melatonin seviyesinin gün boyunca düşük seyretmesiyle etkilenen prospektif etkileri de vardır. Bu etki melatonin yapımının kesilmesinden hemen sonra başlar ve sonraki saatlerde maksimal seviyeye ulaşır.

cAMP-PKA-CREB hipersensitizasyonu ve daha uzun süreçte ortaya çıkan *clock* genlerin ve *clock* kontrol eden genlerin transkripsiyon ve/veya translasyonu yoludur (Amaral ve Cipollo-Neto 2018).

Melatonin sirkadiyan ritimi düzenleyen bir hormondur. Kronobiyotik etkisi karanlık fazlar süresince melatonin sinyalinin günlük tekrarıdır. Melatonin insan sirkadiyan ritminin en güçlü düzenleyicilerinden biridir. Bu etkisi suprakiazmatik nükleus ve periferel dokulardaki (yağ, kas dokusu pankreatik beta hücreler gibi) *clock* genlerle ilişkilidir (Arendt 2007).

Melatoninin diğer önemli senkronizan etkisi mevsimsel ritimlerdir. Buna mevsimsel etki denir. Gece ve gündüz sürelerinin değişmesine bağlı olarak kış ve yaz aylarında farklı ritimler gösterir. Bu mevsimsel senkronizan etkisi pituiter pars tuberalis üzerindeki etkisi ile ilişkilidir. Bu sistem melatoninin üreme, enerji metabolizması, immun cevap, termogenezis, büyüme, vücut ağırlığı gibi mevsimsel olayları kontrol etme yeteneğini gösterir.

İnsanlarda pineal melatonin yapımı gebelik ilerlerken artar. Maternal melatonin plasentayı geçerek fetal dolaşıma ulaşır. Fetüsün tek melatonin kaynağı olur. Annede görülen melatonin etkilerinin bir kısmı fetüste de görülür. Maternal melatonin fetüsün sirkadiyan ritmini düzenler. Ayrıca fetüsün uygun beyin gelişimi için gereklidir (Tamura ve ark 2008).

Melatoninin Antioksidan Etkisi

Melatoninin antioksidatif etkisi ilk kez 1991 yılında Ianas ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Ianas ve ark 1991). Düşük dozlarda antioksidan iken yüksek konsantrasyonlarda doza bağlı prooksidan olabileceği tartışılmıştır (Pandi-Perumal ve ark 2006). Antioksidan etkisi yapısında bulunan pirol halkasına bağlıdır. Melatonin serbest radikalleri tutarak, serbest radikallerle etkileşip aktivitelerini azaltarak veya antioksidan enzimlerin yapımını arttırarak etkisini gösterir (Galano ve Reiter 2018).

Melatonin amfipatik bir madde olduğundan hücre zarını geçebilir. Klasik antioksidanlardan farklıdır. C vitamini, E vitamini gibi antioksidanlar antioksidan

aktivitelerinden sonra prooksidan maddelere dönüşürlerken melatonin böyle bir özelliğe sahip değildir (Tan ve ark 2007).

Melatonin hücre içinde oluşan tüm serbest radikalleri tutma özelliğine de sahiptir. Bu özellik melatonin metabolitleri için de geçerlidir. Melatonin ve metabolitleri birlikte bir bütün olarak serbest radikalleri etkisiz hale getirirler.

Özellikle bir melatonin metaboliti olan 6-hidroksimelatonin oksidatif hasara karşı korunmada önemli bir rol üstlenir (Tan ve ark 2007). Bu madde kinolik asidin neden olduğu nörotoksisiteyi azaltmaktadır. Bu madde aynı zamanda Fe^{++} 'nin neden olduğu nörotoksisiteyi ve lipid peroksidasyonunu da engeller.

Diğer bir önemli antioksidan metabolit de 4-hidroksi melatonindir. Bu madde peroksil radikallerini tutar ve Cu^{+2} atomlarının neden olduğu oksidatif stresi engeller (Galano ve ark 2018). Bu maddenin etkisi yapısındaki fenol bileşikleri sayesinde gerçekleşir.

Diğer bir melatonin metaboliti de siklik 3-hidroksi melatonindir (c3-OHM). Bu madde de serbest radikalleri tutmada oldukça etkilidir (Tan ve ark 2015). Aynı zamanda oksidatif DNA hasarı ve 8-OHdG'ye bağlı oluşan hasarları da engeller. Melatoninin etkinliğini göstermek için de sıklıkla c3-OHM kullanılır.

Burada önemli bir sorun da lipid peroksidasyonudur. Bu aslında doğal süreçte olan bir olaydır. Çeşitli antioksidanlar tarafından düzeltilir. Hücre zaman geçtikçe yaşlanır ve serbest radikaller giderek artar. Bu radikaller zamanla hücre zarındaki lipidlerin oksidasyonuna neden olarak hücre zarının yapısını bozarlar. Bunun sonucu hücredeki birçok fonksiyon bozulur. Özellikle hücre sinyal sistemi ve hücre içindeki birçok metabolik fonksiyon bu süreçten ciddi şekilde etkilenir. Melatonin hücredeki lipid peroksidasyonunu engelleyerek serbest radikallerin bu zararlı etkilerinden hücreyi korur (Reiter ve ark 2016). Burada asıl etkili olan c3-OHM dir. Bu madde her ne kadar göz ardı edilse de melatonin ve diğer metabolitlerden çok daha etkilidir. Melatonin aynı zamanda nitrojen atomlarının oluşturduğu serbest radikalleri de etkisiz hale getirir. Melatoninin özellikle nitrik oksidi etkisiz hale getirdiği gösterilmiştir (Tan ve ark 2015).

Melatonin ve Metabolitlerinin Antioksidan Enzimler Üzerindeki Etkileri:

Hücreler normal şartlarda hücre içerisinde oluşan serbest radikallerden antioksidan enzimlerle korunur. Bu enzimler serbest radikal hasarına karşı iyi bir savunucudurlar. Özellikle uzun süreli fazla miktardaki serbest radikallere karşı çok iyi bir koruma sağlarlar. Melatonin de bu antioksidan enzimleri arttırarak bu korumayı destekler. Özellikle Cu-Zn SOD ve glutatyon peroksidaz enzim aktiviteleri melatonin tarafından arttırılır (Pandi-Perumal ve ark 2006).

Ağır stres altında hücrelerde aşırı miktarda serbest radikal birikir ve bu radikaller zamanla antioksidan enzim aktivitesini engellerler. Melatonin bu engeli ortadan kaldırır ve antioksidanların tekrardan etki etmesini sağlar. Böylece hücre oluşan strese karşı kendini korumaya alır. Özellikle GSH/GSSG dengesini sağlar. Katalaz da melatoninden etkilenen önemli bir antioksidan enzimdir. Melatonin bu enzimin genetik regülasyonunu da düzenler (Jimenez-Ortega ve ark 2009). Böylece antioksidan enzimleri kodlayan genlerin ekspresyonu artarken serbest radikal üretimine neden olan genler baskılanır.

Melatonin ve Metabolitlerinin Mitokondri Üzerindeki Etkileri

Mitokondri hücrenin enerji santralidir. Hücredeki tüm reaksiyonlar için gerekli enerji mitokondriden sağlanır. Mitokondride elektron transport sisteminde bozukluk serbest radikal artışının asıl sorumlusudur. Bu radikaller normalde antioksidan enzimler tarafından kontrol altına alınır.

Farmakolojik dozlarda melatonin mitokondriyi oksidatif ve nitrosatif stresten korur. Bu dozlarda direkt serbest radikali tutucu etkisi söz konusudur. Melatonin hem glutatyon peroksidaz hem de glutatyon redüktazı stimüle eder (Lopez ve ark 2009). Serbest radikalleri etkisiz hale getirir, antioksidan enzimleri arttırır ve iç mitokondri zarındaki elektron transport sistemi aracılığıyla elektron akışını optimize eder. Melatonin aynı zamanda hücre içindeki tüm toksik maddeleri de temizler ve böylece mitokondrideki oluşabilecek her türlü hasarı engellemiş olur.

Melatoninin Metallerle Etkileri:

Ağır metaller hücre için çok büyük sorun teşkil ederler. Bu maddeler hücrenin tüm yapılarını oksitleyebilirler. Metallerin etkisinden korunmak için hücrede antioksidan enzimler vardır. Bu enzimler metallerle birleşerek şelasyon yapıp metalleri etkisiz hale getirirler. Bu iki şekilde olabilir. Enzimler metal iyonların indirgenmesini ve böylece aktive olmasını engellerler veya oluşmuş olan serbest radikalleri etkisizleştirirler. Melatonin de serbest radikalleri nötralize ederek ve metallerle şelat oluşturarak metallerin oksidatif etkilerini engeller. Bu etki melatonin dozuna bağlıdır (Romero ve ark 2014).

Melatonin ve Metabolitlerinin Antiinflamatuvar Etkileri:

İnflamasyon, her türlü doku hasarına karşı immun sistemin normal bir cevabıdır. Birçok deneysel çalışmada melatoninin inflamatuvar sitokinleri baskıladığı tespit edilmiştir. Melatonin aynı zamanda proinflamatuvar sitokin ekspresyonunu önlerken antiinflamatuvar sitokin ekspresyonunu artırır (Carillo-Vico ve ark 2013, Hardeland 2018). Bu sayede hücrede aşırı bir inflamasyon olmasını engeller ve hücreyi inflamasyonun zararlı etkilerinden korur. Bu nedenle melatonin birçok inflamatuvar hastalıkta kullanılabilir. Periferal monositlerde melatonin ve metaboliti olan AFMK, TNF-alfa ve IL-8 üretimini engeller. Antiinflamatuvar etkilerinden dolayı ağır inflamasyonlu beyin harabiyetlerinde, sepsiste, iskemi gibi durumlarda kullanımı gündeme gelmiştir (Nasseem ve Parvez 2014).

Melatonin antiinflamatuvar etkilerini nükleer faktör kB (NF kB)'nin DNA'ya bağlanmasını inhibe ederek, siklooksijenazı inhibe ederek (özellikle Cox 2), indükte edilebilen nitrik oksit sentazın (iNOS) ekspresyonunu baskılayarak gösterir (Deng ve ark 2006, Hardeland 2018).

Melatoninin nöroprotektif etkilerinden biri de gama-aminobutirik asit (GABA) sistem üzerindedir. GABA'erişik reseptörlerin aktivasyonu ile amiloid β peptid toksisitesinden nöronları korur. Bu aktivasyon melatonin antagonistleri tarafından ortadan kaldırılamaz (Louzada ve ark 2004).

Melatonin antisitotoksik aktivite gösterir. Glutamat reseptör antagonisti kainat tarafından yapılan nöronal ölümü önler, hipokampal nöronları korur (Kim ve ark 2014).

Melatoninin Onkostatik Etkileri

Melatonin, kanser hücresi büyüme faktörlerinden olan linoleik asitin kanser hücresine girişini sağlayan reseptörlerini azaltmaktadır. Melatonin bir sitoplazma reseptörü olan Ca^{+2} (Kalsiyum) kalmodulin ile bağlanır. Melatonin kalmodulini kalsiyumdan uzaklaştırarak hücre siklusunu yavaşlatır ve böylece melatonin tümörün büyümesini engeller (Benitez- King ve Anton Tay 1993, Cardinalli 1981).

Melatonin özellikle ilerlemiş metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalarda sisplatin ve etoposid kemoterapisine ek olarak 20 mg/gün de oral verildiğinde, melatonin alan grupta almayan gruba göre tümör regresyon hızında ve 5 yıllık yaşam süresinde belirgin düzelmeler sağlamıştır. Melatonin ile tedavi edilen hastaların kemoterapiyi daha iyi tolere ettiği ve yaşam kalitesinin belirgin düzeldiği gösterilmiştir. Bu nedenle yeni bir kemoterapik strateji olarak kemoterapiye melatonin eklenmesi önerilmiştir (Lissoni ve ark 2003).

2.4.4 Sisplatin Toksikitesi Üzerinde Melatoninin Etkisi

Sisplatinin yaptığı toksik etkiler üzerinde melatoninin etkisini göstermek için yapılan erken çalışmalardan birinde 80 metastatik solid tümörü olan hastada melatonin akşam 20 mg/gün oral verildiğinde trombositopeni, sitomatit ve nöropati riskini azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada akciğer kanserli hastalar, sisplatin ve etoposid; meme kanserliler, mitoksantron; GIS tümürlü hastalar 5-FU almışlardır. Sonuçlar genel kemoterapötiklerin etkisi olarak değerlendirilmiştir (Lissoni ve ark 1997). Metastatik akciğer kanserinde sisplatin ve etoposidin yaptığı anemi üzerinde 5 metoksitriptaminin iyileştirici etkisi gösterilmiştir (Lissoni ve ark 2003).

Melatoninin sisplatinin yaptığı nefrotoksisite üzerindeki etkisi sıçanlarda çalışılmıştır. Melatonin ile tedavi edilen hayvan grubunda plazma kreatinin ve kan üre nitrojen (BUN) seviyeleri tedavi almayan gruba göre belirgin olarak azalmıştır. Melatonin ile tedavi edilen grupta böbrek dokusunda oksidatif stresin düzeldiği ve

antioksidan enzimlerin arttığı gösterilmiştir. Sisplatinin proksimal tubüler hücrelerde yaptığı harabiyetin histolojik olarak melatonin ile önlendiği gösterilmiştir (Hara ve ark 2001).

Bir diğer çalışmada melatonin tedavisinin sisplatinin yaptığı nefrotoksisite üzerindeki etkileri benzer şekilde bulunmuştur. Melatonin tedavisinin ek olarak nükleer bölgede nükleer transkripsiyon faktörü (NRF-2) birikimini ve sitozolik bölgede hem oksijenaz-1 (HO-1) ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra sisplatin ile tedavi edilen grupta nükleer faktör-kappaB (NF-kB) ve AP1 daha yüksek kalmıştır. Sonuçta melatonin, antioksidan etkisi ile sisplatinin yaptığı nefrotoksisite üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Kilic ve ark 2013).

Sisplatinin yaptığı ototoksisite üzerinde de melatoninin etkili olabileceği çalışılmıştır. Sıçanlarda sisplatin kullanımı ile birlikte verilen melatonin otoakustik emisyon ve işitsel beyin cevabını düzeltmiştir. Mikroskobik seviyede ise melatonin kullanan grupta kohleada daha az epitel kaybı gösterilmiştir (Demir ve ark 2015).

2.4.5 Melatoninin Nöroprotektif Olarak Kullanımı

Melatonin güçlü bir antioksidandır. Patogenezinde oksidatif stresin rol aldığı iskemik hasarlarda koruyucu olabilir. Orta serebral arterin oklüzyonu ile yapılan akut iskemi modelinde sıçanlarda pineal gland transplantasyonun infarkt büyüklüğünü azalttığı, motor gücü arttırdığı gösterilmiştir (Borlorgan ve ark 2003). Subaraknoid kanamalı hayvan modellerinde melatonin enjeksiyonunun oksidatif beyin zedelenmesine karşı koruyucu etkisi bulunmuştur (Ersahin ve ark 2009, Wu ve ark 2017).

Melatonin Nox-2 ve Nox-4 ekspresyonunu azaltarak iskemik beyin zedelenmesinde oksidatif stres üzerinde de etkili olmuştur (Li ve ark 2014).

Melatonin kullanımının hipoksik iskemik ensefalopatili sıçanlarda makrofaj beyin infiltrasyonunu azalttığı, aşırı sitokin ve sonrasındaki inflamasyon seviyesini düzelttiği gösterilmiştir (Lee ve ark 2007).

Bir diğer çalışmada melatoninin ekstrasellüler glutamat ve Nox kökenli ROS yapımını azaltarak hipokampal kesitlerde koruyucu etkisi gösterilmiştir (Patino ve ark 2016).

Alzheimer yaş ile ilgili nörodejeneratif bir hastalıktır. Hücre dışı β amiloid ve hücre içi nörofibriller yumakların artışı ile karakterizedir. Bu patolojiler neokortekste ve hipokampüste daha yoğundur. Bu ürünlerin birikimi oksidatif stres, sinaptik disfonksiyon ve nöronal kayıp ile ilişkilidir (Jeong 2017). Melatoninin amiloid yumakların oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Shukla ve ark 2017). Alzheimer fare modelinde melatonin kullanımının hipokampüste ve frontal kortekste amiloid birikimini azalttığı, hipokampüste dejeneratif değişiklikleri azalttığı, mitokondriyal disfonksiyonu önlediği, kognitif disfonksiyonu ve anksiyeteyi geciktirdiği saptanmıştır (Rudnitskaya ve ark 2015). Bir diğer çalışmada ise bu hastalarda melatoninin sirkadiyan osilasyonunun noradrenerjik disfonksiyon ve monoaminooksidaz yapımına bağlı azaldığı gösterilmiştir (Wu ve ark 2003). Bu hasta grubunda melatoninin kognitif fonksiyonda ve uyku kalitesi üzerinde iyileştirici etkileri olduğu saptanmıştır (Cardinalli ve ark 2012).

Melatoninin kullanıldığı bir diğer hastalık Parkinson hastalığıdır. Parkinson hastalığı substansia nigra dopaminerjik nöronlarda kayıp ile karakterizedir ve hastalarda dopamin azlığı söz konusudur. Parkinson hastalığının yaş ile ilişkili tipinde oksidatif stresin hastalığın patogenezinde önemli bir faktör olabileceği söz konusudur (Olanow 1992). Parkinson hayvan modelinde melatoninin anti oksidan enzim seviyelerini yükselterek nöroprotektif etki gösterdiği gösterilmiştir (Saravanan ve ark 2007). İnsanlarda 24 saatlik melatonin değerlerinin Parkinsonlu hastalarda kontrollere göre belirgin azaldığı gösterilmiştir (Videnovic ve ark 2014).

2.4.6 Melatoninin Platin Bazlı Kemoterapötiklerin Yaptığı Nörotoksisite

Üzerindeki Etkisi

Sisplatinin yaptığı periferik nöropati üzerinde melatonin ve alfa lipoik asidin etkileri histopatolojik, elektrofizyolojik olarak çalışılmış alfa lipoik asit nörotoksisitenin önlenmesinde melatonine göre daha etkili bulunmuştur (Tuncer ve ark 2010).

In vitro bir çalışmada fare beyin homejanatlarında sisplatin 24 $\mu\text{g}/\text{gr}$ doku dozunda kullanılarak yapılan doku toksisitesi modelinde 3 mM melatonin ile sisplatinin yaptığı oksidatif stres belirteçlerindeki artışın melatonin ile düzeldiği,

doku antioksidan enzim seviyelerinin arttığı saptanmıştır. Ayrıca melatoninin Giemsa bantlama ve karyotiplendirme ile DNA harabiyetini azalttığı, hücrel fonksiyonların düzeldiği rapor edilmiştir (Surendran ve ark 2012).

Bir platin türevi olan oksaliplatinin yaptığı davranış değişlikleri, mitokondriyal disfonksiyon ve nörotoksisite üzerinde sıçan beyinde melatoninin etkisi çalışılmıştır. Bu çalışmada melatonin 10 mg/kg dozda i.p olarak oksaliplatin kullanımından 30 dakika önce 4 gün kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda melatoninin nöroprotektif etkisinin olduğu, nörolojik değişlikleri ve mitokondral disfonksiyonu önlediği gösterilmiştir (Waseem ve ark 2016).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Gereçler ve Deney Protokolü

Hayvan deneyleri için 24.12.2019 tarihli 2019/13-11 karar numarası ile Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındı.

Deneyler için 48 adet 8-10 haftalık erkek Sprague Dawley sıçan (200-250 g) Kobay A.Ş'den temin edildi. Hayvan deneyleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi. Hayvanlar dörtlü gruplar halinde polipropilen kafeslere yerleştirildi. Standart pellet cinsi yem ve yeterli miktarda su ile beslenerek 20-22°C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık/karanlık periyotlarına ayarlı şekilde barındırıldı.

Deney protokolünde kullanılan kimyasallar

Çalışmada sisplatin (cisplatin, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), melatonin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), ksilazin (Alfazyne %2, Alfasan International BV, Hollanda) ve ketamin (ketalar, Pfizer USA) kimyasalları kullanıldı.

Sisplatin (Cis), %0.9'luk serum fizyolojik ile 6 mg/kg dozunda olacak şekilde çözüldü. Melatonin (Mel) 20 mg/kg dozunda ve etanol konsantrasyonu %5 olacak şekilde saf etanolde çözüldü. Bütün gruplara aynı hacimde (0.1 ml/100 gr) çözelti verilmesi sağlandı.

Deney protokolü

Deney protokolü uygulanmadan önce sıçanların ağırlıkları tartıldı ve rastgele olacak şekilde gruplara ayrıldı. Sisplatin (Cis), melatonin (Mel), serum fizyolojik (%0.9 NaCl) ve çözücü olarak kullanılan %5 etanol intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. Tüm uygulamalar ve sıçanların günlük bakımları günün aynı saatlerinde gerçekleştirildi. Her gün sıçanların genel durumları, hareketlilikleri, beslenme durumları takip edildi. Çalışmanın son günü sıçanların ağırlık ölçümleri yeniden yapıldı.

Çalışma grupları güç analizine göre, her bir çalışma grubunda bulunması gereken hayvan sayısı 8 olarak belirlendi. (Arıhan O ve ark 2009). Çalışma protokolünde biri kontrol grup olmak üzere altı grup planlandı.

Deney grupları aşağıdaki gibi oluşturuldu: (n=8)

Grup 1 (Kontrol): 5 gün %0.9 NaCl solüsyonu

Grup 2 (Çözücü): 5 gün %5 etanol

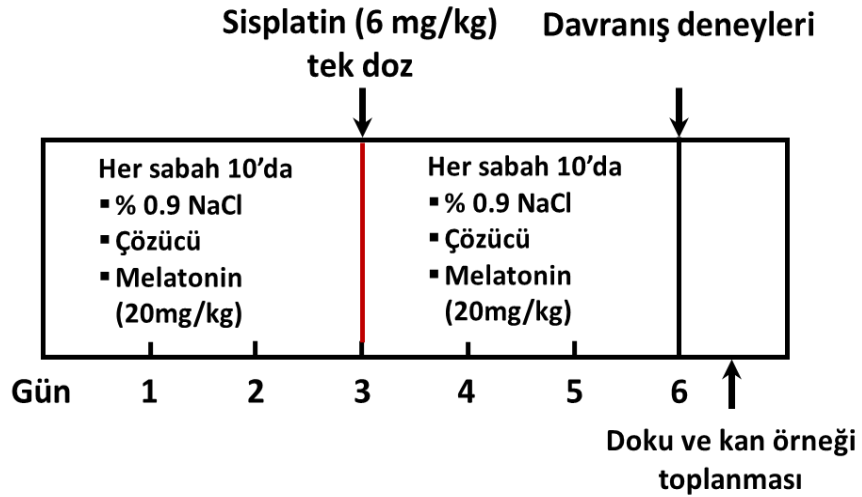
Grup 3 (Cis): Çalışmanın üçüncü günü tek doz 6 mg/kg Cis

Grup 4 (Cis+Çözücü): 5 gün %5 etanol, 3. gün etanol uygulanmasından 2 saat sonra 6 mg/kg Cis

Grup 5 (Mel): 5 gün 20 mg/kg/gün Mel

Grup 6 (Cis+Mel): 5 gün 20 mg/kg/gün Mel, 3. gün Mel uygulamasından 2 saat sonra 6 mg/kg Cis

Deney protokolü Şekil 3.1'de şematize edilmiştir.



Şekil 3.1. Deney protokolü

İlaç protokolü bitiminde (6.gün) hayvanlara davranış testleri yapıldı. Bu amaçla *rotarod* testi, *hot plate* testi ve *T-maze* testi uygulandı.

Davranış testlerinden sonra hayvanlar ketamin (90 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) ile anestetize edildi. Anestezi derinliğini kontrol amacıyla kısırtma, kas tonusları ve palpebral refleksler değerlendirildi. Anestezi altındaki hayvanlardan sol ventrikülden kan örnekleme yapıldı. Alınan kan örnekleri 3500 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek serum ve plazmaları ayrıldı. Elde edilen serumlar rutin biyokimyasal ölçümler için -80°C da saklandı.

Daha sonra anestezi altındaki hayvanlar sakrifiye edilip beyin dokusu, karaciğer, böbrek ve kalp çıkarıldı. Çıkarılan beyin sağ hemisferi çalışmada kullanılmak üzere ayrıldı. Çıkarılan diğer organlar ve beyin sol hemisferi sonraki çalışmalar için -80°C de saklandı.

3.2.Davranış Testleri

T- maze Testi

Uzamsal belleği değerlendirmek için hayvanlarda spontan alternasyon *T- maze* testi uygulandı (Golli ve ark 2016). *T- maze* aparatı tahtadan yaptırıldı. Bir başlangıç kolu ve iki hedef kolundan oluşuyordu. Başlangıç kolu 45x10x10 cm iken hedef kolları 30x10x10 cm idi. Kolların birinde elle açılıp kapatılabilen bir giyotin kapı vardı (Şekil 3.2). Testin hedefi hayvanın alıştığı bir koldan ziyade yeni bir kolu tercih etme yeteneğinin test edilmesidir.



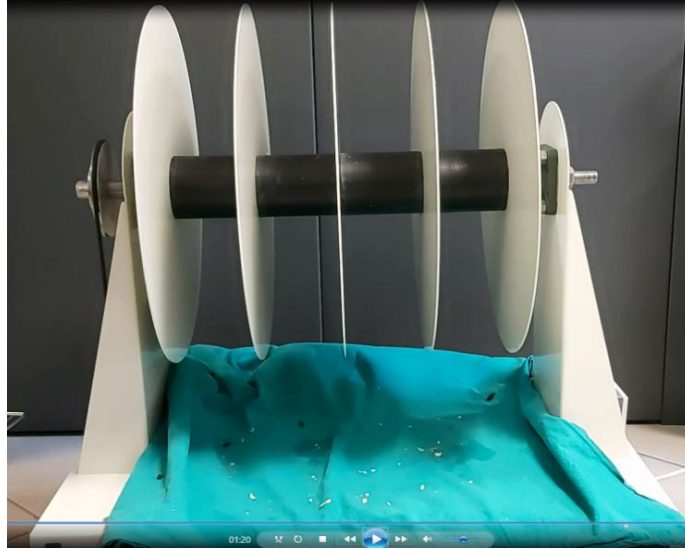
Şekil 3.2. Deneyde kullanılan *T- maze* aparatı

Testte iki aşama vardı. Birinci aşamada T maze'in bir kolu kapatıldı ve hayvanın sadece tek bir kola girmesi sağlandı. Her bir hayvana 5 dakika süre tanındı. Bu testin alıştırma fazıydı. Daha sonra hayvanlara altı saatlik dinlenme süresi tanındı. Altı saat sonra bu sefer labirentin her iki kolu da açıldı. Yine 5 dakika süre verildi. Bu sürede hayvanların hangi kolda ne kadar süre kaldıkları ve her bir kola kaç kez gittikleri videoya kaydedildi. Her bir hayvan testinden sonra T maze ıslak mendil ile temizlendi ve kurulandı. Her bir kola gidiş ve kalış süreleri kronometre kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar alışılmamış kola gidiş sayısının %'si olarak değerlendirildi.

% Alışılmamış kola gidiş= Alışılmamış kola gidiş sayısı / Toplam gidiş sayısı X 100

Rotarod Testi

Motor koordinasyonun değerlendirilmesi için kullanıldı. Test için önceden hazırlanmış labaratuarda bulunan *rotarod* apparatus kullanıldı (Şekil 3.3). Test süresince sıçanlar 16 rpm de dönen rotaroda yerleştirildi. Uyum sağlamaları için iki kez rotarodda yürütüldü. Sonrasında test için dakikada 16 kez dönen *rotarod* çubuğu üzerinde üç kez 60'ar saniye yürütüldü. Maksimum skor 180 saniyeydi. *Rotarod* üzerinde kalma sürelerinin toplam uzunluğu hesaplandı ve motor koordinasyon skoru olarak kaydedildi (Ferrante ve ark 2002).



Şekil 3.3. Deneyde kullanılan *rotarod* apparatusu

Hot plate Testi

Ağrı algılaması için *Hot plate* testi kullanıldı. Burada hayvanlar 54°C lik sıcak bir düzleme yerleştirildi, arka bacağına çekme ve/veya titremedeki gecikme süresi kaydedildi (Gunn ve ark 2011). Bu test için Fizyoloji labaratuvarında Repetier Software program, ısıtıcı düzlem ve hayvanın kaçmasını engelleyen cam bir fanus kullanılarak bir apparatus hazırlandı (Şekil 3.4). Sıcaklık 54°C ye ayarlandı ve sıcak

zeminde hayvanın hareketleri kaydedildi. Sıçanlar işlemiden sonra veya herhangi bir cevap olmuyorsa 50 saniye içerisinde ortamdan uzaklaştırıldı.



Şekil 3.4. Denyede kullanılan *Hot plate* düzeneği

3.3. Biyokimyasal Analizler

Örneklerin hazırlanışı

Sıçanlardan alınan sağ beyin dokuları tartıldı. Dokular, 50 mM Tris/HCl pH 7.4 tampon (0,15 M NaCl, 2mM EDTA, %0.1 Triton X-100 ve 0,1 mM PMSF proteaz inhibitörü) içerisinde %30 (ağırlık/hacim) olacak şekilde Model Pro-200 homojenizatörü kullanılarak 30+30 saniye süre ve 25000 rpm hızda buz üzerinde homojenize edildi. Homojenat ölçülecek parametredeki protokole göre farklı devirlerde +4°C'de santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatant ayrılıp, bölündü. Bu bölünmüş örnekler ELISA, enzim aktivitesi ve protein tayini deneylerinde kullanıldı.

Protein tayini

Örneklerdeki protein miktarlarının saptanması, Bicinchoninic asit (BCA) protein tayin yöntemi ile (sigma) 96 kuyulu plakalarda mikro yöntemle yapıldı (Smith ve ark 1985). Kısaca 200 µL BCA çalışma solüsyonuna, uygun olarak seyreltilmiş protein örneklerinden ve bovin serum albümin standartlarından 25 µL konuldu. Karışım 37°C'de 30 dakika inkübe edildi ve Molecular Devices firmasının Spectramax M2 mikropilaka okuyucusunda 562 nm dalga boyunda okundu. Ölçülen

absorbanslardan örneklerdeki protein miktarları, standart olarak sığır serum albümini kullanılarak elde edilen lineer standart grafik ile hesaplandı.

Asetilkolinesteraz Aktivitesi

Asetilkolinesteraz (AChE) aktivite ölçümü için; finalde pH=7,4 50mM MOPS tamponu, 0,25mM DTNB, 1mM asetilkolin ve 50 µM iso-OMPA ve örnek içerecek şekilde aktivite ortamı hazırlandı. Sonuçlar hemen Molecular Devices firmasının Spectramax M2 mikroparka okuyucusunda 412 nm dalga boyunda 10 dakika boyunca kinetik olarak okundu.

Ünite tanımı: Bir ünite AChE, pH 7,4'te 37° C'te asetilkolinden dakikada 1,0 µmol tiyokolin açığa çıkaran enzim miktarıdır. Spesifik aktivite ise mg protein başına düşen ünite olarak ifade edilir. Birimi ise ünite/mg protein veya µU/mg protein şeklinde ifade edilir (Ellman ve ark 1961).

Total Monoamin Oksidaz Aktivitesi

Total monoamin oksidaz (MAO) ölçümü için *BioVision* Total MAO aktivite kiti (Katalog no: K795-100) kullanıldı. Deney üreticinin yönergelerine uygun olarak yapılmıştır. Deney ortamında 20 µL örnek kullanılmıştır. Kısaca özetle her kuyuya 20 µL örnek ve 0-10 µL standart eklendi. Sonra tüm kuyular 50 µL'ye tampon ile tamamlandı. Ardından 50 µL çalışma çözeltisi eklendi. Sonuçlar hemen Molecular Devices firmasının Spectramax M2 mikroparka okuyucusunda 60 dakika boyunca florometrik olarak Ex/Em: 535/587nm dalga boyunda kinetik olarak okutuldu. Sonuçlar lineer standart grafik kullanılarak hesaplandı.

Bu test yönteminin prensibi MAO aktivitesi sonucu oluşan hidrojen peroksitin florofor madde ile etkileşerek ışımaya dayanır.

MAO enzim aktivitesi ünitesi tanımı: 25 ° C'de dakikada 1.0 µmol H₂O₂ üreten enzim miktarı olarak tanımlanır. Spesifik enzim (MAO) aktivite ise mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak tanımlanır ve birimi ünite/mg protein veya µU/mg protein şeklinde ifade edilir.

TBARS (MDA)

Malondialdehit (MDA) ölçümünde *Cayman Chemical* TBARS analiz kiti (Katalog no:10009055) kullanıldı. Deney üreticinin yönergelerine uygun olarak yapılmıştır. Deney ortamında 100 µL örnek kullanılmıştır. Kısaca özetle her deney tüpüne 100 µL örnek ve standart eklendi. Sonra tüm tüplere 100 µL SDS çözeltisi ve 4ml renk reaktifi eklenerek üzerleri kapatılıp 1 saat 100°C sıcaklıkta inkübe edildi. Reaksiyonu durdurmak için buz üzerinde 10 dakika bekletildi. Ardından 10 dakika 1600 xg'de 4 °C'de santrifüj edildi ve ölçüm öncesi oda sıcaklığına getirildi. Tüm tüplerden 150 µL alınarak 96 kuyulu plakalara eklendi ve sonuçlar hemen Molecular Devices firmasının Spectramax M2 mikropilaka okuyucusunda 530 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar lineer regresyon analizi ile standart grafikten elde edildi.

Süper Oksit Dismutaz Aktivitesi

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi için *BioVision* SOD aktivite kiti (Katalog no:K335-100) kullanıldı. Deney üreticinin yönergelerine uygun olarak yapılmıştır. Bu yöntem SOD aktivitesi ile oluşan süperoksit iyonlarının ksantin oksidaz enzimini inhibe etmesi üzerine kuruludur. SOD aktivitesi ölçümü Ksantin oksidaz aktivitesine kenetlenerek enzim aktivitesinin ölçümü gerçekleştirilir. SOD aktivitesi sonucu oluşan süperoksit iyonları ksantin oksidaz aktivitesini inhibe eder.

Deney ortamında 20 µL örnek kullanılmıştır. Kısaca özetle her kuyuya 20 µL örnek eklendi. Sonra tüm kuyulara 200 µL çalışma çözeltisi ve 20 µL enzim çalışma reaktifi eklenerek üzerleri kapatılıp 20 dakika 37°C sıcaklıkta inkübe edildi. Sonuçlar hemen Molecular Devices firmasının Spectramax M2 mikropilaka okuyucusunda 450 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar SOD aktivite inhibisyon oranına göre hesaplandı.

Ünite tanımı: SOD aktivite ünitesi, WST-1 formazan oluşumu oranının% 50 azalmasına neden olacak enzim miktarı olarak tanımlanır. Spesifik aktivite ise mg protein başına ünite cinsinden ifade edilir. Birimi ise ünite/mg protein veya µU/mg protein şeklinde ifade edilir.

Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi

Glutasyon peroksidaz (GPx) aktivite ölçümü için; finalde pH=7,0 100mM potasyum fosfat tamponu, 0,2mM NADPH, 1mM redükte glutasyon (GSH), 1mM EDTA, 4mM sodyum azit, 10U/ml Glutasyon Redüktaz enzimi, 0,1mM hidrojen peroksit ve örnek içerecek şekilde aktivite ortamı hazırlandı. Sonuçlar hemen Molecular Devices firmasının Spectramax M2 mikropilaka okuyucusunda 340 nm dalga boyunda 10 dakika boyunca kinetik olarak okundu. Sonuçlar NADPH'nin 340 nm'deki absorpsiyon düşüşü üzerinden hesaplandı (Flohe ve Günzler 1984).

Ünite tanımı: 1 ünite glutasyon peroksidaz, 25 ° C ve pH 8.0'de indirgenmiş glutasyon (GSH), glutasyon redüktaz ve tert-butyl hidroperoksit varlığında kenetlenmiş bir reaksiyonda NADPH'den dakikada 1.0 µmol NADP + oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanır. Spesifik aktivite ise mg protein başına düşen ünite olarak ifade edilir. Birimi ise ünite/mg protein veya µU/mg protein şeklinde ifade edilir.

Glutasyon Redüktaz Aktivitesi

Glutasyon redüktaz aktivitesi (GR) Stall metoduna göre çalışıldı (Ulus ve Tandogan 2007). Aktivite ortamı finalde pH=7,4 100mM Sodyum fosfat tamponu, 0,2mM NADPH, 1mM okside glutasyon (GSSG) ve örnek içerecek şekilde hazırlandı. Sonuçlar hemen Molecular Devices firmasının Spectramax M2 mikropilaka okuyucusunda 340 nm dalga boyunda 10 dakika boyunca kinetik olarak okundu. Sonuçlar NADPH'nin 340 nm'deki absorpsiyon düşüşü üzerinden hesaplandı.

GR aktivite ünitesi dakikada 1 umol GSSG'nin indirgenmesini kataliz eden enzim miktarı olarak tanımlanır, dakikada 1 umol NADPH'nin oksidasyonuna eşdeğerdir. Spesifik aktivite ise mg protein başına ünite cinsinden ifade edilir. Birimi ise ünite/mg protein veya µU/mg protein şeklinde ifade edilir.

Tumör Nekrozis Faktör-α

Tumör nekrozis faktör-α (TNF-α) ölçümünde *Bioassay Technology Laboratory* Tumör Nekrozis Faktör-α (TNF-α) ELISA kiti (Katalog no: E0764Ra) kullanıldı. Bu kitte mikropilakalara monoklonal TNF-α antikoru yapıştırılmış bulunmaktadır. Bu şekilde, örnek ve standartlarda var olan TNF-α bu antikor tarafından tanınır ve tutulur. Daha

sonra bağlı örnekleri tanıyan biyotinlenmiş bir poliklonal TNF- α antikorunu tutunmuş proteini tanıır. Sandviç sisteminin en son bileşeni olan streptavidin–peroksidaz konjugatı ise biyotinli antikorunu tanıyarak ortama eklenen kromojen substrat yardımı ile çok düşük miktarlarda bile var olan TNF- α miktarının saptanmasını sağlar. Deney üreticinin yönergelerine uygun olarak yapılmıştır. Deney ortamında 40 μ L örnek kullanılmıştır. Kısaca özetle her kuyuya 40 μ L örnek ve 50 μ L standart eklendi. Sonra örneklerin bulunduğu kuyuya 10 μ L biyotinlenmiş TNF- α eklenerek üzerleri kapatılıp 1 saat 37°C sıcaklıkta inkube edildi. Daha sonra kuyular dört kez 200 μ L yıkama tamponu ile yıkandı. Sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kuyu başına 100 μ L streptavidin–peroksidaz konjugatı eklenerek 10 dakika inkube edildi. İnkubasyon sonunda kuyular dört kez 200 μ L yıkama tamponu ile yıkandı. Sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kuyu başına 100 μ L kromojen substrat eklenerek 10 dakika 37°C’de karanlık ortamda inkube edildi. Bu sürenin sonunda renk oluşumu tepkimesini durdurmak amacı ile kuyu başına asidik 50 μ L durdurma çözeltisi eklendi ve sonuçlar hemen Molecular Devices firmasının Spectramax M2 mikropilaka okuyucusunda 450 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar 4 parametrelili regresyon analizi ile standart grafikten elde edildi.

İnterlökin-1 β

İnterlökin-1 β (IL-1 β) ölçümünde *Bioassay Technology Laboratory* İnterleukin 1-Beta ELISA kiti (Katalog no: E0119Ra) kullanıldı. Bu kitte mikropilakalara monoklonal IL-1B antikorunu yapıştirilmiş bulunmaktadır. Bu şekilde, örnek ve standartlarda var olan IL-1B bu antikor tarafından tanınır ve tutulur. Daha sonra bağlı örnekleri tanıyan biyotinlenmiş bir poliklonal IL-1B antikorunu tutunmuş proteini tanıır. Sandviç sisteminin en son bileşeni olan streptavidin – peroksidaz konjugatı ise biyotinli antikorunu tanıyarak ortama eklenen kromojen substrat yardımı ile çok düşük miktarlarda bile var olan IL-1B miktarının saptanmasını sağlar. Deney üreticinin yönergelerine uygun olarak yapılmıştır. Deney ortamında 40 μ L örnek kullanılmıştır. Kısaca özetle her kuyuya 40 μ L örnek ve 50 μ L standart eklendi. Sonra örneklerin bulunduğu kuyuya 10 μ L biyotinlenmiş IL-1B eklenerek üzerleri kapatılıp 1 saat 37°C sıcaklıkta inkube edildi. Daha sonra kuyular dört kez 200 μ L yıkama tamponu ile

yıkandı. Sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kuyu başına 100 µL streptavidin–peroksidaz konjugatı eklenerek 10 dakika inkube edildi. İnkubasyon sonunda kuyular dört kez 200 µL yıkama tamponu ile yıkandı. Sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kuyu başına 100 µL kromojen substrat eklenerek 10 dakika 37°C’de karanlık ortamda inkube edildi. Bu sürenin sonunda renk oluşumu tepkimesini durdurmak amacı ile kuyu başına asidik 50 µL durdurma çözeltisi eklendi ve sonuçlar hemen Molecular Devices firmasının Spectramax M2 mikropłaka okuyucusunda 450 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar lineer regresyon analizi ile standart grafikten elde edildi.

İnterlökın 6

İnterlökın 6 (IL-6) ölçümünde *Bioassay Technology Laboratory* İnterleukin 6 ELISA kiti (Katalog no: E0135Ra) kullanıldı. Bu kitte mikropłakalara monoklonal IL-6 antikoru yapıştırılmış bulunmaktadır. Bu şekilde, örnekle ve standartlarda var olan IL-6 bu antikor tarafından tanınır ve tutulur. Daha sonra bağlı örnekleleri tanıyan biyotinlenmiş bir poliklonal IL-6 antikoru tutunmuş proteini tanır. Sandviç sisteminin en son bileşeni olan streptavidin – peroksidaz konjugatı ise biyotinli antikoru tanıyarak ortama eklenen kromojen substrat yardımı ile çok düşük miktarlarda bile var olan IL-6 miktarının saptanmasını sağlar. Deney üreticinin yönergelerine uygun olarak yapılmıştır. Deney ortamında 40 µL örnekle kullanılmıştır. Kısaca özetle her kuyuya 40 µL örnekle ve 50 µL standart eklendi. Sonra örneklelerin bulunduğu kuyuya 10 µL biyotinlenmiş IL-6 eklenerek üzerleri kapatılıp 1 saat 37°C sıcaklıkta inkube edildi. Bu kuyular dört kez 200 µL yıkama tamponu ile yıkandı. Sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kuyu başına 100 µL streptavidin– peroksidaz konjugatı eklenerek 10 dakika inkube edildi. İnkubasyon sonunda kuyular dört kez 200 µL yıkama tamponu ile yıkandı. Sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kuyu başına 100 µL kromojen substrat eklenerek 10 dakika 37°C’de karanlık ortamda inkube edildi. Bu sürenin sonunda renk oluşumu tepkimesini durdurmak amacı ile kuyu başına asidik 50 µL durdurma çözeltisi eklendi ve sonuçlar hemen Molecular Devices firmasının Spectramax M2 mikropłaka okuyucusunda 450 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar 4 parametrelili regresyon analizi ile standart grafikten elde edildi.

3.4. Rutin Biyokimyasal Testlerin Analizi

Deney hayvanlarından alınan serum örneklerinde biyokimyasal analizler yapıldı. Bu analizler glukoz, kan üre nitrojen (BUN), kreatinin, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), albumin, globulin, total kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol ve trigliserid idi. Testler Beckman Colter AU 5800 otoanalizör cihazı kullanılarak Hacettepe Erişkin Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında yapıldı.

3.5. İstatiksel Analizler

Çalışmada elde edilen veriler SPSS 25.0 (Statistical Package for the Social Sciences version 25.0) ile değerlendirildi. Sıçanların başlangıç ve son ağırlıklarının karşılaştırılmasında paired sample T test kullanıldı. Tüm gruplar kendi içlerinde dağılım açısından Kolmogorov Simirnov ve histogram ile incelendi. Varyansların homojenitesi ise Levene testi ile değerlendirildi. Grupları birbiriyle karşılaştırmada grup içi değerler homojen dağılım gösteriyorsa ANOVA ve bonferroni düzeltmeli post hoc testi, göstermediğinde Kruskal- Wallis testi ve iki grup karşılaştırmasında Pair wise comparison (Mann- Whitney U) testi kullanıldı. Değerler ortalama (ort) \pm SE olarak verildi. $P < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Genel Bulgular

Tüm hayvanların genel durumları günlük olarak değerlendirildi. Sisplatin (Cis) grup, Cis+çözücü ve Cis+melatonin (Mel) gruplarındaki hayvanlarda Cis enjeksiyonundan sonraki günlerde hafif bir genel durum bozukluğu gözlemlendi. Diğer üç gruptaki sıçanların genel durumları iyi idi.

Sıçanların ağırlıkları, başlangıç ve deney bitiminde ölçüldü. Her grubun başlangıç ve son ağırlıkları karşılaştırıldığında tüm sıçanlar ağırlık artışı gösterdi. Artış kontrol, Çözücü, Mel ve Cis+Mel gruplarındaki hayvanlarda daha fazla idi ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Cis uygulanan iki grupta (Cis ve Cis+Çözücü) ağırlık artışı anlamlı bir farklılık göstermedi ($p>0.05$). Bu, Mel'in Cis'in yaptığı iştah kaybı üzerinde etkili olduğunu düşündürmektedir. Tablo 4.1 de hayvanların başlangıç ve son ağırlıkları verilmiştir.

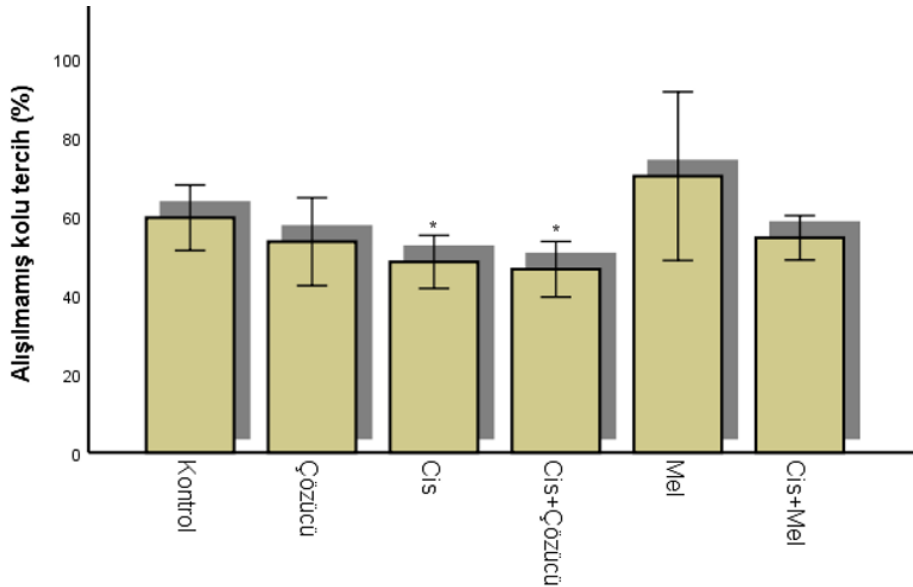
Tablo 4.1. Sıçanların ağırlık (gram) ölçümü sonuçları (ortalama \pm SE)

Gruplar	Başlangıç ağırlık (gr)	Son ağırlık (gr)	P değeri
Kontrol (n=8)	257.00 \pm 2.90	301.25 \pm 3.37	<0.05
Çözücü (n=8)	254.37 \pm 9.05	296.25 \pm 8.17	<0.05
Cis (n=8)	217.88 \pm 3.08	223.38 \pm 2.73	>0.05
Cis+Çözücü (n=8)	217.25 \pm 3.47	227.88 \pm 6.55	>0.05
Mel (n=8)	245.37 \pm 14.10	305.63 \pm 4.94	<0.05
Cis+Mel (n=8)	217.50 \pm 4.23	236.25 \pm 6.73	<0.05

4.2. Davranış Tesleri

4.2.1. T- Maze Testi

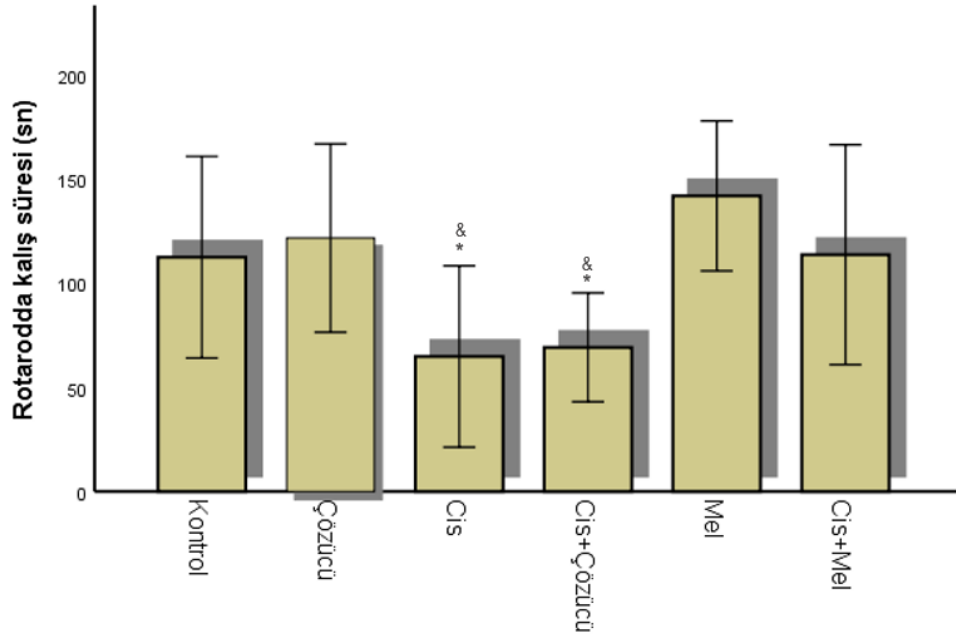
T-maze testinde önemli olan hayvanın alışılmamış tarafa gidişinin toplam gidiş sayıları içinde daha yüksek olup olmamasıdır. Bu nedenle alışılmamış tarafa gidiş yüzdesi kognitif fonksiyon kriteri olarak alındı. Çalışmada alışılmamış kola gidiş yüzdesi göz önüne alındığında gruplar arasında anlamlı bir fark saptandı ($p<0.05$). Grup içi karşılaştırmalarda kontrol grubun alışılmamış kolu tercih yüzdesi Cis ve Cis+Çözücü gruplarının değerlerinden daha yüksekti ($p<0.05$). Buna karşılık kontrol grup ile Cis+Mel grubun alışılmamış kola gidiş yüzdelerinde fark saptanmadı ($p>0.05$). Cis, Cis+Çözücü grupları ile Cis+Mel grubun değerleri karşılaştırıldığında Cis+Mel grubun alışılmamış kola gidiş yüzdesinde anlamlılığa ulaşmayan bir artış vardı. Bu da Cis verildikten sonra kontrole göre bozulan *T-maze* testi sonuçlarının Cis'e Mel eklenmesiyle kontrol seviyelerine yükseldiğini göstermektedir. Sonuçta Cis'e bağlı bir bozukluk olduğu ve Cis'in yaptığı kognitif bozukluğun Mel tarafından düzeltilebildiği görüldü (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. T maze testinde alışılmamış kolu tercih yüzdelerinin dağılımı. Kontrol grubun alışılmamış kolu tercih yüzdesi Cis ve Cis+Çözücü gruplarının değerlerinden daha yüksekti ($p<0.05$). Cis+Mel grubun değerleri ile kontrol grubun alışılmamış kolu kullanması arasında fark yoktu. * Kontrole göre anlamlı ($p<0.05$).

4.2.2. Rotarod Testi

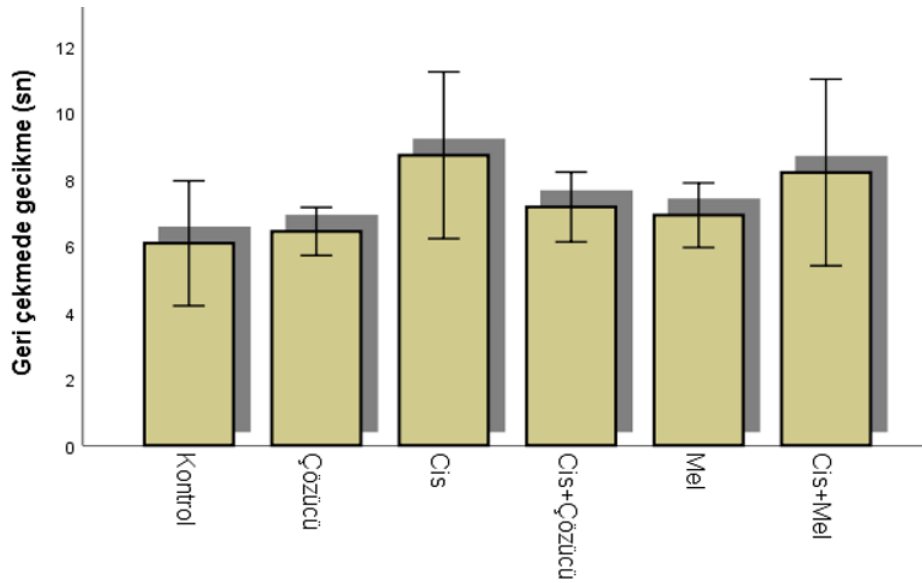
Motor performansı göstermek amacıyla yapılan *rotarod* testinde grupların çoklu karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılık saptandı ($p<0.05$). Cis ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık vardı ($p<0.05$). Cis grup kontrol gruba göre rotarodda daha az süre kaldı. Rotarodda kalış en düşük süre Cis ve Cis+Çözücü gruplarında saptandı. Bu Cis'in motor performans üzerinde belirgin etkisi olduğunu göstermektedir. Cis'e Mel eklenmesiyle rotarodda kalış süresi uzayarak kontrol düzeyine ulaştı. Cis+Mel grup, diğer Cis verilen sıçanlara göre rotarodda daha uzun süre kalış göstermiş oldu. Dolayısıyla Cis+Mel grubun sonucu Cis verilen diğer iki grubun sonuçlarına göre daha iyi ($P<0.05$) ve kontrol grubun değerinden istatistiksel olarak farklı değildi. Cis'in yaptığı motor performans bozukluğunun Mel eklenmesiyle düzeldiği görülmektedir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Rotarod testi sonuçları. Kontrol, Çözücü ve Mel gruplarına göre Cis ve Cis+Çözücü gruplarda rotarodda kalış süresi belirgin düşükken ($p<0.05$) Cis+Mel grupta bu fark ortadan kalkmaktadır. Kontrole göre Cis+Mel grubun değerleri farklılık göstermemektedir. Cis ve Cis+Çözücü gruplara göre Cis+Mel grupta rotarodda kalış süresi belirgin uzundu. * Kontrole göre, & Cis+Mel'e göre anlamlı ($p<0.05$).

4.2.3. Hot Plate Testi

Duyu kaybını göstermek amacıyla kullanılan *Hot plate* testinde geri çekmede gecikme süresinde gruplar arası karşılaştırmada anlamlı bir fark saptanmamakla beraber şekil 4.3'de de görüldüğü gibi Cis ve Cis+Mel grupları kontrole göre daha uzun geri çekmede gecikme süresi gösterdi. Cis+Mel grubun geri çekmede gecikme süresi Cis grubuna göre daha kısa idi. Fakat standart hataların fazla olması nedeniyle anlamlı bir farklılığa ulaşamadığı görülmektedir ($p>0.05$).



Şekil 4.3. Hot Plate testinde geri çekmede gecikme süreleri. Test sonuçlarında gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu.

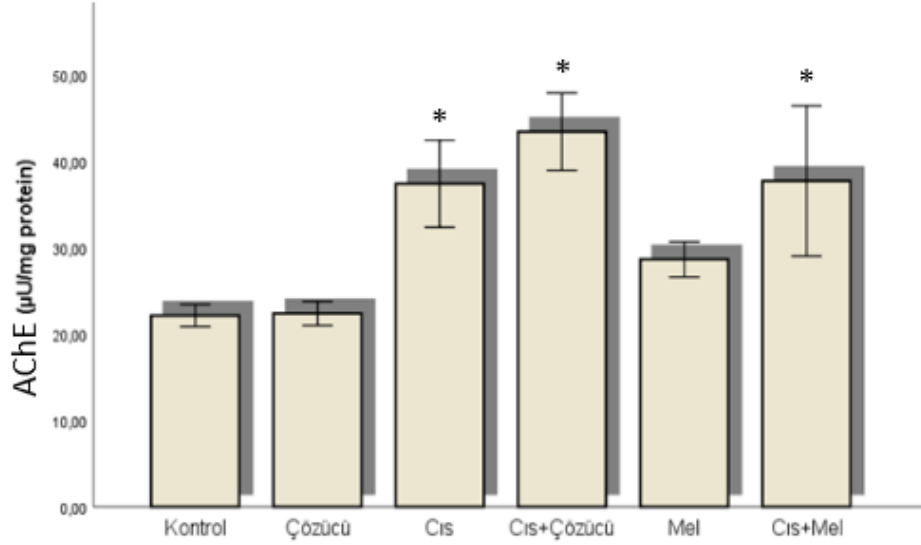
4.3. Biyokimyasal Analizler

4.3.1. Beyin Doku Örneklerinde Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Analizleri

Asetilkolinesteraz Aktivitesi

Beyin dokusunda AChE seviyeleri gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdi ($p<0.05$). Çoklu grup karşılaştırmalarında kontrol grubun beyin AChE seviyeleri Cis, Cis+Çözücü ve Cis+Mel gruplarına göre belirgin düşük idi ($p<0.05$). Şekil 4.4 ve Tablo 4.2'de grupların AChE seviyeleri verilmiştir. Kontrol grubun AChE seviyesi $22.18 \pm 0.54 \mu\text{U}/\text{mg}$ protein iken Cis grupta bu değer $36.81 \pm 2.36 \mu\text{U}/\text{mg}$ proteine yükseldi.

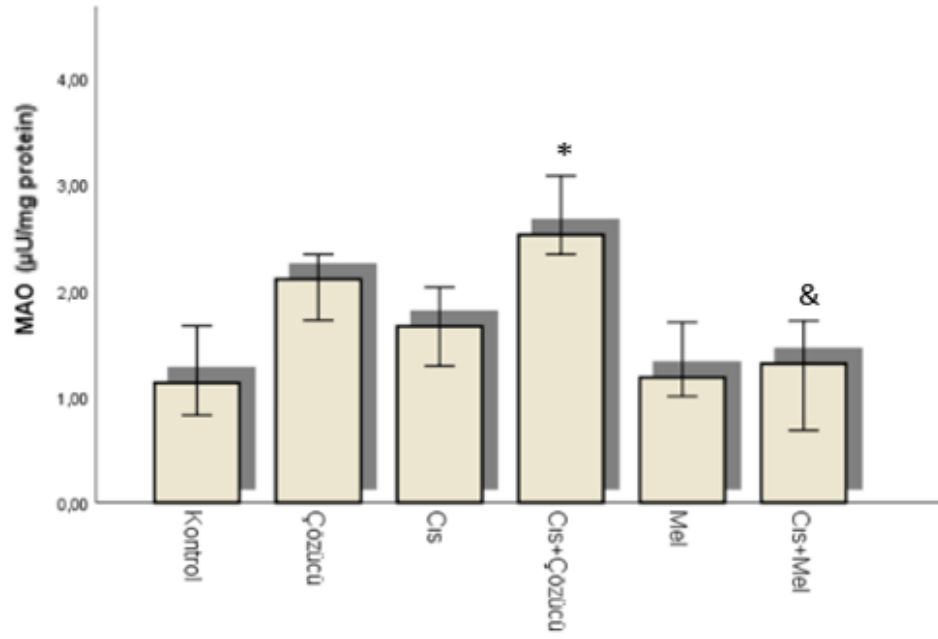
Bu anlamlı yükseklik Cis'e bağılı kolinerjik sistemde belirgin bozukluk olduğunu göstermektedir. Gruplar içerisinde en yüksek değer Cis+Çözücü gruba aitti. Cis ve Cis+Mel gruplarının AChE seviyeleri benzerlik göstermekle beraber Cis+Çözücü ve Cis+Mel grupları karşılaştırıldığında Cis+Mel grubunda anlamlılığa ulaşmayan bir düşme görüldü (sırasıyla 40.75 ± 0.85 ve 36.32 ± 3.90 $\mu\text{U}/\text{mg}$ protein) ($p > 0.05$).



Şekil 4.4. Beyin dokusunda AChE seviyeleri. Cis uygulanan her üç grubun beyin AChE seviyeleri kontrol grubun değerlerine göre anlamlı yüksekti ($p < 0.05$). Cis, Cis+Çözücü ve Cis+Mel grupları arasında belirgin bir fark yoktu. * Kontrolle göre anlamlı ($p < 0.05$).

MAO Aktivitesi

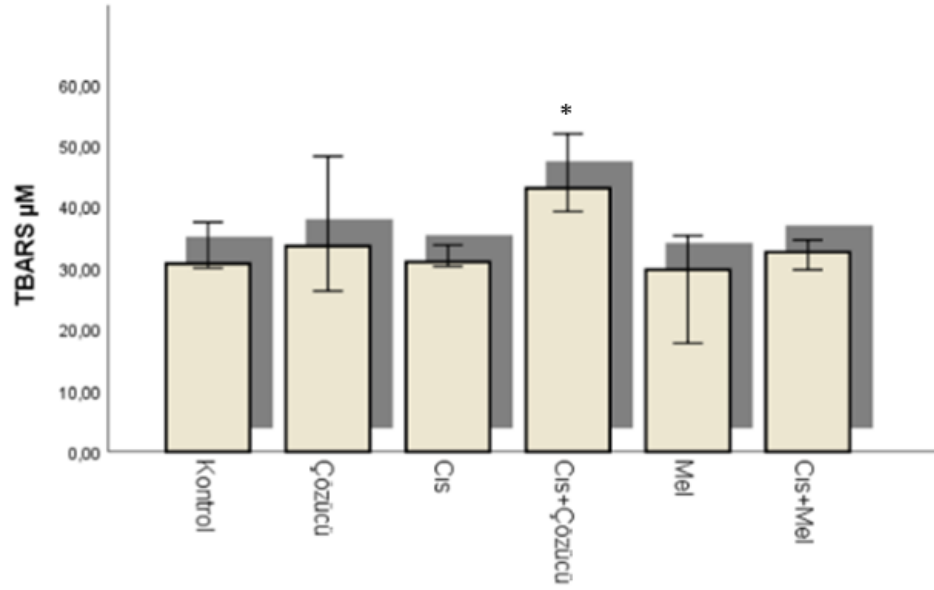
Beyin dokusunda MAO seviyeleri kontrol ve Cis+Mel gruplarında daha düşüktü. Cis uygulanan gruplardan sadece Cis+Çözücü ile kontrol grup arasında anlamlı bir farklılık saptandı ($p < 0.05$). Kontrol grubun MAO seviyesi 1.15 ± 0.11 den Cis grupta $1.64 \pm 0.11 \mu\text{U}/\text{mg}$ proteine, Cis+Çözücü grupta $2.64 \pm 0.12 \mu\text{U}/\text{mg}$ proteine yükseldi. Kontrol grup ile Cis+Mel grup karşılaştırıldığında anlamlı bir fark yoktu ($p > 0.05$). Cis+Mel grubun MAO seviyeleri Cis+Çözücü gruba göre belirgin olarak düşüktü ($p < 0.05$ sırasıyla 1.26 ± 0.15 ve 2.64 ± 0.12 $\mu\text{U}/\text{mg}$ protein). Bu sonuçlar Mel eklenmesinin oksidatif stres üzerinde etkili olduğunu düşündürmektedir. Şekil 4.5. ve Tablo 4.2' de MAO seviyelerinin gruplardaki dağılımı verilmiştir.



Şekil 4.5. Beyin dokusunda MAO seviyeleri. MAO seviyeleri Cis+Çözücü grubunda en yüksekti. Kontrol ve Cis grubu arasında anlamlı bir fark saptanmazken Cis+Çözücü grupta MAO seviyeleri kontrol gruba göre belirgin yüksekti ($p<0.05$). Mel eklenmesi sonrası Cis+Mel grupta MAO seviyesi kontrol grup seviyelerine indi. * Kontrole göre anlamlı, & Cis+Çözücüye göre anlamlı ($p<0.05$).

TBARS Seviyeleri

Beyin dokusunda TBARS seviyeleri MAO'ya benzer şekilde Cis+Çözücü grupta en yüksekti. Gruplar arası çoklu karşılaştırmalarda sadece Cis+Çözücü ve Mel grup arasında anlamlılık saptandı ($p<0.05$). Kontrol grup ile Cis+Çözücü grubun TBARS seviyesi istatistiksel olarak anlamlılık göstermemekle beraber ($p>0.05$) Cis+Çözücü grupta TBARS seviyeleri daha yüksekti. Cis ve Cis+Mel grupları arasında belirgin bir farklılık yoktu. Cis+Çözücü ve Cis+Mel gruplarına bakıldığında Cis+Çözücü grubun TBARS seviyesi Cis+Mel grubunkine göre daha yüksekti; fakat fark anlamlılığa ulaşamadı ($p>0.05$). Bu Mel'in TBARS üzerinde kısmi bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Grupların beyin dokusundaki TBARS seviyeleri şekil 4.6.'da ve Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Beyin dokusundaki TBARS seviyeleri. Beyin dokusunda grupların TBARS seviyeleri benzerdi. Cis+Çözücü grupta en yüksekti. Kontrol grubu ile anlamlı bir farklılık ortaya çıktı. Cis+Mel grubun TBARS seviyesi Cis+Çözücü grubunkine göre düşük olmakla beraber anlamlı farklılığa ulaşamadı. *Kontrol gruba göre anlamlı (P<0.05).

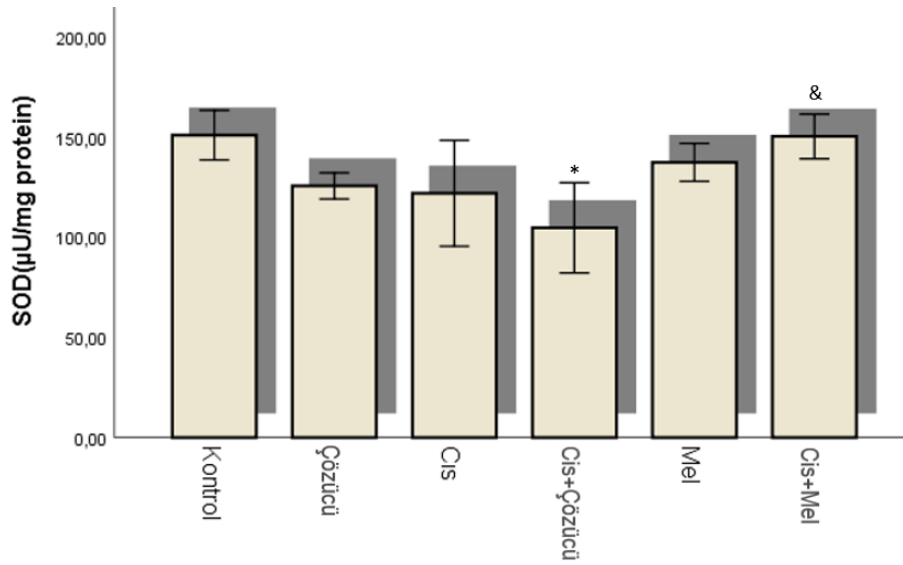
Tablo 4.2. Beyin dokusundaki oksidatif stres belirteçlerinin gruptaki seviyeleri (ortalama±SE)

Gruplar	AchE (µU/mg protein)	MAO (µU/mg protein)	TBARS (µM)
Kontrol (n=8)	22.18±0.54	1.15±0.11	32.17±1.00
Çözücü (n=8)	22.45±0.77	2.05±0.09	31.41±1.83
Cis (n=8)	36.81±2.36*	1.64±0.11	31.65±0.57
Cis+Çözücü (n=8)	40.75±0.85*	2.64±0.12*	44.77±2.40*
Mel (n=8)	28.68±0.86	1.26±0.08	26.98±2.24
Cis+Mel (n=8)	36.32±3.90*	1.26±0.15&	32.19±0.78

Gruplar arası anlamlılıklar * ve & ile gösterildi. AChE seviyeleri kontrole göre Cis, Cis+Çözücü ve Cis+Mel gruplarında daha yüksekti (*p<0.05). MAO seviyeleri kontrole göre Cis+Çözücüde yüksekti (*p<0.05), Cis+Çözücüye göre Cis+Mel grupta daha düşüktü (&p<0.05). TBARS seviyeleri Cis+Çözücü grupta kontrol gruba göre daha yüksekti (*p<0.05). Cis+Mel grupta TBARS seviyesi düşmekle beraber Cis+Çözücü gruba göre anlamlılık göstermedi.

Beyin Dokusundaki Antioksidan Enzim Seviyeleri

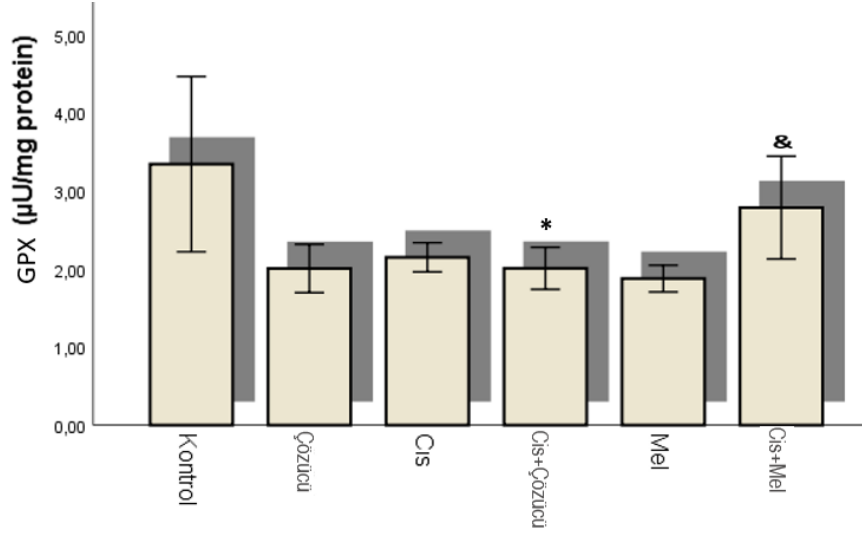
Beyin dokusundaki SOD seviyeleri kontrole göre Cis ve Cis+Çözücü grupta düşüktü. Sadece kontrol ile Cis+Çözücü arasında anlamlı bir fark saptandı ($p<0.05$). Kontrol ve Cis+Mel grup arasında farklılık yoktu. Cis+Çözücü ile Cis+Mel grupları karşılaştırıldığında Cis+Mel gruptaki enzim yüksekliğinin belirgin bir farklılığa ulaştığı saptandı ($p<0.05$) (Tablo 4.3, Şekil 4.7). Bu durum Cis+Çözücü ile enzim aktivitesinin düşerken Mel eklenmesiyle aktivitenin arttığını göstermektedir.



Şekil 4.7. Beyin dokusundaki SOD enzim aktiviteleri.

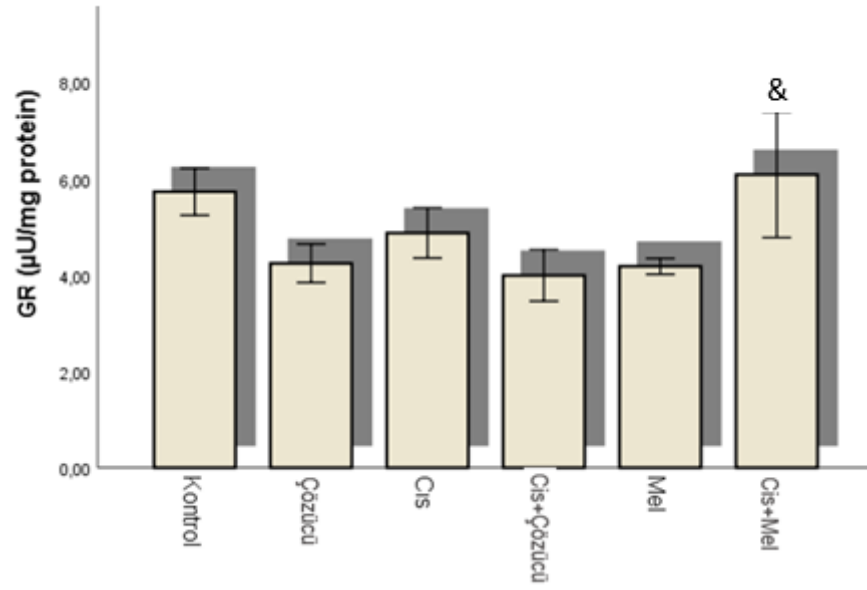
*Kontrole göre anlamlı, &Cis+Çözücüye göre anlamlı ($p<0.05$).

Beyin dokusundaki GPx seviyeleri gruplar arasında anlamlı bir fark gösterdi ($p<0.05$). Cis ve Cis+Çözücü gruplarında enzim aktivitesi düşüktü. Çoklu grup karşılaştırmalarında sadece kontrole göre Cis+Çözücü grup enzim aktivitesi anlamlı bir farklılığa ulaştı ($p<0.05$). Buna karşılık Cis+Mel grubun enzim aktivitesi ile kontrol grup arasında farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Cis+Çözücü grup ile Cis+Mel grup enzim aktivitelerinde belirgin farklılık vardı ($p<0.05$). Cis+Mel grupta enzim aktivitesi daha yüksekti. Sonuçta Cis ile GPx aktivitesi düşerken tedaviye Mel eklenmesi ile antioksidan enzim aktivitesinde bir artış görüldü (Şekil 4.8. ve Tablo 4.3.).



Şekil 4.8. Beyin dokusundaki GPx aktiviteleri. Kontrol grup enzim aktivitesi Cis+Çözücü gruba göre belirgin yüksekken, kontrol ve Cis+Mel grupları arasında fark yoktu. Buna karşılık Cis+çözücü gruba göre Cis+Mel grubun enzim aktivitesi anlamlı bir yükselme gösterdi. *Kontrol gruba göre, & Cis+Çözücüye göre anlamlı ($p<0.05$).

Beyin dokusundaki GR aktivitesi gruplar arasında yine anlamlı bir farklılık gösterdi ($p<0.05$). Bu fark SOD ve GPx' deki ile benzerdi. Cis+Çözücü ve Cis grubun enzim aktiviteleri düşüktü. Fakat bu düşme kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılığa ulaşmadı ($p>0.05$). Tedaviye Mel eklenmesi ile enzim aktivitesinde artış oldu. Bu artış Cis+çözücü grup ile istatistiksel bir farklılık gösterdi ($p<0.05$). Şekil 4.9. ve Tablo 4.3. de görüldüğü gibi Cis'e Mel eklenmesi enzim aktivitesinde artışa neden oldu.



Şekil 4.9. Beyin dokusundaki GR aktiviteleri. Cis+Çözücü ve Cis grubun GR aktiviteleri düşük, fakat Kontrol grubuna göre anlamlı değildi. Buna karşılık Cis+Mel grubunda enzim aktivitesi Cis+Çözücü gruba göre belirgin yüksekti. &Cis+Çözücüye göre anlamlı ($p<0.05$).

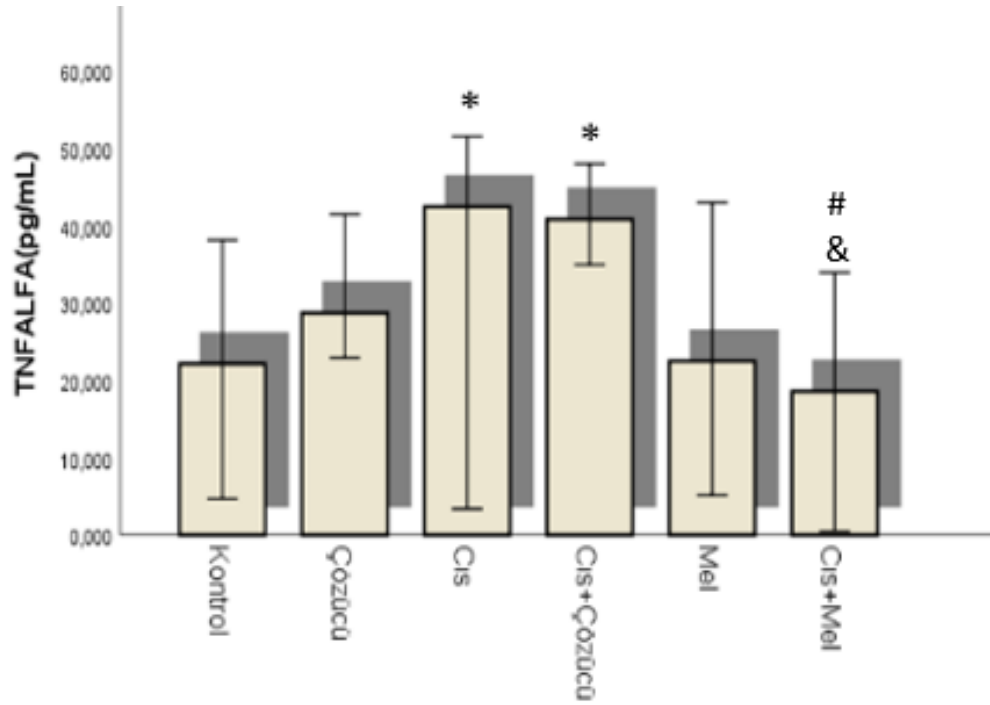
Tablo 4.3. Beyin dokusundaki antioksidan enzimlerde sisplatin nörotoksitesisi ve melatonin eklenmesi ile ortaya çıkan değişiklikler (ortalama±SE)

Gruplar	SOD (µU/mg protein)	GPX (µU/mg protein)	GR (µU/mg protein)
Kontrol (n=8)	150.77±5.24	2.34±0.47	5.73±0.14
Çözücü (n=8)	125.44±2.54	2.00±0.12	4.25±0.16
Cis (n=8)	121.77±11.16	2.15±0.08	4.88±0.22
Cis+Çözücü (n=8)	104.55±9.50*	2.00±0.11*	3.99±0.23
Mel (n=8)	137.19±4.00	1.88±0.07	4.18±0.06
Cis+Mel (n=8)	150.13±4.70&	2.79±0.28&	6.05±0.64&

Gruplar arası anlamlılıklar * ve & ile gösterildi. SOD seviyeleri kontrole göre Cis+Çözücü grupta daha düşüktü ($*p<0.05$); Cis+Çözücü gruba göre ise Cis+Mel grubunda yüksekti ($&p<0.05$). Kontrol ve Cis+Mel grupların SOD aktiviteleri farklı değildi. GPx aktivitesi kontrole göre Cis+Çözücü grubunda daha düşüktü ($*p<0.05$). Cis+Mel grup enzim aktivitesi kontrol gruba göre farklı değilken Cis+Çözücü grubun enzim aktivitesine göre belirgin yükseklik gösterdi ($&p<0.05$). GR aktivitesi kontrole göre diğer gruplar arasında anlamlı bir fark göstermedi ($p>0.05$); Cis+Çözücü gruba göre Cis+Mel grubunda daha yüksekti ($&p<0.05$).

Beyin Dokusundaki Sitokin Düzeyleri

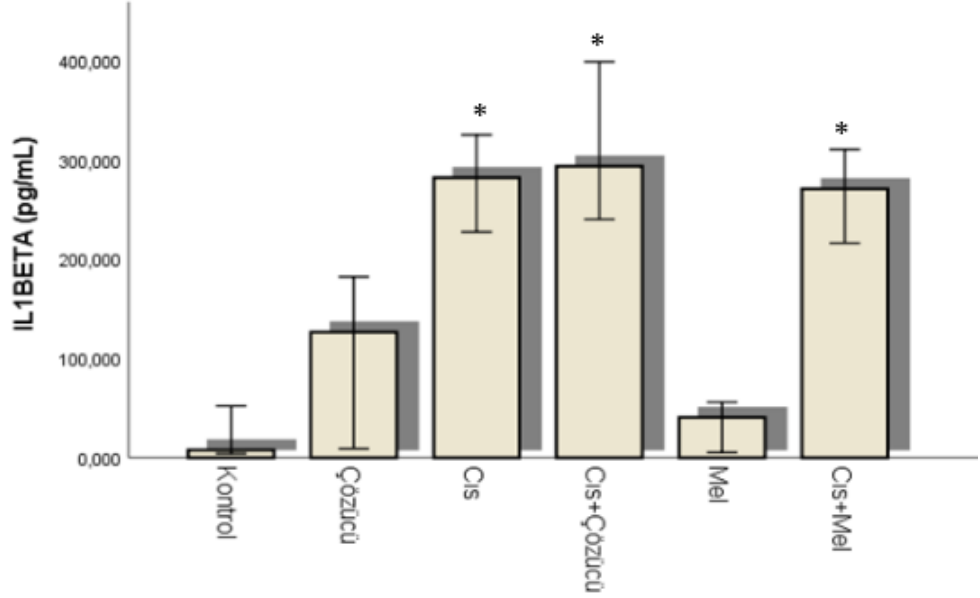
Beyin dokusundaki TNF- α seviyeleri gruplar arasında anlamlı bir farklılık gösterdi ($p<0.05$). Çoklu grup karşılaştırmalarında kontrol grubuna göre Cis ve Cis+Çözücü grupların TNF- α seviyelerinde belirgin bir yükseklik vardı ($p<0.05$) (Şekil 4.10.). Bu durum Cis kullanımı sonrası belirgin bir nöroinflamasyon olduğunu gösterdi. Cis+Mel grubun TNF- α seviyesi ise kontrol gruptan farklı değildi. Buna karşılık Cis ve Cis+Çözücü grubuna göre belirgin düşüktü ($p<0.05$). Bu bulgular Cis'in yaptığı nörotoksisite ile ilişkili nöroinflamasyon üzerinde Mel'in iyi bir antiinflamatuvar etkisi olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 4.10. Beyin dokusundaki TNF- α seviyeleri. Beyin dokusunda en düşük TNF- α seviyesi Cis+Mel grubuna aitti. Cis+Çözücü ve Cis grubuna göre fark anlamlı gözükmemektedir ($p<0.05$). Buna karşılık kontrol grup ile Cis+Mel grup seviyeleri arasında belirgin bir fark yoktu. * Kontrole göre, & Cis+çözücüye göre, # Cis'e göre anlamlı ($p<0.05$).

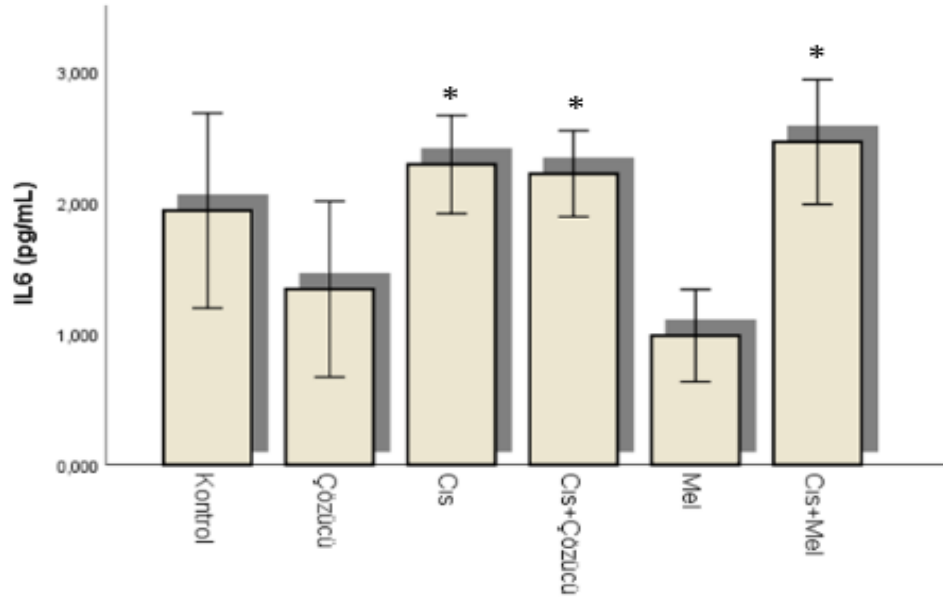
Beyin dokusunda IL-1 β seviyeleri gruplar arasındaki analizlerde anlamlı farklılık gösterdi ($p<0.05$). Kontrol ve Mel grubun IL-1 β seviyeleri gruplar arasında en düşüktü. Kontrol gruba göre Cis verilen 3 grubun (Cis, Cis+çözücü, Cis+Mel) sitokin seviyeleri belirgin yüksek idi ($p<0.05$). Cis gruba göre Cis+Mel grubun

değerlerinde hafif bir düşme kaydedilmekle beraber bu istatistiksel bir anlamlılığa ulaşacak düzeyde değildi. TNF- α 'da Mel sonrası belirgin düşme gözlenirken IL-1 β 'da fark olmaması bu sitokinin metabolizması ile ilişkili olabilir (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. Beyin dokusundaki IL-1 β seviyeleri. Beyin dokusunda en düşük IL-1 β seviyesi kontrol grubuna aitti. Kontrol grup ile Cis grupları arasında belirgin bir farklılık vardı. * Kontrole göre anlamlı ($p < 0.05$).

Beyin dokusundaki IL-6 seviyeleri Cis, Cis+Çözücü ve Cis+Mel gruplarında kontrol grubuna göre yüksek görülmekle birlikte istatistiksel bir anlamlılık saptanamadı. Kontrol grubun standart sapması yüksekti. En düşük seviyeye sahip olan Mel ve çözücü grubun IL-6 seviyeleri Cis uygulanan diğer üç grubun seviyelerinden belirgin olarak düşüktü ($p < 0.05$). Cis, Cis+Çözücü ve Cis+Mel grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanamadı. IL-6 seviyeleri de IL-1 β seviyelerine benzer şekilde Mel ile belirgin bir değişiklik göstermedi (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Beyin dokusundaki IL-6 seviyeleri. Beyin dokusunda en düşük IL-6 seviyesi Mel grubuna aitti. Kontrole göre üç Cis grubunda farklılık saptanmadı ($p>0.05$). *Çözücü ve Mel'e göre anlamlı ($p<0.05$.)

4.3.2. Rutin Biyokimyasal Testlerin Analizi

Grupların serum glukoz değerleri arasında anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$).

Tablo 4.4'de grupların glukoz değerleri verilmiştir.

Grupların serum BUN değerleri karşılaştırıldığında Cis uygulanan üç grubun BUN değerleri diğer gruplara göre daha yüksekti. Kontrol grup ile Cis, Cis+Çözücü ve Cis+Mel grupları arasında anlamlı bir fark saptandı ($p<0.05$). Bu Cis uygulanan gruplarda böbreğin etkilendiğini düşündürmektedir. Cis ve Cis+Mel gruplarının BUN seviyeleri arasında belirgin bir farklılığın olmaması Mel'in bu dozda ve bu sürede böbrek patolojisi üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

Serum kreatinin seviyelerine bakıldığında ise kontrol grubun kreatinin seviyesi, Cis ve Cis+Mel grupların kreatinin seviyelerinden anlamlı düşüktü ($p<0.05$). Bu sonuçlar Cis uygulanan gruplarda nefrotoksisite varlığını düşündürmektedir. Kreatinin seviyeleri ve BUN birlikte değerlendirildiğinde bu çalışmada Mel kullanımının Cis'in yaptığı nefrotoksisite üzerinde belirgin bir etkisi olmadığını göstermektedir. Tablo 4.4.'de grupların BUN ve kreatinin seviyeleri verilmiştir.

Tablo 4.4. Serum glukoz, BUN ve kreatinin seviyeleri

Gruplar	Glukoz (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Kreatinin (mg/dl)
Kontrol (n=8)	157.25±14.60	19.29±0.87	0.23±0.02
Çözücü (n=8)	144.75±15.83	17.40±1.18	0.21±0.01
Cis (n=8)	155.25±26.07	58.70±13.19*	0.95±0.19*
Cis+Çözücü (n=8)	150.13±15.84	41.26±9.90*	0.58±0.13
Mel (n=8)	175.75±15.08	15.98±0.80	0.21±0.02
Cis+Mel (n=8)	152.71±23.26	60.91±14.50*	0.90±0.20*

Serum BUN seviyeleri kontrole göre Cis, Cis+Çözücü ve Cis+Mel gruplarında daha yüksekti (*p<0.05). Kreatinin seviyeleri kontrol gruba göre Cis ve Cis+Mel gruplarında yüksek idi (*p<0.05); Cis+Çözücü grubundaki yükseklik anlamlılığa ulaşamadı.

Karaciğer enzimlerinden sadece ALT seviyesi kontrol ve üç Cis grubu (Cis, Cis+Çözücü ve Cis+Mel) arasında bir farklılık gösterdi (p<0.05). Bu fark, ALT seviyesi kontrolde daha yüksek olduğu için, toksisite lehine alınmadı. AST ve albümin seviyeleri gruplar arasında benzerdi (p>0.05). Karaciğer fonksiyon test sonuçları Tablo 4.5.'de verilmiştir.

Tablo 4.5. Karaciğer fonksiyon testlerinin değerlendirilmesi

	ALT (U/L)	AST (U/L)	Albumin (gr/dl)	Globulin (gr/dl)
Kontrol (n=8)	45.00±3.04	115.25±8.60	2.93±0.05	2.28±0.06
Çözücü (n=8)	40.25±1.80	101.38±3.66	2.81±0.03	2.25±0.03
Cis (n=8)	31.17±2.15*	115.83±6.12	2.83±0.06	2.37±0.07
Cis+çözücü (n=8)	29.25±1.73*	86.13±4.58	2.73±0.08	2.19±0.05
Mel (n=8)	50.38±1.75	96.38±3.67	2.86±0.06	2.37±0.04
Cis+Mel (n=8)	31.38±5.26*	94.63±11.89	2.80±0.13	2.46±0.16

*Kontrole göre anlamlı

Sıçanların lipit profilinde de (total kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol ve trigliserid) beklenildiği gibi gruplar arasında herhangi bir farklılık saptanmadı. Grupların lipit parametre sonuçları Tablo 4.6. da verilmiştir.

Tablo 4.6. Lipit seviyelerinin dağılımı

	Total Kolesterol (mg/dl)	HDL-kolesterol (mg/dl)	LDL-kolesterol (mg/dl)	Trigliserid (mg/dl)
Kontrol (n=8)	58.00±3.31	34.50±1.94	19.63±1.24	43.13±3.61
Çözücü (n=8)	55.38±2.15	33.63±1.07	18.63±1.50	49.38±4.77
Cis (n=8)	60.67±6.87	35.50±3.91	23.33±2.40	34.67±3.64
Cis+Çözücü (n=8)	61.75±5.08	36.13±2.78	25.00±2.17	45.88±5.63
Mel (n=8)	47.63±3.48	29.00±2.00	16.63±1.27	48.50±2.64
Cis+Mel (n=8)	70.88±12.69	45.38±8.00	28.00±4.75	47.13±9.04

5. TARTIŞMA

Kemoterapötik ilaçlar, farklı kanser türleri ve farklı tedavi protokollerinde sıklıkla kombine, daha seyrek olarak tek ilaç olarak kullanılırlar. Kemoterapötiklerin kullanılması ile kanser ölümlerinde belirgin azalmalar kaydedilmiştir. Uzun süredir farklı kanser türlerinde kullanılan platin grubu kemoterapötiklerin ilk ürünü olan sisplatin sonradan geliştirilen platin kökenli ilaçlar içinde halen en etkin ilaç konumundadır (Decatris ve ark 2004, Pignon ve ark 2008). Buna karşılık çeşitli organlarda ağır toksik etkileri vardır. Nefrotoksisite, hepatotoksisite, nörotoksisite, kemik iliği toksisitesi gibi. Bu yan etkileri en aza indirmek amacıyla ilacın etkin dozunun küçük dozlar şeklinde aralıklı kullanılması, doz azaltılması, zorda kalınan koşullarda ilacın kesilmesi önerilmektedir. Son yıllarda ise etkinliği artırmak dozu azaltmak amacıyla lipozomal ürünler gibi değişik formülasyonları önerilmektedir (Stathopoulos 2010). Sisplatinin yaptığı nöropati ilacın kesilmesinden sonra da beklenilenin aksine çok daha ciddi bulgularla ortaya çıkabilmektedir (Starobova ve Vetter 2017).

DRG kan beyin bariyeri olmadığından sisplatin toksisitesine ve sisplatin birikimine yatkın bir dokudur. En sık tutulum yeri olarak rapor edilmiştir (Krarup Hansen ve ark 2007). SSS tutulumu ile ilgili çalışma ve sonuçlar 1990'lı yıllardan sonra önem kazanmıştır. Sisplatinin beyin dokusunda birikebildiği deney hayvanı modellerinde gösterilmiştir (Rzeski ve ark 2004).

Sisplatin nörotoksisite modeli yapmada sisplatin dozu tartışmalı konuların başında gelmektedir. Çalışmalarda farklı dozlar ve değişik protokoller uygulanmıştır. Literatürde sıklıkla sisplatinin 6-12 mg/kg arasında tek doz i.p kullanımı veya insan kullanımını taklit etmek amacıyla düşük sisplatin dozlarının haftalık verildiği görülmektedir.

İlk çalışmalardan birinde araştırmacılar 2 mg/kg sisplatin 9 haftalık siklus şeklinde kullanarak periferik nöropati oluşturmuşlar ve DRG'de sisplatin konsantrasyonunu ölçerek ilacın biriktiğini göstermişlerdir (Cavaletti ve ark 1994). Bu düşük dozda sisplatinin kan beyin bariyerini geçerek beyin dokusunda birikmesi

tek yüksek doz kullanılan modellere göre daha zordur. Bir diğer araştırıcı grubu 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg ve 1 mg/kg sisplatinini üç ardışık günde vererek periferik nöropati modeli oluşturmuşlardır. En düşük dozda dahi nöropati bulguları saptanmış fakat düşük ve yüksek doz sisplatinin bu çalışmada nöropatik cevapları farklı olmuştur (Cata ve ark 2008). Mekanik ve termal uyarıya cevaplar değerlendirildiğinde yüksek doz sisplatin ile hipotaljezi görülürken düşük doz ile hiperaleji ortaya çıkmıştır.

Sisplatin 12 mg/kg tek dozla yapılan 7 günlük bir nörotoksisite modelinde hayvanların %50'sinin kaybedildiği rapor edilmiştir. Sisplatin verilen sıçanlarda beyin dokusunun histopatolojik incelenmesinde belirgin nörotoksisite gösterilmiştir (Hinduja ve ark 2015).

Yüksek doz sisplatin 12 mg/kg/gün üç ardışık gün kullanılan bir diğer sıçan çalışmasında, hayvanlar sisplatin kullanımının altıncı günü sakrifiye edildiklerinde histopatolojik incelemede heterokromatik vakolize nöronlar ve dilate kapiller damarlar tespit edilmiştir. Bu yüksek dozlarda sisplatinin nörotoksik olduğunun iyi bir göstergesidir. Çünkü artan kan sisplatin seviyesi hem sistemik oksidatif stres yaparak kan beyin bariyerinin geçirgenliğini bozmakta hem de beyne geçen sisplatin miktarı daha fazla olmaktadır (Karavelioglu ve ark 2015).

Sisplatin 2 mg/kg haftada iki kez i.p 4 hafta verilen bir çalışmada araştırıcılar bu dozun ortaya çıkardığı nörotoksisitenin sisplatinin direkt nörotoksik etkisi ile ilişkili olduğunu ilaç nefrotoksisitesinin modülasyonuna bağılı olmadığını bu dozun sıçanların genel durumunu bozmayacağını ve yeterli olacağını tartışmışlardır (Zaki ve ark 2017).

Rzeski ve ark kemoterapötik ilaçların potent nörotoksinler olduğunu göstermek amacıyla yaptıkları *in vitro* ve *in vivo* çalışmada sıçanlara 5-10-15 mg/kg i.p sisplatin verdikten sonra 24. saatte beyin dokusunda histopatolojik çalışmada belirgin ultrastrüktürel patolojiler saptamışlardır. Harabiyet derecesi doza bağılı olarak artmıştır. 5 mg/kg ile harabiyet daha hafifken 15 mg/kg dozda ileri derecede harabiyet tespit edilmiştir (Rzeski ve ark 2004).

Bizim çalışmamızda kullandığımız 6 mg tek doz bu çalışmaya göre hafif derecede bozuklukla uyumlu olmaktadır. Davranış test sonuçlarında hot plate hariç

elde ettiğimiz veriler yeterli bir nörotoksitenin oluştuğunu doğrulamaktadır. Histopatolojik çalışmanın olmaması bizim çalışmamızın önemli bir kısıtlılığıdır.

Nöropatinin patogenezi kesin bilinmemekle beraber nöroinflamasyon ve oksidatif stres üzerinde en sık durulan mekanizmalardır (Abdel-Wahab ve Moussa 2019, Areti ve ark 2014, Brouwers ve ark 2009, Chtourou ve ark 2015, Dasari ve Tchounwou 2014, Hashem ve ark 2015, Khadrawy ve ark 2019, Lomeli ve ark 2017, Podratz ve ark 2011).

Sisplatinin yaptığı nörotoksiteyi önlemek amacıyla farklı antioksidan ve antiinflamatuvar ajanlar kullanılmıştır. Alfa lipoik asit, melatonin, balık yağı, eritropoetin, E vitamini gibi (Kamisi ve ark 2014, Nowis ve ark 2007, Pace ve ark 2010, Rodriguez-Menendez ve ark 2008, Tuncer ve ark 2010).

Bu çalışmada sağlıklı sıçanlar kullanılarak sisplatinin yaptığı santral nörotoksite üzerinde iyi bir antioksidan ve antiinflamatuvar ajan olan melatoninin etkisi araştırılmıştır. Sisplatin verilen sıçanların genel sağlık durumları kontrol grubuna göre hafif bir bozulma göstermiştir. Aynı koşullarda ve aynı besinlerle beslenen sıçanlarda ağırlık dağılımı sisplatin uygulanmayan gruplarda belirgin artış gösterirken, Cis ve Cis+Çözücü kullanımı sonrası ağırlık artışı olmasına rağmen fark anlamlı bulunmamıştır. Buna karşılık Cis gruba Mel eklenmesiyle ağırlık artışı kontrol gruplardakine benzer şekilde artış göstermiştir. Bu melatoninin genel durum ve iştah merkezi üzerinde olumlu etkisinin olduğunu göstermektedir.

Sisplatinin yaptığı periferik nöropati üzerinde melatoninin etkisini araştıran bir çalışmada 10 mg/kg i.p sisplatin kullanımı ile belirgin kilo kaybı saptanırken Cis+Mel ile kaybın olmadığı kontrol gruba benzer şekilde kilo aldıkları rapor edilmiştir (Tuncer ve ark 2010).

Sisplatinin yaptığı santral nörotoksitede en sık rapor edilen bozukluklardan bir tanesi kognitif fonksiyon bozukluğudur. Bizim çalışmamızda kognitif fonksiyonu göstermek için spontan alternasyon *T-maze* testi yapılmıştır. *T-maze* testinde kontrol, Mel ve çözücü gruplar alışılmamış kola gidiş yüzdesinde iyi bir performans gösterirken, Cis ve Cis+çözücü gruplarda gidiş yüzdeleri daha düşük bulunmuştur. Bu durum sıçanlarda kognitif fonksiyonun bozulduğunu göstermektedir. Cis'e Mel

eklenmesiyle Cis+Mel grupta kognitif fonksiyonda düzelme olduğu saptanmıştır. Motor performansı göstermek amacıyla yapılan *rotarod* testinde de yine Cis ve Cis+çözücü gruplar kontrol gruba göre *rotarodda* daha kısa kalış süresi gösterirken Cis+Mel grupta fark kaybolarak kontrol gruba benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bir diğer test olarak ağrı eşiğini değerlendirmek amacıyla yapılan *hot plate* testinde geri çekmede gecikme süresi değerlendirildiğinde gruplar arasında belirgin bir fark saptanamamıştır. Davranış testleri sonuçları melatoninin nörotoksisitede etkin olduğunu göstermektedir.

Literatürde sisplatin ile deney hayvanlarında yapılan nörotoksisite modelinde farklı davranış testleri kullanılmıştır. Chtourou ve ark haftada bir 5 mg/kg 5 hafta süresince sisplatin kullanarak yaptıkları nörotoksisite modelinde açık alan testi, yükseltilmiş *plus maze* testlerinde belirgin bozukluk saptamışlardır (Chtourou ve ark 2015). Bir bitkisel flavanoid olan naringin ile davranış testlerinde düzelme kaydedilmiştir.

Sisplatin tek doz 12 mg/kg verilerek yapılan nörotoksisite modelinde davranış testleri olarak açık alan testi kullanılarak nörotoksisite varlığı gösterilmiştir (Khadrawy ve ark 2019). Araştırmacılar nörotoksisiteyi önlemek amacıyla bir flavanoid olan kurkumin kullanmışlar ve davranış testlerinde düzelme göstermişlerdir.

Sisplatinin 7.5 mg/kg tek doz kullanıldığı bir başka çalışmada sisplatin sonrası 4-8'nci günlerde açık alan testi, yükseltilmiş *plus maze* testi, kavrama testi, motor koordinasyon, denge ve motor yetenekleri göstermek için *rotarod* testi kullanılmış ve Cis kullanan grupta tüm davranış testlerinde bozukluk gösterilmiştir (Vukovic ve ark 2019). Nörotoksisitenin önlenmesi amacıyla hayvanlara 500 mg/kg i.p. N-asetil sistein verilmiş ve N-asetil sistein sonrası davranış testlerinde düzelmeler kaydedilmiştir. Bu çalışmada nörotoksisiteyi göstermek için herhangi bir biyokimyasal ve histopatolojik çalışma yapılmamıştır.

Sisplatinin yaptığı nörotoksisite üzerinde sitagliptin ile yapılan bir diğer çalışmada sisplatin 2 mg/kg 4 hafta süreyle kullanılmıştır. 4 hafta sonra yapılan davranış testlerinde Cis verilen grupta lokomotor aktivitede, kas gücünde belirgin azalma saptanmıştır. Hayvanların serebellumunda sisplatine bağlı nöronal kayıplar

gösterilmiştir (Li ve ark 2019). Sitagliptin ile hayvanlarda hem histopatolojik değişikliklerin hem de davranış bozukluklarının düzeldiği gösterilmiştir.

Sisplatin nörotoksitesi oluşumunda oksidatif stres ve nöroinflamasyon kabul edilmiş mekanizmalardır. Bu amaçla antioksidan ve antiinflamatuvar moleküllerin etkinliği sıklıkla beyin dokusunda araştırılmıştır.

Bizim çalışmamızda beyin dokusunda oksidatif stres ve inflamasyon üzerinde melatoninin etkisi araştırılmıştır. Oksidatif stresin en önemli belirteçlerinden olan TBARS seviyeleri kontrol grubuna göre Cis gruplarında yüksek olmasına rağmen belirgin bir farklılığa ulaşamamıştır. En yüksek değer Cis+Çözücü grubunda saptanırken, kontrol, Cis ve Cis+Mel gruplarının değerleri benzerdir. TBARS seviyesinin belirgin yükselmemesinin nedeni sisplatin dozunun ağır oksidatif stres yapabilecek düzeyde olmaması veya hayvanların sisplatine insanlarda olduğu gibi farklı cevaplar göstermesi olabilir. Sisplatine etil alkol eklenmesi ile tablonun biraz daha ağırlaştığı görülmektedir. Melatonin eklenmesi ile TBARS seviyeleri yeniden kontrol seviyelerine inmiştir. Bu da melatoninin antioksidan etki gösterdiğini doğrulamaktadır.

Oksidatif stresin bir diğer belirteci olan MAO seviyelerinde benzer şekilde Cis+Çözücü grubunda kontrole göre anlamlı bir yükseklik saptanmıştır. Cis grubundaki yükseklik istatistiksel farklılığa ulaşamamıştır. Buna karşılık Cis+Mel grubunda MAO seviyelerinin normal seviyelere geldiği görülmüştür. Bu durum melatoninin oksidan enzimler üzerinde iyi yönde etkili olduğunu göstermektedir.

Çalışmadaki antioksidan enzim seviyeleri göz önüne alındığında ise SOD, GPx ve GR aktivitelerinin Cis grubunda kontrole göre istatistiksel anlamlılığa ulaşmayan bir düşme gösterdiği, Cis+Çözücü grubundaki düşmenin anlamlılığa ulaştığı görülmektedir. Cis+Mel gruplarında ise her üç enzim aktivitesinin kontrole göre farklı olmadığı buna karşılık Cis+Çözücü grubundaki enzim seviyelerine göre belirgin yüksek olduğu görülmektedir. Bu bulgular sisplatinin yaptığı antioksidan enzim seviyelerindeki düşmeyi melatoninin düzelttiğini doğrulamaktadır.

Melatonin antioksidan bir ajan olarak bilinmesine rağmen düşük dozlarda antioksidan iken yüksek konsantrasyonlarda doza bağlı prooksidan olabileceği

gösterilmiştir (Pandi-Perumal ve ark 2006). Antioksidan etkisi yapısında bulunan pirol halkasına bağlıdır. Melatonin serbest radikalleri tutarak, serbest radikallerle etkileşip aktivitelerini azaltarak veya antioksidan enzimlerin yapımını arttırarak etkisini gösterir (Hardeland 2009, Lopez ve ark 2009).

Melatonin aynı zamanda çeşitli mekanizmalarla etki gösteren güçlü bir antiinflamatuvar maddedir. Bunun yanı sıra proinflamatuvar etkisi de rapor edilmiştir. Antiinflamatuvar etkileri serbest radikallerin direkt ve indirekt yollardan detoksifikasyonu, mitokondriyal koruma, NADPH oksidazları ve mitokondrideki elektron sızıntısını engelleyerek serbest radikallerin azaltılması, nöronal aşırı uyarılmanın engellenmesi ve çeşitli antiinflamatuvar etkilerden kaynaklanmaktadır (Hardeland 2013). Melatoninin proinflamatuvar etkisi hücre çalışmalarında gösterilmiştir. Monosit kökenli hücrelerde melatonine cevap olarak IL-1 β , IL-2, IL-12, IL-6, TNF- α , INF- γ salınımı arttığı rapor edilmiştir (Carillo-Vico ve ark 2013, Hardeland 2018). Dolayısıyla melatonin geniş spektrumlu immün düzenleyici pro ve anti inflamatuvar etkiler gösterebilir.

Melatonin antioksidan olarak birçok kemoterapötik ilacın (doksorubusin, sisplatin, epirubusin, bleomisin, siklofosfamid) neden olduğu toksisiteyi azaltmaktadır. Melatonin sisplatinin neden olduğu nefrotoksisite, ototoksisite, kemik iliği toksisitesi gibi durumlarda kullanılmıştır(Hara ve ark 2001, Lissoni ve ark 1997, Lissoni ve ark 2003). En fazla çalışma nefrotoksisite ile ilgilidir. Sisplatin böbrekte biriktiğinde ROS artar. Oksidatif stres altında kalan hücreler apoptoza giderler. Bunun yanı sıra lipid peroksidasyonunda artma, böbrek glutatyon ve GPx 'in azalması da sisplatin sonrası görülen patolojilerdir ve melatonin bu patolojileri düzeltmektedir. Sıçanlarda sisplatin tedavisi sonrası ortaya çıkan nefrotoksisitede melatonin kullanımı koruyucu etki göstermiştir. Bu biyokimyasal çalışmalarla ve histolojik analizlerle gösterilmiştir (Kilic ve ark 2013).

Sisplatinin yaptığı nörotoksisite üzerinde koruyucu etkisi olabileceği düşünülerek yapılan diğer antioksidan ilaç çalışmalarında da bizim sonuçlarımıza benzer sonuçlar elde edilmiştir. Tek doz 5 mg/kg sisplatin ve 14 gün rutin

kullanılarak yapılan bir hayvan çalışmasında sadece sisplatin kullanılan grupta TBARS seviyelerinin kontrol gruba göre belirgin arttığı, rutin kullanımı ile azaldığı gösterilmiştir. Glutatyon seviyelerinin kontrol gruba göre sisplatin kullanılan grupta daha düşük olduğu yine rutin ile bunun da düzeldiği, beyin dokusundaki GPx ekspresyonunun sisplatin tedavisi ile azalıp rutin ile arttığı gösterilmiştir (Almutairi ve ark 2017).

Tek doz 7 mg/kg sisplatin ile yapılan bir diğer hayvan çalışmasında ise sıçanlara sisplatinden önce 10 gün kurkumin tedavisi uygulanmış daha sonra beyin dokularında yapılan biyokimyasal çalışmada MDA, NO seviyelerinin sisplatin kullanılan grupta belirgin arttığı saptanmıştır. Bunun yanı sıra katalaz ve GSH seviyelerinin azaldığı, kurkumin tedavisi ile ortaya çıkan patolojinin düzeldiği gösterilmiştir (Hashem ve ark 2015).

Melatonin çeşitli ilaçlara bağlı nörotoksisite modellerinde antioksidan ve antiinflamatuvar etkisiyle koruyucu olarak kullanılmıştır. Metamfetaminin yaptığı nörotoksisitede IL-1 β , IL-6 ve TNF- α aşırı yapımını azaltarak ve ROS'u baskılayarak koruyucu etkisini göstermektedir (Tocharus ve ark 2010). Melatonin ouabainin yaptığı nörotoksik durumda 5-20 mg/kg dozlarda 7 gün kullanıldığında beyin dokusunda ve hipokampüste antioksidan enzimlerin arttığı, ROS'un azaldığı saptanmıştır (Souza ve ark 2014).

Sisplatinin yaptığı oksidatif stres üzerinde melatoninin etkileri *in vitro* fare beyin homojenatlarında da çalışılmıştır. Beyin homojenatlarının gramına 24 μ g sisplatin uygulanarak yapılan nörotoksisite modelinde 3 mM melatoninin etkisi araştırılmıştır. Sisplatin kullanımı sonrası beyin homojenatlarında glutatyon, GPx, GR ve SOD seviyelerindeki belirgin azalma melatonin eklenmesi ile düzelmiştir. Araştırmacılar melatoninin enzimatik ve non enzimatik antioksidan parametreleri düzeltebileceğini tartışmışlardır (Surendran ve ark 2012).

Tuncer ve ark sisplatinin yaptığı periferik nöropati modelinde sisplatin enjeksiyonundan bir gün önce başlayarak 7 gün süresince günde 4 mg/kg melatonin ve 100 mg/kg/gün alfa lipoik asidin etkisini çalışmışlardır. Hem melatonin hem de alfa lipoik asit elektrofizyolojik parametrelerde düzelmeye sağlamıştır. Dokuda

oksidatif stres ve inflamasyon belirteçleri çalışılmamıştır. Hem melatonin hem de alfa lipoik asit elektrofizyolojik çalışmalarda sisplatinin yaptığı nörotoksisteyi önlemiştir. Melatonin ve alfa lipoik asidin karşılaştırılmasında alfa lipoik asidin etkinliği melatonine göre daha fazla bulunmuştur (Tuncer ve ark 2010).

Bizim bilgilerimize göre melatoninin sisplatinin yaptığı santral nörotoksistite üzerinde etkinliğini araştıran *in vivo* çalışma bulunmamaktadır. Buna karşılık bir sisplatin analogu olan oksaliplatinin yaptığı nörotoksistide davranış değişiklikleri, mitokondriyal fonksiyon üzerinde melatoninin koruyucu etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada melatonin 10 mg/kg ve 30 dakika sonra oksaliplatin (Oxa) 4 mg/kg 5 gün boyunca kullanılmıştır. Çalışmanın başlangıcında ve 7. günde davranış testleri yapılmış ve sıçan beyin homojenatlarından mitokondri izole edilerek mitokondriyal enzim kompleksleri, mitokondriyal protein oksidasyonu, non enzimatik oksidanlar çalışılmıştır. Oxa sonrası bozulan davranış testlerinde melatonin kullanımı sonrası düzelme saptanmış, Oxa sonrası azalan mitokondriyal elektron transport enzimleri ve antioksidan enzim aktivitelerinde melatonin kullanımı ile düzelme saptanmıştır. Araştırmacılar melatoninin nonenzimatik ve enzimatik antioksidanları düzeltebileceğini tartışmışlardır (Waseem ve ark 2016). Bu çalışmada inflamatuvar sitokinler araştırılmamıştır

Sisplatinin yaptığı santral nörotoksistide bir sentetik melatonin analogu olan agomelatinin etkileri araştırılmıştır. Hipokampal nöronal hücrelerde *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Çalışmanın *in vivo* kısmında sisplatin 7 mg/kg tek doz ve 7 gün 20-40 mg/kg agomelatin sonrası davranış testleri, beyin hipokampusünde biyokimyasal çalışmalar ve histolojik analizler yapılmıştır. Sisplatinin yaptığı davranış bozukluklarında agomelatinin düşük ve yüksek dozundan sonra benzer düzelmeler, proinflamatuvar sitokinlerde sitokin seviyelerinde azalma, glutatyon seviyesinde artma, MDA seviyesinde azalmalar saptamışlardır. Histopatolojik çalışmalarda agomelatinin her iki dozuyla da sisplatinin yaptığı nörodejeneratif bulgularda düzelme saptanmıştır. Araştırmacılar agomelatinin nörotoksistide etkili olabileceğini fakat bu bulguları doğrulamak gerektiğini tartışmışlardır (Cankara ve ark 2020).

Bu çalışmada inflamasyon belirteci olarak proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α , IL-1 β ve IL-6 çalışılmıştır. TNF- α seviyeleri Cis ve Cis+Çözücü gruplarında kontrol gruba göre belirgin yüksek idi. Bu önemli bir santral sitokinin sisplatin ile yükseldiğini, beyinde belirgin bir nöroinflamasyon oluştuğunu göstermektedir. Sisplatine melatonin eklenmesi ile bu sitokin seviyelerindeki yükselme kontrol seviyelerine düşmüştür. Melatonin iyi bir anti inflamatuvar etki göstermiştir. Bir diğer santral sitokin olan IL-6 sisplatin kullanımı ile beyin dokusunda kontrole gruba göre belirgin yükselirken sisplatine melatonin eklenmesi ile herhangi bir düşme saptanmamıştır. IL-1 β ile de benzer bir sonuç elde edilmiştir.

Melatonin pro ve antiinflamatuvar özellikleri olan bir moleküldür. *In vitro* çalışmalarda sitokin sekresyonu üzerinde melatonin etkisi ile ilişkili tartışılmalı sonuçlar vardır. *In vivo* bir çalışmada parenteral kullanılan melatonin lipopolisakkaridin stimüle ettiği serum TNF- α seviyelerini inhibe ederken IL-1 üzerinde etkisi gösterilememiştir (Sacco ve ark 1998).

Mikroglial hücreler üzerinde lipopolisakkaridin yaptığı inflamasyonda melatonin etkisinin *in vitro* çalışıldığı bir çalışmada orta ve yüksek doz lipopolisakkarid varlığında düşük doz melatoninin IL-1 β üzerinde suprese edici etkisi varken yüksek dozlarda IL-1 β seviyelerinin yüksek kaldığı saptanmıştır. Araştırmacılar melatoninin bu farklı etkilerini sitokin reseptörlerinin baskılanması ile ilişkili olabileceğini, melatoninin önemli bir immünomodülatör etkisi olduğunu tartışmışlardır (Shafer ve ark 2001).

Bizim çalışmamızdaki IL-1 β ve IL-6 seviyelerinin yüksek kalması melatoninin bu sitokin reseptörleri üzerinde etkisinin olmadığını düşündürmektedir. Literatürdeki diğer çalışmalarda sisplatinin yaptığı nörotoksisitede sitokinlerin arttığı bizim çalışmamız ile benzer şekilde gösterilmiştir (Abdel-Wahab ve ark 2019, Almutairi ve ark 2012, Starabova ve Vetter 2017). N-asetil sisteinin, rutinin sitokinler üzerinde etkili olduğu tartışılmıştır.

Melatonin ile yapılan bir sıçan çalışmasında lipopolisakkaridin yaptığı nöroinflamasyon üzerinde melatonin 5-10 mg/kg p.o kullanılmış, TNF- α ve IL-1 β

düzelelerinde düşme saptanılmıştır. Düşük dozda melatonin ile serebral kortekste TNF- α da belirgin bir azalma varken 10 mg/kg melatonin ile hipokampus hariç tüm beyin bölgelerinde TNF- α seviyelerinde azalma görülmüştür. Melatonin 10 mg/kg ile tüm beyin bölgelerinde IL-1 β azalırken, 5 mg/kg ile sadece striatum bölgesinde azalma saptanmıştır (Tyagi ve ark 2010). Dolayısıyla sitokinlerin beyin farklı bölgelerinde melatonine cevapları farklı olabilir. Bizim çalışmamızda özel bir beyin bölgesi kullanılmadığı için bu konuda yorum yapmak mümkün değildir. Farklı melatonin dozları ile beyin farklı bölgeleri alınarak yapılacak çalışmalar çok daha iyi yol gösterici olabilir.

Kolinerjik sistem hafıza ve öğrenmede önemli bir sistemdir. Nörotoksisitenin önemli belirleyicilerinden biri de kolinerjik disfonksiyondur (Abdel-Wahab ve Moussa 2019, Chtourou ve ark 2015). Beyinde kolinerjik sistem üzerinde sisplatin tedavisinin etkisini göstermek için en iyi yöntemler AChE enzim aktivitesini ve asetil kolin seviyesini ölçmektir.

Bizim çalışmamızda beyin dokusunda sadece AChE seviyeleri ölçülmüştür. AChE seviyeleri sisplatin verilen üç grupta da yüksekti. Melatonin kullanılmasından sonra AChE seviyelerinde düşme oldu. Fakat bu düşme miktarı hala kontrol değerlerine göre yüksek kaldı. Bulgularımız melatoninin kolinerjik sistem üzerinde etkin olduğunu düşündürmektedir.

Sisplatinin yaptığı AChE enzim aktivitesi üzerinde önceki çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. AChE aktivitesinin artması beyin dokusunda asetilkolinin azalması ile sonuçlanacaktır. Yüksek ROS seviyeleri, sisplatine bağlı Ca⁺⁺ dengesinin bozulması AChE aktivitesinde artmaya neden olabilir (Abdel-Wahab ve ark 2019, Chtourou ve ark 2015, Jangra ve ark 2016, Owoeye ve ark 2018). ROS, plazma membranının peroksidasyonunu artırarak kolinerjik sistemin bütünlüğünü ve işlevselliğini etkiler (Pearson ve Patel 2016). Bunun tersi olarak bazı araştırmacılar sisplatin nörotoksisitesinde AChE aktivitesinin azaldığını rapor etmişlerdir. AChE aktivitesinin inhibisyonunun kısmen oksidatif strese bağlı olduğunu tartışmışlardır. Sinaptik aralıkta asetil kolinin arttığını bununla birlikte kolinerjik reseptörlerin

desensitizasyona uğrayarak kolinerjik disfonksiyon ortaya çıktığını rapor etmişlerdir (Arafa ve Atteia 2019, Oz ve ark 2015).

Kesin bir sonuca varmak için beyin dokusunda asetilkolinesteraz aktivitesi ile birlikte asetilkolin seviyelerinin çalışılması soruna açıklık getirebilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kanser dünyadaki ölümler arasında halen ilk sırada yer almaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçlar ciddi yan etkileri nedeniyle çoğu kez tedavinin sonlandırılmasına ya da doz azaltılmasına neden olmaktadır. Kemoterapötik ilaçların çoğu özellikle platin grubu kemoterapötikler sinir dokusunda ciddi harabiyete neden olarak nörotoksisite oluştururlar. Bu grubun en fazla kullanılan örneği sisplatin'dir. Sisplatin bazen geri dönüşümsüz periferik nöropatiye ve son yıllarda daha çok dikkati çeken santral nörotoksisiteye neden olabilmektedir. Sisplatin toksisitesinin oluş mekanizmasında oksidatif stres ve inflamasyonun önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu hasarın antioksidan, antiinflamatuvar maddeler yoluyla azaltılması yan etkilerin önlenmesinde önemli bir basamak olabilir. Bu amaçla farklı antioksidan maddeler (N-asetilsistein, alfa-lipoik asit, E vitamini, C vitamini vs) kullanılmıştır. Melatonin, iyi bir antioksidan ve antiinflamatuvar ajandır. Biz çalışmamızda sisplatin ile nörotoksisite oluşturduğumuz deney hayvanlarında melatoninin beyin dokusunda sisplatinin neden olduğu oksidatif stres, pro-inflamatuar sitokinler, kolinerjik sistem, serum biyokimyasal parametreleri ve davranış testleri üzerindeki etkilerini araştırdık. Çalışmada melatoninin davranış testleri, kolinerjik sistem, oksidatif stres ve özellikle bir proinflamatuvar sitokin olan TNF- α üzerinde belirgin etkileri saptanmıştır. Bu sonuçlara göre melatonin sisplatinin santral nörotoksisitesinde antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri ile alternatif bir ajan olarak görülmektedir. Bu çalışmada beyin dokusunun histopatolojik incelemesinin olmaması, antioksidan enzimlerin mRNA ekspresyonlarının yapılmamış olması, sisplatin düzeyinin beyin dokusunda gösterilmemiş olması, nörotoksisite modeli yapmak için sisplatinin farklı dozlarının (düşük, orta, yüksek) kullanılmamış olması çalışmanın önemli kısıtlamalarındandır. Melatoninin sisplatin nörotoksisitesi üzerindeki etkinliğinin daha iyi ortaya çıkarılabilmesi için farklı dozlarda ve farklı sürelerde kullanılarak yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof STR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37: 13-25, 2010
2. Abdel-Wahab WM, Moussa FI. Neuroprotective effect of N-acetylcysteine against cisplatin-induced toxicity in rat brain by modulation of oxidative stress and inflammation. *Drug Des Devel Ther* 13: 1155-1162, 2019
3. Almutairi MM, Alanazi WA, Alshammari MA, Alotaibi MR, Alhoshani AR, Al Rejaie SS, Hafez MM, Al-Shabanah OA. Neuro-protective effect of rutin against cisplatin-induced neurotoxic rat model *BMC Complementary and Alternative Medicine* 17: 472-481, 2017
4. Amaral FGD, Cipollo-Neto J A. Brief review about melatonin, a pineal hormone. *Arch Endocrinol Metab* 62 (4): 472-479, 2018
5. Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Ann Rev Plant Biol* 55: 373-99, 2004
6. Arafa MH, Atteia HH. Protective role of epigallocatechin gallate in a rat model of cisplatin induced cerebral inflammation and oxidative damage: impact of modulating NF-k B and Nrf2. *Neurotox Res* 37: 380-396, 2020
7. Aranarochana A, Chaisawang P, Sirichoat A, Pannangrong W, Wigmore P, Welbat JU. Protective effects of melatonin against valproic acid-induced memory impairments and reductions in adult rat hippocampal neurogenesis. *Neuroscience* 406: 580-593, 2019
8. Arendth J. Aaron Lerner who discovered melatonin. *J Pineal Res* 43: 106-107, 2007
9. Areti A, Yerra VG, Naidu V, Kumar A. Oxidative stress and nerve damage: Role in chemotherapy induced peripheral neuropathy. *Redox Biol* 18: 285-295, 2014
10. Argyriou AA, Chroni E, Polychronopoulos P, Iconomou G, Koutras A, Makatsoris T, Gerolymos MK, Gourzis P, Assimakopoulos K, Kalofonos HP. Efficacy of oxcarbazepine for prophylaxis against cumulative oxaliplatin-Induced neuropathy. *Neurology* 67(12): 2253-2255, 2006

11. Argyriou AA, Cavaletti G, Briani C, Velasco R, Bruna J, Campagnolo M, Alberti P, Bergamo F, Cortinovis D, Cazzaniga M, Santos C, Papadimitriou K, Kalofonos HP. Clinical pattern and associations of oxaliplatin acute neurotoxicity: A prospective study in 170 patients with colorectal cancer. *Cancer* 119: 438-444, 2013
12. Arihan O, Boz M, İskit AB, İlhan M. Antinociceptive activity of coniine in mice. *J Ethnopharmacol* 125(2): 274-278, 2009
13. Arrieta O, García-Navarrete R, Zúñiga S, Ordóñez G, Ortiz A, Palencia G, Morales-Espinosa D, Hernández-Pedro N, Sotelo J. Retinoic acid increases tissue and plasma contents of nerve growth factor and prevents neuropathy in diabetic mice. *Eur J Clin Invest* 35(3): 201-207, 2005
14. Astolfi L, Ghiselli S, Guaran V, Chicca M, Simoni E, Olivetto E, Lelli G, Martini A. Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: A retrospective evaluation. *Oncol Rep* 29(4): 1285–1292, 2013
15. Barberino RS, Menezes VG, Ribeiro AEAS, Palheta RC Jr, Jiang X, Smitz JEJ, Matos MHT. Melatonin protects against cisplatin-induced ovarian damage in mice via the MT1 receptor and antioxidant activity. *Biol Reprod.* 96(6): 1244-1255, 2017
16. Barhwal K, Hota SK, Prasad D, Singh SB, Ilavazhagan G. Hypoxia-induced deactivation of NGF-mediated ERK1/2 signaling in hippocampal cells: Neuroprotection by acetyl-L-carnitine. *J Neurosci Res* 86(12): 2705-21, 2008
17. Benitez-King G, Anton-Tay F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 49(8): 635-641, 1993
18. Bobylev I, Joshi AR, Barham M, Neiss WF, Lehmann HC. Depletion of Mitofusin-2 causes mitochondrial damage in cisplatin induced neuropathy. *Mol Neurobiol* 55(2): 1227-1235, 2017
19. Borlongan CV, Sumaya I, Moss D, Kumazaki M, Sakurai T, Hida H, Nishino H. Melatonin-secreting pineal gland: A Novel tissue source for neural transplantation therapy in stroke. *Cell Transplant* 12(3): 225-34, 2003

20. Boehmerle W, Huehnchen P, Peruzzaro S, Balkaya M, Endres M. Electrophysiological, behavioral and histological characterization of paclitaxel, cisplatin, vincristine and bortezomib-induced neuropathy in C57Bl/6 Mice. *Sci Rep* 18(4): 6370-6379, 2014
21. Boyette-Davis JA, Hou S, Abdi S, Dougherty PM. An updated understanding of the mechanisms involved in chemotherapy-induced neuropathy. *Pain Manag* 8(5): 363-375, 2018
22. Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci* 10: 519-529, 2009
23. Brouwers EEM, Huitema AD, Boogerd W, Beijnen JH, Schellens JH. Persistent neuropathy after treatment with cisplatin and oxaliplatin. *Acta Oncol* 48(6):832-841, 2009
24. Bubenik GA. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci* 47: 2336-48, 2002
25. Cankara NF, Gunaydin C, Celik ZB, Sahin Y, Pekgoz S, Erzurumlu Y, Gulle K. Agomelatine confers neuroprotection against cisplatin induced hippocampal neurotoxicity. *Metab Brain Dis* 36(2): 339-349, 2020
26. Capella JP, Carmo H, Remiao F, Bastos ML, Meisel A, Carvalho F. Molecular and cellular mechanisms of ecstasy-induced neurotoxicity: An Overview. *Mol Neurobiol* 39(3): 210-271, 2009
27. Cardinali DP, Vigo DE, Olivar N, Vidal MF, Furio AM, Brusco LI. Therapeutic application of melatonin in mild cognitive impairment. *Am J Neurodegener Dis* 1(3): 280-91, 2012
28. Cardinali DP. Melatonin: A Mammalian hormone. *Endocr Rev* 2(3): 327-46, 1981
29. Carillo-Vico A, Reiter RJ, Guerrero JM, Lardone PJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 27(12): 189-200, 2005
30. Carillo-Vico A, Lardone PJ, Alvarez-Sanchez N, Rodriguez-Rodriguez A, Guerrero JM. Melatonin: Buffering the immune system. *Int J Mol Sci* 14: 8638-8683, 2013
31. Carlberg C. Gene regulation by melatonin. *Ann N Y Acad Sci* 917: 387-96, 2000

32. Cascinu S, Cordella L, Del Ferro E, Fronzoni M, Catalano G. Neuroprotective effect of reduced glutathione on cisplatin-based chemotherapy in advanced gastric cancer: A randomized double-blind placebo-controlled trial. *J Clin Oncol* 13(1): 26-32, 1995
33. Cassidy J, Paul J, Soukop M, Habeshaw T, Reed NS, Parkin D, Kaye SB. Clinical trials of nimodipine as a potential neuroprotector in ovarian cancer patients treated with cisplatin. *Cancer Chemother Pharmacol* 41(2): 161-6, 1998
34. Cata JP, Weng HR, Dougherty PM. Behavioral and electrophysiological studies in rats with cisplatin induced chemoneuropathy. *Brain Res* 1230: 91-98, 2008
35. Cavaletti G, Minoia C, Schiepatti M, Tredici G. Protective effects of glutathione on cisplatin neurotoxicity in rats. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 29 (4): 771-776, 1994
36. Cavaletti G, Alberti P, Marmioli P. Chemotherapy induced peripheral neurotoxicity in the era of pharmacogenomics. *Lancet Oncol* 12: 1151-1161, 2011
37. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C. Biochemical Mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* 7 (1): 3-18, 2007
38. Chiu GS, Maj MA, Rizvi S, Dantzer R, Vichaya EG, Laumet G, Kavelaars A, Heijnen CJ. Pifithrin μ prevents cisplatin induced chemobrain by preserving neuronal mitochondrial function. *Cancer Res* 77(3): 742-752, 2017
39. Choi YM, Kim HY, Shim W, Anwar MA, Kwon W, Kwon HK, Kim HJ, Jeong H, Kim HM, Hwang D, Kim HS, Choi S. Mechanism of cisplatin-induced cytotoxicity is correlated to impaired metabolism due to mitochondrial ROS generation. *Plos One* 10(8): 1-21, 2015
40. Chovanec M, Abu Zaid M, Hanna N, El-Kouri N, Einhorn LH, Albany C. Long term toxicity of cisplatin in germ-cell tumor survivors. *Ann Oncol* 28: 2670-2679, 2017
41. Chtourou Y, Gargouri B, Kebieche M, Fetoui H. Naringin abrogates cisplatin-induced cognitive deficits and cholinergic dysfunction through the down-

- regulation of AChE expression and iNOS signaling pathways in hippocampus of aged rats. *J Mol Neurosci* 56: 349-362, 2015
42. Cioroiu C, Weimer LH. Update on Chemotherapy Induced Peripheral Neuropathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 17: 47-55, 2017
 43. Claustrat B, Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie* 61(2-3): 77-84, 2015
 44. Colombo N, Bini S, Miceli D, Bogliun G, Marzorati L, Cavaletti G, Parmigiani F, Venturino P, Tedeschi M, Frattola L, Buratti C, Mangioni C. Weekly cisplatin +/- glutathione in relapsed ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 5(2):81-86, 1995
 45. Costa LG. Overview of Neurotoxicology. *Curr Protoc Toxicol Suppl* 74, 2017
 46. Custodio JB, Cardoso CM, Santos MS, Almeida LM, Vicente JA, Fernandes MA. Cisplatin impairs rat liver mitochondrial functions by inducing changes on membrane ion permeability: Prevention by thiol protecting agents. *Toxicology* 259: 18-24, 2009
 47. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Colombo R, Milzani A. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329: 23-38, 2003
 48. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 740:364-378, 2014
 49. Deacon RMJ, Pawlins JNP. T maze alternation in the rodent. *Nature Protocols* 1(1): 7-12, 2006
 50. De Araujo JG, Serra LSM, Lauand L, Kückelhaus SAS, Sampaio ALL. Protective effect of melatonin on cisplatin-induced ototoxicity in rats. *Anticancer Res.* 39(5): 2453-2458, 2019
 51. De Castro Jr G, Alves GV, Castro AF, Chaves ALF, De Marchi P, De Oliveira TB, Dias FL, Guindalini RSC, Nicolau UR, Soares A, Mora PAR. Criteria for eligibility to cisplatin in the curative treatment of head and neck cancer: Consensus opinion from a panel of experts. *Crit Rev Oncol Hematol* 131: 30-34, 2018
 52. Decatris MP, Sundar S, O'Byrne KJ. Platinum based chemotherapy in metastatic breast cancer: Current status. *Cancer Treat Rev* 30: 53-81, 2004

53. Demir MG, Altıntoprak N, Aydın S, Kösemihal E, Başak K. Effect of transtympanic injection of melatonin on cisplatin-induced ototoxicity. *J Int Adv Otol* 11(3): 202-6, 2015
54. Deng WG, Tang ST, Tseng HP, Wu KK. Melatonin suppress macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding. *Blood* 108: 518-524, 2006
55. Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Front Mol Neurosci* 10(284): 1-16, 2017
56. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95, 2002
57. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 27: 101–110, 2005
58. Ellman GL, Courtney KD, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7(2): 88-95, 1961.
59. Ersahin M, Toklu HZ, Cetinel S, Yüksel M, Yegen BC, Sener G. Melatonin reduces experimental subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage and neurological symptoms. *J Pineal Res* 46(3): 324-32, 2009
60. Fallon MT. Neuropathic pain in cancer *Br J Anaesth* 111: 105-111, 2013
61. Ferrante RJ, Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante KL, Jenkins BG, Hersch SM, Beal MF. Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse models of Huntington's Disease. *J Neurosci* 22: 1592-1599, 2002
62. Finosh GT, Jayabalan M. Reactive oxygen species-control and management using amphiphilic biosynthetic hydrogels for cardiac applications. *Adv Biosci Biotechnol* 4: 1134-1146, 2013
63. Flohe L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology* 105: 114-120, 1984
64. Galano A, Reiter RJ. Melatonin and its metabolites vs oxidative stress: From individual actions to collective protection. *J Pineal Res* 65(1):e12514, 2018

65. Gallardo D, Mohar A, Calderillo G, Mota A, Solorza G, Lozano A, Solano P, De La Garza J. Cisplatin, radiation, and amifostine in carcinoma of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer* 9(3): 225-230, 1999
66. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 39: 1529-1542, 1998
67. Golli NE, Dallagi Y, Rahali D, Rejeb I, Fazaa SE. Neurobehavioral assessment following e-cigarette. *Toxicol Mech Methods* 26(6): 425-432, 2016
68. Gunn A, Bobeck EN, Weber C, Morgan MM. The influence of non nociceptive factors on hot plate latency in rats. *Journal of Pain* 12(2): 222-227, 2011
69. Guo Y, Jones D, Palmer JL, Forman A, Dakhil SR, Velasco MR, Weiss M, Gilman P, Mills GM, Noga SJ, Eng C, Overman MJ, Fisch MJ. Oral alpha-lipoic acid to prevent chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Support Care Cancer* 22(5): 1223-31, 2014
70. Hall JE. Guyton's Textbook of Medical Physiology 13.Ed. The Nervous System Cerebral Cortex, Intellectual Functions of The Brain, Learning and Memory. 737-745, Elsevier 2016
71. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 35: 1147-1150, 2007
72. Hara M, Yoshida M, Nishijima H, Yokosuka M, Iigo M, Ohtani-Kaneko R, Shimada A, Hasegawa T, Akama Y, Hirata K. Melatonin, a pineal secretory product with antioxidant properties, protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Pineal Res* 30(3): 129-38, 2002
73. Hardeland R. Neuroprotection by radical avoidance: search for suitable agents. *Molecules* 14(12): 5054-5102, 2009
74. Hardeland R. Melatonin and the theories of aging: a critical appraisal of melatonin's role in antiaging mechanisms. *J Pineal Res* 55(4): 325-56, 2013
75. Hardeland R. Melatonin and inflammation – Story of a double-edged blade. *J Pineal Res* 65: e12525, 2018

76. Harris JB, Blain PG. Neurotoxicology: what the neurologists need to know. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75(SupplIII): iii29-iii34, 2004
77. Hashem RM, Safwat GM, Rashed LA, Bakry S. Biochemical findings on cisplatin-induced oxidative neurotoxicity in rats. *IJAR* 3 (10): 1222-1231, 2015
78. Helbock HJ, Beckmann KB, Ames BM. 8-hydroxy-deoxyguanosine and 8-hydroxy-guanin as biomarkers of oxidative DNA Damage. *Methods Enzymol* 300:156-166, 1999
79. Hess LM, Benham-Hutchins M, Herzog TJ, Hsu HC, Malone DC, Skrepnek GH, Slack MK, Alberts DS. A meta analysis of the efficacy of intraperitoneal cisplatin for the front line treatment of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 17 (3):561-70, 2007
80. Hinduja S, Kraus KS, Manohar S, Salvi RJ. D-methionine protects against cisplatin induced neurotoxicity in the hippocampus of the adult rat. *Neurotox Res* 27(3): 199-204, 2015
81. Hu S, Leblanc AF, Gibson AA, Hong KW, Kim JY, Janke LJ, Li L, Vasilyeva A, Finkelstein DB, Sprowl JA, Sweet DH, Schlatter E, Ciarimboli G, Schellens J, Baker SD, Pabla N, Sparreboom A. Identification of OAT1/OAT3 as contributors to cisplatin toxicity. *Clin Transl Sci* 10(5): 412-420, 2017
82. Hussein AM, Bezu M, Korz V. Evaluating Working Memory on a T-maze in Male Rats. *Bio-protocol* 8(14):2018
83. Ianas O, Olivescu R, Badescu I. Melatonin involvement in oxidative processes. *Endocrinologie* 29(3-4): 147-53, 1991
84. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, recognition, and processing of cisplatin–DNA adducts. *Chem Rev* 99: 2467–2498, 1999
85. Jangra A, Kwatra M, Singh T, Pant R, Kushwah P, Ahmed S, Dwivedi D, Saroha B, Lahkar M. Edaravone alleviates cisplatin-induced neurobehavioral deficits via modulation of oxidative stress and inflammatory mediators in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 791: 51–61, 2016
86. Jeong S. Molecular and cellular basis of neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Mol Cells* 40(9): 613-620, 2017

87. Jimenez-Ortega V, Cano P, Cardinali DP, Esquifino AI. 24-Hour variation in gene expression of redox pathway enzymes in rat hypothalamus: effect of melatonin treatment. *Redox Rep* 14(3): 132-138, 2009
88. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 57(8-9): 1229-35, 2000
89. Jung Y, Lippard SJ. Direct cellular responses to platinum induced DNA damage. *Chem Rev* 107(5): 1387-407, 2007
90. Kamisli S, Ciftci O, Cetin A, Kaya K, Kamisli O, Celik H. Fish oil protects the peripheral and central nervous systems against cisplatin induced neurotoxicity. *Nutr Neurosci* 17 (3): 116-136, 2014
91. Kandula T, Farar MA, Cohn RC, Mizrahi D, Carey K, Johnston K, Kiernan MC, Krishnan AV, Park SB. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy in long-term survivors of childhood cancer clinical, neurophysiological, functional, and patient-reported outcomes. *JAMA Neurol* 75(8): 980-988, 2018
92. Karale S, Kamath JV. Effect of daidzein on cisplatin-induced hematotoxicity and hepatotoxicity in experimental rats. *Indian J Pharmacol* 49(1): 49–54, 2017
93. Karavelioglu E, Boyaci MG, Simsek N, Sonmez MA, Koc R, Kandemir M, Guven M, Eser O. Selenium protects cerebral cells by cisplatin induced neurotoxicity. *Acta Cir Bras.* 30(6): 394-400, 2015
94. Khadrawy YA, El-Gizawy MM, Sorour SM, Sawie HG, Hosny EN. Effect of curcumin nanoparticles on the cisplatin induced neurotoxicity in rat. *Drug Chem Toxicol* 42(2): 194–202, 2019
95. Kidera Y, Kawakami H, Sakiyama T, Okamoto K, Tanaka K, Takeda M, Kaneda H, Nishina S, Tsurutani J, Fujiwara K, Nomura M, Yamazoe Y, Chiba Y, Nakagawa K. Risk factors for cisplatin-induced nephrotoxicity and potential of magnesium supplementation for renal protection. *Plos One* 9(7): 1-10, 2014
96. Kim HA, Lee KH, Lee BH. Neuprotective effect of melatonin against kainic acid-induced oxidative injury in hippocampal slice culture of rats. *Int J Mol Sci* 15: 5940-5951, 2014

97. Kilic U, Kilic E, Tuzcu Z, Tuzcu M, Ozercan İH, Yilmaz O, Sahin F, Sahin K. Melatonin suppresses cisplatin-induced nephrotoxicity via activation of Nrf-2/HO-1 pathway. *Nutr Metab*: 10: 7-11, 2013
98. Ko JW, Shin NR, Jung TY, Shin IS, Moon C, Kim SH, Lee IC, Kim SH, Yun WK, Kim HC, Kim JC. Melatonin attenuates cisplatin-induced acute kidney injury in rats via induction of anti-aging protein, Klotho. *Food Chem Toxicol* 129: 201-210, 2019
99. Kottschade LA, Sloan JA, Mazurczak MA, Johnson DB, Murphy BP, Rowland KM, Smith DA, Berg AR, Stella PJ, Loprinzi CL. The use of vitamin E for the prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Results of a randomized phase III clinical trial. *Support Care Cancer* 19(11): 1769-77, 2011
100. Krarup-Hansen A, Helweg-Larsen S, Schmalbruch H, Rorth M, Kraup C. Neuronal involvement in cisplatin neuropathy: Prospective clinical and neurophysiological studies. *Brain* 130(4): 1076-1088, 2007
101. Lange M, Heuitte N, Rigal O, Noal S, Kurtz JE, Levy C, Allouache D, Rieux C, Lefel J, Edicte B, Clarisse B, Veyret C, Barthelemy P, Longato N, Castel H, Eustache F, Giffard B, Joly F. Decline in cognitive function in older adults with early-stage breast cancer after adjuvant treatment. *Oncologist* 21 (11): 1337–1348, 2016
102. Lee MY, Kuan YH, Chen HY, Chen TY, Chen ST, Huang CC, Yang IP, Hsu YS, Wu TS, Lee EJ. Intravenous administration of melatonin reduces the intracerebral cellular inflammatory response following transient focal cerebral ischemia in rats. *J Pineal Res* 42(3): 297-309, 2007
103. LeDoux MS. *Movement Disorders: Genetics and Models* 2.Ed Techniques for Motor Assessment in Rodents Elsevier 2014
104. Leo M, Schmitt LI, Jastrow H, Thomale J, Kleinschnitz C, Hagenacker T. Cisplatin alters the function and expression of N-type voltage gated calcium channels in the absence of morphological damage of sensory neurons. *Mol Pain* 13: 1-12, 2017
105. Li H, Wang Y, Feng D, Liu Y, Xu M, Gao A, Tian F, Zhang L, Cui Y, Wang Z, Chen G. Alterations in the time course of expression of the Nox family in the brain in a

- rat experimental cerebral ischemia and reperfusion model: Effects of melatonin. *J Pineal Res* 57(1): 110-9, 2014
106. Li Y, Zheng M, Sah SK, Mishra A, Singh Y. Neuroprotective influence of sitagliptin against cisplatin induced neurotoxicity, biochemical and behavioral alterations in Wistar rats. *Mol Cell Biochem* 455: 91-97, 2019
 107. Lissoni P, Chieffo M, Villa S, Cerizza L, Tancini G. Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: A randomized trial. *J Pineal Res* 35(1): 12-5, 2003
 108. Lissoni P, Tancini S, Barni S, Paolorossi F, Ardizzone A, Conti A, Maestroni G. Treatment of cancer chemotherapy-induced toxicity with the pineal hormone melatonin. *Support Care Cancer* 5(2): 126-9, 1997
 109. Lomeli N, Di K, Czerniawski J, Guzowski JF, Bota DA. Cisplatin-induced mitochondrial dysfunction is associated with impaired cognitive function in rats. *Free Radic Biol Med*. 102: 274–286, 2017
 110. Lopez A, Garcia JA, Escames G, Venegas C, Ortiz F, Lopez LC, Acuna-Castroviejo DJ. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential and superoxide anion production. *J Pineal Res* 46 (2): 188-198, 2009
 111. Louzada PR, Paula-Lima AC, Mendonca-Silva DL, Noel F, De Mello FG, Ferreira ST. Taurine prevents the neurotoxicity of beta-amyloid and glutamate receptor agonists: activation of GABA receptors and possible implications for Alzheimer's disease and other neurological disorders. *FASEB J* 18(3): 511-518, 2004
 112. Ma J, Huo X, Jarpe MB, Kavelaars A, Heijnen CJ. Pharmacological inhibition of HDAC6 reverses cognitive impairment and tau pathology as a result of cisplatin treatment. *Acta Neuropathol Commun* 6(1): 103-117, 2018
 113. Madhu P, Reddy KP, Reddy PS. Melatonin reduces oxidative stress and restores mitochondrial function in the liver of rats exposed to chemotherapeutics. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 323(5): 301-8, 2015

114. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione related enzymes. *J Nutr Biochem* 16: 577-586, 2005
115. Medrano-Campillo P, Sarmiento-Soto H, Alvarez-Sanchez N, Alvarez-Rios AI, Guerrero JM, Rodriguez-Prieto I, Castillo-Palma MJ, Lardone PJ, Carrillo-Vico A. Evaluation of the immunomodulatory effect of melatonin on the T-cell response in peripheral blood from systemic lupus erythematosus patients. *J Pineal Res* 58(2): 219-226, 2015
116. Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: Significant answers and significant questions. *Neuron* 70(4): 687-702, 2011
117. Monville C, Torres EM, Dunnett SB. Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. *J Neurosci Meth* 158(2): 219-23, 2007
118. Mosser VC, Aschner M, Richardson RJ, Philbert MA. Toxic Responses of the Nervous System. In C.D Klaassen (Ed.), Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons 8 th ed 733-766 New York McGraw Hill, 2013
119. Naseem M, Parvez S. Role of melatonin in traumatic brain injury and spinal cord injury. *Sci World J* Article ID:586270, 2014
120. Nishida N, Arizumi T, Takita M. Reactive oxygen species induced epigenetic instability through the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in human hepatocarcinogenesis. *Dig Dis* 31(5-6): 459-66, 2013
121. Noback CR, Strominger NL, Demarest RJ, Ruggiero DA. The Human Nervous System 6.Ed. *Basic Neurophysiology* 49-84, Humana press 2005
122. Nowis D, Legat M, Bill J, Kurzaj Z, Issat T, Stoklosa T, Mioduszezewska B, Kaczmarek L, Jakobisiak M, Golab J. Erythropoietin reduces cisplatin induced neurotoxicity without impairment of cytotoxic effects against tumor cells. *Int J Oncol* 31(6): 1547-52, 2007
123. Olanow CW. An Introduction to the free radical hypothesis in Parkinson's Disease. *Ann Neurol* 32 Suppl: S2-9, 1992

124. Ongnok B, Chattipacorn N, Chattipacorn SC. Doxorubicin and cisplatin induced cognitive impairment: The possible mechanisms and interventions. *Experimental Neurology* 324: 113118-113140, 2020
125. Owoeye O, Adedara I, Farombi E. Pre treatment with taurine prevented brain injury and exploratory behavior associated with administration of anticancer drug cisplatin in rats. *Biomed Pharmacother* 102: 375-384,2018
126. Oz M, Nurullahoglu Atalik KE, Yerlikaya FH, N Demir EA. Curcumin alleviates cisplatin induced learning and memory impairments. *Neurobiol Learn Mem* 123: 43-49, 2015
127. Pabla N, Murphy RF, Liu K, Dong Z. The copper transporter CTR1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 296(3): 505-11, 2009
128. Pace A, Giannarelli D, Galiè E, Savarese A, Carpano S, Della-Giulia M, Pozzi A, Silvani A, Gaviani P, Scaioli V, Jandolo B, Bove L, Cognetti F. Vitamin E neuroprotection for cisplatin neuropathy: a randomized, placebo-controlled trial. *Neurology* 74(9): 762-766, 2010
129. Pacher P, Bekmann JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and diseases. *Physiological Rev* 87: 315-424, 2007
130. Pai VB, Nahata MC. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: Incidence, treatment and prevention. *Drugs Saf* 22(4):263-302, 2000
131. Pandi- Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J* 273: 2813–2838, 2006
132. Patino P, Parada E, Farre-Alins V, Molz S, Cacabelos R, Marco-Contelles J, López MG, Tasca CI, Ramos E, Romero A, Egea J. Melatonin protects against oxygen and glucose deprivation by decreasing extracellular glutamate and Nox-derived ROS in rat hippocampal slices. *Neurotoxicol* 57: 61-68, 2016
133. Pearson JN, Patel M. The role of oxidative stress in organophosphate and nerve agent toxicity. *Ann N Y Acad Sci* 1378(1): 17-24, 2016

134. Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, Douillard JY, Shepherd FA, Stephens RJ, Dunant A, Torri V, Rosell R, Seymour L et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol* 26: 3552-3559, 2008
135. Pinto-Leite R, Arantes, Rodrigues R, Palmeira C, Colaco B, Lopes C, Colaco A, Costa C, da Silva VM, Oliviera P, Santos L. Evorolimus combined with cisplatin has a potential role in treatment of urethelial bladder cancer. *Biomed Pharmacother* 67: 116-121, 2013
136. Planting AS, Catimel G, Mulder PHD, Graeff AD, Höppener F, Verweij J, Oster W, Vermorken JB. Randomized study of a short course of weekly cisplatin with or without amifostine in advanced head and neck cancer. EORTC Head and Neck Cooperative Group. *Ann Oncol* 10(6): 693-700, 1999
137. Podratz JL, Knight AM, Ta LE, Staff NP, Gass JM, Genelin K, Schlattau A, Lathroum L, Windebank AJ. Cisplatin induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. *Neurobiol Dis* 41: 661-668, 2011
138. Powers SK, Jackson MJ. Exercise induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 88: 1243-1276, 2008
139. Priyanka S, Rao KJ, Sushma NJ. Therapeutic effect of melatonin against aluminum induced neurotoxicity in cerebellum of albino mice. *Toxicol environmental chemistry* 94(7): 1422-1432, 2012
140. Pryor WA. On the detection of lipid hydroperoxydes in biological samples. *Free Radic Biol Med* 7: 177-178, 1989
141. Qi L, Luo Q, Zhang Y, Jia F, Zhao Y, Wang F. Advances in toxicological research of the anticancer drug cisplatin. *Chem Res Toxicol* 32: 1469-1486, 2019
142. Rademaker-Lakhai JM, Crul M, Zuur L, Baas P, Beijnen JH, Simis YJW, Zandwijk NV, Schellens JHM. Relationship between cisplatin administration and the development of ototoxicity. *J Clin Oncol* 24: 918-924, 2006
143. Radogna F, Diederich M, Ghibelli L. Melatonin: A pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochem Pharmacol* 80: 1844–1852, 2010

144. Rasheed MZ, Andrabi SS, Salman M, Tabassum H, Shaquiquzzaman M, Parveen S, Parvez S. Melatonin improves behavioral and biochemical outcomes in a rotenone-induced rat model of Parkinson's disease. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 37(2): 139–150, 2018
145. Rehman MU, Rather IA. Myricetin abrogates cisplatin-induced oxidative stress, inflammatory response and goblet cell disintegration in colon of wistar rats. *Plants* 9(1): 28-46, 2019
146. Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin: Exceeding Exceptions. *Physiology* 29: 325-333, 2014
147. Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. Melatonin as an antioxidant under promises but over delivers. *J Pineal Res* 61: 253-278, 2016
148. Rodriguez-Menendez V, Gilardini A, Bossi M, Canta A, Oggioni N, Carozzi V, Tremolizzo L, Cavaletti G. Valproate protective effects on cisplatin induced peripheral neuropathy: an in vitro and in vivo study. *Anticancer Res* 28:335-42, 2008
149. Romero A, Ramos E, de Los Rio C, Egea J, Del Pino J, Reiter RJ. A review of metal-catalyzed molecular damage: protection by melatonin. *J Pineal Res* 56(4): 343-370, 2014
150. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of Cell Division In Escherichia Coli By Electrolysis Products From A Platinum Electrode. *Nature* 13(205): 698-9, 1965
151. Rudnitskaya EA, Muraleva NA, Maksimova KY, Kiseleva E, Kolosova NG, Stefanova NA. Melatonin attenuates memory impairment, amyloid- β accumulation and neurodegeneration in a rat model of sporadic Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* 47(1): 103-16, 2015
152. Rzeski W, Pruskil S, Macke A, Felderhoff-Mueser U, Reiher AK, Hoerster F, Jarosz B, Stefovská V, Bittigau P, Ikonomidou C. Anticancer agents are potent neurotoxins in vitro and in vivo. *Ann Neurol* 56: 351–360, 2004

153. Sacco S, Aquilini L, Ghexxi P, Pinza M, Guglielmotti A. Mechanisms of the inhibitory effects of melatonin on tumor necrosis factor production in vivo and in vitro. *Eur J Pharmacol* 343: 249-255, 1998
154. Saravanan KS, Sindhu KM, Mohanakumar KP. Melatonin protects against rotenone-induced oxidative stress in a hemiparkinsonian rat model. *J Pineal Res* 42(3): 247-53, 2007
155. Seretny M, Curie GL, Sena ES, Ramnarine S, Grant R, MacLeod MR, Colvin LA, Fallon M. Incidence, prevalence and predictors of chemotherapy induced peripheral neuropathy: A systemic review and meta analysis. *Pain* 155(12): 2461-2470, 2014
156. Shafer LL, McNutty JA, Young MRI. Assessment of melatonin's ability to regulate cytokine production by macrophage and microglia cell types. *J Neuroimmunol* 120(1-2): 84-93, 2001
157. Shagirtha K, Muthumani M, Prabu SM. Melatonin abrogates cadmium induced oxidative stress related neurotoxicity in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 15(9): 1039-1050, 2011
158. Shahid F, Farooqui Z, Khan F. Cisplatin-induced gastrointestinal toxicity: An update on possible mechanisms and on available gastroprotective strategies. *Eur J Pharmacol* 827: 49-57, 2018
159. Shen D, Dalton TP, Nebert DW, Shertzer HG. Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production. *J Biol Chem* 280: 25305-25312, 2005
160. Shukla M, Govitrapong P, Boontem P, Reiter RJ, Satayavivad J. Mechanisms of melatonin in alleviating Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol* 15(7): 1010-1031, 2017
161. Simo M, Root JC, Vaquero L, Ripolles P, Jove J, Ahles T, Navarro A, Caedenal F, Bruna J, Rodriguez-Fornells A. Cognitive and brain structural changes in a lung cancer population. *J Thorac Oncol* 10(1): 38-45, 2015
162. Slomonski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slomonski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol* 351(52): 116-124, 2012

163. Smith PE, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano M, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150(1): 76-85, 1985
164. Smyth JF, Bowman A, Perren T, Wilkinson P, Prescott RJ, Quinn KJ, Tedeschi M. Glutathione reduces the toxicity and improves quality of life of women diagnosed with ovarian cancer treated with cisplatin: Results of a double-blind, randomised trial. *Ann Oncol* 8(6): 569-73, 1997
165. Souza LC, Wilhelm EA, Bortolatto CF, Nogueira CW, Boeira SP, Jesse CR. The protective effect of melatonin against brain oxidative stress and hyperlocomotion in a rat model of mania induced by ouabain. *Behavioural Brain Research* 271: 316–324, 2014
166. Starobova H, Vetter I. Pathophysiology of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Front Mol Neurosci* 10: 174-188, 2017
167. Stathopoulos GP. Liposomal Cisplatin: a new cisplatin formulation. *Anticancer Drugs* 21(8): 732-6, 2010
168. Surendran D, Geetha CS, Mohanan PV. Amelioration of melatonin on oxidative stress and genotoxic effects induced by cisplatin in vitro. *Toxicol Mech Methods* 22(8): 631-637, 2012
169. Ta LE, Espeset L, Podratz J, Windebank AJ. Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum DNA binding. *Neurotoxicology* 27: 992-1002, 2006
170. Ta LE, Bieber AJ, Carlton SM, Loprinzi CL, Low PA, Windebank AJ. Transient receptor potential vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice. *Mol Pain* 5: 6-15, 2010
171. Tamura H, Takayama H, Nakamura Y, Reiter RJ, Sugino N. Fetal/placental regulation of maternal melatonin in rats. *J Pineal Res* 44(3): 335-340, 2008
172. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 42(1): 28-42, 2007

173. Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: Synthesis and Metabolism. *Molecules* 20(10): 18886-18906, 2015
174. Tocharus J, Khonthun C, Chongthammakun S, Govitrapong P. Melatonin attenuates methamphetamine induced overexpression of pro-inflammatory cytokines in microglial cell lines. *J Pineal Res* 48 (4): 347-352, 2010
175. Tomaszewski A, Büsselberg D. Cisplatin modulates voltage gated channel currents of dorsal root ganglion neurons of rats. *Neurotoxicology* 28(1): 49-58, 2007
176. Tordjman S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, Fougere C. Melatonin pharmacology, functions and therapeutic benefits. *Current Neuropharmacology* 15 (3): 434–443, 2017
177. Townsend DM, Hanigan MH. Inhibition of γ -glutamyl transpeptidase or cysteine *S*-conjugate β -lyase activity blocks the nephrotoxicity of cisplatin in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 300(1): 142–148, 2002
178. Tuncer S, Dalkilic N, Akif Dunbar M, Keles B. Comparative effects of α lipoic acid and melatonin on cisplatin-induced neurotoxicity. *Int J Neurosci* 120(10): 655-63, 2010
179. Tyagi E, Agrawal R, Nath C, Shukla R. Effect of melatonin on neuroinflammation and acetylcholinesterase activity induced by LPS in rat brain. *Eur J Pharmacol* 640(1-3): 206-210, 2010
180. Ulusu NN, Tandogan B. Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovine liver. *Mol Cell Biochem* 303(1-2): 45-51, 2007
181. Urien S, Lokiec F. Population pharmacokinetics of total and unbound plasma cisplatin in adult patients. *Br J Clin Pharmacol* 57(6): 756–763, 2004
182. Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin MD, Mazur M, Telser J. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *Int J Biochem Cell Biology* 39: 44-84, 2007

183. Videnovic A, Noble C, Reid KJ, Peng J, Turek FW, Marconi A, Rademaker AW, Simuni T, Zadikoff C, Zee PC. Circadian melatonin rhythm and excessive daytime sleepiness in Parkinson Disease. *JAMA Neurol* 71(4):463-9, 2014
184. Vukovic R, Kumborovic I, Jovic JJ, Jovicic N, Stankovic JSK, Mihalovic V, Djuric M, Velickovic S, Arnaut A, Selakovic D, Rosic G. N-Acetylcysteine protects against the angiogenic response to cisplatin in rats. *Biomol* 17(9): 892-907, 2019
185. Waseem M, Tabassum H, Parvez S. Neuroprotective effects of melatonin as evidenced behavioral alterations, mitochondrial dysfunction and neurotoxicity in rat brain. *Mitochondrion* 30: 168-176, 2016
186. Widmaier E, Raff H, Strang KT. *Vander's Human Physiology 14.Ed Nervous System The Mechanisms of Body Function*. Mc Graw Hill, 2015
187. Wu HJ, Wu C, Niu HJ, Wang K, Mo LJ, Shao AW, Dixon BJ, Zhang JM, Yang SX, Wang YR. Neuroprotective mechanisms of melatonin in hemorrhagic stroke. *Cell Mol Neurobiol* 37(7): 1173-1185, 2017
188. Wu HY, Feenstra MGP, Zhou JN, Liu RY, Torano JS, Van Kan HJM, Fischer DF, Ravid R, Swaab DF. Molecular changes underlying reduced pineal melatonin levels in Alzheimer disease: alterations in preclinical and clinical stages. *J Clin Endocrinol Metab* 88(12): 5898-906, 2003
189. Yamamoto BK, Bankson MG. Amphetamine neurotoxicity: Causes and consequences of oxidative stress. *Crit Rev Neurobiol* 17(2): 87-117, 2005
190. Yasuo S, Yoshimura T, Ebihara S, Korf HW. Melatonin transmits photoperiodic signals through the MT1 melatonin receptor. *J Neurosci* 29(9): 2885-2889, 2009
191. Zajackowska R, Kepska MK, Leppert W, Wrzosek A, Mika J, Wordliczek J. Mechanisms of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Int J Mol Sci* 20: 1451-1480, 2019
192. Zaki SM, Mohamed EA, Motawie AG, Fattah SA. N-acetylcysteine versus Progesterone on the Cisplatin Induced Peripheral Neurotoxicity. *Folia Morphol* 77(2): 234-245, 2018
193. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 8(1): 59-73, 2008

